



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PAULA TERRA BANDEIRA

**EXPRESSÃO RECOMBINANTE DE UMA CRUSTINA DO
CAMARÃO NATIVO *Farfantepenaeus paulensis* E
DETERMINAÇÃO DE SEU LOCAL DE SÍNTESE ATRAVÉS DE
IMUNOMARCAÇÃO.**

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia.

Orientadora Prof^ª. Dr^ª. Margherita Anna Antônia Maria Barracco

Florianópolis
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

B244e Bandeira, Paula Terra

Expressão recombinante de uma crustina do camarão nativo *Farfantepenaeus paulensis* e determinação de seu local de síntese através de imunomarcagem [dissertação] / Paula Terra Bandeira ; orientadora, Margherita Anna Antônia Maria Barracco. - Florianópolis, SC, 2010.

92 p.: il., tabs.;

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Inclui referências

1. Biotecnologia. 2. Peptídeos. 3. Agentes anti-infecciosos. 4. Hemolinfa. 5. Crustáceo. 6. Camarão rosa. I. Barracco, Margherita Anna Antonia Maria. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 577.23

**Expressão recombinante de uma crustina do camarão
nativo *Farfantepenaeus paulensis* e determinação de seu local de
síntese através de imunomarcação.**

Por

PAULA TERRA BANDEIRA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM BIOTECNOLOGIA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia.

Prof. Edmundo Carlos Grisard, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dra. Margherita Anna Antônia Maria Barracco – *Orientadora*

Dr. Daniel M. Lorenzini

Dr. Javier Vernal

Dra. Luciane M. Perazzolo



PAULA TERRA BANDEIRA

**EXPRESSÃO RECOMBINANTE DE UMA CRUSTINA DO
CAMARÃO NATIVO *Farfantepenaeus paulensis* E
DETERMINAÇÃO DE SEU LOCAL DE SÍNTESE ATRAVÉS DE
IMUNOMARCAÇÃO.**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Orientadora Prof^a. Dr^a. Margherita Anna Antonia Maria Barracco

Florianópolis
2010

**Dedico este trabalho aos meus indispensáveis.
Meus pais, irmãos e Daniel.**

AGRADECIMENTOS

“Nas nossas vidas diárias, devemos ver
que não é a felicidade que nos faz agradecidos,
mas a gratidão é que nos faz felizes”.
Albert Clarke

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à professora Margherita Barracco, que me recebeu no seu laboratório há quase 6 anos atrás e nunca deixou de me ensinar algo, desde então. Não apenas sobre ciência, mas sobre dedicação e gosto pelo que se faz, e empenho para oferecer o seu melhor. Mesmo nos momentos de atritos e (muitos) puxões de orelha, sei que ela busca o melhor que seus alunos podem oferecer, pois ela sabe que eles podem crescer e melhorar mais. Agradeço a essa dedicação plena de nos ensinar e sei que aprendi e amadureci muito nessa jornada e apesar de mudada, continuo a te admirar do mesmo modo como quando comecei no laboratório.

Em seguida, é essencial agradecer ao meu “co-orientador” extra oficial, mas sem o qual este trabalho não seria possível, o MSc. Rafael Diego da Rosa. Um verdadeiro discípulo de nossa orientadora, com uma dedicação sem igual ao que faz e aos outros, sempre tentando ajudar da melhor maneira que pode. Obrigada Rafa, você sabe o quanto você foi necessário e espero que também saiba o quanto sou agradecida. Mais ainda pela amizade, confiança e também, como não, pelos puxões de orelha. Não importa em que parte do mundo, você sempre terá uma amiga aqui.

Faz-se necessário também meus agradecimentos ao professor Hernán Terenzi e ao Dr. Javier Vernal, sem os quais este estudo não poderia ter sido feito. Agradeço pelo acolhimento no laboratório, pelas condições, pela ajuda e paciência. Obrigada por tudo. Aproveito para agradecer também a todos do Laboratório de Expressão Gênica que também me acolheram e ajudaram sempre que possível, em especial às alunas Priscila, Camila e Gabriela.

Agradeço também ao professor Aguinaldo Pinto e sua enorme ajuda e paciência em relação a produção de anticorpos e ao espaço em seu laboratório para que isso fosse possível. Agradeço também às alunas Carol e Mariana, sempre disponíveis para ensinar, tirar dúvidas e também dar boas risadas.

Ao Laboratório de Protozoologia, em especial à Dra. Patrícia Stocco, por estar sempre disponível e nos ajudar com o sequenciamento e diversas outras dúvidas e necessidades.

Ao MSc. Felipe Vieira, do Laboratório de Camarões Marinhos, que me deu todo suporte para os testes antimicrobianos e também nos cedeu as bactérias para o teste final.

À Joice, da secretaria da pós-graduação em Biotecnologia, pela ajuda e paciência em tantas ocasiões durante o mestrado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Indispensável agradecer a todos os meus colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura, pela convivência, suporte, ajuda, risos e aprendizados compartilhados. Tantos nomes que já passaram por lá e cada um deixou sua contribuição. Agradeço em separado à professora Luciane Perazzolo, por se mostrar disponível para me ajudar e por seus conselhos valiosos. Em especial vou agradecer áquelas que fizeram toda a diferença neste tempo e na minha vida, que realmente compartilharam as derrotas, tragédias, dores, e as alegrias, felicidades e vitórias. Mirian Kayser, Liege Cantelli, Priscila Gonçalves e Cristhiane Guertler, obrigada por **tudo**, desde mil coletas de camarões, hemolinfas, conselhos, dicas, ajudas, até simplesmente por me fazerem mais feliz. Vocês são permanentes.

Agradeço a todos os meus amigos que tanto torceram por mim e me apoiaram nesse caminho e que agora irão celebrar comigo mais uma etapa da minha vida. Sem vocês não teria brilho. Ao amigos distantes (mas presentes) e aos amigos que sempre estavam aqui do meu lado. Gostaria de citar a Carolzinha, cujo casamento não pude comparecer devido ao mestrado, mas que sabe que eu estava presente de coração. Déia, Fê, Fezinha, Angie, Cynthia, obrigada por fazerem parte da minha vida.

Enfim, faltam palavras para demonstrar o quanto sou grata a minha família, por todo crescimento, Amor incondicional, sabedoria, alegrias, tristezas e felicidades que me proporcionaram. Minha mãe, meu pai, meus irmãos, de todos os modos, por tudo que vocês são, eu amo vocês. Gratidão eterna. Também quero agradecer aos meus tios e tias, meus primos e meu vô que sempre torcem por mim e me incentivam, amo vocês!

Quero por fim agradecer ao Daniel, que tanto teve que ser paciente e cuidadoso e consolador nesse período (e sempre), seja na hora em que tudo desse errado, que as bactérias não morressem, ou os camundongos o fizessem, ele sempre soube me acalantar e cuidar de mim. Também não tenho palavras para agradecer todo o suporte indispensável

que você me deu e espero que você realmente saiba o quanto aprecio tudo que você fez por mim e o quanto que eu te Amo.

Como não poderia deixar de ser, agradeço á Deus, e esse sim, por absolutamente tudo. Cada passo, cada aprendizado, enfim pela “poesia (inexplicável) da vida”. É tudo em seu nome.

A maior recompensa para o
trabalho de uma pessoa não
é o que ela recebe por ele,
mas o que ela se torna
através dele.
John Ruskin

RESUMO

Crustinas são peptídeos antimicrobianos que integram o sistema imune inato dos crustáceos e atuam na defesa destes animais contra infecções, juntamente com outras moléculas imunofetoras presentes na hemolinfa. O objetivo do presente trabalho foi clonar e expressar, em sistema heterólogo, uma crustina do camarão nativo *Farfantepenaeus paulensis* para avaliar sua atividade antimicrobiana e produzir anticorpos policlonais para imunolocalizar este peptídeo nas diferentes populações de hemócitos deste peneídeo, assim como em diferentes grupos de crustáceos. Por abordagem molecular, foi possível clonar uma sequência gênica correspondente a uma crustina, com características do subgrupo da crustina I, que denominamos de *crusFpau2*. A *crusFpau2* apresentou 94% de homologia com a única isoforma já descrita em *F. paulensis* (*crusFpau*). Esta nova isoforma caracteriza-se por apresentar uma região N-terminal rica em resíduos de glicina, além da região C-terminal com doze resíduos conservados de cisteína, onde se encontra um domínio WAP (*wey acidic protein*). A *crusFpau2* foi expressa em *E. coli* BL21(DE3)pLysS com peso molecular de 17,3 kDa e foi utilizada para avaliar sua atividade antimicrobiana e produzir anticorpos policlonais em camundongo. A crustina recombinante mostrou-se ativa contra a bactéria *Micrococcus luteus*. Através de imunomarcação foi possível determinar que as crustinas são produzidas de forma constitutiva apenas nos hemócitos granulares (HG) de *F. paulensis*, sendo armazenadas em seus grânulos. Aparentemente, estas proteínas não são processadas no interior dos grânulos e não são secretadas para a hemolinfa. Os anticorpos produzidos contra a *crusFpau2* recombinante foram ainda capazes de reconhecer especificamente crustinas nos hemócitos granulares de outros grupos de crustáceos (*Litopenaeus vannamei*, *Macrobrachium potiana* e *Callinectes sapidus*), mas não no mexilhão marinho *Perna perna*. Estes resultados sugerem que as crustinas são peptídeos de ocorrência geral em crustáceos. Este é o primeiro trabalho que produziu um peptídeo antimicrobiano a partir de uma espécie nativa brasileira de crustáceos marinhos, além de produzir os primeiros anticorpos contra crustinas até o momento. Estes anticorpos constituem uma ferramenta importante para imunomarcas especificamente populações de hemócitos granulares de crustáceos, além de auxiliar a uma melhor compreensão do sistema imune deste grupo zoológico, que inclui muitas espécies de interesse econômico. Por fim, uma avaliação futura mais detalhada do seu real espectro

antimicrobiano poderá revelar o seu potencial promissor como agente terapêutico para aquicultura e saúde humana.

Palavras-chave: peptídeos antimicrobianos; crustinas; expressão heteróloga; hemolinfa; hemócitos; imunomarcação; crustáceos; camarão; *Farfantepenaeus paulensis*.

ABSTRACT

Crustins are antimicrobial peptides that belong to the innate immune system of crustaceans and are involved in the defense against infections in cooperation with other immunoeffector molecules from the hemolymph. The aim of this study was to clone one crustin from the hemocytes of the indigenous shrimp *Farfantepenaeus paulensis* and express it in a heterologous system, to determine the antimicrobial activity and produce polyclonal antibodies to immunolocalize crustins in the different hemocyte populations of *F. paulensis* as well as in other crustaceans. We were able to clone through molecular approach a gene sequence corresponding to a crustin, belonging to the subgroup of crustin I, that was called *crusFpau2*. *crusFpau2* showed 94% of homology with the unique crustin isoform previously detected in *F. paulensis* (*crusFpau*). Biochemically, this new isoform has a N-terminal region rich in glycine residues, in addition to a C-terminal region with twelve conserved cysteine residues that contains the WAP domain (whey acidic protein). The *crusFpau2* was expressed in *E. coli* BL21(DE3)pLysS with a molecular weight of 17,3 kDa and used to evaluate its antimicrobial activity and produce polyclonal antibodies in mice. The recombinant crustin was capable to inhibit the growth of *Micrococcus luteus*. By immunostaining it was observed that crustins were constitutively produced only in the granular hemocytes (HG) of *F. paulensis* and were stored in their granules. Apparently, these proteins were not processed within the granules and were not secreted into the hemolymph. The antibodies produced against the recombinant *crusFpau2* were also able to specifically recognize crustins in the granular hemocytes of other crustacean groups (*Litopenaeus vannamei*, *Macrobrachium potiana* e *Callinectes sapidus*), but not in the marine mussel *Perna perna*. These results suggest that crustins are widespread among different crustacean groups. This is the first study to produce an antimicrobial peptide from an indigenous Brazilian marine crustacean, and to produce antibodies against a crustin so far. These antibodies might be an important tool to specifically recognize granular hemocyte populations in crustaceans, and thus be of help to better understand the immune system of this zoological group, which includes many species of economic interest. Finally, a more detailed assessment of the antimicrobial spectrum of the expressed crustin might reveal if it could serve as a potential promising therapeutic agent for aquaculture and/or human health.

Key words: antimicrobial peptides; crustins; recombinant expression; hemolymph; hemocytes; crustaceans; immunostaining; shrimp; *Farfantepenaeus paulensis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:

Figura 1: Mecanismos de ação de peptídeos antibacterianos em uma membrana bacteriana (representada como uma bicamada lipídica amarela). Os PAMs estão representados com as regiões hidrofílicas em vermelho e as hidrofóbicas em azul. A-D: Modelos de mecanismos que explicam a permeabilização da membrana. A: Modelo de ‘*agregação*’- após interagirem com a membrana, os peptídeos se reorientam e levam a membrana a formar agregados de peptídeos e lipídeos. B: Modelo de ‘*poro toroidal*’- os peptídeos se inserem perpendicularmente ao plano da bicamada, com as regiões hidrofílicas se associando às cabeças polares dos fosfolipídeos enquanto a região hidrofóbica se associa ao núcleo lipídico. A parte interna da membrana se curva de forma que a bicamada se alinhe ao poro. C: Modelo de ‘*barril*’ (C) - os peptídeos inserem sua região hidrofílica em orientação perpendicular ao plano da bicamada formando um agregado em forma de barril, com suas regiões hidrofílicas voltadas para o lúmen do poro e as hidrofóbicas interagindo com a bicamada lipídica. D: Modelo de ‘*carpete*’- os peptídeos se agregam paralelamente a bicamada lipídica, revestindo as áreas locais como se fosse um carpete. Quando atingem uma determinada concentração causam uma ação do tipo detergente, o que leva a formação de micelas e poros nas membranas (adaptado de JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006).

4

Figura 2:

Assinatura do domínio WAP e do domínio WAP específico das crustinas. X indica qualquer resíduo de aminoácido e Xn um número qualquer de resíduos. Os resíduos de aminoácido conservados na assinatura WAP das crustinas estão sublinhados (segundo

	RANGANATHAN et al., 1999; SMITH et al., 2008).	12
Figura 3:	Representação esquemática (fora de escala) da organização dos domínios dos três sub-tipos de crustinas de crustáceos (adaptado de Smith et al. 2008). Cys = cisteína, Gly = glicina e Pro-Arg = prolina e arginina.	14
Figura 4:	Representação esquemática (fora de escala) da organização dos domínios dos três tipos de crustinas de crustáceos e da SWD, segundo Zhao e Wang (2008). Cys representa resíduos de cisteína, Cys = cisteína, Gly = glicina e Pro-Arg = prolina e arginina.	15
Figura 5:	Assinatura dos diferentes tipos de crustina presentes em peneídeos, segundo Zhao e Wang (2008).	15
Figura 6:	Exemplar adulto da espécie de camarão <i>Farfantepenaeus paulensis</i> .	23
Figura 7:	Representação esquemática do vetor pET-14b com os sítios de corte para as enzimas de restrição, inclusive as utilizadas neste trabalho, <i>NdeI</i> e <i>BamHI</i> , destacadas com retângulos (Novagen [®]).	27
Figura 8:	Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio mostrando a amplificação da sequência codificante correspondente a uma crustina de <i>F. paulensis</i> . Linha 1: controle negativo, linha 2: sequência da crustina (~ 480 pb), linha 3: marcador de peso molecular (escala de 100 pb).	33
Figura 9:	Sequências nucleotídica e aminoacídica deduzidas da isoforma madura da crustina <i>crusFpau2</i> de <i>F. paulensis</i> (GU971374) ancorada à cauda <i>His-tag</i> proveniente do plasmídeo pET-14b (sublinhada).	34
Figura 10:	Comparação das sequências aminoacídicas deduzidas das duas diferentes isoformas de crustinas de <i>F. paulensis</i> , <i>crusFpau</i> (EF182747) sem o peptídeo sinal e <i>crusFpau2</i> (GU971374). Resíduos idênticos entre ambas as sequências estão indicados, na linha inferior, por asterisco	

(*). Os hífen indicam *gaps* e os símbolos (.) e (:)
resíduos pouco e muito similares, respectivamente. Os resíduos de cisteína conservados da assinatura das crustinas estão com o asterisco correspondente em vermelho. 35

Figura 11: Assinatura do subgrupo de *crustina I* de peneídeos, segundo Zhao e Wang (2008). X indica qualquer resíduo de aminoácido e Xn um número qualquer de resíduos. 35

Figura 12: Alinhamento múltiplo das seqüências aminoacídicas deduzidas de crustinas I de peneídeos e de uma lagosta. A *crusFpau2* está destacada em negrito. Os resíduos de cisteína conservados estão ressaltados em cinza. Resíduos idênticos entre as seqüências estão indicados, na linha inferior, por asterisco (*). Os hífen indicam *gaps* e os símbolos (.) e (:)
resíduos pouco e muito similares, respectivamente. O peptídeo sinal está sublinhado. As diferentes isoformas estão representadas à esquerda: *crusFpau2* (GU971374); *Farfantepenaeus brasiliensis* (EF601055); *crusFpau* (EF182747); *Farfantepenaeus subtilis* (EF450744); *Litopenaeus schmitti* (EF182748); *Litopenaeus vannamei* (AY488492); *Marsupenaeus japonicus* (AB121741); *Litopenaeus setiferus* (AF430077); *Panulirus japonicus* (FJ797417); *Penaeus monodon* (FJ380049). 37

Figura 13: Filograma consenso, resultante do alinhamento de seqüências aminoacídicas deduzidas de crustinas (carcininas, crustina I e II) e SWDs de diferentes espécies de crustáceos, incluindo a seqüência encontrada neste trabalho, *crusFpau2*, marcada com uma elipse dupla, e a *crusFpau* marcada com uma elipse simples. Os valores presentes em cada nó representam a porcentagem de vezes que um determinado nó ocorreu em 1.000 árvores geradas pelo programa MEGA. As diferentes isoformas representadas à direita: *Pacifastacus leniusculus*

(crustin 2, EF523613); *Procambarus clarkii*, (crustin 2, GQ301202); *Homarus gammarus* (AJ786653); *Homarus americanus* (EF193003); *Eriocheir sinensis* (FJ974138), *Hyas araneus* (crustin Ha2, EU921642), *Scylla paramamosain* (ABY20728), *Carcinus maenas* (AJ427538), *crusFpau2* (GU971374), *crusFpau* (EF182747), *Farfantepenaeus brasiliensis* (EF601055); *Farfantepenaeus subtilis* (EF450744); *Litopenaeus schmitt* (EF182748); *Litopenaeus setiferus* (crustin2, AF430078); *Litopenaeus vannamei* (crustin I, AY488492); *Litopenaeus vannamei* (crustin P, AY488495); *Marsupenaeus japonicus* (crustin 2, AB121741); *Penaeus monodon* (Pm5, FJ380049); *Litopenaeus setiferus* (crustin 1, AF430077); *Panulirus japonicus* (FJ797417); *Fenneropenaeus chinensis* (DQ097703); *Fenneropenaeus indicus* (GQ469987); *Penaeus monodon* (GU299808); *Penaeus monodon* (crustin-like 2, FJ539178); *Penaeus monodon* (crustin-like 3, EF654659); *Litopenaeus vannamei* (SWD 1, AY464465); *Penaeus monodon* (SWD 1, EU623979); *Fenneropenaeus chinensis* (SWD, EF216349); *Penaeus monodon* (SWD 2, EU623980); *Litopenaeus vannamei* (SWD 2, AY465833).

40

Figura 14:

Análise por SDS-PAGE (17%) da expressão da *crusFpau2* recombinante em *E. coli* BL21(DE3)pLysS após indução ou não com IPTG. As bandas referentes à *crusFpau2* estão indicadas pela seta. M: marcador de peso molecular PN: *pellet* da fração insolúvel antes da indução; PI: *pellet* da fração insolúvel após expressão de 4 h a 37°C; SN: sobrenadante da fração solúvel antes da indução SI: sobrenadante da fração solúvel após expressão de 4 h a 37°C.

42

Figura 15:

Análise por Western blot, utilizando anticorpos anti-polihistidina, mostrando a presença da *crusFpau2* recombinante no sobrenadante e no

precipitado da *E. coli* BL21(DE3)plysS contendo o plasmídeo pET-crus*Fpau2* na altura correspondente a aproximadamente 17 kDa. P-: *pellet* com o plasmídeo pET-14b sem o inserto (controle negativo); P+: *pellet* com o plasmídeo pET-crus*Fpau2*; S-: sobrenadante da fração solúvel com o plasmídeo pET-14b sem o inserto (controle negativo); S+: sobrenadante da fração solúvel com o plasmídeo pET-crus*Fpau2*.

43

Figura 16:

Perfil parcial da purificação de crus*Fpau2* recombinante pelo sistema ÄKTA HPLC. Análise por SDS-PAGE 17% das frações 27 a 32, referentes aos picos obtidos durante a purificação. M: marcador de peso molecular (10, 15, 20, 25, 30, 40 e 50 kDa, sendo as bandas de 20 e 50 kDa as mais proeminentes).

44

Figura 17:

Atividade antimicrobiana da rcrus*Fpau2* contra *M. luteus* pelo ensaio de sobreposição de gel. A: gel de acrilamida corado com azul de coomassie mostrando a lisozima (1), a rcrus*Fpau2* purificada (2) e a rcrus*Fpau2* liofilizada (3). B: gel de acrilamida contendo as mesmas amostras que o gel A, mas corado apenas após transferência das proteínas para o meio de cultura contendo as bactérias. Pode-se notar as bandas protéicas mais fracas (1) ou inexistentes (2,3) devido à transferência das proteínas para o meio de cultura. C: sobreposição do gel sobre a placa de petri mostrando a localização das bandas protéicas. D: placa de petri com *M. luteus* crescendo em meio sólido, apresentando dois halos de inibição correspondentes a posição das bandas protéicas. O círculo mostra a lisozima (controle positivo) e o retângulo a rcrus*Fpau2* purificada. A rcrus*Fpau2* liofilizada não foi capaz de gerar um halo de inibição do crescimento bacteriano.

46

Figura 18:

Imunolocalização de crustinas nos hemócitos de *F. paulensis* A: soro pré-imune (controle negativo), C e E: anti-rcrus*Fpau2* (1:400). B, D e F correspondem as células observadas em A,

- C e E respectivamente, vistas ao microscópio de contraste de fase. Setas indicam hemócitos granulares (HG). Barra: 10 μ m. 49
- Figura 19:** Imunolocalização de crustinas nos hemócitos de diferentes invertebrados aquáticos. A: hemócitos de *L. vannamei*; C: hemócitos de *M. potiuna*; E: hemócitos de *C. sapidus*; G: hemócitos de *P. perna* (1:10). B, D, F, H: correspondem as células observadas em A, C, E e G respectivamente observadas no microscópio de contraste de fase. Setas indicam hemócitos granulares (HG). Barra: 10 μ m.
- Figura 20:** Análise por *western blot* da presença da crustina *crusFpau2* e da sua massa molecular estimada em diferentes frações da hemolinfa de *F. paulensis* utilizando o anticorpo anti-*crusFpau2*. A: Gel de acrilamida 17% corado com azul de coomassie após transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose. B: resultado do Western blot correspondente a migração de proteínas do gel A. P: plasma; Ht: Hemolinfa total; HLS: lisado de hemócitos, Crus: *crusFpau2*; C-: controle negativo (HLS de *P. perna*); M: marcador de peso molecular. 51
- 54

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Parâmetros bioquímicos das duas isoformas das crustinas de *F. paulensis*. 36
- Tabela 2:** Similaridade entre as sequências aminoacídicas de crustinas do subgrupo de crustina I de peneídeos. 39

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

4DSC	do inglês <i>four-disulphide core</i>
ALF	Fator Anti-lipopolissacarídeo (do inglês <i>anti-lipopolysaccharide factor</i>)
cDNA	DNA complementar ao RNA mensageiro
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Deoxinucleotídeos trifosfatados
EST	Etiquetas de seqüência expressa/transcrita (do inglês <i>expressed sequence tags</i>)
HG	Hemócito granular
HH	Hemócito hialino
HLS	do inglês: <i>hemocyte lysate supernatant</i>
HT	hemolinfa total
IMNV	do inglês <i>Infectious myonecrosis virus</i>
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kDa	Kilodalton
LB	Meio Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
MAS	Solução de Alsever modificada (do inglês <i>modified Alsever solution</i>)
mRNA	RNA mensageiro
OD	Densidade ótica (do inglês <i>optical density</i>)
PAGE	do inglês Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PAM	Peptídeo antimicrobiano
pb	Pares de base de DNA
PBS	Tampão salina fosfato (do inglês <i>phosphate-buffered saline</i>)
PBS-T	PBS adicionado de Tween20

PCR	Reação em cadeia da Polimerase (do inglês <i>Polymerase chain reaction</i>)
pH	Potencial de hidrogênio
pI	Ponto isoelétrico
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	RNA de interferência
RT-PCR	Reação de transcrição reversa (do inglês <i>reverse transcription Polymerase chain reaction</i>)
SWD	do inglês <i>Single WAP Domain</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
WAP	do inglês <i>Whey Acidic Protein</i>
WDP	<i>WAP Domain Protein</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WSSV	Síndrome do Vírus da Mancha Branca (do inglês <i>White Spot Syndrome Virus</i>)
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- -D-galactosídeo

Aminoácidos

A – Alanina	C – Cisteína	D – Ácido aspártico
E – Ácido glutâmico	F – Fenilalanina	G – Glicina
H – Histidina	I – Isoleucina	K – Lisina
L – Leucina	M – Metionina	N – Asparagina
P – Prolina	Q – Glutamina	R – Arginina
S – Serina	T – Treonina	V – Valina
W – Triptofano	Y – Tirosina	

SUMÁRIO

Resumo	x
Abstract	xii
Lista de ilustrações	xiv
Lista de tabelas	xx
Lista de símbolos, abreviaturas e siglas	xxi
1. Introdução	01
1.1 Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)	01
1.2 Resistência bacteriana e necessidade de uma nova geração de antibióticos	05
1.3 Crustinas	11
1.4 O cultivo de crustáceos	18
2. Objetivos	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3. Materiais e Métodos	23
3.1 Animais	23
3.2 Amplificação e clonagem de uma crustina de <i>F. paulensis</i> e construção do vetor de expressão	23
3.3 Expressão e purificação da crustina de <i>F. paulensis</i>	27
3.4 Ensaio antimicrobiano por sobreposição de gel	30
3.5 Produção de anticorpos policlonais anti-crustina	30
3.6 Imunolocalização das crustinas na hemolinfa de <i>F. paulensis</i> e de outras espécies de invertebrados aquáticos.....	31

4. Resultados e Discussão	33
4.1 Amplificação e clonagem de uma sequência de cDNA codificando para crustina	33
4.2 Clonagem, sequenciamento e análise da sequência correspondente à crustina	33
4.3 Expressão e purificação da crusa <i>Fpau2</i>	41
4.4 Atividade antimicrobiana	44
4.5 Imunolocalização de crustinas	47
6. Conclusões	56
Referências	57

1. Introdução

Microorganismos permeiam nossa biosfera e a grande maioria deles desempenha funções essenciais para a manutenção da vida no planeta. No entanto uma minoria deles está diretamente envolvida em processos patológicos. O homem e outros organismos multicelulares convivem com microorganismos desde sua origem na Terra e a colonização de pele, trato respiratório, sistema gênito-urinário e trato digestivo dos seres humanos pelos microorganismos começa imediatamente após o nascimento. Deste modo, várias espécies de microorganismos estabeleceram associações com hospedeiros específicos que vão desde relações mutuamente benéficas até as situações de parasitismo nas quais vivem às expensas de seus hospedeiros, muitas vezes espoliando-os gravemente. Logo, não é surpreendente que todos os organismos multicelulares tenham desenvolvido algum tipo de sistema de defesa para lidar com essas ameaças.

O primeiro sistema de defesa começou a se desenvolver há 2 bilhões de anos e constitui ainda hoje a primeira linha de defesa da maioria dos organismos multicelulares sendo denominado de *sistema imune inato* (RADEK; GALLO, 2007). Este sistema possui ação imediata, diversificada e de baixa especificidade e funciona como um escudo protetor de amplo alcance. O sistema imune inato provou ser um mecanismo de defesa digno de sua missão, já que apenas recentemente, em termos evolutivos, os vertebrados ladearam-no, mas não o substituíram, com o sofisticado sistema imune adaptativo, dotado de especificidade antigênica e memória imunológica (GIULIANI et al., 2008; RADEK; GALLO, 2007). Confirmando este fato, sabe-se que o sistema imune inato é o único sistema de defesa utilizado pelo grupo dos invertebrados, que não possuem o sistema imune adaptativo, e se considerarmos o sucesso evolutivo extraordinário destes animais em nosso planeta, fica evidente que os mecanismos da imunidade inata extremamente eficazes.

1.1. Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)

Dentre os mecanismos do sistema imune inato destacam-se os peptídeos e/ou proteínas antimicrobianos (PAMs). Estas moléculas são conhecidas por apresentarem um amplo espectro de ação, com atividades contra bactérias, fungos e em alguns casos inclusive contra vírus e protozoários. Estas moléculas possuem ainda a capacidade de matar bactérias em concentrações muito baixas (da ordem de micromolar), serem rapidamente sintetizados e facilmente armazenados em grânulos, estando disponíveis logo no início de uma infecção

(JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006). Os PAMs possuem ainda uma considerável especificidade em relação a células procariotas e geralmente uma baixa toxicidade para células eucarióticas. Todas estas características fazem com que sejam moléculas efetoras essenciais na proteção contra organismos patogênicos, tornando-as componentes-chave do sistema imune inato (BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004).

Os PAMs foram isolados a partir de um grande número de espécies, como bactérias, invertebrados (em especial insetos), plantas e uma variedade de vertebrados, incluindo o homem, o que sugere que mesmo na presença do eficiente sistema imune adaptativo, esses peptídeos possuem ainda um papel essencial na defesa do hospedeiro (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006).

1.1.1 Origem, distribuição, caracterização bioquímica e modo de ação

O primeiro PAM descrito foi inicialmente identificado na hemolinfa da mariposa *Hyalophora cecropia* por Steiner e colaboradores (1981) e denominado de cecropina. A partir destas primeiras observações em insetos, inúmeros outros PAMs foram detectados e caracterizados nos mais diferentes grupos de seres vivos, confirmando sua ubiquidade. Atualmente, mais de 1.000 PAMs foram identificados nos diferentes reinos de seres vivos e referidos na literatura (BOMAN, 2003; BULLET; STÖCKLIN; MENIN, 2004; HANCOCK; SAHL, 2006; RADEK; GALLO, 2007; ZAIYOU, 2007) ou incluídos em bases de dados (por exemplo: <http://www.bbc.m.univ.trieste.it/tossi/pag1.html>, <http://public1.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol/home.shtml>, <http://research.i2r.a-star.edu.sg/Templar/DB/ANTIMIC/>).

Os PAMs caracterizam-se por serem moléculas pequenas, com massa molecular abaixo de 25-30 kDa. Em sua maioria possuem caráter catiônico, com carga positiva em pH fisiológico devido à predominância dos resíduos de aminoácidos lisina, arginina e/ou histidina (resíduos de carga positiva) sobre resíduos de ácido aspártico e/ou ácido glutâmico (resíduos carregados negativamente). Além desta característica catiônica em comum, os PAMs compartilham ainda de uma estrutura anfipática, apresentando também uma região hidrofóbica (BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004; BARRACCO, PERAZZOLO; ROSA, 2008). Assim, o caráter catiônico, associado a uma tendência de adotar uma estrutura anfipática, facilita a interação e inserção dos PAMs nas superfícies aniônicas dos microorganismos, principalmente em suas membranas (BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004). Os PAMs conhecidos até o momento foram divididos em quatro grandes classes, com base em seu tamanho, estrutura e presença ou ausência de pontes

dissulfeto, a saber: (1) peptídeos -hélice lineares anfipáticos; (2) peptídeos cíclicos ou cíclicos com extremidades abertas, com uma ou mais pontes de cisteína; (3) peptídeos ricos em um tipo particular de aminoácido, e, (4) peptídeos gerados a partir da hidrólise de uma proteína precursora (BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004).

De forma resumida, o modo de ação dos PAMs envolve uma interação inicial com os fosfolipídeos aniônicos (região catiônica) da monocamada externa da membrana plasmática bacteriana, seguido por uma penetração parcial (região hidrofóbica) na bicamada lipídica. Os diferentes modos de ação deste mecanismo estão demonstradas na Figura 1. Essa inserção desestabiliza a bicamada fosfolipídica podendo levar à perda de sua integridade estrutural, o que aumenta sua permeabilidade não seletiva a íons e pequenas moléculas colapsando o potencial transmembrana e levando à morte do microorganismo (ASHRAFUZZAMAN; ANDERSEN; McELHANEY, 2008). Observações mais recentes demonstraram ainda que alguns peptídeos podem também interagir com alvos intracelulares como o DNA e RNA e diferentes vias metabólicas, o que leva igualmente à morte dos microorganismos (BROGDEN, 2005; HALE; HANCOCK, 2007).

A membrana plasmática como alvo de ação torna os PAMs uma alternativa de combate a infecções muito interessante, visto que para gerar resistência a estas moléculas seria necessária uma reorganização desta estrutura, o que representaria um custo muito alto para os microorganismos (ZASLOFF, 2002).

1.1.2 Produção e localização celular

O local de síntese dos PAMs é variável dentre os invertebrados. Em muitas espécies de insetos, a transcrição dos genes dos PAMs ocorre nos corpos gordurosos, que corresponderiam, a grosso modo, ao fígado dos vertebrados. Durante uma infecção, principalmente de origem bacteriana, ocorre uma rápida indução da produção de PAMs nos corpos gordurosos seguida de sua secreção para a hemolinfa ou sangue, onde atuam de forma sistêmica (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). Em contrapartida, em outras espécies de invertebrados, como aracnídeos, crustáceos e moluscos, muitos PAMs são sintetizados de forma constitutiva pelas células imunocompetentes ou hemócitos, presentes na hemolinfa e são armazenados em seus grânulos (DESTOUMIEUX et al., 2000; MITTA et al., 2000; LORENZINI et al., 2003 a,b).

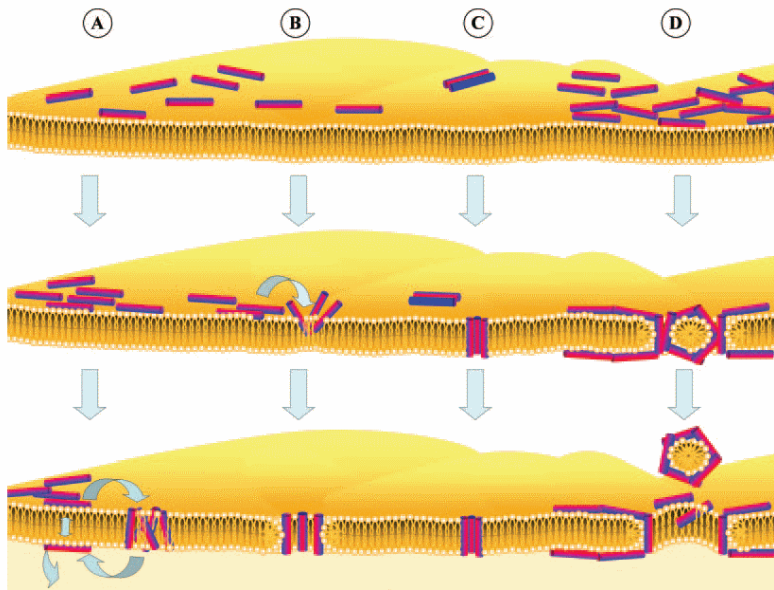


Figura 1: Mecanismos de ação de peptídeos antibacterianos em uma membrana bacteriana (representada como uma bicamada lipídica amarela). Os PAMs estão representados com as regiões hidrofílicas em vermelho e as hidrofóbicas em azul. A-D: Modelos de mecanismos que explicam a permeabilização da membrana. A: Modelo de *'agregação'* - após interagirem com a membrana, os peptídeos se reorientam e levam a membrana a formar agregados de peptídeos e lipídeos. B: Modelo de *'poro toroidal'* - os peptídeos se inserem perpendicularmente ao plano da bicamada, com as regiões hidrofílicas se associando às cabeças polares dos fosfolipídeos enquanto a região hidrofóbica se associa ao núcleo lipídico. A parte interna da membrana se curva de forma que a bicamada se alinhe ao poro. C: Modelo de *'barril'* (C) - os peptídeos inserem sua região hidrofílica em orientação perpendicular ao plano da bicamada formando um agregado em forma de barril, com suas regiões hidrofílicas voltadas para o lúmen do poro e as hidrofóbicas interagindo com a bicamada lipídica. D: Modelo de *'carpete'* - os peptídeos se agregam paralelamente a bicamada lipídica, revestindo as áreas locais como se fosse um tapete. Quando atingem uma determinada concentração causam uma ação do tipo detergente, o que leva a formação de micelas e poros nas membranas (adaptado de JENSSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006).

Em crustáceos decápodes são usualmente descritos três tipos de hemócitos: hemócitos hialinos, hemócitos semi-granulares ou com grânulos pequenos e hemócitos granulares ou com grânulos grandes.

Entretanto, ainda hoje, não há uma classificação uniforme e definitiva para esses tipos celulares, uma vez que estas células alteram rápida e significativamente suas características morfológicas *in vitro*, por serem lábeis e altamente reativas, dificultando assim sua classificação (vide revisões de BAUCHAU, 1981; HOSE et al., 1990; BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008). Os hemócitos semi-granulares e granulares estão principalmente envolvidos na fagocitose de microorganismos, na formação de nódulos e cápsulas e na produção de moléculas tóxicas e microbidas, como os PAMs, capazes de lisar e/ou degradar patógenos invasores (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

Em crustáceos, a primeira família de PAM a ser identificada e caracterizada molecularmente foi denominada de *peneidina* por ter sido purificada da hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* (DESTOUMIEUX et al., 1997). Diferentemente dos insetos, em que a síntese de PAMs é induzida, foi demonstrado em crustáceos que a família de PAM *peneidina* é sintetizada de forma constitutiva e armazenada nos grânulos dos hemócitos granulares, até o momento de sua liberação (seja no meio intracelular ou extracelular) após o animal ter entrado em contato com os microorganismos (BACHÈRE et al., 2004). Evidências do acúmulo de PAMs nos grânulos dos hemócitos foram confirmadas através de imunomarcagem e hibridização *in situ* em diferentes espécies de peneídeos (MUÑOZ et al., 2002; KANG et al., 2004; BARRACCO et al., 2005) e outros invertebrados (MIYATA et al., 1989; MURAKAMI et al., 1991; MENZEL et al., 2002; YEDERY; REDDY, 2009).

1.2 Resistência bacteriana e necessidade de uma nova geração de antibióticos

Os genomas procarióticos caracterizam-se por uma elevada plasticidade e um enorme potencial evolutivo, incluindo a transmissão horizontal de genes, como os da resistência a antibióticos, o que contribui para um alto poder de adaptação (MATSUZAKI et al., 1997). Estudados nas últimas três décadas, os PAMs têm despertado cada vez mais interesse devido às suas características únicas e ao seu modo de ação alternativo em relação aos antibióticos tradicionais. Este interesse tem se elevado mais ainda nos últimos anos, principalmente devido ao crescente problema de resistência bacteriana aos antibióticos tradicionais e a necessidade pungente de alternativas a esse problema emergente.

1.2.1 Emergência e estabelecimento de cepas bacterianas resistentes

Após anos de uso demasiado e indiscriminado de antibióticos, o surgimento e propagação de muitas cepas de microorganismos patogênicos resistentes tem se espalhado cada vez mais (PELÁEZ, 2006; DeLEO; CHAMBERS, 2009; FISCHBACH; WALSH, 2009). Dentre estas, três classes de patógenos resistentes a antibióticos estão emergindo como as maiores ameaças a saúde pública.

A primeira classe é representada pelas cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, chamadas MRSA (do inglês *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*, 1993) mais de 95% das cepas de *S. aureus* no mundo estão atualmente resistentes a penicilina e mais de 60% resistentes ao seu derivado, a meticilina (HIRAMATSU et al., 1997). MRSA se tornou um problema significativo e crescente nos hospitais desde o início dos anos 60 e agora está presente na maioria das infecções nosocomiais. A resistência dessas bactérias está se espalhando não apenas nas infecções adquiridas em hospitais, mas também nas comunidades, tornando-se um problema global e epidêmico (RACHAKONDA; CARTEE, 2004).

A segunda classe de patógenos resistentes a antibióticos são aquelas resistentes a multi-drogas (MDR) ou pan-drogas (PDR). Estas cepas estão se alastrando e contribuindo mais substancialmente ao problema, e apesar de serem menos prevalentes que MRSA, representam uma grave ameaça com infecções realmente não tratáveis. Determinadas cepas (*Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*) são resistentes a algumas (MRD) ou a todas (PDR) as classes de antibióticos comumente utilizadas para bactérias Gram negativas. Perspectivas de encontrar novos antibióticos para patógenos Gram negativos são especialmente difíceis, pois sua membrana externa bloqueia a entrada de alguns antibióticos e bombas de efluxo expõem muitos dos restantes (OVERBYE; BARRETT, 2005). Dentre os novos antibióticos introduzidos na última década ou que estão em desenvolvimento, nenhum teve uma atividade aumentada contra patógenos Gram negativos resistentes a multi-drogas (NORRBY; NORD; FINCH, 2005).

A terceira classe de patógenos resistentes emergentes compreende as cepas de *Mycobacterium tuberculosis* MDR e XDR (MDR-TB e XDR-TB, do inglês respectivamente *Multi-Drug Resistant tuberculosis* e *Extremely Drug-Resistant tuberculosis*), que tem sido

uma crescente ameaça especialmente nos países desenvolvidos (de SOUZA, 2009).

1.2.2 O colapso dos antibióticos tradicionais

Desde o início dos anos 60 apenas 4 novas classes de antibióticos foram introduzidas no mercado e nenhuma obteve o mesmo impacto anteriormente conseguido (FISCHBACH; WALSH, 2009).

Os membros de cada classe de antibióticos compartilham uma estrutura central essencial, o chamado *scaffold*. A maioria dos *scaffolds* químicos, dos quais os antibióticos atuais são derivados, foram introduzidos entre a metade da década de 30 até o início dos anos 60 (FISCHBACH; WALSH, 2009). Nos últimos 30 anos, os únicos agentes realmente novos que agem em alvos não-convencionais que foram lançados foram as *oxazolidinonas* (atuam na subunidade 50S do ribossomo bacteriano), o lipopeptídeo *daptomicina* (liga-se à membrana celular bacteriana, levando ao efluxo de potássio e à subsequente despolarização da membrana) e os PAMs, que ainda estão em testes clínicos. Os outros agentes são meramente análogos das classes anteriores de antibióticos, derivados das mesmas já desgastadas estruturas (*scaffolds*), que como suas antecessoras, provavelmente irão provocar o desenvolvimento de resistência nos patógenos (OVERBYE; BARRETT, 2005; PELÁEZ, 2006; FISCHBACH; WALSH, 2009).

1.2.3 Biodiversidade marinha como fonte de novos produtos

A partir do sucesso de Bergmann e Burke (1955) no desenvolvimento de duas drogas baseadas em moléculas de esponjas marinhas e do Instituto de Pesquisa Roche de Farmacologia Marinha que identificaram vários compostos de interesse farmacológico de origem marinha em meados de 70 (McCONNELL; LONGLEY; KOEHN, 1994), vários pesquisadores passaram a explorar a diversidade marinha e seu potencial para descoberta de novos compostos bioativos.

Os invertebrados marinhos compõem mais de 30% de todas as espécies animais, e vivem em um ambiente em que os microorganismos invasores podem chegar a 10^6 bactérias/ml e 10^8 vírus/ml (TINCU; TAYLOR, 2004). Esta situação evidencia que estes animais devem possuir um sistema imune extremamente robusto e efetivo, capaz de impedir/limitar infecções neste ambiente particularmente rico em microorganismos. No entanto, a busca de compostos bioativos naturais de uso farmacêutico, em invertebrados marinhos, como antibióticos, continua ainda relativamente pouco explorada.

Apesar do esforço de companhias farmacêuticas no design de químicos sintéticos, produtos marinhos naturais ainda oferecem estruturas químicas incomuns que poderiam servir de base para a síntese

química e modelamento molecular de novas drogas bioativas (FLEMING et al., 2006). A pesquisa de produtos naturais em organismos marinhos tem sido o foco de diversas revisões (KERR; KERR, 1999; MAYER; LEHMANN, 2000; PROKSCH; EDRADA; EBEL, 2002; HAEFNER, 2003; JENSEN; MINCER; FENICAL, 2003; TINCU; TAYLOR, 2004; FLEMING et al., 2006; SMITH; DESBOIS; DYRYNDA, 2010).

1.2.4 PAMs como novos agentes anti-infeciosos

Devido ao fato dos PAMs ainda se mostrarem efetivos contra infecções bacterianas mesmo depois de pelo menos cem milhões de anos, é possível inferir que o desenvolvimento de resistência em um período curto de tempo é algo improvável de ocorrer. Tal fato decorre provavelmente do modo de ação único dos PAMs, que consiste em afetar as membranas dos microorganismos que são estruturas essenciais para a sobrevivência desses e onde mutações a fim de escapar dos efeitos danosos dos PAMs são praticamente inviáveis (ZASLOFF, 2002; PERRON; ZASLOFF; BELL, 2005). Somando-se a isso, a grande diversidade dos PAMs e seus diferentes modos de ação podem ter impedido o desenvolvimento de mecanismos de resistência nas populações naturais de bactérias (ZASLOFF, 2002; PERRON; ZASLOFF; BELL, 2005).

Outra grande vantagem desse grupo de moléculas refere-se não só à sua capacidade de destruir rapidamente células-alvo, como também de exibir seletividade para padrões comuns a diversos grupos de microorganismos. Em adição, apesar da função primária e original dos PAMs ser o efeito antimicrobiano, esses peptídeos podem apresentar ainda uma função imunomodulatória, regulando as funções imunológicas e até inflamatórias, no caso dos vertebrados (BROWN; HANCOCK, 2006; RADEK; GALLO, 2007).

Deste modo, os peptídeos antimicrobianos, purificados das diversas espécies de animais, parecem realmente apresentar características desejáveis a uma nova classe de antibióticos: amplo espectro de atividade, incluindo contra bactérias resistentes a antibióticos convencionais; ação rápida, evitando a seleção de mutantes resistentes; sinergia com outros antibióticos; neutralização de endotoxinas e, portanto, bloqueio da resposta septicêmica (DAFFRE et al., 2001). Em conclusão, é possível inferir que os PAMs representam hoje uma fonte potencial de agentes antimicrobianos com mecanismos de ação muito interessantes e efetivos. Estes surgiram e foram selecionados durante o curso da evolução dos seres vivos e seus domínios moleculares conservados podem ser utilizados como modelos

para o design de novos agentes terapêuticos de aplicação nas áreas biotecnológicas e médicas (PROKSCH; EDRADA; EBEL, 2002; REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004; BROWN; HANCOCK, 2006; HANCOCK; SAHL, 2006; HALE; HANCOCK, 2007; RADEK; GALLO, 2007; GIULIANI et al., 2008).

1.2.5 PAMs de crustáceos

O primeiro PAM a ser isolado bioquimicamente em crustáceos foi um peptídeo de 6,5 kDa, purificado da hemolinfa do caranguejo *Carcinus maenas* e demonstrou ter atividade contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (SCHNAPP; KEMP; SMITH, 1996). Nesse mesmo trabalho, os autores isolaram ainda um peptídeo maior, de 11,5 kDa, cuja atividade era restrita a bactérias Gram positivas marinhas. Este último foi caracterizado posteriormente como sendo uma molécula hidrofóbica, rica em resíduos de cisteína (RELF et al., 1999). Outras famílias de peptídeos antimicrobianos, incluindo vários subtipos e isoformas, foram em seguida identificadas em outros crustáceos, bioquimicamente ou por abordagem molecular, como as peneidinas no camarão *Litopenaeus vannamei* (DESTOUMIEUX et al., 1997), a calinectina no caranguejo azul *Callinectes sapidus* (KHOO; ROBINETTE; NOGA, 1999), os fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs) nos camarões *L. vannamei*, *Litopenaeus setiferus* e *Penaeus monodon* (GROSS et al., 2001; SUPUNGUL et al., 2002), as astacidinas no lagostim *Pacifastacus leniusculus* (LEE; LEE; SÖDERHÄLL, 2003; JIRAVANICHPAISAL et al., 2007), a armadilidina no isópodo *Armadillidium vulgare* (HERBINIÈRE et al., 2005) e muito recentemente as arasinas e a hiastatina no caranguejo aranha *Hyas araneus* (STENSVÅG et al., 2008; SPERTAD et al., 2009) e a homarina no lagostim *Homarus americanus* (BATTISON; SUMMERFIELD; PATRZYKAT, 2008).

A presença de diferentes famílias de PAMs na mesma espécie de crustáceos, aliada à ocorrência de inúmeras isoformas dentro de uma mesma família de PAMs, provavelmente com atividades antimicrobianas distintas, sugerem uma atuação sinérgica destas diferentes moléculas imunofetoras, que podem assim eliminar um amplo espectro de agentes patogênicos simultaneamente. A modulação da expressão das diferentes famílias de PAMs de crustáceos diante de uma infecção assinala a grande importância dessas moléculas no combate a agentes patogênicos (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

Nos camarões peneídeos, a primeira família de PAMs foi isolada e caracterizada em *L. vannamei* e como mencionado

anteriormente foi denominada peneidina (DESTOUMIEUX et al., 1997, DESTOUMIEUX et al., 2000). As peneidinas, que parecem estar restritas apenas a camarões peneídeos, caracterizam-se molecularmente por conter um domínio rico em resíduos de prolina na região N-terminal e outro rico em cisteína na região C-terminal, formando 3 pontes dissulfeto intramoleculares. As peneidinas apresentam uma atividade potente contra bactérias Gram positivas e fungos filamentosos (DESTOUMIEUX et al., 1999, CUTHBERTSON et al., 2008). Posteriormente, peneidinas foram também detectadas na hemolinfa de várias outras espécies de peneídeos (GROSS et al., 2001; ROJTINNAKORN et al., 2002; SUPUNGUL et al., 2002; CUTHBERTSON et al., 2004; KANG et al., 2004; MUÑOZ et al., 2004; GUEGUEN et al., 2006; KANG et al., 2007) e inclusive nos camarões nativos brasileiros, *Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus paulensis*, *Farfantepenaeus subtilis* e *Farfantepenaeus brasiliensis* (BARRACCO et al., 2005; ROSA, 2007).

Mais recentemente, foi também identificada e caracterizada molecularmente outra família de PAMs presente nos peneídeos, denominada de fator anti-lipopolissacarídeo (ALF). Essa família, detectada nos peneídeos inicialmente em *L. setiferus* (GROSS et al., 2001), apresenta dois resíduos de cisteína na sua estrutura, formando uma estrutura terciária na forma de um grampo. Esta alça, formada pela ponte dissulfeto concentra uma região altamente anfipática com um domínio de ligação à lipopolissacarídeo (LPS). Além de neutralizar os efeitos prejudiciais induzidos pelos LPS, o ALF apresenta ainda uma potente atividade microbicida contra um amplo espectro de bactérias Gram positivas e negativas, incluindo víbrios marinhos patogênicos para camarões, e também contra fungos filamentosos (SOMBOONWIWAT et al., 2005). Sequências codificadoras para ALF foram também encontradas nos hemócitos de outros peneídeos (vide revisão de BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008), inclusive nas espécies de camarões nativos brasileiros *L. schmitti* e *F. paulensis* (ROSA; STOCO; BARRACCO, 2008).

A terceira grande família de PAMs descrita em peneídeos é denominada *crustina* e será tratada em maior ênfase abaixo, por ser o tema do presente trabalho. Além destas três famílias majoritárias e melhor caracterizadas de PAMs, existem ainda outros peptídeos antimicrobianos encontrados nos peneídeos. Em revisão recente, Zhao e Wang (2008) descrevem oito tipo de PAMs em peneídeos, incluindo ainda as histonas (PATAT et al., 2004), a hemocianina (DESTOUMIEUX-GARZON et al., 2001; ZHANG et al., 2004), as

lisozimas (BURGE et al., 2007; BU et al., 2008; XING et al., 2009), a lectina do tipo C (SUN et al., 2008) e as peritrofinas (LOONGYAI et al., 2007).

1.3 Crustinas

1.3.1 Origem e distribuição

O PAM de 11,5 kDa, inicialmente isolado da hemolinfa (hemócitos granulares) do caranguejo *C. maenas* mencionado previamente, foi depois também detectado nos peneídeos *L. vannamei* e *L. setiferus* através da técnica EST (Expressed Sequence Tag) (GROSS et al., 2001). Posteriormente, Bartlett e colaboradores (2002) caracterizaram diferentes isoformas completas dessas moléculas nessas duas espécies de peneídeos e propuseram a denominação de *crustina* para essa família de PAMs em camarões.

As crustinas de peneídeos são moléculas ricas em resíduos de cisteínas, de forma semelhante ao peptídeo de 11,5 kDa. Recentemente, foram identificadas novas sequências gênicas em *C. maenas*, codificando para várias isoformas do peptídeo de 11,5 kDa (BROCKTON; HAMMOND; SMITH, 2007) e os autores as denominaram de *carcininas*. No entanto, no ano seguinte, Smith e colaboradores (2008) propuseram unir estas duas famílias de PAMs num grupo único sob a denominação de *crustinas* e classificando-as em três subgrupos, crustinas Tipo I, II e III. Neste mesmo ano, porém, Zhao e Wang (2008) sugeriram dividir as crustinas em 4 subgrupos, designando-as crustina I, crustina II, carcininas/carcinina-like e SWD (do inglês, *Single WAP Domain*).

Atualmente, mais de 50 membros da família das crustinas foram identificados, revelando que esta família de PAMs está presente em diferentes grupos de crustáceos como em camarões peneídeos (Dendrobranchiata) (GROSS et al., 2001; BARTLETT et al., 2002; RATTANACHAI et al., 2004; SUPUNGUL et al., 2004; VARGAS-ALBORES et al., 2004; ROSA; BANDEIRA; BARRACCO, 2007; ZHANG et al., 2007; AMPARYUP et al., 2008; VATANAVICHARN et al., 2009; ANTONY; BRIGHT SINGH; PHILIP, 2010; SUN et al., 2010) e em caranguejos, lagostas e lagostins (Pleociemata) (STOSS et al., 2004; HAUTON; BROCKTON; SMITH, 2006; BROCKTON; HAMMOND; SMITH, 2007; CHRISTIE et al., 2007; JIRAVANICHPAISAL et al., 2007; BATTISON; SUMMERFIELD; PATRZYKAT, 2008; IMJONGJIRAK et al., 2009; PISUTTHARACHAI et al., 2009; SPERSTAD et al., 2009; MU et al., 2010; SPERSTAD; SMITH; STENSVAG, 2010; YUE et al., 2010).

1.3.2 Caracterização bioquímica

A família das crustinas caracteriza-se por apresentar polipeptídeos antibacterianos catiônicos, ricos em resíduos de cisteína, com peso molecular variando de 7-14 kDa, ponto isoeletrico (*pI*) na faixa de 7-9 e contendo um domínio WAP (do inglês, *Whey Acidic Protein*) altamente conservado na extremidade C-terminal (SMITH et al., 2008).

Até o momento, todas as crustinas descritas possuem um peptídeo sinal contendo 16-24 resíduos de aminoácidos, o qual provavelmente direciona o transporte da proteína para o retículo endoplasmático granular e posteriormente aos grânulos dos hemócitos para em seguida serem exocitadas para a hemolinfa (SMITH et al., 2008). Após o peptídeo sinal, segue-se o peptídeo maduro contendo geralmente um arranjo conservado de 8 ou 12 resíduos de cisteína, entre os quais está localizado o domínio WAP.

O domínio WAP encontra-se próximo à região C-terminal e é formado por um arranjo conservado de 8 resíduos de cisteínas que formam 4 pontes dissulfeto, gerando uma estrutura compacta descrita como *four-disulphide core* (4DSC) (BARTLETT et al., 2002). Este domínio WAP não é exclusivo das crustinas e encontra-se também presente em uma variedade de outras proteínas de vertebrados e invertebrados, em especial nas proteínas secretadas no soro do leite de mamíferos, de onde surgiu inicialmente a denominação WAP (RANGANATHAN et al., 1999).

Uma assinatura para este domínio foi determinada a partir da análise de mais de 80 sequências, gerando um esqueleto básico com os 8 resíduos de cisteínas, separados por um número variável de outros resíduos de aminoácidos (RANGANATHAN et al., 1999) (Figura 2).

Domínio WAP: C₁-(Xn)-C₂-(Xn)-C₃-(XXXXXX)-C₄-(XXXXXX)-C₅-C₆-(XXX,X5)-C₇-(X3,X4)-C₈

Domínio WAP: C₁-(Xn)-C₂-(Xn)-C₃-(XXDXX)-C₄-(XXXDK)-C₅-C₆-[XD(X)]-C₇-(X3,X4)-C₈
de crustinas

Figura 2: Assinatura do domínio WAP e do domínio WAP específico das crustinas. X indica qualquer resíduo de aminoácido e Xn um número qualquer de resíduos. Os resíduos de aminoácido conservados na assinatura WAP das crustinas estão sublinhados (segundo RANGANATHAN et al., 1999; SMITH et al., 2008).

1.3.3 Classificação das crustinas

Segundo Smith e colaboradores (2008), as crustinas de camarões possuem a assinatura descrita para o domínio WAP, porém de forma ainda mais conservada devido a ocorrência de outros resíduos de aminoácidos que não apenas os 8 resíduos de cisteína do esqueleto básico da assinatura (Figura 2). Estes outros resíduos de aminoácidos provavelmente são essenciais para a funcionalidade da molécula e ocorrem em quase todas as isoformas de crustinas identificadas até hoje. Apesar destas regiões altamente conservadas, a organização protéica desta família de PAMs contém certa variabilidade nas outras regiões, o que levou Smith e colaboradores (2008) à classificá-las inicialmente em 3 subgrupos denominados de tipo I, II e III (Figura 3).

As crustinas do tipo I possuem uma região de tamanho variável entre o peptídeo sinal e o domínio WAP, rica em resíduos de cisteína (até 6 resíduos) que não fazem parte do domínio WAP (Figura 3). Este tipo de crustina é encontrado principalmente em caranguejos e lagostas. Estas seqüências eram denominadas *carcininas* (BROCKTON; HAMMOND; SMITH, 2007) por outros grupos de pesquisa, sendo modificada nesta revisão de Smith e colaboradores (2008). No entanto, recentemente foi descrita uma crustina que se enquadra neste subgrupo no camarão *Fenneropenaeus chinensis*, porém nos ovários (e não nos hemócitos) e sem possuir atividade antimicrobiana (SUN et al., 2010).

As crustinas do tipo II possuem a mesma região rica em cisteínas descrita acima, porém contêm ainda uma região rica em resíduos de glicina em sua porção N-terminal. Esta região pode conter de 39-80 resíduos deste aminoácido, organizados em arranjos repetitivos (5-8 vezes) de 'VGGGLG' e se localiza logo após o peptídeo sinal (Figura 3). Esta região rica em glicina pode conferir uma conformação mais flexível ao peptídeo, devido ao pequeno tamanho destes aminoácidos, ou ainda permitir curvaturas mais firmes na estrutura madura da molécula. No entanto ainda não há nenhum trabalho que tenha mostrado sua verdadeira função (SMITH et al., 2008). Este tipo de crustina é característico de camarões peneídeos.

A crustina do Tipo III não possui nenhuma das regiões características dos dois tipos anteriores entre o peptídeo sinal e o domínio WAP, não somando os 12 resíduos de cisteínas comuns aos outros dois tipos (Figura 3). Até o momento existe um número muito reduzido de representantes descritos deste Tipo III, todos provenientes de camarões peneídeos. Na literatura estas moléculas não haviam sido inicialmente identificadas como crustinas, mas como SWD – *single WAP domain*, ou *chelonianin-like proteins* ou ainda

antileukoproteinase-like proteins, mas por se enquadrarem na assinatura das crustinas proposta por Smith e colaboradores (2008), estas moléculas foram classificadas como crustina tipo III, por estes autores.

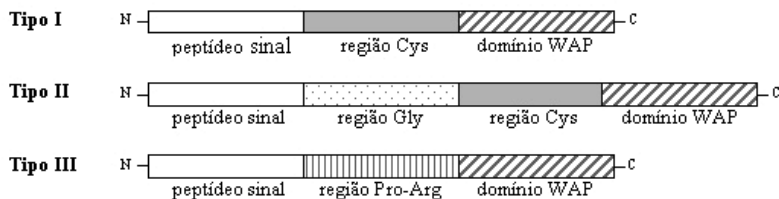


Figura 3: Representação esquemática (fora de escala) da organização dos domínios dos três sub-tipos de crustinas de crustáceos (adaptado de Smith et al. 2008). Cys = cisteína, Gly = glicina e Pro-Arg = prolina e arginina.

Diferentemente de Smith e colaboradores (2008), Zhao e Wang (2008) propõem que a assinatura que realmente caracteriza as crustinas não deveria se restringir apenas ao domínio WAP, mas deveria englobar todos os 12 resíduos conservados de cisteína encontrados nestas moléculas. Segundo estes autores, algumas das moléculas classificadas como crustinas por Smith e colaboradores (2008) não possuem os 12 resíduos conservados de cisteína (as crustinas do tipo III), mas apenas o domínio WAP (com 8 dos 12 resíduos de cisteína conservados), e por isso não seriam crustinas verdadeiras. Defendem, portanto, a manutenção da denominação original, SWD (*Single WAP Domain*), para estes peptídeos e a assimilação das carcininas (que possuem os 12 resíduos de cisteína) no grupo das crustinas.

Segundo Zhao e Wang (2008), diversos estudos demonstraram a presença de crustinas e SWDs em diferentes espécies de peneídeos e em outros crustáceos, incluindo sequências ESTs depositadas no *GenBank*, mas não de carcininas. Os autores fizeram um alinhamento dessas sequências aminoacídicas e uma análise filogenética e mostraram que as proteínas de crustáceos contendo o domínio WAP poderiam ser divididas em 4 grupos diferentes, que eles denominaram de crustina I, crustina II, carcinina (e carcininas-like) e SWD (Figura 4).

O primeiro subgrupo corresponde a crustina I e se caracteriza por possuir um peptídeo sinal relativamente conservado, uma região N-terminal rica em resíduos de glicina e uma região C-terminal rica em resíduos de cisteína, somando os 12 resíduos conservados (Figura 5).

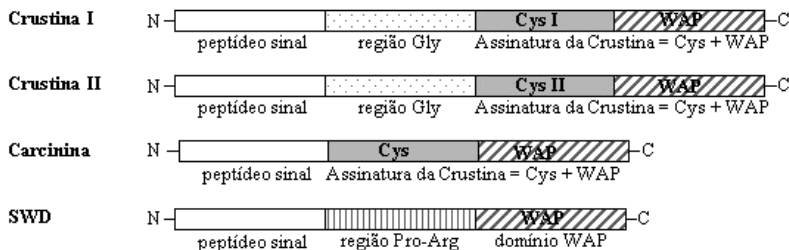


Figura 4: Representação esquemática (fora de escala) da organização dos domínios dos três tipos de crustinas de crustáceos e da SWD, segundo Zhao e Wang (2008). Cys representa resíduos de cisteína, Cys = cisteína, Gly = glicina e Pro-Arg = prolina e arginina.

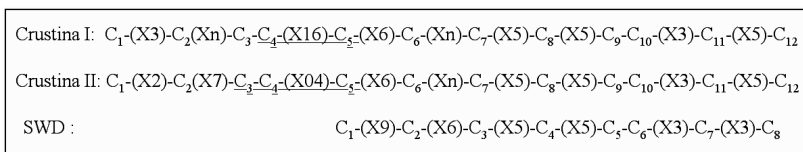


Figura 5: Assinatura dos diferentes tipos de crustina presentes em peptídeos, segundo Zhao e Wang (2008).

O segundo subgrupo de crustinas (II) (anteriormente denominadas como crustin-like) possui as mesmas características gerais do subgrupo I, mas difere deste em relação a sequência do peptídeo sinal e por apresentar variações na quantidade de aminoácidos presentes entre os 5 primeiros resíduos de cisteína e especialmente entre os resíduos C4 e C5 (sublinhados) (Figura 5). As carcininas e carcinina-like possuem a assinatura de crustina proposta por Zhao e Wang (2008) com os 12 resíduos conservados de cisteína, porém não possuem a região N-terminal rica em glicina. Já as SWDs são bem distintas das crustinas do tipo I, II e das carcininas, pois não possuem a assinatura completa da crustina com os 12 resíduos de cisteína (Figura 5). Este grupo possui ainda um peptídeo sinal altamente conservado, seguido de uma região rica em resíduos de prolina e arginina que precede o domínio WAP.

Assim, os autores dividiram os grupos de todas as WDPs (do inglês, *Wap Domain Proteins*) de crustáceos em duas subfamílias, as *crustinas* (crustina I, II e carcininas: que possuem a assinatura completa das crustinas com 12 resíduos de cisteínas) e as *SWDs* (que possuem apenas o domínio WAP – 8 resíduos de cisteínas). Interessantemente, Zhao e Wang (2008) reportam ainda que estas duas subfamílias

possuem diferentes funções *in vitro*, como será descrito abaixo. No presente estudo, seguiremos a classificação proposta por Zhao e Wang (2008) que abrange todas as proteínas que contém o domínio WAP.

1.3.3 Atividade biológica das crustinas

As proteínas que contém o domínio WAP são ubíquas entre os Metazoa e possuem funções biológicas altamente diversas, como a regulação da diferenciação e crescimento celular, ação sobre a remodelagem da matriz extracelular, atividade antibacteriana e antiviral (incluindo o vírus HIV), atividade anticarcinogênica e principalmente a função de inibição de proteases (HAGIWARA et al., 2003; ALVAREZ et al., 2008).

A presença deste domínio WAP na região C-terminal das crustinas e SWDs pode sugerir que essas moléculas desempenhem uma atividade similar à realizada por inibidores de proteases. Estudos recentes com SWDs recombinantes demonstraram que estas apresentavam uma forte inibição competitiva com a subtilisina A (protease de *Bacillus licheniformis*) sugerindo que estas moléculas poderiam contribuir para a regulação de proteases durante uma infecção, além de possuírem atividade antimicrobiana (AMPARYUP; DONPUDSA; TASSANAKAJON, 2008; JIA et al., 2008). Outros autores defendem que o domínio WAP conservado, quando envolvido na inibição de proteases, deve possuir um resíduo de *metionina* adjacente ao segundo resíduo de *cisteína*, enquanto os peptídeos antimicrobianos como as crustinas, possuem resíduos de aminoácidos catiônicos ou hidrofóbicos no lugar da metionina, o que auxiliaria na interação com os microorganismos (RANGANATHAN et al., 1999). Porém, talvez as crustinas possam exercer ambas as atividades, caracterizando-se como estruturas quiméricas, podendo assumir multifuncionalidades na mesma molécula, o que representaria um importante papel *in vivo* (ZHAO; WANG, 2008; SMITH; DESBOIS; DYRYNDA, 2010).

A carcinina purificada do caranguejo *C. maenas* (RELF et al., 1999) demonstrou apenas atividade contra bactérias Gram positivas, assim como a carcinina recombinante do caranguejo *Scylla paramamosain* (IMJONGJIRAK et al., 2009), no entanto no caranguejo *Hyas araneus* (SPERSTAD et al., 2009), a carcinina purificada apresentou reação contra bactérias Gram positivas, negativas e fungos. Já as crustinas e SWDs produzidas até o momento em sistema heterólogo mostraram atividade microbicida significativa contra um amplo e variável espectro de bactérias. A crustina I (SUN et al., 2010) e crustina II (ZHANG et al., 2007) de *F. chinensis* apresentaram atividade

apenas contra bactérias Gram positivas, do mesmo modo que duas crustinas I (Pm1 e Pm5) de *P. monodon* (SUPUNGUL et al., 2007; VATANAVICHARN et al., 2009). Porém uma crustina II de *P. monodon* (AMPARYUP et al., 2008) mostrou atividade tanto contra bactérias Gram positivas quanto negativas, apesar de mais fraca nessas últimas. Do mesmo modo, uma isoforma de SWD de *P. monodon* (AMPARYUP; DONPUDSA; TASSANAKAJON, 2008), que foi também descrita como tendo atividade anti serino-protease, mostrou forte atividade bactericida não só contra bactérias Gram positivas, mas também contra bactérias Gram negativas (*Escherichia coli* 363 e *Vibrio harveyi*), assim como uma SWD de *F. chinensis* (JIA et al., 2008), que além de atividade contra várias bactérias Gram positivas e algumas Gram negativas, também mostrou atividade contra diversos fungos, mostrando que a atividade das crustinas pode variar de acordo com o subgrupo.

As funções das crustinas (subgrupo I) foram analisadas *in vivo* muito recentemente em *L. vannamei* através de silenciamento gênico, utilizando-se a via do RNA de interferência (RNAi) (SHOCKEY et al., 2009). Os autores mostraram que a depleção de crustinas neste peneídeo resultava em uma mortalidade aumentada, durante infecções com a bactéria Gram negativa *Vibrio penaeicida*, sugerindo o envolvimento das crustinas no sistema imune inato e no controle de infecções deste peneídeo. Foi ainda mostrado, que em *L. vannamei* injetados com LPS (OKUMURA, 2007) ou com bactérias do gênero *Vibrio* (de LORGERIL et al., 2008) havia uma diminuição significativa da expressão de crustinas (tipo I) nas primeiras 3 e 6 h e um aumento significativo após 72 h. Estes resultados sugerem, interessantemente, uma indução tardia destas moléculas durante infecções em camarões. Por outro lado, no caranguejo *C. maenas* a expressão da carcinina foi também estudada após desafio com a bactéria Gram positiva *Planococcus citreus*, porém não houve modulação de sua expressão (BROCKTON; SMITH, 2008). Já no lagostim *P. leniusculus* foi encontrada apenas uma isoforma de carcinina em animais não desafiados e interessantemente após desafio com bactérias Gram negativas (*E. coli* D21, *Acinetobacter* sp. e *Aeromonas hydrophila*) a expressão desta isoforma se mostrou inalterada, porém houve a expressão de duas outras isoformas de acordo com a bactéria utilizada, sugerindo que cada isoforma possa ter uma modulação diferenciada (JIRAVANICHPAISAL et al., 2007). Estes resultados confirmam a importância dessas moléculas no sistema imune inato de crustáceos na defesa contra agentes patogênicos.

1.4 O cultivo de crustáceos

Os crustáceos vem assumindo um crescente destaque na aquicultura mundial e o cultivo de várias espécies, em especial de camarões marinhos, vem trazendo uma importante contribuição na economia de muitos países tropicais, incluindo o Brasil.

A carcinicultura é atualmente praticada em mais de 50 países e é responsável por milhões de empregos em países em desenvolvimento, sendo fundamental na pauta de suas exportações. A espécie mais cultivada atualmente a nível mundial é o camarão-branco do Pacífico *L. vannamei*. Cerca de 30% dos camarões consumidos no mundo são provenientes de cultivo, sendo que a produção mundial em 2007 foi de aproximadamente 6,5 milhões de toneladas, gerando uma receita bruta que ultrapassou 13 bilhões de dólares (FAO, 2008). Atualmente, a China e a Tailândia são os principais produtores de camarões marinhos a nível mundial. Na América Latina, os principais produtores são o Equador, México e Brasil (ROCHA, 2007).

1.4.1 Carcinicultura no Brasil

No Brasil, devido à crescente estagnação da pesca e à procura comercial da indústria alimentícia, a carcinicultura vem constituindo uma grande alternativa para o suprimento de camarões da demanda interna e externa. Assim, esta atividade veio nos últimos anos ganhando cada vez mais espaço e interesse no país, devido ainda às condições ambientais favoráveis que o país oferece para esta atividade. A carcinicultura gera em torno de 48 mil empregos diretos somente no Nordeste do país, onde se concentra cerca de 95% da produção brasileira (ROCHA, 2007). Em 2003 a produção de camarão de cultivo chegou a 90.190 toneladas, cultivados em mais de 15 mil hectares de viveiros, alcançando seu ápice na história da carcinicultura brasileira (RODRIGUES, 2005). Contudo, a carcinicultura vem passando por alguns desafios importantes a nível mundial, especialmente no que diz respeito à enfermidades e à degradação ambiental. No caso específico do Brasil, a carcinicultura vem sofrendo forte impacto devido ao surgimento de duas graves viroses: o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV, do inglês, *Infectious Myonecrosis Virus*) nos cultivos da Região Nordeste e o vírus da mancha branca (WSSV do inglês, *White Spot Syndrome Virus*) em Santa Catarina (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004; ROCHA, 2007) o que levou a uma queda na produção nacional para apenas 65.000 toneladas em 2005 e assim sua estagnação até o ano de 2007, porém com um aumento para 70.000 toneladas em 2008 (FAO, 2008).

O IMNV, detectado inicialmente em 2002 (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004), causou perdas econômicas importantes para os produtores de camarões do nordeste do Brasil, causando mortalidades de até 70% (ROCHA, 2007). Hoje em dia, a síndrome causada pelo IMNV passou para um estágio crônico, com taxas de mortalidade baixas e persistentes, devido à melhora das condições de cultivo, como a diminuição da densidade dos animais nos cultivos (ROCHA, 2007).

O segundo vírus, o WSSV, teve grande impacto no cultivo em Santa Catarina, onde a produção de camarões vinha em franco crescimento até 2004. A partir de 2005, os cultivos foram acometidos pelo WSSV e a produção de camarões teve um declínio acentuado. Apesar dos vários esforços realizados para o combate e o controle desta enfermidade, não existem ainda perspectivas otimistas para o retorno da produção aos patamares anteriores. Juntas, estas duas viroses rebaixaram o posto brasileiro de líder latinoamericano na produção de camarão em 2003 para um menos atrativo 3º lugar, precedido pelo México e Equador (SEIFFERT et al., 2006; FAO, 2008).

A carcinicultura marinha brasileira está limitada atualmente ao cultivo de uma única espécie, o camarão do Pacífico *L. vannamei*. Em Santa Catarina, por exemplo, o cultivo de espécies nativas de peneídeos, como o camarão rosa *F. paulensis* e o camarão branco *L. schmitti* foi substituído em 1998 pelo cultivo de *L. vannamei*, o que ocorreu como consequência da baixa conversão alimentar e do longo ciclo de vida apresentados pelas espécies nativas, o que resultava em um baixo rendimento econômico (SEIFFERT et al., 1998). Devido ao seu interesse econômico, o sistema imune dessa espécie é amplamente investigado por vários grupos a nível internacional. Por outro lado, é de suma importância conhecer também os mecanismos de defesa desencadeados pelas espécies nativas *F. paulensis* e *L. schmitti*. Atualmente é reconhecido que o aumento da mortalidade de *L. vannamei* por WSSV está fortemente associado às baixas temperaturas da água nos cultivos, comuns em Santa Catarina (RODRIGUEZ et al., 2003; GRANJA et al., 2006). Efetivamente, nos meses em que ocorrem quedas bruscas de temperatura registra-se uma maior incidência da infecção por WSSV em *L. vannamei* cultivados em Santa Catarina. Assim sendo, estudos sobre o sistema imune de espécies nativas, adaptadas às condições ambientais locais, são de fundamental importância, pois elas poderiam vir a representar uma alternativa para o cultivo de *L. vannamei*, o qual, embora munido de características zootécnicas superiores, encontra-se fortemente ameaçado pelas viroses.

1.4.2 Outras dificuldades do setor

Além das doenças virais já citadas, infecções bacterianas também ameaçam os cultivos, em especial as larviculturas. Vários gêneros de bactérias, como *Pseudomonas* e *Aeromonas*, foram descritos como causa de mortalidade de larvas, porém o gênero *Vibrio* é de longe a mais importante ameaça para a carcinicultura (BACHÈRE et al., 2004). Descritos como comensais, os víbrios são também considerados oportunistas e estão associados à mortalidade de larvas e juvenis de camarões. Para contornar estes sérios problemas, a aquicultura tem feito uso contínuo de antibióticos com o objetivo de prevenir e controlar infecções. Contudo, essa prática vem se tornando cada vez mais contraindicada, pois contribui enormemente para o surgimento de cepas bacterianas resistentes, podendo ainda gerar a contaminação do ambiente e a produção de camarões impróprios para consumo humano (BACHÈRE et al., 2004; MADRID, 2005; RODRIGUES, 2005).

No ambiente natural, os camarões desenvolveram sistemas efetivos para detectar e discriminar os microorganismos benéficos para seu bem estar fisiológico daqueles potencialmente prejudiciais e patogênicos e atingir um equilíbrio em seu ambiente (BACHÈRE et al., 2004). No entanto, na prática da aquicultura, os animais são submetidos a um ambiente estressante e condições ecológicas que enfraquecem seriamente a manutenção de sua homeostase. Práticas de cultura intensivas estão ligadas a alta densidade de animais, distúrbios ambientais, poluição e desequilíbrio nutricional, condições estas que favorecem o desenvolvimento de doenças (BACHÈRE et al., 2004). A inexistência de um sistema imune adaptativo nesses animais resulta, conseqüentemente, na impossibilidade de se desenvolver vacinas no sentido clássico da palavra, diminuindo assim, de forma substancial, as possibilidades de se prevenir e controlar doenças, o que tem sido atualmente o principal fator limitador da indústria camaroneira a nível mundial (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

Atualmente, os programas de seleção de camarões consideram o crescimento e a resistência à patógenos específicos, os principais critérios para seleção genética (BACHÈRE et al., 2004). Deste modo é interessante pensar que explorando o sistema imune desses animais é possível identificar genes que podem conferir aos animais selecionados um aumento de sua resposta imune e conseqüentemente uma maior resistência a doenças. Neste contexto, avanços na caracterização dos efetores imunes, como os PAMs, podem gerar novas alternativas na manutenção de saúde e controle de infecções em aquicultura.

Em nosso conhecimento, a ocorrência de peptídeos antimicrobianos nas células imunocompetentes de crustáceos brasileiros, em especial em camarões marinhos de interesse para aquicultura, foi muito pouco estudada. Os únicos estudos deste tipo até o momento em camarões nativos são do nosso laboratório que detectou peneidinas em *L. schmitti*, *F. paulensis*, *F. subtilis* e *F. brasiliensis* (BARRACCO et al., 2005; ROSA, 2007), fatores antilipopolisacarídeos (ALF) em *L. schmitti* e *F. paulensis* (ROSA, STOCO; BARRACCO, 2008) e crustinas nos camarões *L. schmitti*, *F. paulensis*, *F. brasiliensis* e *F. subtilis* (ROSA; BANDEIRA; BARRACCO, 2007).

O estudo de PAMs em camarões pode ser particularmente importante para um maior entendimento do sistema imune desses animais e de sua capacidade de resistir a infecções, contribuindo para um maior controle das enfermidades. Além disso, os PAMs de invertebrados marinhos podem representar uma nova geração de agentes terapêuticos, haja visto a biodiversidade brasileira, podendo encontrar aplicações potenciais não apenas em aquicultura, como também em saúde humana e veterinária, no sentido de constituir uma alternativa para o problema do crescente número de microorganismos resistentes à maioria dos antibióticos atualmente utilizados.

Diante da necessidade de métodos alternativos no combate a infecções em aquicultura e na saúde, o presente trabalho teve por objetivo produzir através de expressão heteróloga a crustina rcrusFpau de *F. paulensis*, recentemente clonada em nosso laboratório, para avaliar sua atividade antimicrobiana e produzir anticorpos policlonais contra esta molécula a fim de elucidar o local de sua síntese e processamento na hemolinfa e determinar sua presença em outras espécies de crustáceos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Amplificar por abordagem molecular uma crustina na hemolinfa do camarão nativo *Farfantepenaeus paulensis* e proceder à sua expressão em sistema heterólogo. Avaliar sua atividade antimicrobiana e determinar a população de hemócitos responsável pela sua produção através da produção de anticorpos e imunolocalização.

2.2 Objetivos específicos

1. Detectar e clonar uma crustina a partir dos hemócitos de *F. paulensis*;
2. Construir o plasmídeo recombinante a partir do vetor pET-14b para a expressão heteróloga da crustina;
3. Expressar a crustina recombinante em *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS e purificá-la;
4. Avaliar a atividade antimicrobiana da crustina recombinante contra diferentes bactérias Gram positivas e negativas;
5. Produzir anticorpos policlonais anti-crustina em camundongos;
6. Imunolocalizar crustinas nativas nos hemócitos e no plasma de *F. paulensis* e imunodetectar crustinas nativas nos hemócitos de outros grupos de crustáceos;
7. Avaliar se a crustina sofre processamento (clivagem proteolítica) nos hemócitos ou no plasma de *F. paulensis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Neste trabalho foram utilizados camarões adultos (20-25 g) de ambos os sexos, da espécie nativa *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967) (Figura 6), obtidos diretamente de pescadores da baía norte da Ilha de Santa Catarina (27°49'S; 48°53'W).

Os animais foram imediatamente transportados para o Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura - LIAA (BEG/UFSC), onde permaneceram acondicionados em aquários de 40 l contendo água do mar filtrada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$; salinidade 32-34%) e aeração constante, por um período mínimo de 24 h, sendo alimentados uma vez ao dia com ração específica. Somente os animais aparentemente saudáveis e fora do período de muda foram utilizados neste estudo.



Figura 6: Exemplar adulto da espécie de camarão *Farfantepenaeus paulensis*.

3.2 Amplificação e clonagem de uma crustina de *F. paulensis* e construção do vetor de expressão

3.2.1 Coleta de hemolinfa e obtenção dos hemócitos

A hemolinfa dos camarões foi extraída sob a forma de *pool* (n=10 animais) através de punção direta da região ventral, entre o último esternito cefalotorácico e o primeiro abdominal, utilizando-se uma seringa estéril de 1 ml, na presença de uma solução anticoagulante (solução de Alsever modificada ou MAS: 27 mM citrato de sódio, 336 mM cloreto de sódio, 115 mM glicose, 9 mM EDTA, pH 7,0). Os hemócitos foram precipitados por centrifugação (800 x g por 10 min a 4°C) e lavados (1x) em MAS e utilizados para extração de RNA..

3.2.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA total dos hemócitos de *F. paulensis* foi realizada em TRIzol (Invitrogen®). A seguir foi adicionado clorofórmio para separação da fração correspondente ao RNA e esta foi então

precipitada pela adição de álcool isopropílico. Após lavagem com álcool 75%, as amostras de RNA foram secas e dissolvidas em água MilliQ tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). A concentração e a pureza das amostras foram avaliadas em espectrofotômetro ($A_{260/280} > 1,8$).

Para obtenção da primeira fita de cDNA, 1µg do RNA total foi reversamente transcrito utilizando-se a enzima *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* (Invitrogen®) na presença de 0,4 mM de cada dNTP (Invitrogen®), tampão (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) e um iniciador *oligo (dT)₁₂₋₁₈*, direcionado para região da cauda poli(A) dos mRNA.

3.2.3 Desenho dos iniciadores

Para a construção do plasmídeo de expressão e obtenção da crustina recombinante, foram desenhados iniciadores específicos baseados na sequência de uma crustina madura do camarão *F. paulensis*, denominada *crusFpau* (GenBank: EF182747) e recentemente descrita por nosso grupo (ROSA; BANDEIRA; BARRACCO, 2007). O iniciador senso CRGL-Fw (5' GGATTTCATATGGGCAAGTTTCGT GGCTTCGG 3') foi desenhado a partir da região inicial do peptídeo maduro e o iniciador anti-senso CRCY-Rv (5' GTAAACGGATCCC TATCCGAAAAGGGGCTTTCC 3') foi desenhado imediatamente após o final da sequência codificadora. Na extremidade 5' dos iniciadores senso e anti-senso foram acrescentados, respectivamente, sítios de restrição para as endonucleases *NdeI* e *BamHI* (regiões sublinhadas).

3.2.4 Amplificação por PCR

A amplificação da sequência correspondente à crustina foi realizada por PCR na presença de 100 ng de cDNA, 0,4 µM de cada iniciador, 1 U da enzima *Taq DNA Polimerase* (Invitrogen®), 0,2 mM de cada dNTP e 1,5 mM de MgCl₂, em um volume final de 10 µl. As condições utilizadas foram: desnaturação inicial a 94°C por 10 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, temperatura de ligação dos iniciadores de 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. Ao término dos ciclos, as amostras foram submetidas a uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram examinados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio em água destilada (0,01% v/v).

3.2.5 Preparo de bactérias competentes

Suspensões bacterianas de *E. coli* DH5⁺, crescidas em meio LB (peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, cloreto de sódio 1%, pH 7,4) em fase exponencial ($OD_{600nm} = 0,6$), foram centrifugadas (5.000 x g por 5 min a 4°C), homogeneizadas em uma solução estéril de 100 mM

CaCl₂ e incubadas por 1 h a 4°C. Após nova centrifugação, as bactérias foram mais uma vez homogeneizadas em CaCl₂ na presença de glicerol estéril 20% e mantidas no gelo durante 30 min. Alíquotas (200 µl) foram separadas e imediatamente congeladas a -80°C até o momento de uso.

3.2.6 Clonagem molecular

Os produtos de PCR de tamanho esperado (~ 480 pb) foram ligados no vetor plasmidial pGEM[®]-T Easy (Promega[®]), utilizando-se a enzima *T4 DNA Ligase*, durante 12 h a temperatura de 16°C. O plasmídeo recombinante foi utilizado para transformar células competentes, que foram utilizadas como hospedeiras para a clonagem da sequência da crustina e propagação dos plasmídeos. As bactérias competentes previamente preparadas foram transformadas com o plasmídeo recombinante (2 µl) através de choque térmico a 42°C por 45 s, seguidos de 2 min no gelo. Após o procedimento de transformação, foram adicionados 600 µl de meio LB para o crescimento das bactérias durante 1 h a 37°C, sob agitação. Diferentes volumes das bactérias transformadas (100–500 µl) foram cultivados em meio LB-ágar (adição de ágar 1,5% em meio LB) a 37°C por aproximadamente 12 h. Para a clonagem molecular, os meios LB foram acrescidos de antibiótico (ampicilina – 100 µg/ml) e nos meios LB-ágar, além do antibiótico, foi adicionado o reagente X-GAL (Invitrogen[®] – 20 µg/ml).

Colônias de coloração branca, potencialmente contendo as sequências de interesse, foram repicadas para um novo meio LB-ágar e a comprovação da presença dos insertos nos plasmídios recombinantes foi realizada através da amplificação por PCR diretamente da colônia de bactérias, utilizando os iniciadores CRGL-Fw e CRCY-Rv. As condições de amplificação foram as mesmas utilizadas para as reações da amplificação da crustina, porém substituindo o cDNA por uma parte da colônia bacteriana. Após a comprovação da presença do inserto de tamanho esperado, as colônias escolhidas tiveram seus plasmídios (pGEM-crus*Fpau*) extraídos através de um protocolo padrão de lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

3.2.7 Construção do vetor de expressão

O plasmídeo pGEM-crus*Fpau* purificado e o vetor plasmidial pET-14b (Novagen[®]) foram digeridos separadamente com as endonucleases *NdeI* e *BamHI*. Os produtos da digestão foram visualizados em gel de agarose 1% e posteriormente submetidos à purificação, utilizando-se o kit *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham[®]) conforme recomendações do fabricante. Após a purificação, o fragmento correspondente à sequência da crustina

e a forma linearizada do plasmídeo pET-14b foram submetidos à reação de ligação, conforme descrito no item 3.2.6, resultando no plasmídeo de expressão pET-crus*Fpau*. No plasmídeo pET-14b (Figura 7), a sequência da crustina foi inserida sob o controle do promotor do fago T7 (presente no vetor pET-14b), cuja expressão torna-se então dependente da RNA polimerase de T7. Essa, por sua vez, encontra-se no genoma da bactéria (DE3) sob a regulação do promotor do operon lac. O isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), por ser um análogo da alolactose, atua como indutor da expressão do gene da RNA polimerase de T7 e consequentemente do gene de interesse (STUDIER et al. 1990; DUBENDORFF; STUDIER, 1991a,b). Além disso, o gene inserido corretamente fica “in frame”, localizando-se imediatamente após à sequência de DNA que codifica para os aminoácidos da cauda contendo um *His-tag*, que inclui 6 histidinas: MGSSHHHHHSSGLVPRGSH.

O plasmídeo pET-crus*Fpau* foi então clonado em bactérias competentes *E. coli* DH5 e sequenciado em ambas as direções (sequenciador *MegaBace 1000*[®] *DNA Analysis System* – GE Healthcare[®]) para confirmação da identidade da sequência nucleotídica do inserto e verificação da posição correta dessa sequência no vetor de expressão. A tradução e análise da sequência aminoacídica deduzida foi estimada utilizando-se as ferramentas virtuais do *ExpASy Proteomics* (*Expert Protein Analysis System*: <http://us.expasy.org/tools>), do Instituto Suíço de Bioinformática (GASTEIGER et al., 2003). A comparação da sequência da crustina sequenciada com a previamente obtida (ROSA, BANDEIRA, BARRACCO, 2007) e com outras crustinas foi realizada através do alinhamento múltiplo utilizando-se o software ClustalX (THOMPSON et al., 1997). Após alinhamento, as sequências comparadas foram submetidas a métodos de *Neighbor-joining* para construção de árvores filogenéticas. Essas árvores foram obtidas utilizando-se o *software* MEGA 4 (TAMURA et al., 2007) com deleção completa de *gaps* e 1.000 replicatas, a fim de checar a repetição dos resultados.

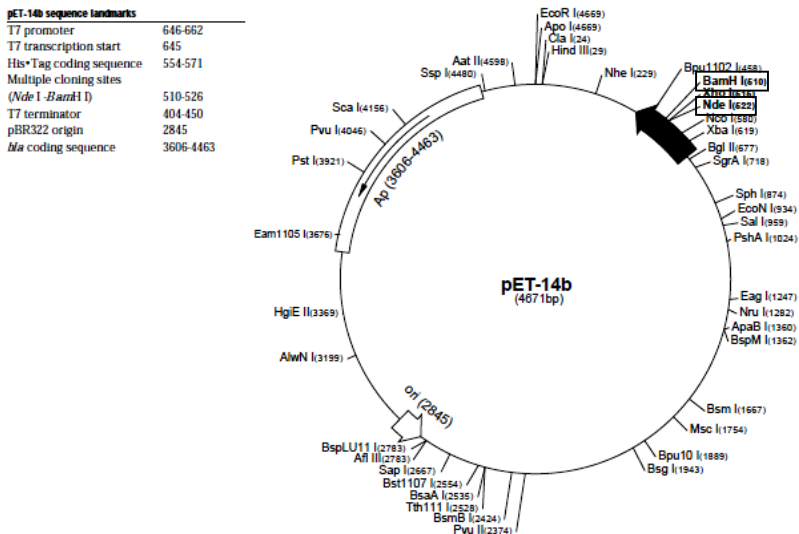


Figura 7: Representação esquemática do vetor pET-14b com os sítios de corte para as enzimas de restrição, inclusive as utilizadas neste trabalho, *Nde*I e *Bam*HI, destacadas com retângulos (Novagen®).

3.3 Expressão e purificação da crustina de *F. paulensis*

3.3.1 Expressão heteróloga da crustina em *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Para a expressão heteróloga da crustina de *F. paulensis* foram utilizadas células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS que são especialmente indicadas para vetores de expressão pET (Plasmid for Expression by T7 RNA polymerase) (Novagen®). Além disso, essa cepa carrega o plasmídeo pLysS, que expressa constitutivamente pequena quantidade de lisozima T7, que por sua vez inibe os níveis basais da T7 RNA polimerase. Logo, a expressão da proteína de interesse ocorre realmente apenas na presença do indutor IPTG, pois a quantidade de T7 RNA polimerase supera a quantidade de lisozima T7 presente na bactéria. Estas bactérias também carregam um plasmídeo que confere resistência ao cloranfenicol.

As bactérias *E. coli* BL21(DE3)pLysS foram preparadas e transformadas da mesma forma descrita para as células *E. coli* DH5. Para os ensaios de expressão heteróloga, os meios LB foram acrescidos dos antibióticos ampicilina (100 µg/ml) e cloranfenicol (50 µg/ml). Após crescimento em LB por um período de aproximadamente 12 h, as bactérias contendo o inserto foram identificadas a partir de PCR,

conforme descrito no item 3.2.6. Colônias positivas foram então inoculadas em 10 ml de meio LB e incubadas a 37°C por 12 h, sob agitação. Aproximadamente 5 ml desse pré-cultivo foi inoculado em 250 ml de LB e incubados a 37°C sob agitação até atingirem uma OD_{600nm} entre 0,5-0,8. Em seguida, foi adicionado 1 mM de IPTG para a indução da expressão da proteína recombinante. Para otimizar as condições de expressão foram testados diferentes tempos (0h, 4h e 15h) e diferentes temperaturas (20°C e 37°C) de indução com a finalidade de se obter uma maior concentração da proteína recombinante na fração solúvel. Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se 4 h de indução à 37°C.

Após indução, as culturas bacterianas foram centrifugadas (2.500 x g por 20 min a 4°C), lavadas com tampão fosfato (50 mM, pH 8,0) e o precipitado bacteriano foi homogeneizado em 1 ml de tampão de ligação (50 mM fosfato de sódio, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8), contendo o inibidor de protease PMSF (Sigma®; diluição 100x v/v). As bactérias foram então submetidas à lise celular por sonicação (7 ciclos a 10 W por 20 s com 30 s de intervalo), centrifugadas (10.000 x g por 20 min a 4°C) e o sobrenadante e precipitado resultantes foram separados para análise em SDS-PAGE (17%) e Western blot e para purificação da crustina recombinante. As amostras foram, congeladas a -20°C até o momento de uso.

3.3.2 Eletroforese em gel de acrilamida (SDS-PAGE)

A expressão e as etapas de purificação da crustina recombinante foram analisadas por eletroforese em gel de poli(acrilamida) sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970), utilizando o sistema Mini-PROTEAN® 3 (Bio-Rad®). Alíquotas de 10 µl de cada amostra foram misturadas com 10 µl de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 25%, ficoll 15%, em água ultrapurificada), aquecidas a 100°C por 5 min e aplicadas no gel (acrilamida/bis-acrilamida 17%) a uma voltagem de 100 V por 2-3 h, em tampão de migração (124 mM Tris, 1 M glicina, SDS 0,5%, pH 8,3). As bandas protéicas foram coradas com azul de Coomassie (SYROVY; HODNY, 1991) e a massa molecular aparente da proteína de interesse foi estimada utilizando-se os marcadores de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen®).

3.3.3 Confirmação da expressão da crustina por Western Blot

A expressão da crustina foi confirmada por Western blot utilizando anticorpos monoclonais anti-polihistidina (Sigma®). Após eletroforese em gel de acrilamida, as proteínas separadas foram eletrotransferidas para uma membrana Hybond (Amersham®),

utilizando o sistema Transblot (Bio Rad®). A transferência das proteínas foi monitorada através da coloração da membrana com vermelho Ponceau 0,5%. As membranas foram então saturadas com leite em pó desnatado 5% em PBS (Difco®) por 1 h sob agitação. A seguir, as membranas foram lavadas (3 x por 5 min) com PBS acrescido de Tween20 0,1% (PBS-T 0,1%) e incubadas com o anticorpo primário anti-histidina (Sigma®, 1:5000 em tampão PBS-T 2%) por 1 h sob agitação. Após lavagem com PBS-T 0,1% (3 x 5 min), as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:10.000) por 1 h sob agitação. Para revelação, as membranas foram incubadas com 1 ml do reagente ECL (GE Healthcare®) e posteriormente utilizadas para marcação por quimioluminescência de filmes radiográficos em câmara escura, conforme especificações do fabricante.

3.3.4 Purificação da crustina recombinante

Devido à presença da região *His-tag* na proteína recombinante, sua purificação foi realizada em uma única etapa, diretamente do lisado de bactérias, por cromatografia de afinidade a metal (IMAC, *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*) (PORATH et al, 1975). Inicialmente a purificação foi realizada a partir do sobrenadante do lisado de bactérias através da utilização da resina *Ni-NTA* (QIAGEN). Posteriormente esta metodologia foi substituída pela purificação da mesma fração através do Sistema ÄKTA HPLC (GE Healthcare®), através da coluna HisTrap 1 ml (GE Healthcare®), que gerou melhores resultados com um rendimento aproximado de 1 mg/litro de cultura celular.

Para a purificação, o sobrenadante do lisado de bactérias foi filtrado (0,22 µm) para garantir a eliminação de detritos celulares e transferidos (5 ml) para a coluna HisTrap, conectada ao sistema ÄKTA HPLC. A coluna foi submetida a um gradiente de 60 a 500 mM de imidazol, que é um análogo da cadeia lateral do aminoácido histidina, competindo, assim, com a proteína pela ligação ao metal da matriz. Durante as etapas do processo, foram coletadas frações de 1 ml e alíquotas das diferentes eluições foram separadas para análise em SDS-PAGE. As eluições onde foi detectada a crustina recombinante foram unidas e concentradas por ultra filtração (Amicon – Millipore, poro de 10 kDa) e sua concentração foi determinadas pelo método de Bradford, utilizando-se soro-albumina bovina como proteína padrão (BRADFORD, 1976). A pureza das amostras foi verificada por SDS-PAGE.

3.4 Ensaio antimicrobiano por sobreposição de gel

A atividade antimicrobiana da crustina recombinante purificada foi avaliada contra *Micrococcus luteus* A270 através do método de sobreposição de gel (*overlay*) de modo semelhante ao descrito para as carcininas do lagostim *P. leniusculus* (JIRAVANICHPAISAL et al., 2007). Este método propicia a desnaturação das proteínas (crustina) devido a uma alta concentração de uréia, e sua posterior renaturação após a remoção desta. Este processo também remove o imidazol das amostras. De forma resumida, as amostras de crustina (2 ug) perfeitamente secas a vácuo foram dissolvidas em 3 M de uréia em 5% ácido acético e 0,01% verde metila e submetidas a uma eletroforese reversa (direcionada ao eletrodo negativo, a uma voltagem de 120 V, 20 mA) em gel de acrilamida (12,5%) ácido-uréia. Os géis foram realizados em duplicata, e após migração, o primeiro gel foi diretamente corado com azul de coomassie para determinar a localização das bandas protéicas e o segundo gel utilizado para ser sobreposto à cultura bacteriana. Este segundo gel foi lavado com 10 mM PBS (pH 7,4) e sobreposto a uma placa de Petri contendo *M. luteus* (12×10^6 bactérias) crescendo em meio pobre (Poor Broth ou PB: TSB 0,03%, agarose 1%, 10 mM NaPO₄, pH 7,4, 40 ml) durante 4h a 30°C, a fim de possibilitar a transferência da crustina para o meio de cultura. Decorrido este tempo, o gel foi removido e corado com azul de coomassie. Paralelamente, a cultura bacteriana foi acrescida de um meio rico (TSB 6% e agarose 1%) para estimular o crescimento bacteriano por um período de 15 h a 30°C. Após incubação, a presença de halos de inibição de crescimento bacteriano foi monitorada e fotografada. Controles positivos foram realizados utilizando-se lizozima de clara de ovo de galinha (AMRESCO®).

3.5 Produção de anticorpos policlonais anti-crustina

A produção de anticorpos policlonais contra a crustina recombinante foi realizada em camundongos isogênicos BALB/c (3 fêmeas adultas: aprovação CEUA-PP00347). Os animais foram imunizados primeiramente através de injeção subcutânea (pata) com a crustina recombinante (15 µg) em adjuvante completo de Freund (1:1). Três doses de reforço foram realizadas: a primeira dose, após decorridos dez dias, continha a mesma concentração de crustina em adjuvante incompleto de Freund, a segunda dose, após 18 dias, continha 45 µg de crustina sem adjuvante e a última dose, após 35 dias, continha 10 µg de crustina. O soro dos camundongos imunizados foi obtido uma semana após o último reforço. Foi também coletado soro pré-imune dos camundongos para os ensaios controle.

3.6 Imunolocalização das crustinas na hemolinfa de *F. paulensis* e de outras espécies de invertebrados aquáticos

3.6.1 Preparo das amostras de hemolinfa

O soro anti-crustina recombinante foi utilizado para detectar crustinas na hemolinfa (hemócitos e plasma) de *F. paulensis*. Para tal, sua hemolinfa foi coletada conforme descrito no item 3.2.1, sendo que a solução anticoagulante foi acrescida de PMSF (Sigma[®], 100x v/v). Parte da hemolinfa foi centrifugada (800 x g por 10 min a 4°C) para separar os hemócitos do plasma. O sobrenadante ou plasma foi mantido a 4°C e o precipitado celular foi utilizado para preparar um lisado de hemócitos e também para realizar monocamadas celulares para os ensaios de imunofluorescência indireta.

O lisado celular foi obtido através de sonicação (3 x 15 s com intervalos de 20 s – 50 W a 0°C) dos hemócitos em tampão cacodilato de sódio (10 mM cacodilato de sódio, 330 mM NaCl, pH 7,5). Após centrifugação (20.000 x g por 30 min a 4°C), o sobrenadante resultante ou HLS (do inglês *hemocyte lysate supernatant*) foi coletado e utilizado nos ensaios.

Outra parte da hemolinfa fresca foi utilizada para a preparação de *hemolinfa total*. Para tal, amostras de hemolinfa coletada em anticoagulante, foram sonicadas e centrifugadas como acima descrito. O sobrenadante resultante, constituído por plasma e produtos exocitados pelos hemócitos, foi coletado e utilizado nos ensaios e denominado de hemolinfa total (HT).

Procedimentos semelhantes foram utilizados para coletar e processar a hemolinfa de outras espécies de invertebrados aquáticos: o camarão peneídeo *Litopenaeus vannamei* (n=10), o camarão de água doce *Macrobrachium potiuna* (n=30), o siri *Callinectes sapidus* (n=5) e o mexilhão *Perna perna* (n=10).

3.6.2 Imunolocalização de crustinas nos hemócitos através de ensaios de imunofluorescência indireta

Os ensaios de imunofluorescência para detectar crustinas nos hemócitos de *F. paulensis* e nas outras espécies de invertebrados aquáticos foram realizados de acordo com o método descrito por Schleder et al (2008). De forma resumida, as monocamadas de hemócitos foram preparadas em lamínulas de vidro (22 x 22 mm), perfeitamente limpas e aprotogênicas e depositadas em microplacas de 6 poços. As lamínulas receberam 100 µl de uma suspensão de hemócitos em MAS (4x10⁵ células/ml) na presença de 20 mM de CaCl₂ propiciando a adesão celular por cerca de 20 min. Após adesão, as

células foram lavadas e fixadas em 4% paraformaldeído durante 20 min. Após nova lavagem, as monocamadas foram permeabilizadas (25 mM Tris, 0,2% gelatina, 0,5% Triton X-100, 50 mM cloreto de amônio, pH 7,2) por 10 min, saturadas por 1 h com 5% de leite em pó desnatado em 0,1% PBS-T. Após lavagem, as monocamadas foram então incubadas por 1 h com 100 µl de soro de camundongo anti-crustina em diferentes diluições, de acordo com a espécie utilizada (1:10 a 1:400). As monocamadas celulares foram então novamente lavadas e tratadas com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com FITC (1:500) durante 15 min no escuro. Após nova lavagem, as monocamadas foram então montadas em lâminas com bicarbonato-glicerina (pH 9,0) e observadas ao microscópio de fluorescência com sistema de filtros para fluoresceína (Zeiss – *Axiostar Plus*). Controles foram realizados utilizando-se o soro pré-imune de camundongo em substituição ao anticorpo primário.

3.6.3 Localização de crustinas nas diferentes frações de hemolinfa através de western blot

A presença de crustinas nas diferentes frações de hemolinfa (HT, plasma e HLS) foi avaliada em *F. paulensis* e nas outras espécies de invertebrados aquáticos utilizando-se o soro policlonal anti-crustina. Os ensaios de Western blot foram realizados conforme descrito no item 3.3.3. O anticorpo anti-crustina foi utilizado em diferentes concentrações de acordo com cada espécie e fração de hemolinfa (1:200 a 1:2000 em 0,1% PBS-T) por 1-3 h. As membranas foram então lavadas e incubadas com um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (1:10.000) por 1 h sob agitação e a revelação foi realizada como previamente descrito.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Amplificação e clonagem de uma sequência de cDNA codificando para crustina

Recentemente foi clonada em nosso laboratório uma sequência gênica correspondente a uma crustina do camarão nativo *F. paulensis* denominada *crusFpau* (ROSA; BANDEIRA; BARRACCO, 2007). Visando dar continuidade ao estudo desta molécula, neste novo trabalho buscamos amplificar novamente a crustina de *F. paulensis* (vide item 3.2), a partir de iniciadores específicos, baseados na sequência da *crusFpau* e desenhados de tal forma a produzir uma crustina madura contendo sítios de restrição para *Xho*I e *Bam*HI, para posterior inserção no vetor de expressão pET-14b. A amplificação da sequência gerou um produto de PCR de cerca de 480 pb, condizente com o tamanho esperado para a crustina madura (Figura 8).

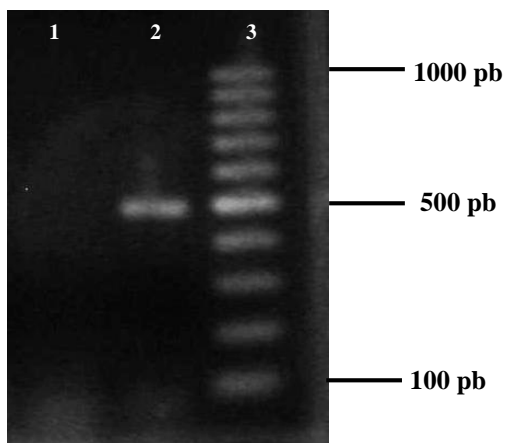


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio mostrando a amplificação da sequência codificante correspondente a uma crustina de *F. paulensis*. Linha 1: controle negativo, linha 2: sequência da crustina (~ 480 pb), linha 3: marcador de peso molecular (escala de 100 pb).

O produto de PCR foi então clonado a partir de sua ligação ao plasmídeo pGEM e após transformação de bactérias *E. coli* DH5 . Em seguida o plasmídeo pGEM-crustina foi submetido a uma digestão com as endonucleases *Nde*I e *Bam*HI, juntamente com o vetor de expressão pET-14b e ambos foram purificados.

4.2 Clonagem, sequenciamento e análise da sequência correspondente à crustina

Após purificação e ligação da sequência correspondente à crustina no vetor pET-14b, o plasmídeo resultante pET-crustina foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* DH5 com o objetivo de clonar e sequenciar o plasmídeo para verificação da ligação correta do inserto. O sequenciamento mostrou que de fato a sequência nucleotídica obtida correspondia a uma crustina (Figura 9) e ao ser confrontada com a sequência madura da *crusFpau* (EF182747). A análise apresentou 94% de homologia com a sequência completa da primeira crustina descrita em *F. paulensis*, *crusFpau* (Figura 10). Estes resultados sugeriram, portanto, que a sequência obtida correspondia a uma nova isoforma de crustina em *F. paulensis*, sendo por nós denominada de *crusFpau2* e depositada no *GenBank* sob o número GU971374.

1	<u>atggggcagcagccatcatcatcatcatcacagcagcggcctggctgcgcgcggcagccat</u>	60
1	M G S S H H H H H S S G L V P R G S H	20
61	atgggcaagtttcgtggccttcggaagtcocatctggaggcgggtgttcaggaggcgggtata	120
21	M G K F R G F G S P F G G G V P G G G I	40
121	ggtggcgggttccccggaggcgggtataggtgtaggtggcggfctccccggagccggcatt	180
41	G G G F P G G G I G V G G G F P G R G I	60
181	ggtgtaggtggcgggttccccggagc tggta ttgggtgtaggtggcggccttgggtg gga	240
61	G V G G G F P G A G I G V G G G L G V G	80
241	ggcggccttggagttggcaatggccc gagc gactgc aggtat ttggtgcaagactccggag	300
81	G G L G V G N G P S D C R Y W C K T P E	100
301	ggtcaagcctactgctgcgagtcggcgcacgaaccagagacacctgttggtagcaagcca	360
101	G Q A Y C C E S A H E P E T P V G T K P	120
361	ctcaactgcccaaaagtcctgccacatgccccagcttccagtgggccccccacaccctgt	420
121	L N C P Q V R P T C P R F S G P P T P C	140
421	tccaacgactacaagtgctggcctcgacaagtgctgcttcgacaggtgttgaaagaa	480
141	S N D Y K C A G L D K C C F D R C L K E	160
481	cacgtgtgcaagcctcttctgtcttcggaaaagccccttttcggatag	528
161	H V C K P P S V F G K P L F G -	175

Figura 9: Sequências nucleotídica e aminoacídica deduzidas da isoforma madura da crustina *crusFpau2* de *F. paulensis* (GU971374) ancorada à cauda *His-tag* proveniente do plasmídeo pET-14b (sublinhada).

A sequência do polipetídeo traduzido corresponde a uma crustina madura (sem peptídeo sinal) que compreende 154 aminoácidos (175, considerando a cauda *His-tag*) com massa molecular calculada em 15,05 kDa (17,35 kDa, considerando a cauda *His-tag*) (Tabela 1).

A nova isoforma de crustina, *crusFpau2*, apresenta uma região N-terminal rica em resíduos de glicina, onde se observa a presença de 4 resíduos de aminoácidos a mais em relação a *crusFpau*. A *crusFpau2*

possui ainda 8 resíduos de aminoácidos diferentes, sendo que apenas um resíduo (G^{138}) não apresenta alguma similaridade com seu resíduo correspondente (K^{134}) na *crusFpau* (Figura 10). Todos os resíduos de cisteínas conservados e a assinatura do motivo WAP, característicos das crustinas, estão presentes na *crusFpau2*. Conforme a classificação proposta por Zhao e Wang (2008), esta nova isoforma pertence ao subgrupo de *crustina I*, assim como a *crusFpau*, uma vez que ambas apresentam correspondência com a assinatura deste subgrupo (Figura 11). A *crusFpau2* apresenta-se ainda ligeiramente mais catiônica ($pI = 8,48$) que a *crusFpau* ($pI = 8,29$) (Tabela 1).

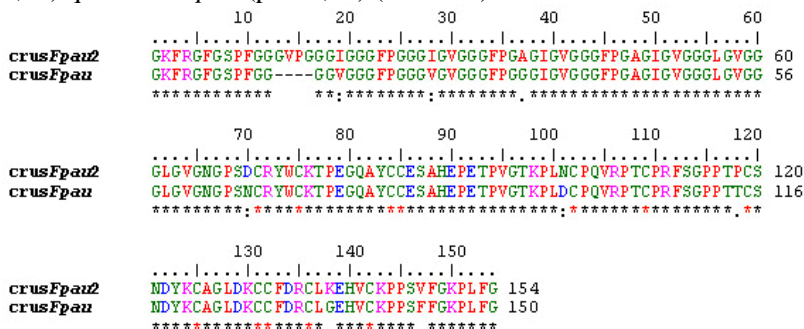


Figura 10: Comparação das seqüências aminoacídicas deduzidas das duas diferentes isoformas de crustinas de *F. paulensis*, *crusFpau* (EF182747) sem o peptídeo sinal e *crusFpau2* (GU971374). Resíduos idênticos entre ambas as seqüências estão indicados, na linha inferior, por asterisco (*). Os hífens indicam *gaps* e os símbolos (.) e (:) resíduos pouco e muito similares, respectivamente. Os resíduos de cisteína conservados da assinatura das crustinas estão com o asterisco correspondente em vermelho.

Crustina I: C ₁ -(X3)-C ₂ (Xn)-C ₃ -C ₄ -(X16)-C ₅ -(X6)-C ₆ -(Xn)-C ₇ -(X5)-C ₈ -(X5)-C ₉ -C ₁₀ -(X3)-C ₁₁ -(X5)-C ₁₂
--

Figura 11: Assinatura do subgrupo de *crustina I* de peneídeos, segundo Zhao e Wang (2008). X indica qualquer resíduo de aminoácido e Xn um número qualquer de resíduos.

Tal como observado em *F. paulensis*, diferentes isoformas de crustinas e SWDs podem ocorrer em uma mesma espécie de peneídeo, como já descrito em *L. vannamei* (BARTLETT et al., 2002; VARGAS-ALBORES et al., 2004), *L. setiferus* (BARTLETT et al., 2002) e *M. japonicus* (RATTANACHAI et al., 2004), assim como em outros crustáceos (BROCKTON; HAMMOND; SMITH, 2007; JIRAVANICHPAISAL et al., 2007). Essa grande variedade de

isoformas em uma única espécie de crustáceo sugere que os genes codificantes para essa família de PAM ocorram em cópias múltiplas pelo genoma dos crustáceos (RATTANACHAI et al., 2004). No entanto, em *C. maenas*, Brockton e colaboradores (2007) sugeriram a presença de um único gene multi-exon para explicar a diversidade de isoformas neste caranguejo. Em *P. monodon* essa grande diversidade de sequências também foi observada, com mais de 6 isoformas identificadas com tamanhos e sequências primárias bem diferenciadas. No entanto a análise da organização dos genes das crustinas de *P. monodon* demonstrou que diferentes isoformas de crustinas eram codificadas por genes diferentes e com promotores e sequências regulatórias distintas (TASSANAKAJON et al., 2006; VATANAVICHARN et al., 2009). A presença de múltiplas cópias de membros desta família de PAM em crustáceos ressalta sua importância no sistema imunológico desses animais.

Tabela 1: Parâmetros bioquímicos das duas isoformas das crustinas de *F. paulensis*.

Crustina	Peptídeo Sinal	Peptídeo Maduro	PM	<i>pI</i>
<i>crusFpau</i>	18 aa	150 aa	14,68	8,29
<i>crusFpau2</i>	-	154 aa	15,05	8,48

pI: ponto isoelétrico teórico; PM: massa molecular (valores em kDa); aa: resíduos aminoácídicos. *crusFpau* (EF182747), *crusFpau2* (GU971374).

Os iniciadores desenvolvidos para a amplificação da *crusFpau2*, foram, como dito anteriormente, baseados na sequência madura de *crusFpau*. No alinhamento múltiplo de sequências pertencentes ao subgrupo *crustina I* (Figura 12) é possível observar que as sequências, incluindo *crusFpau* e *crusFpau2*, possuem ambas as extremidades N-terminal e C-terminal muito conservadas, porém de forma diferenciada dos outros subgrupos. Isto explica o porquê foi amplificada outra isoforma do subgrupo de crustina I e que isso não representa necessariamente uma evidência de que este subgrupo seja mais transcrito em *F. paulensis*. Seria interessante avaliar quais isoformas de crustinas são as mais abundantemente expressas em *F. paulensis* para melhor compreender seu papel no sistema imunológico destes camarões. Nos bancos de dados virtuais (*GenBank*), as isoformas de crustina I são as mais abundantes em relação aos outros subgrupos

presentes em peneídeos (crustina II e SWDs). No entanto, ainda assim, esta situação não permite afirmar que o subgrupo de crustina I seja de fato o mais expresso em peneídeos.

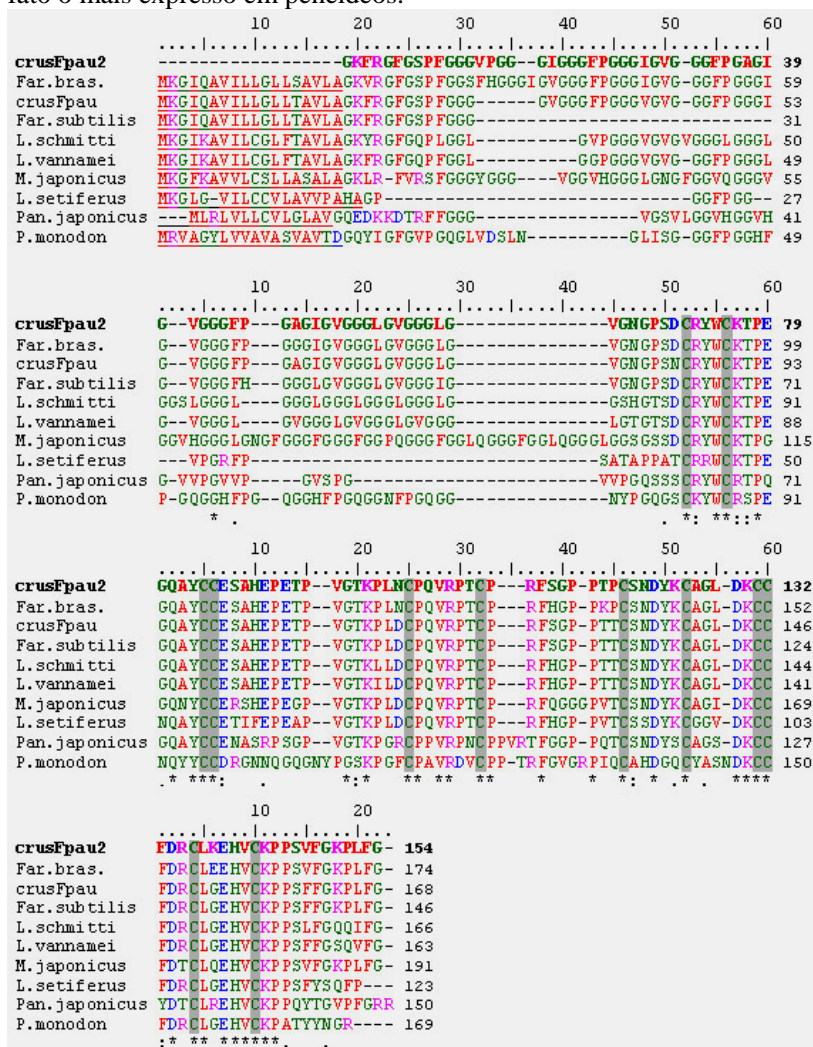


Figura 12: Alinhamento múltiplo das seqüências aminoacídicas deduzidas de crustinas I de peneídeos e de uma lagosta. A *crusFpau2* está destacada em negrito. Os resíduos de cisteína conservados estão ressaltados em cinza. Resíduos idênticos entre as seqüências estão indicados, na linha inferior, por asterisco (*). Os hífens indicam *gaps* e os símbolos (.) e (:), resíduos pouco e muito similares, respectivamente. O peptídeo sinal está sublinhado. As

diferentes isoformas estão representadas à esquerda: *crusFpau2* (GU971374); *Farfantepenaeus brasiliensis* (EF601055); *crusFpau* (EF182747); *Farfantepenaeus subtilis* (EF450744); *Litopenaeus schmitti* (EF182748); *Litopenaeus vannamei* (AY488492); *Marsupenaeus japonicus* (AB121741); *Litopenaeus setiferus* (AF430077); *Panulirus japonicus* (FJ797417); *Penaeus monodon* (FJ380049).

O alinhamento múltiplo das sequências da crustinas de *F. paulensis* (*crusFpau* e *crusFpau2*) com as crustinas I de outros crustáceos (Figura 12) mostra que as diferentes isoformas são bastante relacionadas entre si, mesmo apresentando trechos de composições aminoacídicas variadas. As sequências apresentam diversos fragmentos aminoacídicos bem conservados, especialmente em relação à assinatura das crustinas I (Figura 11) característica de todas as sequências, com exceção apenas da isoforma de *P. monodon*. Cabe ainda salientar que esta assinatura é também obedecida pelas crustinas da lagosta *P. japonicus* (uma delas representada no filograma, Figura 13), mostrando que as crustinas I não são exclusivas de camarões peneídeos.

Curiosamente, *crusFpau2* apresenta maior similaridade com a crustina identificada em outra espécie nativa, *Farfantepenaeus brasiliensis* (94% sem o peptídeo sinal), do que com a *crusFpau* de *F. paulensis* (92% sem o peptídeo sinal). Do mesmo modo, a *crusFpau* tem maior homologia com a crustina do camarão nativo *F. subtilis* (Tabela 2). O filograma gerado a partir do alinhamento de sequências dos diferentes subgrupos de WDPs (*WAP Domain Protein*) de crustáceos também confirma que pode haver uma semelhança maior entre isoformas de diferentes espécies do que entre isoformas da mesma espécie (Figura 13). A ocorrência de uma variedade de crustinas dentro de uma mesma espécie sugere que estas diferentes isoformas desempenhem funções diferenciadas e complementares dentro do sistema imune de crustáceos, como é sugerido na família das peneídnas (CUTHBERTSON et al., 2008).

Os diferentes subgrupos de crustinas propostos por Zhao e Wang (2008) podem ser claramente reconhecidos na árvore filogenética (Figura 13), sendo que apenas algumas poucas sequências não se enquadram no subgrupo a que teoricamente pertencem, como é o caso da carcinina do caranguejo *Eriocheir sinensis*, e a crustina Pm5 de *P. monodon*.

Tabela 2. Similaridade entre as sequências aminoacídicas de crustinas do subgrupo de crustina I de peneídeos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 crusFpau2	100	92	94	82	74	79	61	45	67	48
2 crusFpau		100	92	97	79	87	63	42	67	51
3 crusFbra			100	91	76	84	60	42	67	52
4 crusFsub				100	82	90	60	42	76	54
5 crusLsch					100	88	63	39	72	54
6 crusLvan						100	60	41	69	52
7 crusLset							100	43	59	51
8 crusPmon								100	41	37
9 crusMjap									100	54
10 crusPan.jap										100

As diferentes isoformas foram as mesmas utilizadas no alinhamento múltiplo da figura 12.

Os valores representam a porcentagem de similaridade compartilhada entre as moléculas das diferentes espécies. A crustina obtida neste trabalho está representada em negrito.

Uma característica marcante encontrada nas crustinas de camarões e que está ausente na grande maioria das sequências similares descritas em crustáceos pleociematos (caranguejos e lagostas) refere-se à presença de uma porção hidrofóbica rica em resíduos de glicina na região N-terminal da molécula, já mencionada na introdução. Esta região distingue essencialmente os subgrupos *crustinas* (I e II), presentes majoritariamente em camarões peneídeos, das *carcininas*, descritas nos pleociematos. Interessantemente, ambos os subgrupos foram recentemente detectados na hemolinfa do lagostim *P. leniusculus* (JIRAVANICHPAISAL et al., 2007). Do mesmo modo, na lagosta *P. japonicus* foram encontradas 4 isoformas de crustinas contendo uma região rica em glicina (FJ797417, FJ797418, FJ797419, FJ797420) e 3 delas contendo a assinatura do subgrupo de crustina I. Já a forma incomum de carcinina de *E. sinensis* (FJ974138), que não se integrou às carcininas na árvore filogenética, apresenta 3 resíduos de glicina em sequência na sua região N-terminal, como normalmente ocorre nos peneídeos.

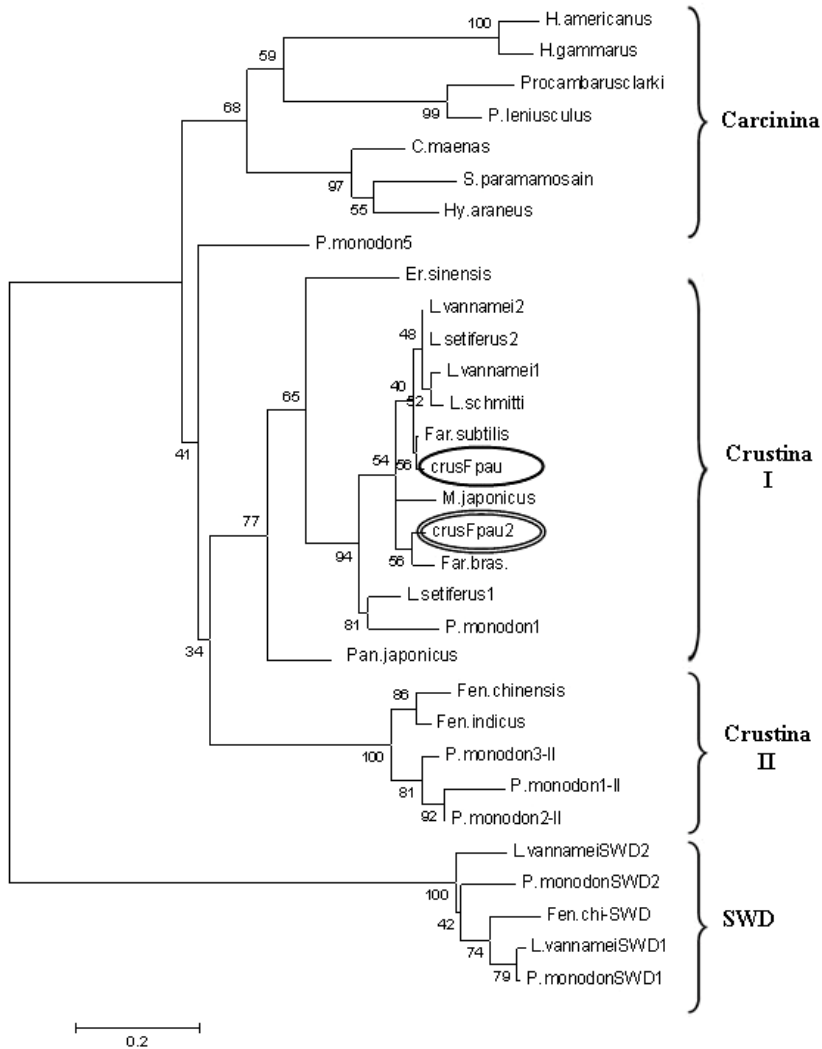


Figura 13: Filograma consenso, resultante do alinhamento de seqüências aminoacídicas deduzidas de crustinas (carcininas, crustina I e II) e SWDs de diferentes espécies de crustáceos, incluindo a seqüência encontrada neste trabalho, *crusFpau2*, marcada com uma elipse dupla, e a *crusFpau* marcada com uma elipse simples. Os valores presentes em cada nó representam a porcentagem de vezes que um determinado nó ocorreu em 1.000 árvores geradas pelo programa MEGA. As diferentes isoformas representadas à direita: *Pacifastacus leniusculus* (crustin 2, EF523613); *Procambarus clarkii*, (crustin

2, GQ301202); *Homarus gammarus* (AJ786653); *Homarus americanus* (EF193003); *Eriocheir sinensis* (FJ974138), *Hyas araneus* (crustin Ha2, EU921642), *Scylla paramamosain* (ABY20728), *Carcinus maenas* (AJ427538), *crusFpau2* (GU971374), *crusFpau* (EF182747), *Farfantepenaeus brasiliensis* (EF601055); *Farfantepenaeus subtilis* (EF450744); *Litopenaeus schmitti* (EF182748); *Litopenaeus setiferus* (crustin2, AF430078); *Litopenaeus vannamei* (crustin 1, AY488492); *Litopenaeus vannamei* (crustin P, AY488495); *Marsupenaeus japonicus* (crustin 2, AB121741); *Penaeus monodon* (Pm5, FJ380049); *Litopenaeus setiferus* (crustin 1, AF430077); *Panulirus japonicus* (FJ797417); *Fenneropenaeus chinensis* (DQ097703); *Fenneropenaeus indicus* (GQ469987); *Penaeus monodon* (GU299808); *Penaeus monodon* (crustin-like 2, FJ539178); *Penaeus monodon* (crustin-like 3, EF654659); *Litopenaeus vannamei* (SWD 1, AY464465); *Penaeus monodon* (SWD 1, EU623979); *Fenneropenaeus chinensis* (SWD, EF216349); *Penaeus monodon* (SWD 2, EU623980); *Litopenaeus vannamei* (SWD 2, AY465833).

Devido ao fato dos camarões peneídeos serem um dos grupos mais antigos dentro da classe Malacostraca, acredita-se que as crustinas presentes nesses animais sejam os ortólogos precursores das demais carcininas encontradas em outros crustáceos decápodos (ROSA, 2007). Deste modo, a ausência desse domínio rico em glicina na região N-terminal da maioria das espécies filogeneticamente mais recentes (caranguejos) aliada à recente descoberta da ocorrência de ambos os subgrupos (com e sem o domínio rico em glicina) em espécies intermediárias (lagostins e lagostas), sugere que durante o processo evolutivo esta região tenha se perdido durante as segregações gênicas oriundas de espécies ancestrais (camarões peneídeos) e que possivelmente esta sequência tenha sido segregada em apenas um *locus* nas espécies mais recentes (BROCKTON; HAMMOND; SMITH, 2007; ROSA, 2007).

Entretanto, a composição gênica das crustinas de diferentes crustáceos precisa ainda ser estudada para confirmar estas hipóteses. Até o momento, não se conhece a função deste domínio rico em resíduos de glicina na região N-terminal das crustinas de peneídeos e as possíveis funções serão examinadas abaixo (item 4.5.2).

4.3 Expressão e purificação da *crusFpau2*

4.3.1 Expressão heteróloga da *crusFpau2* em *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Após confirmação da correta construção do plasmídeo de expressão, este foi extraído da bactéria DH5 e utilizado para transformar bactérias próprias para expressão da proteína. Inicialmente foram utilizadas diferentes linhagens de *E. coli* competentes

[BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS e Rosetta (Novagen[®])], em diferentes tempos (4 e 15 h) e temperaturas de indução (20°C e 37°C) (dados não mostrados). Os melhores resultados de expressão foram obtidos com a linhagem BL21(DE3)pLysS, cultivada a 37°C durante 4 h e induzidas com 1 mM de IPTG. Nestas condições, a banda protéica correspondente a *crusFpau2*, visualizada em SDS-PAGE 17%, (17,3 kDa), mostrou-se mais proeminente, tanto no sobrenadante quanto no precipitado celular (Figura 14). Além disso, foi possível observar que a proteína recombinante encontrava-se majoritariamente na fração solúvel.

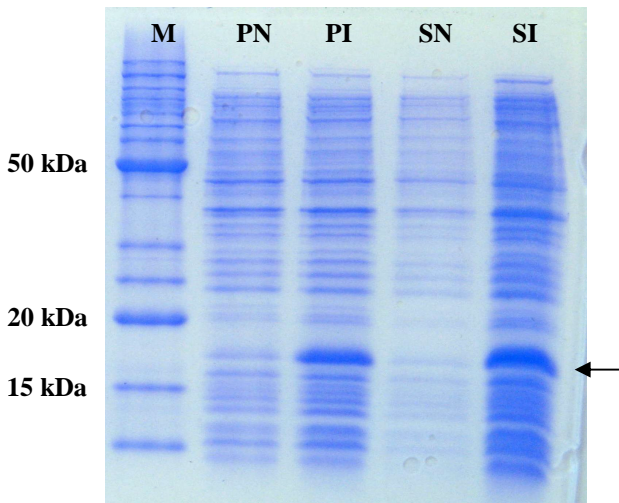


Figura 14: Análise por SDS-PAGE (17%) da expressão da *crusFpau2* recombinante em *E. coli* BL21(DE3)pLysS após indução ou não com IPTG. As bandas referentes à *crusFpau2* estão indicadas pela seta. M: marcador de peso molecular PN: *pellet* da fração insolúvel antes da indução; PI: *pellet* da fração insolúvel após expressão de 4 h a 37°C; SN: sobrenadante da fração solúvel antes da indução SI: sobrenadante da fração solúvel após expressão de 4 h a 37°C.

A expressão da proteína recombinante tanto no precipitado quanto no sobrenadante do lisado bacteriano foi ainda confirmada por Western blot, através da utilização de anticorpos anti-polihistidina que se ligam à cauda *His-tag* das proteínas recombinantes (Figura 15). Os resultados revelaram a presença de duas bandas marcadas com aproximadamente 17 kDa.

4.3.2 Purificação da *rcrusFpau2*

A purificação da proteína recombinante denominada de *rcrusFpau2* baseou-se em métodos de cromatografia de afinidade para íons metálicos imobilizados, devido à adição da cauda de histidina (*His-tag*). Os primeiros ensaios foram realizados utilizando-se a resina de imobilização *Ni-NTA* (QIAGEN), mas o rendimento da eluição da proteína foi muito baixo, uma vez que grande parte da proteína permanecia ligada à resina (dados não apresentados). Melhores resultados foram obtidos utilizando-se uma coluna *His-trap* no sistema *ÄKTA HPLC* (Figura 16). A *rcrusFpau2* foi obtida principalmente nas frações de número 27 a 35. Após a concentração das diferentes eluições a amostra foi liofilizada ou congelada até seu uso.

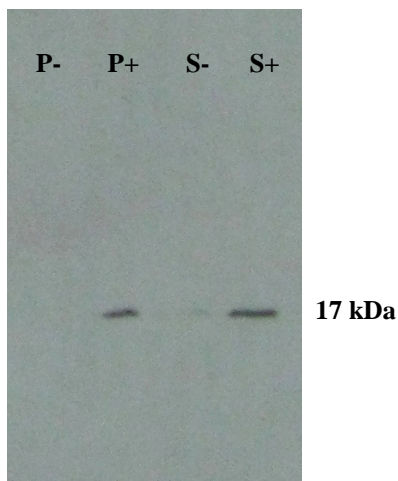


Figura 15: Análise por Western blot, utilizando anticorpos anti-polihistidina, mostrando a presença da *rcrusFpau2* recombinante no sobrenadante e no precipitado da *E. coli* BL21(DE3)plysS contendo o plasmídeo pET-*rcrusFpau2* na altura correspondente a aproximadamente 17 kDa. P-: *pellet* com o plasmídeo pET-14b sem o inserto (controle negativo); P+: *pellet* com o plasmídeo pET-*rcrusFpau2*; S-: sobrenadante da fração solúvel com o plasmídeo pET-14b sem o inserto (controle negativo); S+: sobrenadante da fração solúvel com o plasmídeo pET-*rcrusFpau2*.

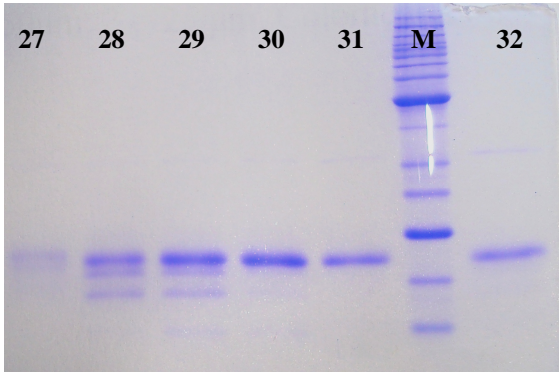


Figura 16: Perfil parcial da purificação de *rcrusFpau2* recombinante pelo sistema ÄKTA HPLC. Análise por SDS-PAGE 17% das frações 27 a 32, referentes aos picos obtidos durante a purificação. M: marcador de peso molecular (10, 15, 20, 25, 30, 40 e 50 kDa, sendo as bandas de 20 e 50 kDa as mais proeminentes).

4.4 Atividade antimicrobiana

O potencial antimicrobiano da *rcrusFpau2* foi inicialmente avaliado através de ensaios convencionais de inibição de crescimento bacteriano em microplacas incubando-se diferentes bactérias Gram positivas (*Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*) e Gram negativas (*Enterobacter* sp., *Escherichia coli* e *Vibrio harveyi*) com diferentes concentrações (0,78 -100 μ M) da proteína recombinante liofilizada (liofilizador L101 da Liotop[®]). No entanto, os resultados mostraram-se pouco conclusivos. Estes resultados derivaram provavelmente da dificuldade da crustina recombinante em atingir sua conformação estrutural apropriada, haja visto as muitas pontes dissulfeto que esta molécula deve formar. Por outro lado, várias crustinas expressas em sistemas heterólogos, de modo semelhante a este estudo, apresentaram atividade antimicrobiana em graus variados (AMPARYUP et al., 2008; AMPARYUP; DONPUDSAA; TASSANAKAJONA, 2008; JIA et al., 2008; SUPUNGUL et al., 2008; VATANAVICHARN et al., 2009; SUN et al., 2010). Na maioria dos trabalhos, porém, as crustinas foram purificadas da fração insolúvel das bactérias (corpos de inclusão) e para tal passaram por processos de desnaturação e renaturação. Já a *rcrusFpau2* foi purificada a partir da fração solúvel do lisado bacteriano, o que deveria diminuir a probabilidade de uma desnaturação da proteína.

A baixa atividade da *rcrusFpau2* poderia ainda ser devida ao processo de liofilização, que poderia ter interferido na formação das pontes dissulfeto, provavelmente essenciais para a atividade deste peptídeo e para sua resistência à proteólise. No entanto, a crustina I de *F. chinensis* também obtida a partir da fração solúvel da bactéria de expressão e posteriormente liofilizada apresentou atividade antimicrobiana (ZHANG et al., 2007).

Existe uma evidente correlação entre a estrutura de peptídeos e sua atividade, especialmente no que se refere à atividade antimicrobiana. Vários trabalhos mostram a importância da formação das pontes dissulfeto na estrutura de PAMs e sua influência nas características bioquímicas (hidrofobicidade e propriedade anfipática) e conseqüentemente, em sua atividade funcional, principalmente seu efeito antimicrobiano (AHN et al., 2006; LUDERS et al., 2005). Foi mostrado, por exemplo, que as duas pontes dissulfeto presentes na extremidade C-terminal da gomesina, um PAM produzido pela aranha *Acanthoscurria gomesiana*, são essenciais para sua atividade antimicrobiana (SILVA, 2000). A perda de uma ou das duas pontes dissulfeto provocam a diminuição da atividade microbiana e hemolítica deste peptídeo além de reduzir sua estabilidade (FAZIO et al., 2006). IMAMURA et al. (2008) referem por sua vez que as pontes dissulfeto não são apenas indispensáveis para a atividade antimicrobiana dos PAMs, como também para a especificidade de ação contra diferentes tipos de bactérias. Por outro lado, foi também demonstrado que as pontes dissulfeto de alguns PAMs, não são essenciais, uma vez que sua redução não acarreta uma perda de atividade. A defensina de coelho é um exemplo deste caso, uma vez que após redução, sua atividade torna-se ainda mais potente (AHN et al., 2006). Já a bacterenecina de neutrófilos bovinos, aumenta sua atividade contra bactérias Gram positivas, após redução das pontes dissulfeto, mas diminui seu efeito contra as Gram negativas (WU; HANCOCK, 1999).

Frente a estas evidências, a atividade antimicrobiana da *rcrusFpau2* foi avaliada através de um método alternativo por sobreposição de gel, utilizando-se a bactéria Gram positiva *M. luteus* e a crustina recombinante purificada antes ou após sua liofilização. Neste método, a proteína sofre desnaturação devido à presença de uma alta concentração de uréia e em seguida permite-se sua renaturação por ocasião de sua retirada através de eletroforese em gel de acrilamida (item 3.4). Interessantemente, os resultados deste ensaio mostraram que apenas a *rcrusFpau2* purificada não liofilizada, apresentou uma evidente atividade inibitória (halo de inibição) para o crescimento de *M. luteus*

(Figura 17). Já a crustina liofilizada mostrou-se inativa, corroborando a hipótese de que o processo de liofilização possa ter interferido no dobramento correto da proteína.

Além da atividade antimicrobiana, as proteínas com assinatura WAP podem estar adicionalmente envolvidas em outras funções do sistema imunológico de crustáceos, como na inibição de proteases endógenas, presentes em muitas cascatas imunológicas, e também de proteases exógenas provenientes dos microorganismos invasores. A atividade anti-proteásica foi mostrada no caso do SWD de *F. chinensis* (JIA et al. 2008) e da SWD-Pm2 de *P. monodon* (AMPARYUP et al., 2008). Ambas as moléculas mostraram uma atividade inibitória contra a protease subtilisina além de atividade contra bactérias Gram positivas. No entanto, nenhum estudo confirmou até o momento se a propriedade anti-proteásica ocorre também nos outros subgrupos de WDPs ou se essas proteínas possuem ainda algum papel regulatório endógeno, atuando em algumas vias imunológicas de crustáceos, como por exemplo, na regulação do sistema pró-fenoxidase.

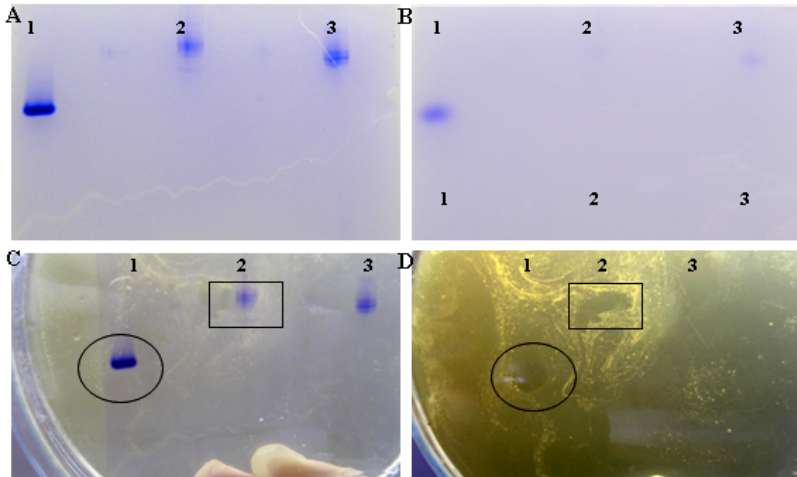


Figura 17: Atividade antimicrobiana da rcrusFpau2 contra *M. luteus* pelo ensaio de sobreposição de gel. A: gel de acrilamida corado com azul de coomassie mostrando a lisozima (1), a rcrusFpau2 purificada (2) e a rcrusFpau2 liofilizada (3). B: gel de acrilamida contendo as mesmas amostras que o gel A, mas corado apenas após transferência das proteínas para o meio de cultura contendo as bactérias. Pode-se notar as bandas protéicas mais fracas (1) ou inexistentes (2,3) devido à transferência das proteínas para o meio de cultura. C: sobreposição do gel sobre a placa de petri mostrando a localização

das bandas protéicas. D: placa de petri com *M. luteus* crescendo em meio sólido, apresentando dois halos de inibição correspondentes a posição das bandas protéicas. O círculo mostra a lisozima (controle positivo) e o retângulo a rcrus*Fpau2* purificada. A rcrus*Fpau2* liofilizada não foi capaz de gerar um halo de inibição do crescimento bacteriano.

As WDPs de peneídeos são moléculas catiônicas, mas seu ponto isoelétrico teórico ($pI < 8,5$) é inferior a outras classes de PAM de crustáceos (DESTOUMIEUX et al., 1997; HERBINIÈRE et al., 2005). Este fato pode explicar o porquê destas moléculas apresentarem uma atividade antimicrobiana mais reduzida e de mais restrito espectro do que as outras famílias de PAMs. Efetivamente, peptídeos fortemente catiônicos interagem mais facilmente com as membranas de microorganismos, devido à sua grande afinidade por fosfolipídios aniônicos comumente encontrados nestas membranas. Por outro lado, a abundância de transcritos para crustina nos hemócitos de crustáceos sugere que estas moléculas possam ter funções adicionais. Nos peneídeos *L. setiferus* e *L. vannamei*, as crustinas representam respectivamente 4 e 9% dos transcritos dos hemócitos (GROSS et al. 2001) e em *P. monodon* representam cerca de 26% dos PAMs expressos em seus hemócitos (SUPUNGUL et al., 2004).

Cabe ainda salientar, que em vários grupos de animais, como moluscos, peixes, sapos, mamíferos e humanos, foi mostrada a co-localização de alguns peptídeos antimicrobianos em diferentes tecidos e tipos celulares com evidências de atividade sinérgica entre eles, o que expandiria a resposta de defesa do hospedeiro durante as infecções (GUEGUEN et al., 2009). Deste modo, as crustinas poderiam talvez atuar em sinergismo com outros PAMs e otimizar a defesa contra um amplo espectro de microorganismos. A demonstração da co-localização e co-atividade da crustina com outros PAMs poderia auxiliar a melhor compreender a eficiência das respostas antimicrobianas contra uma ampla variedade de microorganismos.

4.5 Imunolocalização de crustinas

4.5.1 Imunolocalização das crustinas nos hemócitos

Até o momento, os relatos existentes sobre as crustinas referem-se basicamente à presença de transcritos gênicos codificando para estas proteínas nos hemócitos de crustáceos, mas nada se sabe a respeito da real presença das proteínas correspondentes, ou qual a população de hemócitos que as produz. Desconhece-se ainda se estas proteínas são armazenadas em grânulos como ocorre com as peneíginas (DESTOUMIEUX et al., 2000; BARRACCO et al., 2005) e os ALFs

(SOMBOONWIWAT et al., 2005). Para esclarecer estes pontos, foram produzidos anticorpos policlonais anti-rcrus*Fpau2* em camundongos e estes se mostraram monoespecíficos para a proteína recombinante. Os anticorpos foram então utilizados para imunolocalizar as crustinas nos hemócitos de *F. paulensis* inicialmente. Os ensaios foram realizados em monocamadas de hemócitos em lamínulas de vidro incubadas com o soro anti-rcrus*Fpau2* (1:400). Apenas os hemócitos granulares (HGs) reagiram positivamente aos anticorpos, confirmando a presença de crustinas apenas neste tipo celular (Figura 18, C e E). A reação positiva restringiu-se basicamente aos grânulos dos HGs, mas nem todos os grânulos ou todos os HGs mostraram-se reativos ao anticorpo (Figura 18, E).

Estes resultados sugerem que as crustinas nativas de *F. paulensis* não estejam presentes em todos os HGs e/ou em todos os grânulos, que podem armazenar ainda outras famílias de PAMs e várias outras moléculas imunoefetoras. Cabe ressaltar que os HGs são as principais células imunoefetoras de crustáceos, estando envolvidas em diferentes processos imunológicos como a fagocitose, encapsulamento, a produção das moléculas do sistema pró-fenoxidase e de PAMs. Já, os hemócitos hialinos (HHs) mostraram-se sempre totalmente negativos aos anticorpos (Figura 18, C e E), sugerindo a ausência de crustinas. Como esperado, o soro pré-imune dos camundongos (controle negativo) não gerou reações positivas em nenhuma classe de hemócitos, confirmando a especificidade da reação (Figura 18, A).

A presença de crustinas foi investigada também por imunolocalização nos hemócitos de outros invertebrados aquáticos. Para tal, foram selecionados o peneídeo *L. vannamei* (antisoro diluído a 1:200), o camarão de água-doce *Macrobrachium potiuma* (antisoro diluído a 1:50), o caranguejo *Callinectes sapidus* (antisoro diluído a 1:10) e o mexilhão *Perna perna* (Figura 19). O antisoro anti-rcrus*Fpau2* reagiu positivamente com os hemócitos de todos os crustáceos, embora em concentrações diferentes, mas não mostrou reatividade alguma com as células do mexilhão *P. perna*. Também nos outros crustáceos, as crustinas foram encontradas apenas nos hemócitos granulares, mais especificamente em seus grânulos (Figura 19, A, C e E). Estes resultados confirmam a ampla distribuição de crustinas em diferentes grupos de crustáceos e sua homologia com a crustina de *F. paulensis*. A inexistência de marcação nos hemócitos do mexilhão *P. perna* reforça o fato das crustinas serem proteínas específicas do grupo dos crustáceos, fazendo jus à denominação *crustina*. Nossos resultados indicam ainda que os anticorpos anti-rcrus*Fpau2* constituem, uma

ferramenta imunomarcadora, capaz de identificar especificamente os HGs de crustáceos.

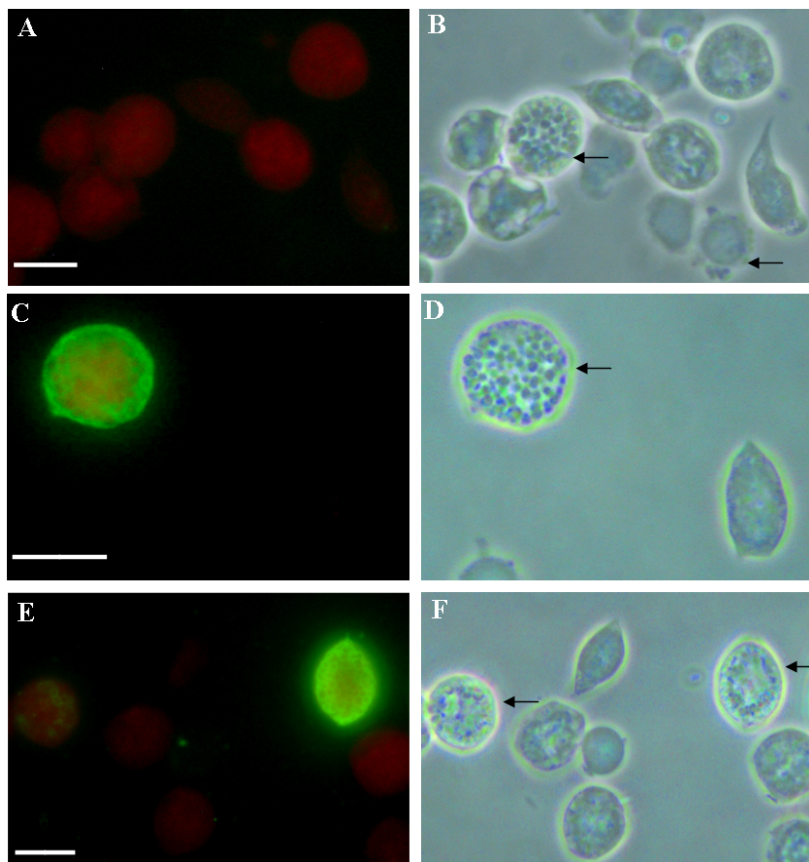


Figura 18: Imunolocalização de crustinas nos hemócitos de *F. paulensis* A: soro pré-imune (controle negativo), C e E: anti-rCrusFpau2 (1:400). B, D e F correspondem as células observadas em A, C e E respectivamente, vistas ao microscópio de contraste de fase. Setas indicam hemócitos granulares (HG). Barra: 10 μ m.

A localização das crustinas nos grânulos dos hemócitos sugere que estas proteínas não sejam constitutivamente secretadas para o plasma após sua síntese, mas ficam armazenadas nestes grânulos, provavelmente até o momento de uso durante as infecções. No camarão *L. vannamei* as três famílias das peneidinas (peneidinas 1, 2 e 3)

também são produzidas constitutivamente e armazenadas nos grânulos dos HGs e presume-se que durante as infecções estas células migrem para o local da injúria e liberem os peptídeos para o plasma, onde atuarão extracelularmente contra os microorganismos invasores (BACHÉRE et al., 2004). Foi demonstrado ainda que os níveis de mRNA que codifica para peneidinas diminuem nos hemócitos circulantes imediatamente após um desafio bacteriano, mas paralelamente ocorre um aumento da concentração de peneidinas no plasma, devido à sua liberação pelos grânulos dos hemócitos (DESTOUMIEUX et al., 2000; KANG et al., 2004). Através de imunomarcacão e hibridizacão *in situ* foi também constatada a presença de ALF nos grânulos dos hemócitos e os autores sugeriram que seu modo de armazenamento e liberaçao devia ser semelhante ao das peneidinas (LIU et al., 2005; SOMBOONWIWAT et al., 2005). Este mesmo modo de açao poderia ocorrer também para as crustinas, que seriam liberadas dos grânulos dos hemócitos apenas diante de uma infecçao. Contudo, nada se sabe a este respeito até o momento.

Os diferentes PAMs podem ainda ser utilizados intracelularmente para a destruicão de bactérias e outros microorganismos após sua fagocitose pelos hemócitos. Esta propriedade foi constatada no mexilhão *Mytilus galloprovincialis*, onde, por imunomarcacão, foi mostrado que as mitilinas eram liberadas para dentro dos fagossomos (MITTA et al., 2000). Já em *L. vannamei*, foi demonstrado que quando os hemócitos eram incubados *in vitro* com víbrios, os HHs eram as principais células fagocitárias, embora os HGs que continham peneidinas (imunomarcacão) também eram capazes de fagocitar as bactérias em menor escala. No entanto, os autores não obtiveram nenhuma evidência da liberaçao do conteúdo dos grânulos positivos para peneidina nos fagossomos contendo bactérias (MUNÓZ et al., 2002), como ocorre em *M. galloprovincialis*. Não existem ainda estudos deste tipo de atuação com as crustinas e seria interessante investigar se estes peptídeos funcionam intra ou extracelularmente ou em ambas as situações.

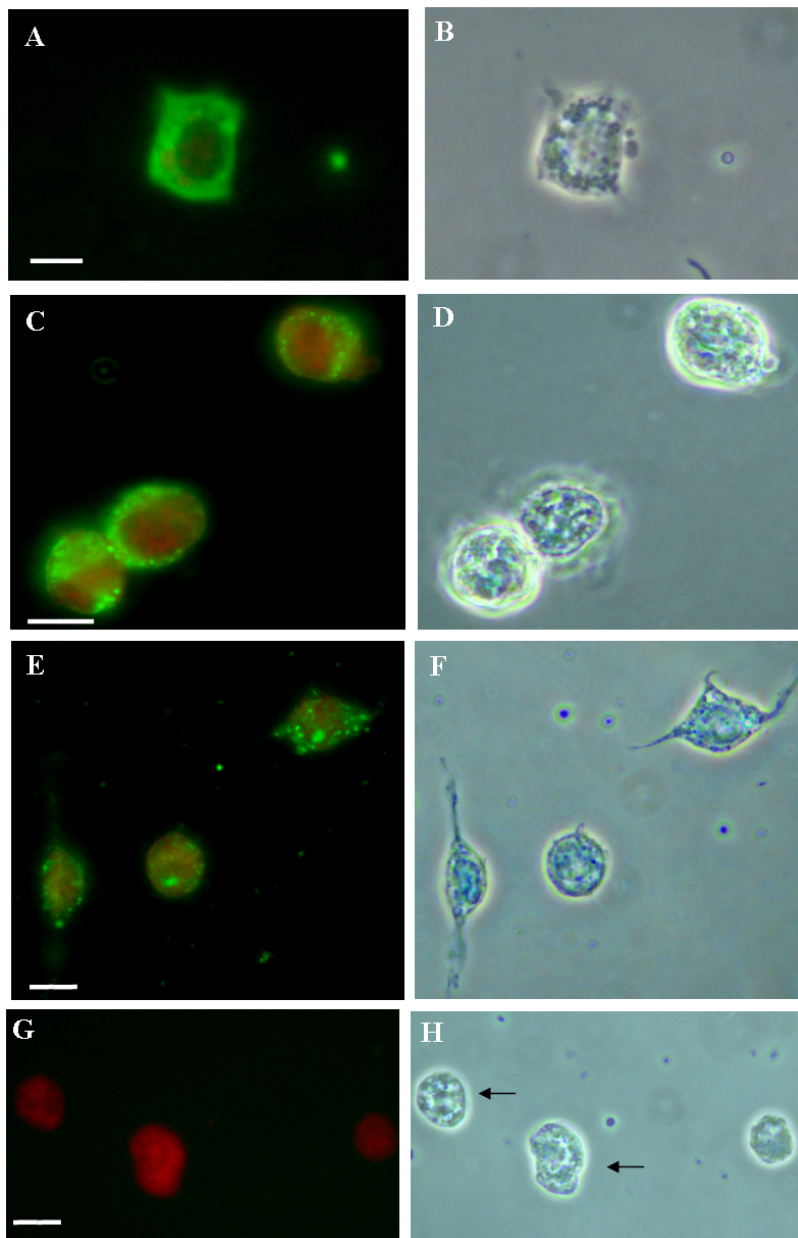


Figura 19: Imunolocalização de crustáceos nos hemócitos de diferentes invertebrados aquáticos. A: hemócitos de *L. vannamei*; C: hemócitos de *M.*

potiuna; E: hemócitos de *C. sapidus*; G: hemócitos de *P. perna* (1:10). B, D, F, H: correspondem as células observadas em A, C, E e G respectivamente observadas no microscópio de contraste de fase. Setas indicam hemócitos granulares (HG). Barra: 10 μ m.

4.5.2 Presença de crustinas em diferentes frações da hemolinfa

A existência de uma região rica em glicina na extremidade N-terminal das crustinas de peneídeos, como ressaltado anteriormente, atraiu a atenção de pesquisadores, uma vez que esta região é naturalmente hidrofóbica. Bartlett e colaboradores (2002) levantaram algumas hipóteses a respeito de algumas possíveis funções desta região da molécula. Uma destas refere-se ao fato de que essa região protegeria os hemócitos dos efeitos tóxicos deste PAM antes de sua ativação. Quando as células são estimuladas por um patógeno, estas poderiam clivar a região rica em glicina das crustinas nativas, armazenada em seus grânulos, ativando-as e liberando a proteína funcional no espaço extracelular. Uma segunda hipótese sugere que as crustinas seriam proteínas integrais de membrana, e a região com sequências repetidas de glicina poderia agir como uma âncora dentro da bicamada lipídica da membrana. Finalmente uma última hipótese seria a de que esses peptídeos pudessem ser sintetizados na forma de precursores inativos (pró-peptídeo), sendo essa região removida durante seu processamento. Esta última hipótese, no entanto, é possível descartá-la devido a atividade presente na *rcrusFpau2* e nas outras crustinas de peneídeos produzidas através de sistema recombinante, pois todas elas, derivadas do mRNA dos peneídeos, possuíam a região N-terminal e mesmo assim se mostraram ativas. Logo esta região não teria a função de inativar o PAM como ocorre nos pró-peptídeos, como por exemplo, a gomesina (FUKUZAWA et al., 2008), as defensinas das células de Paneth (GHOSH et al., 2002) e nas catelicidinas de mamíferos (ZANETTI et al., 2000).

Assim, até o presente momento, não há nenhuma evidência concreta a respeito da função específica dessa região da molécula. Estas observações, aliadas ao fato desta região rica em resíduos de glicina não existir nos crustáceos mais recentes como os caranguejos (espécies derivadas), levantou a questão se a crustina nativa madura dos peneídeos perderia esta região durante seu processamento. Para avaliar esta possibilidade, realizamos um ensaio de western blot para estimar a massa molecular da crustina armazenada nos hemócitos e secretada para o plasma de *F. paulensis*, com base no tamanho esperado a partir da sequência obtida do mRNA. Diferenças de tamanho em relação ao

esperado poderiam evidenciar um possível processamento da molécula durante seu armazenamento nos grânulos dos hemócitos e/ou após sua secreção.

A presença de crustinas foi então investigada nas diferentes frações de hemolinfa (hemolinfa total, plasma e lisado de hemócitos ou HLS). A partir destas análises foi possível determinar que a crustina nativa está presente apenas na fração celular (HLS), mas não no plasma ou hemolinfa total (Figura 20). Estes resultados confirmam que a proteína é de fato armazenada nos hemócitos, mas não é naturalmente exocitada para o plasma, pelo menos em concentrações detectáveis. Pode-se especular que as crustinas de *F. paulensis* sejam exocitadas apenas durante infecções, como no caso das peneidinas acima descrito.

No que diz respeito à massa molecular das crustinas nativas em comparação à crustina recombinante, foi possível observar que esta última apresenta uma massa molecular apenas ligeiramente superior à crustina nativa do HLS. Esta pequena diferença deve-se à cauda *His-tag* presente na *rcrusFpau2* que confere um acréscimo de aproximadamente 2,2 kDa na proteína recombinante. Desconsiderando-se a cauda de polihistidina, a crustina nativa e a *rcrusFpau2* teriam assim uma massa molecular muito próxima, o que sugere que a crustina nativa realmente não é processada dentro dos grânulos e que portanto mantém seu domínio rico em glicina na região N-terminal, pelo menos enquanto se encontra armazenada nos grânulos dos hemócitos. Porém, isto não elimina a possibilidade que as crustinas sejam processadas, perdendo-a posteriormente. Deste modo, ainda é possível especular se as crustinas de peneídeos são processadas após (ou durante) sua liberação para o plasma, no momento de uma infecção, como ocorre com a defensina de *M. galloprovincialis* (MITTA et al., 1999) e a StCT1 de escorpião (YUAN et al., 2010) que perdem um pedaço de suas moléculas em sua forma madura ou ainda como outros PAMs que sofrem outros processamentos pós-traducionais, como a drosocina, de *Drosophila melanogaster* (BULET et al., 1993), a astacidina 2, de *P. leniusculus* (JIRAVANICHPAISAL et al., 2007), e as peneidinas, de *L. vannamei* (DESTOUMIEUX et al., 1997). Para esclarecer essa questão seria interessante purificar bioquimicamente uma crustina nativa de peneídeos para analisar se sua forma ativa possui esta região N-terminal rica em glicina, visto que as únicas crustinas purificadas até hoje foram as carcininas de alguns caranguejos e lagostins que carecem desta região.

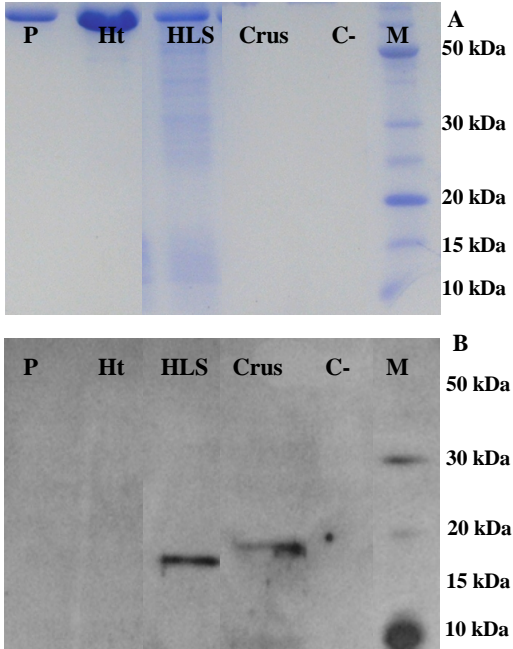


Figura 20: Análise por *western blot* da presença da crustina *crusFpau2* e da sua massa molecular estimada em diferentes frações da hemolinfa de *F. paulensis* utilizando o anticorpo anti-*crusFpau2*. A: Gel de acrilamida 17% corado com azul de coomassie após transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose. B: resultado do Western blot correspondente a migração de proteínas do gel A. P: plasma; Ht: Hemolinfa total; HLS: lisado de hemócitos, Crus: *rcrusFpau2*; C-: controle negativo (HLS de *P. perna*); M: marcador de peso molecular.

Em conclusão, neste estudo foi clonada uma nova isoforma de crustina tipo I no camarão *F. paulensis* que foi denominada de *crusFpau2*. Este clone foi expresso em sistema heterólogo e demonstrou uma atividade antibacteriana contra a bactéria Gram positiva *M. luteus*. A produção de anticorpos policlonais mono-específicos para a crustina recombinante permitiu determinar que esta proteína é produzida de forma constitutiva nos hemócitos granulares deste camarão, sendo armazenada em seus grânulos. Foi ainda possível demonstrar que proteínas homólogas à crustina de *F. paulensis* são também produzidas nos hemócitos de diferentes crustáceos (outros peneídeos, camarões dulcícolas e caranguejos). O anticorpo produzido constitui assim uma

importante ferramenta capaz de reconhecer especificamente os hemócitos granulares de crustáceos. Os resultados obtidos sugerem ainda que a crustina nativa de *F. paulensis* não é processada dentro dos hemócitos e não é naturalmente secretada para o plasma.

6. CONCLUSÕES

- ❖ Foi clonada uma sequência gênica correspondendo a uma nova isoforma de crustina a partir dos hemócitos do camarão *Farfantepenaeus paulensis*, tendo sido depositada no *GenBank*: GU971374.
- ❖ A sequência aminoacídica deduzida da crustina clonada apresentou 94% de homologia com a outra isoforma de crustina já detectada neste peneídeo (*crusFpau*).
- ❖ A sequência aminoacídica deduzida correspondeu a uma crustina I, com 154 resíduos de aminoácidos, incluindo um domínio WAP e apresentou um pI de 8,48.
- ❖ A sequência gênica correspondendo a crustina foi expressa com sucesso em sistema recombinante [*Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS] e purificada e a proteína recombinante foi denominada *rcrusFpau2*.
- ❖ A *rcrusFpau2* apresentou atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram positiva *Micrococcus luteus*.
- ❖ Anticorpos policlonais monoespecíficos produzidos a partir de *rcrusFpau2* permitiram demonstrar que as crustinas nativas ocorrem apenas nos hemócitos granulares (grânulos) de *F. paulensis*, mas não em todos os hemócitos granulares.
- ❖ Os anticorpos policlonais mostraram ainda que crustinas estão também presentes apenas nos hemócitos granulares de outros grupos de crustáceos (peneídeo *Litopenaeus vannamei*, camarão dulcícola *Macrobrachium potiana*, e caranguejo *Callinectes sapidus*).
- ❖ O anticorpo produzido revelou-se assim uma importante ferramenta capaz de reconhecer especificamente os hemócitos granulares de crustáceos.
- ❖ As crustinas nativas foram imunolocalizadas apenas nas células, mas não no plasma de *F. paulensis* (western blot), indicando que estas proteínas não são secretadas constitutivamente para o plasma.
- ❖ A massa molecular da crustina nativa (dos hemócitos) mostrou-se muito semelhante à crustina recombinante, sugerindo que a crustina nativa não é processada enquanto dentro dos hemócitos.

REFERÊNCIAS

- AHN, H.S.; CHO, W.; KANG, S.H.; KO, S.S.; PARK, M.S.; CHO, H.; LEE, K.H. Design and synthesis of novel antimicrobial peptides on the basis of alpha helical domain of Teneclin 1, an insect defensin protein, and structure-activity relationship study. **Peptides**, v. 27, p. 640-8, 2006.
- ALVAREZ, R.; READING, J.; KING, D.F.L.; HAYES, M.; EASTERBROOK, P.; RESSLER, S.; YANG, F.; ROWLEY, D.; VYAKARNAM, A. WFDC1/ps20 is a novel innate immunomodulatory signature protein of HIV permissive CD4+ CD45RO+ memory T-cells that promotes infection by up-regulating CD54 integrin expression and is elevated in HIV-1 infection. **Journal of virology**, v. 82, p. 471-486, 2008.
- AMPARYUP, P.; DONPUDSA, S.; TASSANAKAJON, A. Shrimp single WAP domain (SWD)-containing protein exhibits proteinase inhibitory and antimicrobial activities. **Developmental and comparative immunology**, v. 32, p. 1497-509, 2008.
- AMPARYUP, P.; KONDO, H.; HIRONO, I.; AOKI, T.; TASSANAKAJON, A. Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Molecular immunology**, v. 45, p. 1085-93, 2008.
- ANTONY, S.P.; BRIGHT SINGH, I.S.; PHILIP, R. Molecular characterization of a crustin-like, putative antimicrobial peptide, Fi-crustin, from the Indian white shrimp, *Fenneropenaeus indicus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 28, p. 216-20, 2010.
- ASHRAFUZZAMAN, M.; ANDERSEN, O.S.; McELHANEY, R.N. The antimicrobial peptide gramicidin S permeabilizes phospholipid bilayer membranes without forming discrete ion channels. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1778, p. 2814-22, 2008.
- BACHÈRE, E.; GUEGUEN, Y.; GONZALEZ, M.; de LORGERIL, J.; GARNIER, J.; ROMESTAND, B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological reviews**, v. 198, p. 149-68, 2004.
- BARRACCO, M.A.; DE LORGERIL, J.; GUEGUEN, Y.; BACHÈRE, E. Molecular characterization of penaeidins from two Atlantic Brazilian shrimp species, *Farfantepenaeus paulensis* and *Litopenaeus schmitti*. **FEMS microbiology letters**, v. 250, p. 117-20, 2005.
- BARRACCO, M.A.; PERAZZOLO, L.M.; ROSA, R.D. 2008. **Immunologia en camarones** - Capítulo 6. In: MORALES, V e CUELLAR-ANGEL J. (eds). *Guía Práctica de Inmunología y Patología del Camarón*. Ed. CYTED, p. 169 – 224.
- BARTLETT, T.C.; CUTHBERTSON, B.J.; SHEPARD, E.F.; CHAPMAN, R.W.; GROSS, P.S.; WARR, G.W. Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. **Marine Biotechnology**, v. 4, p. 278-93, 2002.

- BATTISON, A.L.; SUMMERFIELD, R.; PATRZYKAT, A. Isolation and characterisation of two antimicrobial peptides from haemocytes of the American lobster *Homarus americanus*. **Fish and shellfish immunology**, v. 25, p. 181-7, 2008.
- BAUCHAU, A.G. 1981. **Crustaceans**. In: RATCLIFFE, N.A.; ROWLEY, A.F. (eds.) Invertebrate Blood Cells. v. 2. Academic Press Inc. p. 385-420.
- BERGMANN, W.; BURKE, D.C. Contributions to the study of marine products. **Journal of Organic Chemistry**, v. 20, p. 1501-7, 1955.
- BOMAN, H.G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. **Journal of internal medicine**, v. 254, p. 197-215, 2003.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BROCKTON, V.; HAMMOND, J.A.; SMITH, V.J. Gene characterization, isoforms and recombinant expression of carcinin, an antibacterial protein from the shore crab, *Carcinus maenas*. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 943-9, 2007.
- BROCKTON, V.; SMITH, V.J. Crustin expression following bacterial injection and temperature change in the shore crab, *Carcinus maenas*. **Developmental and comparative immunology**, v. 3, p.1027-33, 2008.
- BROGDEN, K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature reviews**, v. 3, p. 238-50, 2005.
- BROWN, K.L.; HANCOCK, R.E. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Current opinion in immunology**, v. 18, p. 24-30, 2006.
- BU, X.J.; DU, X.J.; ZHOU, W.J.; ZHAO, X.F.; WANG, J.X. Molecular cloning, recombinant expression, and characterization of lysozyme from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. **Chinese journal of biotechnology**, v. 24, p. 723-32, 2008.
- BULET, P.; DIMARCO, J.L.; HETRU, C.; LAGUEUX, M.; CHARLET, M.; HEGY, G.; VAN DORSSELAER, A.; HOFFMANN, J.A. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, p. 14893-7, 1993.
- BULET P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 169-184, 2004.
- BURGE, E.J.; MADIGAN, D.J.; BURNETT, L.E.; BURNETT, K.G. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 22, p. 327-39, 2007.
- CHRISTIE, A.E.; RUSC, S.; GOINEY, C.C.; SMITH, C.M.; TOWLE, D.W.; DICKINSON, P.S. Identification and characterization of a cDNA encoding a crustin-like, putative antibacterial protein from the American lobster *Homarus americanus*. **Molecular immunology**, v. 44, p. 3333-7, 2007.
- CUTHBERTSON, B.J.; BÜLLESBACH, E.E.; FIEVET, J.; BACHÈRE, E.; GROSS, P.S. A new class (penaeidin class 4) of antimicrobial peptides from the Atlantic white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) exhibits target specificity and

- an independent proline-rich-domain function. **The Biochemical journal**, v. 381, p. 79-86, 2004.
- CUTHBERTSON, B.J.; DETERDING, L.J.; WILLIAMS, J.G.; TOMER, K.B.; ETIENNE, K.; BLACKSHEAR, P.J.; BÜLLESBACH, E.E.; GROSS, P.S. Diversity in penaeidin antimicrobial peptide form and function. **Developmental and comparative immunology**, v. 32, p.167-81, 2008.
- DAFFRE, S.; MIRANDA, A.; MIRANDA, M.T.M.; BULET, P.; SILVA, P.T.; MACHADO, A.; FOGAÇA, A.C.; LORENZINI, D.M.; PEREIRA, L.S.; FÁZIO, M.A.; ESTEVES, E.; BURGIERMAN, M.R. Peptídeos antimicrobianos produzidos por aracnídeos. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 23, p. 48-55, 2001.
- de LORGERIL, J.; GUEGUEN, Y.; GOARANT, C.; GOYARD, E., MUGNIER, C.; FIEVET, J.; PIQUEMAL, D.; BACHÈRE, E. A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. **Molecular immunology**, v. 45, p. 3438-47, 2008.
- de SOUZA, M.V. Promising candidates in clinical trials against multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) based on natural products. **Fitoterapia**, v. 80, p. 453-60, 2009.
- DeLEO, F.R.; CHAMBERS, H.F. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, p. 2464-74, 2009.
- DESTOUMIEUX, D.; BULET, P.; LOEW, D.; VAN DORSSELAER, A.; RODRIGUEZ, J.; BACHÈRE, E. Penaeidins: A new family of antimicrobial peptides in the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 28398-406, 1997.
- DESTOUMIEUX, D.; BULET, P.; STRUB, J.M.; BACHÈRE, E. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. **European Journal of Biochemistry**, v. 266, p. 335-46, 1999.
- DESTOUMIEUX, D.; MUÑOZ, M.; BULET, P.; BACHÈRE, E. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). **Cellular and molecular life sciences**, v. 57, p. 1260-71, 2000.
- DESTOUMIEUX-GARZON, D.; SAULNIER, D.; GARNIER, J.; JOUFFREY, C.; BULET, P.; BACHÈRE, E. Crustacean immunity. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 47070-7, 2001.
- DUBENDORFF, J.W.; STUDIER, F.W. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. **Journal of molecular biology**, v. 219, p; 45-59, 1991a.
- DUBENDORFF, J.W.; STUDIER, F.W. Creation of a T7 autogene. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase under control of its cognate promoter. **Journal of molecular biology**, v. 219, p. 61-8, 1991b.
- FAO, Estatísticas da Produção Mundial de Pescado em 2008 – FISHSTAT, ROMA, 2009 Disponível em <<http://www.fao.org.br>>. Acesso em 15/01/2010.

- FAZIO, M. A.; OLIVEIRA, V. X.; BULET, P.; MIRANDA, M. T.; DAFFRE, S.; MIRANDA, A. Structure-activity relationship studies of gomesin: importance of the disulfide bridges for conformation, bioactivities, and serum stability. **Biopolymers**, v. 84, p. 205-18, 2006.
- FISCHBACH, M.A.; WALSH, C.T. Antibiotics for emerging pathogens. **Science**, v. 325, p. 1089-93, 2009.
- FLEMING, L.E.; BROAD, K.; CLEMENT, A.; DEWAILLY, E.; ELMIR, S.; KNAP, A.; POMPONI, S.A.; SMITH, S.; SOLO GABRIELE, H.; WALSH, P. Oceans and human health: Emerging public health risks in the marine environment. **Marine pollution bulletin**, v. 53, p. 545-60, 2006.
- FUKUZAWA, A.H.; VELLUTINI, B.C.; LORENZINI, D.M.; SILVA, P.IJR.; MORTARA, R.A.; DA SILVA, J.M.; DAFFRE, S. The role of hemocytes in the immunity of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Developmental and comparative immunology**, v.32, p. 716-25, 2008.
- GASTEIGER, E.; GATTIKER, A.; HOOGLAND, C.; IVANYI, I.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 3784-3788, 2003.
- GHOSH, D.; PORTER, E.; SHEN, B.; LEE, S.K.; WILK, D.; DRAZBA, J.; YADAV, S. P.; CRABB, J. W.; GANZ, T.; BEVINS, C. L. Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. **Nature immunology**, v. 3, p. 583-90, 2002.
- GIULIANI, A.; PIRRI, G.; BOZZI, A.; DI GIULIO, A.; ASCHI, M.; RINALDI, A.C. Antimicrobial peptides: natural templates for synthetic membrane-active compounds. **Cellular and molecular life sciences**, v. 65, p.2450-60, 2008.
- GRANJA, C.B.; VIDAL, O.M.; PARRA, G.; SALAZAR, M. Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 68, p. 175–180, 2006.
- GROSS, P.S.; BARTLETT, T.C.; BROWDY, C.L.; CHAPMAN, R.W.; WARR, G.W. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, p. 565-577, 2001.
- GUEGUEN, Y.; ROMESTAND, B.; FIEVET, J.; SCHMITT, P.; DESTOUMIEUX-HAEFNER, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug discovery today**, v. 8, p. 536-44, 2003.
- GUEGUEN, Y.; GARNIER, J.; ROBERT, L.; LEFRANC, M.P.; MOUGENOT, I.S.; de LORGERIL, J.; JANECH, M.; GROSS, P.S.; WARR, G.W.; CUTHBERTSON, B.J.; BARRACCO, M.A.; BULET, P.; AUMELAS, A.; YANG, Y.; BO, D.; XIANG, J.; TASSANAKAJON, A.; PIQUEMAL, D.; BACHÈRE, E. PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: sequence-based classification and recommended nomenclature. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 30, p. 283-288, 2006.

- GUEGUEN, Y.; ROMESTAND, B.; FIEVET, J.; SCHMITT, P.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; VANDENBULCKE, F.; BULET, P.; BACHÈRE, E. Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin. **Molecular Immunology**, v. 46, p. 516-22, 2009.
- HAGIWARA, K.; KIKUCHI, T.; ENDO, Y.; USUI, K.; TAKAHASHI, M.; SHIBATA, N.; KUSAKABE, T.; XIN, H.; HOSHI, S.; MIKI, M.; INOOKA, N.; TOKUE, Y.; NUKIWA, T. Mouse SWAM1 and SWAM2 are antibacterial proteins composed of a single whey acidic protein motif. **Journal of Immunology**, v. 170, p. 1973-1979, 2003.
- HALE, J.D.; HANCOCK, R.E. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 5, p. 951-9, 2007.
- HANCOCK, R.E.; SAHL, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature biotechnology**, v. 24, p. 1551-7, 2006.
- HAUTON, C.; BROCKTON, V.; SMITH, V.J. Cloning of a crustin-like, single whey-acidic-domain, antibacterial peptide from the haemocytes of the European lobster, *Homarus gammarus*, and its response to infection with bacteria. **Molecular Immunology**, v. 43, p. 1490-6, 2006.
- HERBINIÈRE, J.; BRAQUART-VARNIER, C.; GRÈVE, P.; STRUB, J.M.; FRÈRE, J.; VAN DORSSELAER, A.; MARTIN, G. Armadillidin: a novel glycine-rich antibacterial peptide directed against gram-positive bacteria in the woodlouse *Armadillidium vulgare* (Terrestrial Isopod, Crustacean). **Developmental and comparative immunology**, v. 29, p. 489-99, 2005.
- HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAKI, H.; KAWASAKI, S.; HOSODA, Y.; HORI, S. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **Lancet**, v. 350, p. 1670-3, 1997.
- HOSE, J.E.; MARTIN, G.G.; GERARD, A.S. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. **Biological Bulletin**, v. 178, p. 33-45, 1990.
- IMAMURA, T.; YAMAMOTO, N.; TAMURA, A.; MURABAYASHI, S.; HASHIMOTO, S.; SHIMADA, H.; TAGUCHI, S. NMR based structure-activity relationship analysis of an antimicrobial peptide, thanatin, engineered by site-specific chemical modification: Activity improvement and spectrum alteration. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 369, p. 609-15, 2008.
- IMJONGJIRAK, C.; AMPARYUP, P.; TASSANAKAJON, A.; SITTIPRANEED, S. Molecular cloning and characterization of crustin from mud crab *Scylla paramamosain*. **Molecular biology reports**, v. 36, p. 841-50, 2009.
- JENSEN, P.R.; MINCER, T.J.; FENICAL, W. The true potential of the marine microorganism. **Current Drug Discovery**, p. 17-9, 2003.

- JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R.E. Peptide antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, p. 491-511, 2006.
- JIA, Y.P.; SUN, Y.D.; WANG, Z.H.; WANG, Q.; WANG, X.W.; ZHAO, X.F. A single whey acidic protein domain (SWD)-containing peptide from fleshy prawn with antimicrobial and proteinase inhibitory activities. **Aquaculture**, v. 284, p. 246-59, 2008.
- JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, S.Y.; KIM, Y.A.; ANDREN, T.; SÖDERHÄLL, I. Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: characterization and expression pattern. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 31, p. 441-55, 2007.
- KANG, C.J.; WANG, J.X.; ZHAO, X.F.; YANG, X.M.; SHAO, H.L.; XIANG, J.H. Molecular cloning and expression analysis of Chpenaeidin, an antimicrobial peptide from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 16, p. 513-25, 2004.
- KANG, C.J.; XUE, J.F.; LIU, N.; ZHAO, X.F.; WANG, J.X. Characterization and expression of a new subfamily member of penaeidin antimicrobial peptides (penaeidin 5) from *Fenneropenaeus chinensis*. **Molecular immunology**, v. 44, p. 1535-43, 2007.
- KERR, R.G.; KERR, S.S. Marine natural products as therapeutic agents. **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 9, p. 1207-22, 1999.
- KHOO, L.; ROBINETTE, D.W.; NOGA, E.J. Callinectin, an antibacterial peptide from blue crab, *Callinectes sapidus*, hemocytes. **Marine Biotechnology**, v. 1, p. 44-51, 1999.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEE, S.Y.; LEE, B.L.; SÖDERHÄLL, K. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 7927-33, 2003.
- LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annual review of immunology**, v. 25, p. 697-743, 2007.
- LIU, F.; LIU, Y.; LI, F.; DONG, B.; XIANG, J. Molecular cloning and expression profile of putative antilipoplysaccharide factor in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). **Marine Biotechnology**, v. 7, p. 600-608, 2005.
- LOONGYAI, W.; AVARRE, J.C.; CERUTTI, M.; LUBZENS, E.; CHOTIGEAT, W. Isolation and functional characterization of a new shrimp ovarian peritrophin with antimicrobial activity from *Fenneropenaeus merguensis*. **Marine Biotechnology**, v. 9, p. 624-37, 2007.
- LORENZINI, D.M.; FUKUZAWA, A.H.; SILVA, P.I.Jr.; MACHADO-SANTELLI, G.; BIJOVSKY, A.T.; DAFFRE, S. Molecular cloning, expression analysis and cellular localization of gomesin, an anti-microbial peptide from hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, p. 1011-16, 2003a.
- LORENZINI, D.M.; SILVA, P.I.Jr.; FOGAÇA, A.C.; BULET, P.; DAFFRE, S. Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively

- expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 27, p. 781-91, 2003b.
- LUDERS, G.A.; BIRKEMO, J.; NISSEN-MEYER, O.; ANDERSEN; NES, I.F. Proline conformation-dependent antimicrobial activity of a proline-rich histone h1 N-terminal peptide fragment isolated from the skin mucus of Atlantic salmon. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, p. 2399–406, 2005.
- MADRID, R.M. A crise econômica da carcinicultura. **Panorama da Aquicultura**, v. 90, p.30-32, 2005.
- MATSUZAKI, K.; SUGISHITA, K.I.; HARADA, M.; FUJII, N.; MIYAAJIMA, K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram negative bacteria. **Biochimica et biophysica acta**, v.1327, p.119-30, 1997.
- MAYER, A.M.S.; LEHMANN, V.K.B. Marine pharmacology. **Pharmacologist**, v. 42, p. 62-9, 2000.
- McCONNELL, O.J.; LONGLEY, R.E.; KOEHN, F.E. 1994 **The discovery of marine natural products with therapeutic potential**. In: Gullo, V.P. (Ed.), *The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential*. Butterworth-Heinemann, Boston, p. 109–74.
- MENZEL, L.P.; LEE, I.H.; SJOSTRAND, B.; LEHRER, R.I. Immunolocalization of clavansins in *Styela clava* hemocytes. **Developmental and comparative immunology**, v. 26, p. 505-15, 2002.
- MITTA, G.; VANDENBULCKE, F.; NOEL, T.; ROMESTAND, B.; BEAUVILLAIN, J.C.; SALZET, M.; ROCH, P. Differential distribution and defense involvement of antimicrobial peptides in mussel. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 2759-69, 2000.
- MIYATA, T.; TOKUNAGA, F.; YONEYA, T.; YOSHIKAWA, K.; IWANAGA, S.; NIWA, M.; TAKAO, T.; SHIMONISHI, Y. Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. **Journal of biochemistry**, v. 106, p. 663–8, 1989.
- MU, C.; ZHENG, P.; ZHAO, J.; WANG, L.; ZHANG, H.; QIU, L.; GAI, Y.; SONG, L. Molecular characterization and expression of a crustin-like gene from Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. **Developmental and comparative immunology**, v. 34, p. 734-40, 2010.
- MUÑOZ, M.; VANDENBULCKE, F.; SAULNIER, D.; BACHÈRE, E. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 2678-89. 2002
- MUÑOZ, M.; VANDENBULCKE, F.; GARNIER, J.; GUEGUEN, Y.; BULET, P.; SAULNIER, D.; BACHÈRE, E. Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic vibrio. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 961-72, 2004.

- MURAKAMI, T.; NIWA, M.; TOKUNAGA, F.; MIYATA, T.; IWANAGA, S. Direct virus inactivation of tachyplesin-I and its isopeptides from horseshoe crab hemocytes. **Chemotherapy**, v. 37, p. 327–34, 1991.
- NORRBY, S.R.; NORD, C.E.; FINCH, R. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. **The Lancet infectious diseases**, v. 5, p. 115-9, 2005.
- NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. C.; GESTEIRA, T. C. V., Carcinicultura ameaçada: Produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). **Panorama da Aquicultura**, v. 14, p. 37-51, 2004.
- OKUMURA, T. Effects of lipopolysaccharide on gene expression of antimicrobial peptides (penaeidins and crustin), serine proteinase and prophenoloxidase in haemocytes of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 22, p. 68-76, 2007.
- OVERBYE, K.M.; BARRETT, J.F. Antibiotics: where did we go wrong? **Drug discovery today**, v. 10, p. 45-52, 2005.
- PATAT, S.A.; CARNEGIE, R.B.; KINGSBURY, C.; GROSS, P.S.; CHAPMAN, R.; SCHEY, K.L. Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp. **European journal of biochemistry**, v. 271, p. 4825-33, 2004.
- PELÁEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products - can history repeat? **Biochemical pharmacology**, v. 71, p. 981-90, 2006.
- PERRON, G.G.; ZASLOFF, M.; BELL, G. Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. **Proceedings Biological sciences**, v. 273, p. 251-6, 2006.
- PISUTTHARACHAI, D.; FAGUTAO, F.F.; YASUIKE, M.; AONO, H.; YANO, Y.; MURAKAMI, K.; KONDO, H.; AOKI, T.; HIRONO, I. Characterization of crustin antimicrobial proteins from Japanese spiny lobster *Panulirus japonicus*. **Developmental and comparative immunology**, v. 33, p. 1049-54, 2009.
- PORATH, J.; CARLSSON, J.; OLSSON, I.; BELFRAGE, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, v. 258, p. 598-9.
- PROKSCH, P.; EDRADA, R.; EBEL, R. Drugs from the sea – current status and microbiological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 125–34, 2002.
- RACHAKONDA, S.; CARTEE, L. Challenges in antimicrobial drug discovery and the potential of nucleoside antibiotics. **Current medicinal chemistry**, v. 11, p. 775-93, 2004.
- RADEK, K.; GALLO, R. Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system. **Seminars in immunopathology**, v. 29, p. 27-43, 2007.
- RANGANATHAN, S.; SIMPSON, K.J.; SHAW, D.C.; NICHOLAS, K.R. The whey acidic protein family: a new signature motif and three-dimensional

- structure by comparative modeling. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 17, p. 106-13, 1999.
- RATTANACHAI, A.; HIRONO, I.; OHIRA, T.; TAKAHASHI, Y.; AOKI, T. Cloning of kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* crustin-like peptide cDNA and analysis of its expression. **Fisheries Science**, v. 70, p. 765-71, 2004.
- REDDY, K.V.; YEDERY, R.D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International journal of antimicrobial agents**, v. 24, p. 536-47, 2004.
- RELIF, J.M.; CHISHOLM, J.R.; KEMP, G.D.; SMITH, V.J. Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. **European journal of biochemistry**, v. 264, p. 350-7, 1999.
- ROCHA, L.P. Panorama da carcinicultura brasileira em 2007. **Panorama da Aquicultura**, v. 17, p. 26-31, 2007.
- RODRIGUES, J. Carcinicultura marinha – desempenho em 2004. **Revista da ABCC**, v. 2, p. 38-44, 2005.
- RODRIGUEZ, J.; BAYOT, B.; AMANO, Y.; PANCHANA, F.; DE BLAS, I.; ALDAY, V.; CALDERON, J. White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. **Journal of Fish Diseases**, v. 26, p. 439-50, 2003.
- ROJTINAKORN, J.; HIRONO, I.; ITAMI, T.; TAKAHASHI, Y.; AOKI, T. Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 13, p. 69-83, 2002.
- ROSA, R.D. **Identificação e caracterização de seqüências codificadoras de peptídeos antimicrobianos (PAM) nas células da hemolinfa de espécies nativas de penéideos marinhos**. 2007. 75f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC.
- ROSA, R.D.; BANDEIRA, P.T.; BARRACCO, M.A. Molecular cloning of crustins from the hemocytes of Brazilian penaeid shrimps. **FEMS Microbiology Letters**, v. 274, p. 287-90, 2007.
- ROSA, R.D.; STOCO, P.H.; BARRACCO, M.A. Cloning and characterisation of cDNA sequences encoding for anti-lipopolsaccharide factors (ALFs) in Brazilian palaemonid and penaeid shrimps. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 25, p. 693-6, 2008.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. (Eds) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. vol 1-3.
- SCHLEDER, D.D.; KAYSER, M.; SÜHNEL, S.; FERREIRA, J.F.; RUPP, G.S.; BARRACCO, M.A. Evaluation of hemato-immunological parameters during the reproductive cycle of the scallop *Nodipecten nodosus* in association with a carotenoid-enriched diet. **Aquaculture**, v. 280, p. 256-63, 2008.
- SCHNAPP, D.; KEMP, G.D.; SMITH, V.J. Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bacterenecin-7, from the haemocytes of shore crab, *Carcinus maenas*. **European Journal of Biochemistry**, v. 240, p. 532-9, 1996.

- SEIFFERT, W.Q.; BELTRAME, E.; ANDREATTA, E.R.; MAGGIONI, D.S. Enfermidades: uma oportunidade para repensar o cultivo de camarões marinhos. **Panorama da Aquicultura**, v. 16, p. 32-8, 2006.
- SEIFFERT, W.Q.; DERNER, R.B.; ANDREATTA, E.R. **Potencial e perspectivas do cultivo de camarões marinhos no estado de Santa Catarina, sul do Brasil**. I Congresso Sul-Americano de Aquicultura, Recife-PE, Brasil, resumo 103, 1998.
- SHOCKEY, J.E.; O'LEARY, N.A.; DE LA VEGA, E.; BROWDY, C.L.; BAATZ, J.E.; GROSS, P.S. The role of crustins in *Litopenaeus vannamei* in response to infection with shrimppathogens: an in vivo approach. **Developmental and comparative immunology**, v. 33, p. 668-73, 2009.
- SILVA JR, P. I. Sistema imune em aracnídeos: estrutura química e atividade biológica de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana*. 104 p. (Doutorado). Departamento de Parasitologia, ICB, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- SMITH, V.J.; FERNANDES, J.M.; KEMP, G.D.; HAUTON, C. Crustins: enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. **Developmental and comparative immunology**, v. 32, p. 758-72, 2008.
- SMITH, V.J.; DESBOIS, A.P.; DYRYNDA, E.A. Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. **Marine drugs**, v. 8, p. 1213-62, 2010.
- SOMBOONWIWAT, K.; MARCOS, M.; TASSANAKAJON, A.; KLINBUNGA, S.; AUMELAS, A.; ROMESTAND, B.; GUEGUEN, Y.; BOZE, H.; MOULIN, G.; BACHÈRE, E. Recombinant expression and antimicrobial activity of anti-lipopopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 29, p. 841-51, 2005.
- SPERSTAD, S. V., HAUG, T., VASSKOG, T., AND STENSVÅG, K. Hyastatin, a glycine-rich multi-domain antimicrobial peptide isolated from the spider crab (*Hyas araneus*) hemocytes. **Molecular immunology**, v. 13, p. 2604-12, 2009.
- SPERSTAD, S.V.; SMITH, V.J.; STENSVÅG, K. Expression of antimicrobial peptides from *Hyas araneus* haemocytes following bacterial challenge in vitro. **Developmental and comparative immunology**, v. 34, p. 618-24, 2010.
- STEINER, H.; HULTMARK, D.; ENGSTRÖM, A.; BENNICH, H.; BOMAN, H.G. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature**, v. 292, p. 246-48, 1981.
- STENSVÅG, K.; HAUG, T.; SPERSTAD, S.V.; REKDAL, O.; INDREVOLL, B.; STYRVOLD, O.B. Arasin 1, a proline-arginine-rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, *Hyas araneus*. **Developmental and comparative immunology**, v. 32, p. 275-85, 2008.
- STOSS, T.D.; NICKELL, M.D.; HARDIN, D.; DERBY, C.D.; MCCLINTOCK, T.S. Inducible transcript expressed by reactive epithelial cells at sites of olfactory sensory neuron proliferation. **Journal of Neurobiology**, v. 58, p. 355-68, 2004.

- STUDIER, F.W.; ROSENBERG, A.H.; DUNN, J.J.; DUBENDORFF, J.W.; Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods in enzymology**, v. 185, p. 60–89, 1990.
- SUN, C.; DU, X.J.; XU, W.T.; ZHANG, H.W.; ZHAO, X.F.; WANG, J.X. Molecular cloning and characterization of three crustins from the Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 28, p. 517-24, 2010.
- SUN, Y.D.; FU, L.D.; JIA, Y.P.; DU, X.J.; WANG, Q.; WANG, Y.H. A hepatopancreas specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. **Molecular immunology**, v. 45, p. 348-61, 2008.
- SUPUNGUL, P.; KLINBUNGA, S.; PICHYANGKURA, R.; JITRAPAKDEE, S.; HIRONO, I.; AOKI, T.; TASSANAKAJON, A. Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Marine Biotechnology**, v. 4, p. 487-94, 2002.
- SUPUNGUL, P.; KLINBUNGA, S.; PICHYANGKURA, R.; HIRONO, I.; AOKI, T.; TASSANAKAJON, A. Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 61, p. 123-135, 2004.
- SUPUNGUL, P.; TANG, S.; MANEERUTTANARUNGROJ, C.; RIMPHANITCHAYAKIT, V.; HIRONO, I.; AOKI, T.; TASSANAKAJON, A. Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, p. 61-70, 2007.
- SYROVY, L.; HODNY, Z. Staining and quantification of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v. 569, p. 175-96, 1991.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular biology and evolution**, v. 24, p. 596-9, 2007.
- TASSANAKAJON, A.; KLINBUNGA, S.; PAUNGLARP, N.; RIMPHANITCHAYAKIT, V.; UDOMKIT, A.; JITRAPAKDEE, S.; SRITUNYALUCKSANA, K.; PHONGDARA, A.; PONGSOMBOON, S.; SUPUNGUL, P.; TANG, S.; KUPHANUMART, K.; PICHYANGKURA, R.; LURSINSAP, C. *Penaeus monodon* gene discovery project: the generation of an EST collection and establishment of a database. **Gene**, v. 384, p.104-12, 2006.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAC, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.
- TINCU, J.A.; TAYLOR, S.W. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, p. 3645-54, 2004.

- VARGAS-ALBORES, F.; YEPIZ-PLASCENCIA, G.; JIMENEZ-VEGA, F.; AVILA-VILLA, A. Structural and functional differences of *Litopenaeus vannamei* crustins. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 138, p. 415-422, 2004.
- VATANAVICHARN, T.; SUPUNGUL, P.; PUANGLARP, N.; YINGVILASPRASERT, W.; TASSANAKAJON, A. Genomic structure, expression pattern and functional characterization of crustinPm5, a unique isoform of crustin from *Penaeus monodon*. **Comparative biochemistry and physiology**, v. 153, p. 244-52, 2009.
- WU, M.; HANCOCK, R.E. Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, p. 29-35, 1999.
- XING, Y.; FENG-YING, G.; QING-MEI, Z.; BAI JUN-JIE, HUAN, W.; HAI-HUA, L.; QING, J. Cloning and characterization of the tiger shrimp lysozyme. **Molecular Biology Reports**, v. 36, p. 1239-46, 2009.
- YEDERY, D.R.; REDDY, K.V.R. Purification and characterization of antibacterial proteins from granular hemocytes of Indian mud crab, *Scylla serrata*. **Acta biochimica Polonica**, v. 56, p. 71-82, 2009.
- YUAN, W.; CAO, L.; MA, Y.; MAO, P.; WANG, W.; ZHAO, R.; WU, Y.; CAO, Z.; LI, W. Cloning and functional characterization of a new antimicrobial peptide gene StCT1 from the venom of the scorpion *Scorpiops tibetanus*. **Peptides**, v. 31, p. 22-6, 2010.
- YUE, F.; PAN, L.; MIAO, J.; ZHANG, L.; LI, J. Molecular cloning, characterization and mRNA expression of two antibacterial peptides: Crustin and anti-lipopolysaccharide factor in swimming crab *Portunus trituberculatus*. **Comparative biochemistry and physiology**, v. 56, p. 77-85, 2010.
- ZAIYOU, M. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. **Journal of molecular medicine**, v. 85, p. 317-29, 2007.
- ZANETTI, M.; GENNARO, R.; SCOCCHI, M.; SKERLAVAJ, B. Structure and biology of cathelicidins. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 479, p. 203-18, 2000.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, p. 389-95, 2002.
- ZHANG, J.; LI, F.; WANG, Z.; XIANG, J. Cloning and recombinant expression of a crustin-like gene from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 605-14, 2007.
- ZHANG, X.; HUANG, C.; QIN, Q. Anti-viral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*. **Antiviral Research**, v. 61, p. 93-99, 2004.
- ZHAO, X.F.; WANG, J.X. The antimicrobial peptides of the immune response of shrimp. **Invertebrate Survival Journal**, v. 5, p. 162-79, 2008.