

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLÁVIA BORDIGNON HENDGES

EXPRESSÃO GÊNICA DE PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO DO
HEPATOPÂNCREAS DE CAMARÃO *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879)
POR RT-PCR SEMI-QUANTITATIVA DESAFIADO COM *Aeromonas hydrophila*

PALOTINA

2021

FLÁVIA BORDIGNON HENDGES

EXPRESSÃO GÊNICA DE PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO DO
HEPATOPÂNCREAS DE CAMARÃO *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879)
POR RT-PCR SEMI-QUANTITATIVA DESAFIADO COM *Aeromonas hydrophila*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheira em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Fiorini Rosado

PALOTINA

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ATA DE REUNIÃO

Aos dezessete dias do mês de dezembro do ano de 2021, às dezesseis horas, na Sala virtual https://teams.microsoft.com/l/meetup-join/19%3aNCwMvP_DBtHRSHnns1v1EE03pROwKxoa2ewK1JAQfKA1%40thread.tacv2/1638323138337?context=%7b%22Tid%22%3a%22c37b37a3-e9e2-42f9-bc67-4b9b738e1df0%22%2c%22Oid%22%3a%22c9135a3d-8cbb-438f-965d-ed2f55f7d2ff%22%7d da Plataforma Microsoft Teams, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Expressão Gênica de Peptídeo Antimicrobiano do Hepatopâncreas de Camarão *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) por RT-PCR Semi-quantitativa Desafiado com *Aeromonas hydrophila*." apresentado pela discente Flávia Bordignon Hendges, orientada pela Prof.(a) Dr.(a) Adriana Fiorini Rosado, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, a orientadora e Presidente da Banca concedeu a palavra à discente, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Exame, os quais passaram a arguir a discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Exame, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído à discente as seguintes notas: Prof.(a) Dr.(a) Adriana Fiorini Rosado, nota: 90 (noventa), Prof. Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester, nota: 90 (noventa), e Prof. Dr. Fabio Rogério Rosado, nota: 90 (noventa). A nota final da discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi 90 (noventa). As considerações e sugestões feitas pela Banca de Exame deverão ser atendidas pela discente sob acompanhamento de sua orientadora. Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA FIORINI ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 23/12/2021, às 11:37, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **FABIO ROGERIO ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 23/12/2021, às 11:38, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **EDUARDO LUIS CUPERTINO BALLESTER, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 23/12/2021, às 12:14, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **4149564** e o código CRC **7258210B**. Referência: Processo nº 23075.055357/2021-90

RESUMO

A prática da aquicultura vem demonstrando um crescimento acentuado globalmente, ganhando espaço no mercado brasileiro. Sua constante expansão com criações de variadas espécies permitiu ao Brasil atingir a oitava posição na cultura de organismos de água doce. Um dos principais representantes desse ramo em crescimento é o camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879. Sua produção intensiva e alta densidade populacional o expõe a uma série de microrganismos patogênicos, como a bactéria *Aeromonas hydrophila*, presente nos ambientes aquáticos. Assim, o crustáceo necessita de um sistema imunológico eficiente e ativo respondendo por meio de reações rápidas (resposta inata) aos estímulos causados pelo meio. Por meio do sistema imunológico, a interação entre as células e tecidos do corpo é mediada visando a eliminação do agente infeccioso. Pequenas cadeias de aminoácidos denominados de peptídeos antimicrobianos (PAMs) são secretados e reagem de forma ativa no combate a infecções adversas. Os PAMs são considerados moléculas essenciais do sistema imunológico inato, estando presentes nas mais variadas espécies, encontrados amplamente distribuídos nos organismos e são eficientes na eliminação dos patógenos. O hepatopâncreas é um órgão essencial presente nos invertebrados e é considerado como fonte de moléculas imunológicas. Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de um PAM específico, denominado de Pellino-1, em resposta à injúria séptica causada por *A. hydrophila*, em adultos de *M. rosenbergii*. A bactéria utilizada foi isolada de resíduos de água de abatedouro bovino industrial e caracterizada por testes bioquímicos e microbiológicos. Os experimentos foram realizados no Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA), da Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Setor Palotina. O perfil transcricional do gene Pellino foi analisado por RT-PCR semi-quantitativa utilizando o gene da β -actina como normalizador da expressão. Amostras foram coletadas nos tempos 0, 12 e 24 horas após infecção com a bactéria. O gene β -actina foi expresso em todos os tratamentos testados estando presente nos organismos de forma constitutiva, já o gene Pellino apresentou uma regulação positiva (maior expressão) após 12 horas de desafio séptico com a bactéria. Assim, foi possível observar que o hepatopâncreas foi capaz de expressar genes relacionados com a resposta imunológica do camarão quando em situação de desafio com microrganismo e que as técnicas empregadas foram adequadas.

Palavras-chave: Carcinicultura. Camarão dulcícola. Resposta imunológica. Atividade antimicrobiana. Imunidade inata.

ABSTRACT

Aquaculture has been showing strong growth globally, gaining ground in the Brazilian market. Its constant expansion with creations of various species allowed Brazil to reach the eighth position in the culture of freshwater organisms. One of the main representatives of this growing branch is the freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879. Its intensive production and high population density exposes it to a series of pathogenic microorganisms, such as the *Aeromonas hydrophila* bacteria, present in aquatic environments. Thus, the crustacean needs an efficient and active immune system, responding through rapid reactions (innate response) to stimuli caused by the environment. Through the immune system, the interaction between cells and tissues in the body is mediated aiming at eliminating the infectious agent. Small chains of amino acids called antimicrobial peptides (AMPs) are secreted and actively react to fight adverse infections. AMPs are considered essential molecules of the innate immune system, being present in the most varied species, found widely distributed in organisms and are efficient in eliminating pathogens. The hepatopancreas is an essential organ present in invertebrates and is considered a source of immunological molecules. This work aimed to evaluate the production of a specific AMP, called Pellino-1, in response to septic injury caused by *A. hydrophila*, in adults of *M. rosenbergii*. The bacteria used was isolated from waste water from an industrial bovine slaughterhouse and characterized by biochemical and microbiological tests. The experiments were carried out at the Experimental Nucleus of Applied Mycology (NEMA), at the Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Setor Palotina. The transcriptional profile of the Pellino gene was analyzed by semi-quantitative RT-PCR using the β -actin gene as expression normalizer. Samples were collected at times 0, 12 and 24 hours after infection with the bacteria. The β -actin gene was expressed in all the treatments tested, being constitutively present in the organisms, while the Pellino gene showed up-regulation (higher expression) after 12 hours of septic challenge with the bacteria. Thus, it was possible to observe that the hepatopancreas was able to express genes related to the immunological response of shrimp when in a situation of challenge with a microorganism and that the techniques used were adequate.

Keywords: Shrimp farming. Fresh shrimp. Immune response. Antimicrobial activity. Innate immunity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ENSAIOS BIOQUÍMICOS REALIZADOS COM O ISOLADO <i>A. hydrophila</i>	27
FIGURA 2 – TESTE DA CATALASE.....	28
FIGURA 3 – COLORAÇÃO DE GRAM PARA O ISOLADO DE <i>Aeromonas hydrophila</i>	29
FIGURA 4 – CRESCIMENTO EM MEIO SELETIVO TCBS PARA O ISOLADO DE <i>Aeromonas hydrophila</i>	29
FIGURA 5 – ELETROFORESE DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DA β -ACTINA.	33
FIGURA 6 – ELETROFORESE DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DO PAM PELLINO-1.....	35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – TABELA DE INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE EXPRESSÃO GÊNICA EM <i>M. rosenbergii</i>	24
TABELA 2 – RESULTADOS DOS ENSAIOS BIOQUÍMICOS, REALIZADOS PARA O ISOLADO DE <i>Aeromonas hydrophila</i>	26
TABELA 3 – RESULTADOS DOS ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS, REALIZADOS PARA O ISOLADO DE <i>Aeromonas hydrophila</i>	28
TABELA 4 – PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS, PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO, PARA O ISOLADO DE <i>Aeromonas hydrophila</i>	30
TABELA 5 – TEMPO DE COAGULAÇÃO DA HEMOLINFA PARA <i>M. rosenbergii</i> DESAFIADOS E NÃO DESAFIADOS.	31
TABELA 6 – DADOS DO CULTIVO, ANIMAIS UTILIZADOS E DA QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL EM EQUIPAMENTO NANODROP®.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

® – Marca registrada

% – Por cento

°C – Graus Celsius

Ágar TSA – Ágar Triptona de Soja

cDNA – DNA complementar

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

LMI – Lisina, Motilidade e Indol

mA – Miliampère

MIO – Motilidade, Indol e Ornitina

mL – Mililitros

mm – Milímetros

mRNA – RNA Mensageiro

µL – Microlitros

µg/mL – Micrograma por mililitro

NaCl – Cloreto de Sódio

nm – Nanômetros

PAMs – Peptídeos Antimicrobianos

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pb – Pares de Bases

pH – Potencial Hidrogeniônico

RNA – Ribonucleotídeo

SIM – Sulfeto de Hidrogênio, Indol e Motilidade

TBE – Tris/Borato/EDTA

TCH – Tempo de Coagulação da Hemolinfa

TSA – Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

TCBS – Tiosulfato-Citrato-Bile-Sacarose

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 ESPÉCIE <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	12
2.2 O SISTEMA IMUNOLÓGICO DO CAMARÃO	13
2.3 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (PAMS)	14
3 OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 COLETA DOS ANIMAIS E ISOLAMENTO DA BACTÉRIA	19
4.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO ISOLADO DE <i>A. hydrophila</i> E TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)	20
4.2.1 Teste da Catalase	20
4.2.2 Coloração de Gram	20
4.2.3 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA)	21
4.2.4 Obtenção do Inoculo para Desafio Séptico	22
4.3 DESAFIO IMUNOLÓGICO	22
4.4 COAGULAÇÃO DA HEMOLINFA	23
4.5 COLETA DOS TECIDOS PARA EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL	23
4.6 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE CDNA	24
4.7 ESCOLHA DOS INICIADORES	24
4.8 PCR CONVENCIONAL (END POINT) APÓS TRANSCRIÇÃO REVERSA	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO ISOLADO BACTERIANO	26
5.2 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)	30
5.3 TEMPO DE COAGULAÇÃO DA HEMOLINFA (TCH)	31
5.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E EXPRESSÃO DE PELLINO-1	32
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é definida como a produção de organismos aquáticos, sendo eles: peixes, moluscos, crustáceos e também plantas aquáticas, assim, o cultivo e criação destes organismos tem como finalidade melhorar a produção, fazendo uso de regularidade nas estocagens, alimentação adequada, além de oferecer proteção contra predadores (FAO, 2021).

A produção mundial de animais aquáticos apresentou um aumento de 3,7% para o ano de 2019 em comparação ao ano anterior, alcançando 177,8 milhões de toneladas. O valor estimado com a comercialização foi de 406 bilhões de dólares americanos, sendo que deste montante US\$ 260 bilhões são provenientes da aquicultura (FAO, 2021).

Um dos ramos relacionados à aquicultura que está sendo evidenciado frequentemente é o cultivo de camarão para consumo humano, tanto o camarão marinho quanto o de água doce, tornando-se um importante setor econômico na produção de alimentos, devido, principalmente, às proteínas disponíveis presentes na carne de camarão (AYISI et al., 2017). Em 2019, o camarão representou cerca de 16% do total dos produtos pesqueiros comercializados internacionalmente (FAO, 2021). O camarão é considerado uma das principais commodities, dentre os produtos aquícolas (BALLESTER et al., 2017). Assim, a aquicultura demonstra-se uma alternativa sustentável de cultivo, visando amenizar as perdas causadas aos estoques ambientais devido à sobre-exploração das espécies de camarão, pois este excesso de exploração resulta no declínio dos estoques naturais e conseqüentemente, dano à genética das populações de crustáceos (BLANCK et al., 2013).

O Brasil demonstra domínio na tecnologia de criação do camarão dulcícola podendo, portanto, adaptá-la às diferentes regiões brasileiras e desta forma, vem apresentando destaque mundial, estando entre os maiores produtores de crustáceos de água doce (RIBEIRO; LOGATO, 2002). Sendo assim, é imprescindível a seleção e avaliação dos alimentos do ponto de vista da qualidade, visando atender as legislações alimentares tanto dos países produtores quanto as demandas e exigências dos clientes (HAIDER et al., 2011).

O maior camarão de água doce encontrado dentre os camarões existentes é a espécie *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879), considerado o preferido entre os consumidores por peculiaridades como seu sabor, tamanho

e cor (HAIDER et al., 2011). A produção aquícola desta espécie é altamente promissora devido a características como seu alto valor comercial para exportação e crescimento rápido, e em virtude disto, apresenta grande potencial para cultivo em tanques de água doce (CHAND; SAHOO, 2006; FENG et al., 2019). A espécie foi considerada adequada para cultivo segundo os autores Nguyen et al. (2019), pois apresenta boas taxas de crescimento e sobrevivência.

O interesse pela cultura torna-se maior à medida que as tecnologias e a padronização de técnicas de cultivo avançam, dessa forma, o controle das doenças, bem como, a prevenção tornam-se indispensáveis para manter o setor aquícola em desenvolvimento (CHAND; SAHOO, 2006). Porém, as doenças são um dos principais problemas encontrados nos incubatórios e berçários, que são capazes de interferir diretamente na qualidade das larvas produzidas, resultando em baixo rendimento e mortalidades em massa, restringindo assim a produção regular de pós-larvas de alta qualidade (NHAN et al., 2010).

O surgimento de inúmeras doenças infecciosas e ataque de patógenos, fazem com que a cultura do camarão esteja ameaçada (REECE et al., 2015). Antibióticos e desinfetantes ainda são as metodologias convencionais mais utilizadas para o controle de infecções bacterianas nos incubatórios de camarão, no entanto, técnicas alternativas de controle, que sejam ecológicas (como por exemplo, formas de controle biológico) e visem a manutenção da saúde dos animais precisam ser desenvolvidas rapidamente (NHAN et al., 2010). O sistema imunológico presente naturalmente nos organismos interage para que ocorra a eliminação de agentes patogênicos. Diferentes classes de patógenos são responsáveis pela ativação da resposta imunológica inata nos organismos invertebrados, de forma distinta. A presença de patógenos na hemolinfa (líquido circulatório dos invertebrados), faz com que as células imunes secretem pequenas cadeias de aminoácidos, denominadas de peptídeos antimicrobianos ou PAMs (REECE et al., 2015). Essas moléculas, podem ser expressas em um organismo, de maneira constitutiva ou indutiva, por meio das respostas à exposição do organismo aos microrganismos invasores (TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012).

Para que o cultivo de camarão de água doce em cativeiro seja possível, muito tem sido feito até o momento e, apesar da crescente evolução da tecnologia de cultivo, os camarões cultivados apresentam em média, peso

corporal inferior quando comparado aos animais nativos, assim, ações que incrementem a produção e a sustentabilidade, reduzindo os custos de produção, otimizando o uso de recursos e preservando o meio ambiente são necessárias (BLANCK et al., 2016), para que a cultura possa continuar progredindo e sendo vantajosa do ponto de vista comercial, além de dispor de animais saudáveis, possuindo sistema imunológico ativo e também livres de doenças.

Neste cenário, este trabalho foi planejado visando avaliar uma parte da resposta imunológica do camarão de água doce *M. rosenbergii*, por meio da caracterização do perfil transcricional de um gene relacionado com a produção de peptídeo antimicrobiano, quando submetido a injúria séptica causada por *Aeromonas hydrophila*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESPÉCIE *Macrobrachium rosenbergii*

Conhecido também como camarão gigante de água doce, a espécie *Macrobrachium rosenbergii* é cultivada em larga escala em muitos países, porém, é nativo da região do sudeste Asiático, de países como Vietnã, Tailândia, Camboja, Malásia, Mianmar, Bangladesh, Índia, Sri Lanka e Filipinas (HAMEED, 2009). Em locais como Bangladesh, um grande exportador deste camarão, *M. rosenbergii* pode ser capturado em fontes naturais, além disso, com a demanda crescente do mercado internacional devido à grande aceitação do produto, o cultivo *M. rosenbergii* está se expandindo rapidamente por todo o país (HAIDER et al., 2011). Transferida de sua faixa geográfica natural, esta espécie foi introduzida em muitas outras zonas tropicais e subtropicais do mundo, onde pudesse se estabelecer (NEW, 2002).

Atualmente, *M. rosenbergii* ainda se destaca como um dos crustáceos mais importantes economicamente, e dessa forma, o cultivo em larga escala da espécie ocorre em diferentes partes do mundo (RAO et al., 2016; JARIYAPONG et al., 2019; PUDGERD et al., 2019). A espécie foi introduzida em diversas outras regiões, e há registros de sua ocorrência em pelo menos 40 países (IKETANI et al., 2011; ANGER, 2013).

No Brasil, a espécie foi relatada na década de 1970, em meados do ano de 1977, a Universidade Federal de Pernambuco, por meio do Departamento de Oceanografia importou larvas provenientes do Havaí, a partir deste momento desenvolveu-se a cultura em laboratório, e estima-se que no ano de 2007, existiam cerca de 450 pequenas fazendas de criação (NOMURA, 1986; NEW et al., 2010). Em países como Brasil, Índia e Tailândia, onde a espécie foi inserida em reservatórios, conforme foi relatado por New (2002), obtendo sucesso em sua introdução, sendo que no Brasil, é atualmente a espécie mais favorecida para cultivo e exploração. São encontrados na literatura registros da ocorrência desta espécie em diferentes estados brasileiros (GAZOLA-SILVA; MELO, VITULE 2007), como em algumas bacias hidrográficas no Paraná (SILVA; BALLESTER; CUNICO, 2020).

Algumas espécies podem preferir para seu desenvolvimento, condições de rios de águas limpas, outros porém, como é o caso do *M. rosenbergii*, priorizam condições extremamente turvas em ambientes tropicais de água doce (NEW, 2002; TIRUVAYIPATI; BHASSU, 2016). O pH ideal para o cultivo de *M. rosenbergii* é de 7,0 a 8,5 e a temperatura ideal para crescimento da espécie encontra-se entre 27 a 31 °C, cultivos a temperatura de 29 °C possibilitam maior movimentação e captura de alimento pela espécie, temperaturas abaixo dos 24 °C causam redução no consumo alimentar, sendo que temperaturas inferiores a 20 °C são consideradas críticas para a sobrevivência e entre 13 e 14 °C são letais para *M. rosenbergii* (NEW, 2002; VOGEL et al., 2016).

Nos ambientes aquáticos, *M. rosenbergii* pode ser encontrado nos fundos de rios, lagos, reservatórios e estuários, fazendo parte da macrofauna bentônica. Para sua locomoção quando percebe situações de perigo a espécie contrai a musculatura abdominal e pode movimentar-se com grande rapidez para trás utilizando o batimento de seu leque caudal (PINHEIRO; HEBLING, 1998).

2.2 O SISTEMA IMUNOLÓGICO DO CAMARÃO

Uma das principais preocupações na criação dos camarões é a prevenção de possíveis surtos patológicos, necessitando-se para tal, um elevado conhecimento sobre a imunidade e a resposta aos organismos invasores (TASSANAKAJON et al., 2018).

Uma espécie de patógeno amplamente distribuído pelo ambiente aquático é a *Aeromonas hydrophila*. Caracteristicamente, são bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, não formadora de esporos e possuem formato de bastonete, apresentam motilidade através de um único flagelo, são catalase e oxidase positivas e fermentadoras de glicose. A temperatura ideal de crescimento é aproximadamente 28 °C, porém algumas cepas podem crescer em temperaturas tão baixas quanto -0,1 °C. Não são tolerantes a salinidade, portanto, o principal local onde *A. hydrophila*, pode ser encontrada são lagos e córregos de água doce ou também em redes de esgoto (DASKALOV, 2006; SAMAYANPAULRAJ et al., 2020).

A. hydrophila são organismos causadores de doenças zoonóticas (que podem ser transmitidas de animais para humanos e vice-versa), com a água

sendo um importante veículo de contaminação. Em humanos, são causadores de gastroenterites. Essa espécie é encontrada em muitos produtos alimentícios como frutos do mar, moluscos, alimentos crus de origem animal (aves, carne moída, leite cru e vegetais crus). São patógenos de animais aquáticos e em temperatura de refrigeração produzem exotoxinas (DASKALOV, 2006; PEIXOTO et al., 2012). Surtos causados por *A. hydrophila* relacionam-se com mudanças na suscetibilidade do hospedeiro, muitas vezes ocasionados por alterações ambientais (SAMAYANPAULRAJ et al., 2020).

Durante uma infecção, proteínas de reconhecimento detectam a presença dos patógenos rapidamente após a invasão, e logo após ocorre a sinalização da inflamação através das vias de sinalização do sistema imunológico (TASSANAKAJON et al., 2018).

A compreensão dos mecanismos de defesa do sistema imunológico do camarão frente ao ataque de patógenos pode fornecer informações essenciais para desenvolvimento de métodos de controle mais eficazes (TASSANAKAJON et al., 2013; TASSANAKAJON et al., 2018). Contudo, para o controle das doenças, convencionalmente ainda se faz uso de antibióticos (CHOMWONG et al., 2018), podendo resultar em patógenos resistentes devido ao uso indiscriminado destas drogas.

2.3 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (PAMS)

Dentre as moléculas que compõem o sistema imune, uma nova classe vem sendo estudada, são os denominados peptídeos antimicrobianos (PAMs). Consideradas como moléculas essenciais do sistema imune inato, os PAMs apresentam grande espectro de ação e como particularidade são eficientes no combate aos patógenos (RICILUCA, 2016). Diversas propriedades relacionadas ao potencial de modulação da resposta imune, são atribuídas aos peptídeos de defesa do hospedeiro em muitos organismos, estes peptídeos são conhecidos como PAMs (TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012).

PAMs apresentam o potencial de modular a resposta imune, principalmente a inata, através de uma ampla variedade de mecanismos, sendo que estas moléculas podem integrar, organizar, e estruturar a imunidade inata

do hospedeiro de diversas formas (TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012; RICILUCA, 2016).

Caracteristicamente os PAMs são moléculas relativamente pequenas, normalmente apresentam menos de 150 – 200 resíduos de aminoácidos e devido a esta característica são sintetizados com baixo consumo energético e de biomassa (ZUCCA; SCUTERA; SAVOIA, 2011; PASUPULETI; SCHMIDTCHEN; MALMSTEN, 2012; TASSANAKAJON et al., 2013; CAETANO; QUEIROZ, 2014). Podem ser encontrados circulando nos organismos, estando amplamente distribuídos (RICILUCA, 2016).

PAMs são codificados pela clivagem de genes e peptídeos derivados de proteínas maiores, apresentam estrutura anfipática e de acordo com sua carga elétrica líquida são classificados como catiônicos e aniônicos (BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004; TASSANAKAJON et al., 2013; TASSANAKAJON et al., 2018). Nas espécies de camarão, PAMs catiônicos podem ser comumente encontrados, ao mesmo tempo que os PAMs aniônicos são menos comuns possuindo apenas, os ALFs (fatores anti-lipopolisacarídeos) e a stylicina (peptídeo derivado da hemocianina) (TASSANAKAJON et al., 2013; TASSANAKAJON et al., 2018).

Os PAMs são produzidos como proteínas precursoras, ficando armazenados nos hemócitos granulares, e após uma indução de resposta imunológica são prontamente liberados (PASUPULETI; SCHMIDTCHEN; MALMSTEN, 2012; TASSANAKAJON et al., 2013; TASSANAKAJON et al., 2018). Evidências sugerem que os PAMs podem desempenhar função vital na imunidade, seja diretamente por meio da ação antibacteriana ou atuando por meio das respostas imunes inatas e adaptativas (TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012).

PAMs podem eliminar bactérias e outros patógenos de modo seletivo, rompendo a integridade da membrana da célula alvo intercalando-se na membrana das células. O modo que os PAMs atuam é determinado principalmente pela a sua conformação estrutural, carga e anfipaticidade (ROSA; BARRACCO, 2010; FAN et al., 2020).

PAMs podem ser induzidos de forma sistêmica no hospedeiro, geralmente localizam-se em células ou tecidos específicos e mais suscetíveis a uma infecção por um conjunto específico de patógenos. A compartimentalização

entre produção/distribuição dos PAMs demonstra ser uma alternativa importante de acordo com o tipo e a especificidade do patógeno invasor, pois isto implica não somente em uma regulação específica a nível celular, mas também uma distribuição polarizada no hospedeiro (TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012).

Existem diferentes classes de PAMs já conhecidos, sendo que um mesmo organismo pode sintetizar este componente de mais de uma classe, possuindo atividade biológica complementar à atividade antimicrobiana (ALMEIDA, 2007). O camarão, assim como a maioria dos artrópodes, produz PAMs que se tornam ativos contra um grande número de patógenos. Geralmente o mecanismo de ação dos PAMs ocorre nas membranas dos microrganismos, onde através da desagregação de suas membranas plasmáticas podem inativar ou eliminar os invasores, causando desequilíbrio nas funções por meio da interação eletrostática com os fosfolipídios aniônicos da membrana, também são capazes de se intercalar entre a bicamada lipídica, formando poros, levando ao extravasamento dos conteúdos citoplasmáticos e conseqüentemente a morte do microrganismo (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2007; REECE et al., 2015; RICILUCA, 2016).

Encontra-se disponível atualmente uma base de dados (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), com cerca de 3 mil sequências de PAMs depositadas para as mais diversas espécies. Neste banco de dados é possível a consulta por nome do PAM ou espécie de interesse, e possui a finalidade de auxiliar na disseminação de forma sistêmica do conhecimento obtido, bem como na identificação de novas moléculas de PAMs.

Para a espécie *M. rosenbergii*, consta na base de dados dos PAMs um importante peptídeo catiônico, denominado de Pellino-1. As proteínas Pellino possuem importante função imunológica, e são proteínas que apresentam estruturas conservadas evolutivamente. Pellino-1 é um importante modulador do sistema imune em *M. rosenbergii*, atuando na regulação de várias vias de sinalização imunológica (RAVICHANDRAN et al., 2016).

PAMs produzidos por várias espécies de camarão têm atraído atenção dos pesquisadores devido a sua capacidade de eliminar bactérias ou vírus, desempenhando papel fundamental na imunidade. Já foram relatados em camarão diferentes tipos de PAMs, que poderiam eventualmente serem utilizados na aquicultura no combate à doenças, pois são considerados como os

principais efetores imunes humorais, sendo especialmente úteis para sobrevivência dos camarões durante uma invasão patogênica (LI; XIANG, 2013; TASSANAKAJON et al., 2013; TASSANAKAJON et al., 2018). Nos crustáceos dulcícolas, diversos tipos de PAMs foram identificados e caracterizados, como por exemplo: ALFs, crustinas e lisozimas (HUANG; REN, 2020).

Assim, os PAMs são responsáveis pela proteção dos camarões frente a infecções através da morte direta dos patógenos, pela modulação das respostas imunes ou ainda possuindo efeitos de prevenção e profilaxia representando uma alternativa a medicamentos tradicionais devido ao seu potencial uso terapêutico e surgindo com uma importante estratégia para eliminar surtos de doenças graves (TASSANAKAJON et al., 2011). Em consequência do desenvolvimento rápido da resistência microbiana frente aos antibióticos convencionais utilizados atualmente, os PAMs vêm sendo cada vez mais estudados contribuindo com descobertas de novas substâncias farmacêuticas e mecanismos de defesas devido ao amplo espectro observado nos PAMs (TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar o nível de expressão transcricional de um gene relacionado com a resposta imunológica, denominado de Pellino-1, envolvido na produção de peptídeo antimicrobiano do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii*, no hepatopâncreas antes e após desafio séptico com *Aeromonas hydrophila*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção e confirmação do gênero e espécie da bactéria utilizada no desafio séptico (*Aeromonas hydrophila*) através da caracterização morfológica e bioquímica do isolado;
- Determinar se o gene avaliado relacionado ao sistema imunológico de *M. rosenbergii* pode ser expresso diferencialmente no hepatopâncreas;
- Comparar o nível de expressão transcricional deste gene expresso no hepatopâncreas de camarões experimentalmente infectados com *A. hydrophila* e em animais não infectados;
- Verificar se o gene Pellino-1 ao qual será avaliado pode ser expresso de forma diferencial entre os tempos avaliados (tempo 0 horas, 12 horas e 24 horas após injeção) nos animais desafiados e não desafiados com a bactéria.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório do Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Setor Palotina. Para o experimento, foram utilizados indivíduos adultos da espécie *M. rosenbergii*.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente randômico, composto por três repetições por tratamento. Os tratamentos foram: controle (T1), animais infectados por *A. hydrophila* com 12 horas pós infecção (T2) e animais infectados por *A. hydrophila* com 24 horas pós infecção (T3). Cada tratamento permaneceu acondicionado e distribuído em baldes com capacidade de 20 litros. Nos baldes foram colocados 6 litros de água proveniente do cultivo e para cada balde a aeração fornecida foi forçada por meio de oxigenadores. Os animais permaneceram de forma individualizada acondicionados em cada balde durante o experimento. A qualidade da água foi monitorada no cultivo e no momento das coletas foram realizados controle da temperatura por meio de termômetro e de pH através do equipamento de pHmetro de bancada. Os animais foram alimentados com ração comercial e permaneceram nessas condições por 36 horas antes do início do experimento para adaptação. O peso de todos os animais e o peso do hepatopâncreas foram obtidos no momento das coletas.

4.1 COLETA DOS ANIMAIS E ISOLAMENTO DA BACTÉRIA

Os exemplares de camarão da espécie *M. rosenbergii* utilizados nos experimentos, foram capturados de sistemas de cultivo localizados na região Oeste do Paraná, gentilmente cedidos pelo professor Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester.

A bactéria *Aeromonas hydrophila* utilizada no desafio séptico dos camarões é proveniente de isolados encontrados em águas residuais de abatedouro bovino, e foi gentilmente cedida pela professora Dra. Eliane Hermes.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO ISOLADO DE *A. hydrophila* E TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)

Foram realizados alguns testes bioquímicos para a caracterização de *A. hydrophila*, sendo os testes de Lactose gelatina, MIO (Motilidade, Indol e Ornitina), SIM (Sulfeto de Hidrogênio, Indol e Motilidade), LMI (Lisina, Motilidade e Indol) e Citrato. Todos os reagentes utilizados eram da marca Laborclin®. Também foram analisados os potenciais da bactéria para produção de catalase, através do teste da catalase em lâmina, coloração de Gram, crescimento em meio seletivo (TCBS – Tioossulfato-Citrato-Bile-Sacarose) e susceptibilidade a antibióticos.

Para a realização dos testes foram utilizadas colônias de até 24 horas de *A. hydrophila* crescidas em meio Ágar Triptona de Soja (TSA) a 30°C. Nos ensaios de Lactose gelatina, MIO, SIM e LMI utilizou-se a técnica pico central sem encostar a alça bacteriológica no fundo dos tubos. Para o teste do citrato, o inóculo foi estriado na superfície do ágar inclinado. A análise dos resultados foi realizada após incubação dos tubos teste por 24 horas em estufa a 30 °C. Todos os testes foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.1 Teste da Catalase

O teste da catalase foi realizado depositando uma colônia, obtida de uma cultura recente de até 24 horas de *A. hydrophila*, sobre uma lâmina de microscopia. Sobre a colônia adicionou-se uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. O resultado foi interpretado na sequência em que, caso houvesse a formação de bolhas indicaria que presença da ação da enzima catalase em hidrolisar o peróxido de hidrogênio, produzindo água e oxigênio.

4.2.2 Coloração de Gram

Para confirmar a identidade do isolado de *A. hydrophila* além dos testes bioquímicos, foi ainda realizada o teste microbiológico de coloração de Gram. Este procedimento permite que as bactérias retenham a cor com base nas diferenças nas propriedades químicas e físicas da composição da parede

celular. A coloração envolve 3 etapas principais: Coloração com violeta de cristal (corante solúvel em água, roxo), Descoloração (utilizando etanol + acetona), e Contra-coloração (utilizando corante Fucsina ou Safranina, vermelho).

Primeiramente foi depositado no centro de uma lâmina de microscopia uma gota de solução salina (NaCl 0,9% p/v) e na sequência sobre a solução salina colocou-se uma colônia da bactéria de interesse com movimentos circulares. A solução salina foi evaporada sobre o bico de Bunsen e as bactérias puderam fixar-se na lâmina. O esfregaço foi coberto com cristal violeta por aproximadamente 1 minuto. O cristal violeta é retido na parede bacteriana apenas de microrganismos Gram positivos. Em seguida, a lamina foi lavada com água destilada e adicionou-se lugol com a finalidade de fixar o corante cristal violeta, deixado por aproximadamente 1 minuto.

Com a lâmina inclinada, passou-se várias vezes a solução de descoloração, aguardando-se aproximadamente 30 segundos e em seguida procedeu-se a lavagem da lamina. Por último adicionou-se a safranina e aguardou-se aproximadamente 45 segundos.

O teste foi realizado em duplicata e os resultados foram analisados prontamente.

4.2.3 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA)

O antibiograma para a determinação do perfil de susceptibilidade a antibióticos foi realizado pela técnica de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966), por meio de disco-difusão, em que, foi realizada uma suspensão de colônias bacterianas em solução salina estéril (NaCl 0,9% p/v) de uma cultura de até 24 horas de *A. hydrophila* até atingir o padrão de turbidez 0,5 comparando-se com a escala de MacFarland.

A suspensão bacteriana foi semeada em toda a placa de ágar Müeller-Hinton (MH), com o auxílio de um *swab* estéril, em três planos, para que houvesse crescimento confluyente. Discos de papel contendo os antimicrobianos (em concentrações padronizadas) foram adicionados a placa de cultivo com o auxílio de uma pinça estéril, sem ultrapassar 15 minutos após a inoculação da bactéria. Em cada placa adicionou-se 4 antibióticos diferentes.

Foram utilizados os seguintes antibióticos: AMI (Amicacina 30µg), AMO (Amoxicilina 10µg), PEN (Penicilina 10µg), OXA (Oxacilina 01µg), CLI (Clindamicina 02µg), NOR (Norfloxacinina 10µg), NAL (Ácido Nalidíxico 30µg), ERI (Eritromicina 15µg), CFC (Cefaclor 30µg) e CLO (Cloranfenicol 30µg). As placas foram incubadas em estufa a 30°C durante 12 a 18 horas e na sequência a leitura dos resultados foi realizada.

4.2.4 Obtenção do Inoculo para Desafio Séptico

A cultura das células bacterianas para desafio séptico de *A. hydrophila* foi realizada em placas contendo meio Müller-Hinton (MH), com crescimento a 30°C em estufa microbiológica por um período de 24 horas.

Para o preparo do inoculo, colônias da cultura foram ressuspendidas em solução salina (NaCl 0,9% p/v). A concentração bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 600 nm, para a densidade óptica correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL no momento da aplicação nos animais desafiados.

4.3 DESAFIO IMUNOLÓGICO

Para análises do desafio imunológico foi testada a resposta de um grupo de adultos de *M. rosenbergii*. As amostras deste grupo foram avaliadas em triplicata.

As coletas de hepatopâncreas foram realizadas logo após o desafio séptico com *A. hydrophila* (tempo 0), 12 horas após a infecção (tempo 12) e 24 horas após a infecção (tempo 24). Sendo que cada tratamento foi composto da seguinte forma:

Tempo zero (0): 3 animais não infectados com a bactéria (controle) e 3 infectados com *Aeromonas hydrophila*;

Tempo doze (12) horas: 3 animais não infectados com a bactéria (controle) e 3 infectados com *Aeromonas hydrophila*;

Tempo vinte e quatro (24) horas: 3 animais não infectados com a bactéria (controle) e 3 infectados com *Aeromonas hydrophila*.

Após a aclimação dos animais nos baldes, foi injetado intraperitonealmente 30 μ L da solução contendo as bactérias em cada animal desafiado e 30 μ L de solução salina (0,9% p/v) nos animais do grupo controle (não desafiados), de forma que todos os grupos estiveram sujeitos a condições de manipulação e estresse semelhantes. Após a inoculação, a primeira coleta foi realizada e as demais foram realizadas nos tempos previstos do experimento (12 e 24 horas).

4.4 COAGULAÇÃO DA HEMOLINFA

Ensaio do tempo de coagulação foram realizados a partir da extração da hemolinfa na região ventral do abdômen dos animais, utilizando-se uma agulha (13x0,4 mm) acoplada a uma seringa estéril de 5 mL sem a utilização de anticoagulantes. Primeiramente os camarões da espécie *M. rosenbergii* foram pesados em balança digital de precisão e os valores foram registrados. Na sequência, uma pequena quantidade de hemolinfa (aproximadamente 500 μ L) foi depositada individualmente sobre lâminas de microscopia. A amostra coletada foi esfregada contra a lâmina até que houvesse a coagulação, em que a hemolinfa passa a apresentar um aspecto gelatinoso. O tempo de coagulação da hemolinfa (TCH) foi medido em triplicata com auxílio de um cronômetro.

4.5 COLETA DOS TECIDOS PARA EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

Após a obtenção da hemolinfa e realização do TCH, os camarões foram sacrificados por hipotermia, onde foram imersos em água e gelo (0°C por 10 minutos) para a dissecação do hepatopâncreas. A extração foi feita com o auxílio de pinça e tesoura estéril, realizando-se uma incisão mediana nos animais para a retirada total do órgão.

Todos os órgãos coletados foram preservados em solução de *RNA later Stabilization Solution*[®] (Invitrogen) e mantidos em freezer (-20°C) até posterior utilização, onde as amostras seguiram para análises de extração de RNA total.

4.6 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA

Para avaliar a expressão gênica no hepatopâncreas, o RNA total foi extraído das amostras em todas as condições experimentais propostas (animais estimulados e não estimulados). As amostras coletadas foram processadas utilizando-se o *kit* de extração *SV Total RNA Isolation* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração das amostras foi determinada pela leitura de absorbância em espectrofotômetro (NanoDrop® 2000 - Thermo Scientific).

Em seguida, com o RNA total extraído e quantificado foi realizada a síntese do cDNA com o *Kit GoScript™ Reverse Transcription System* (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

4.7 ESCOLHA DOS INICIADORES

Para as análises de expressão gênica foi escolhido um gene que é responsável pela expressão de PAMs em *M. rosenbergii*, com base na literatura científica, sendo esse gene denominado de Pellino-1. O gene para β -actina foi utilizado como normalizador da expressão gênica. A seguir (Tabela 1), estão apresentados os iniciadores utilizados para a análise.

TABELA 1 – TABELA DE INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE EXPRESSÃO GÊNICA EM *M. rosenbergii*.

Primer	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	PAM
<i>MrPeli-1</i> (<i>MrDN</i>)	GCCAAGCATCACCTCAAGTA	CGTCTGTGGAGGACAACTTAC	Pellino
Mr Actin	CCCAGAGCAAGAGAGGTA	GCGTATCCTTCGTAGATGGG	Controle

FONTE: A Autora (2021).

4.8 PCR CONVENCIONAL (END POINT) APÓS TRANSCRIÇÃO REVERSA

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20 μ L contendo no mix reacional: 0,8 μ L de MgCl₂ (50 mM), 0,25 μ L de dNTP Mix (40 mM), 1,25 μ L dos iniciadores (primers) senso (forward) e antissenso (reverse) a

10 μ M, 4 μ L de tampão 5x, 1U da enzima *Taq* DNA Polimerase (5U/ μ l), 12,2 μ L de água ultrapura e 5 μ L de cDNA. As reações de PCR, foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems, modelo 2720) usando as condições de ciclagem: desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 50°C (temperatura de acordo com o par de iniciadores utilizados) por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação de cada gene foram visualizados em gel de agarose a 2% em tampão TBE 1x (Tris-base 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM pH 8,0), corados com brometo de etídeo (0,1 μ g/mL) e os *amplicons* foram comparados com padrão molecular de 100 pb (Ludwig Biotecnologia).

A expressão dos genes deste trabalho foi avaliada de forma semi-quantitativa.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO ISOLADO BACTERIANO

Os resultados dos ensaios bioquímicos realizados para a bactéria *A. hydrophila* estão resumidos na Tabela 2 e Figura 1.

TABELA 2 – RESULTADOS DOS ENSAIOS BIOQUÍMICOS, REALIZADOS PARA O ISOLADO DE *Aeromonas hydrophila*.

Testes Bioquímicos	Propriedades de <i>A. hydrophila</i>
Lactose gelatina	Hidrólise da gelatina + Fermentação da lactose +
MIO	Motilidade + Indol – Ornitina –
SIM	Sulfeto de hidrogênio – Indol – Motilidade +
LMI	Lisina + Motilidade + Indol –
Citrato	+
Catalase	+

FONTE: A Autora (2021).

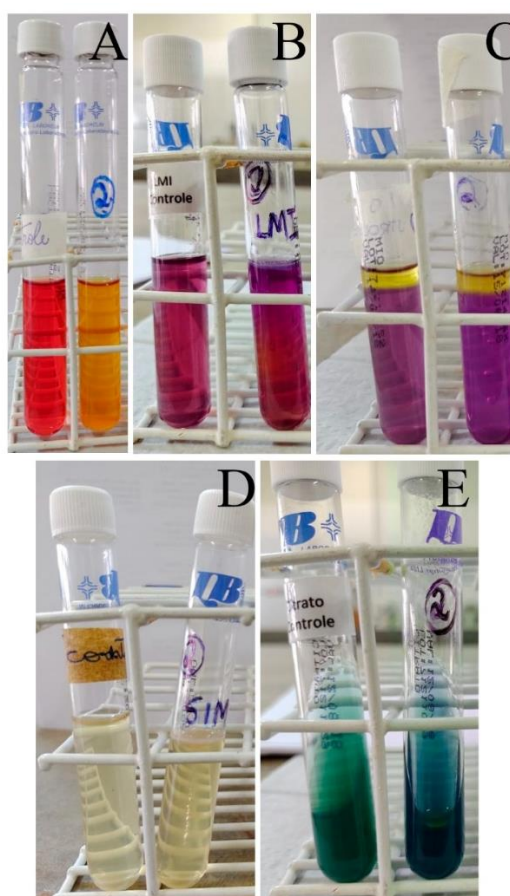
O isolado testado foi capaz de liquefazer a gelatina, no meio Lactose gelatina. Esse meio é normalmente utilizado para detectar espécies de *Clostridium* spp. em amostras de alimentos. Para o isolado em estudo, o principal objetivo foi verificar a capacidade de liquefazer a gelatina, uma característica de bactérias com potencial proteolítico. A cor vermelha do meio sofreu alteração, permanecendo com tonalidade amarelada ao final da incubação do meio, isto pode ser explicado devido a capacidade do isolado em fermentar a lactose presente no meio (UEMURA, 2019).

A. hydrophila apresentou resultado positivo para motilidade, tanto em meio MIO como em meio SIM e LMI, representada pelo crescimento axial em torno do pico central e turvação do meio de cultura. O resultado de produção de indol foi negativo em todos os testes realizados. Resultados positivos se

caracterizam pela presença de um anel vermelho ao topo do meio de teste, após a adição do reativo de Kovacs, o que não pode ser observado no ensaio realizado. O isolado também não produziu sulfeto de hidrogênio no meio SIM, observada pela não formação de um precipitado escuro após o período de incubação. A coloração do meio MIO foi alterada para amarelo, na presença do isolado, indicando a fermentação de dextrose e não descarboxilação da L-Ornitina. A cor amarela é devido a uma diminuição do pH do meio, causada pela fermentação de dextrose (LABORCLIN, 2019).

Para o teste de citrato, o isolado foi capaz de utilizar citrato como fonte de carbono, evidenciado pela alteração da cor do meio de citrato (verde) para azul. Isso ocorre devido a metabolização do citrato pelas bactérias alcalinizando o meio. O pH básico faz o meio, que antes apresentava-se verde, ficar azul, devido ao indicador azul de bromotimol (LABORCLIN, 2019).

FIGURA 1 – ENSAIOS BIOQUÍMICOS REALIZADOS COM O ISOLADO *A. hydrophila*.



FONTE: A Autora (2021).

LEGENDA: Todos os testes estão representados ao lado do controle, sendo em: **A)** Lactose gelatina. **B)** Ágar LMI. **C)** Ágar MIO após adição do reagente de Kovacs. **D)** Ágar SIM. **E)** Ágar Citrato.

Quanto à capacidade de ação da enzima catalase hidrolisar o peróxido de hidrogênio, houve a formação de bolhas indicando a presença da enzima, produzindo água e oxigênio (figura 2).

FIGURA 2 – TESTE DA CATALASE.



FONTE: A Autora (2021).

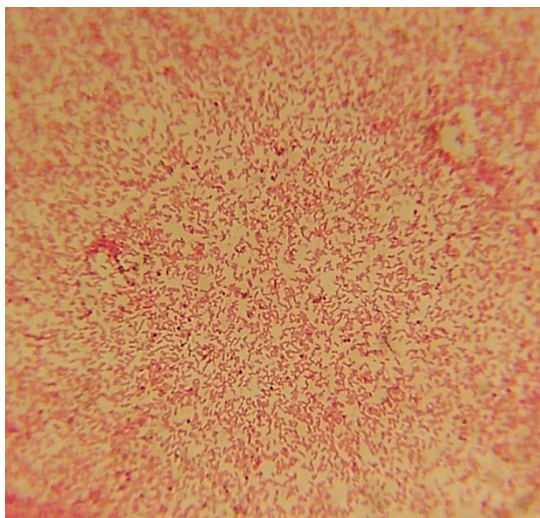
Os ensaios microbiológicos realizados para o isolado *A. hydrophila* são apresentados abaixo na Tabela 3 e Figuras 3 e 4.

TABELA 3 – RESULTADOS DOS ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS, REALIZADOS PARA O ISOLADO DE *Aeromonas hydrophila*.

Testes Microbiológicos	Propriedades de <i>Aeromonas hydrophila</i>
Coloração de Gram	Negativa
Crescimento em Meio Seletivo	Apresentando formato de bastonete
	Sim

FONTE: A Autora (2021).

FIGURA 3 – COLORAÇÃO DE GRAM PARA O ISOLADO DE *Aeromonas hydrophila*.



FONTE: A Autora (2021).

LEGENDA: Aspecto morfotintorial de *A. hydrophila*, evidenciando bacilos Gram negativos após coloração de Gram Aumento de 400x observado em microscópio ótico.

FIGURA 4 – CRESCIMENTO EM MEIO SELETIVO TCBS PARA O ISOLADO DE *Aeromonas hydrophila*.



FONTE: A Autora (2021).

Os resultados aqui apresentados tanto dos testes bioquímicos quanto microbiológicos corroboram com os encontrados no trabalho de Mouriño et al. (2006), onde os autores relataram que após a inoculação da bactéria *A.*

hydrophila e visualização dos resultados de 24 a 48 horas depois da inoculação foi possível observar as mesmas características aqui descritas, com exceção para o indol, pois de acordo com o trabalho dos autores, a bactéria *A. hydrophila* apresenta atividade positiva para indol. Este fato pode ser justificado pela adição do reativo de Kovacs na superfície do meio, em que, o surgimento de coloração vermelha ou rósea indica resultado positivo para indol, visto que em nosso trabalho não foi possível apresentar resposta positiva.

No meio TCBS foi possível observar a presença de colônias pequenas e circulares de cor esverdeada. Ágar TCBS é um meio seletivo para bactérias do gênero *Vibrio spp.*, porém não inibe o crescimento de *A. hydrophila* como pode ser observado na Figura 4. Este resultado está em acordo com dados obtidos por Al-Shalah (2017), trabalhando com amostras obtidas de humanos, o autor verificou que *A. hydrophila* foi capaz produzir colônias amarelas / verdes devido à fermentação da sacarose e com diâmetro de 2-3 mm.

5.2 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)

Os resultados do perfil de susceptibilidade a antibióticos estão apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 – PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS, PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO, PARA O ISOLADO DE *Aeromonas hydrophila*.

Antibiótico	Código	Concentração (µg/disco)	Diâmetro do halo (mm)	Intensidade do halo
Amoxicilina	AMO	10	A	A
Penicilina	PEN	10	A	A
Clindamicina	CLI	02	A	A
Amicacina	AMI	30	21	+++
Oxacilina	OXA	01	A	A
Cefaclor	CFC	30	A	A
Ácido Nalidíxico	NAL	30	7	+
Norfloxacina	NOR	10	12	++
Eritromicina	ERI	15	A	A
Cloranfenicol	CLO	30	38	+++

FONTE: A Autora (2021).
 LEGENDA: A – Ausência de halo de inibição;
 + – Fraca intensidade do halo;
 ++ – Intermediária intensidade do halo;
 +++ – Forte intensidade do halo

Não foi possível, até a finalização desse trabalho, classificar o isolado como R (Resistente), S (Sensível) ou I (Intermediário) frente aos antibióticos utilizados, devido à dificuldade de se encontrar documentos do CLSI e referências na literatura atual que abrangesse todos os antibióticos utilizados neste trabalho. Portanto, a interpretação dos resultados foi apenas qualitativa (presença e ausência de halo de inibição e intensidade dos halos, sendo os símbolos +, ++, +++ para fraca, intermediária e intensa).

A. hydrophila foi capaz de apresentar resistência aos antibióticos: Amicacina, Ácido Nalidíxico da classe das fluoroquinolonas, Norfloxacin e Cloranfenicol. Os demais antibióticos foram eficientes em inibir o crescimento do isolado. Resultados semelhantes foram encontrados por Díaz et al. (2006).

Segundo o trabalho realizado por Barcellos, et al. (2018) em jundiás (*Rhamdia quelen*), os resultados encontrados na literatura para os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos de amostras de *Aeromonas spp.* são variados, e de acordo com os autores isso reforça a necessidade de realizar testes regionalizados, uma vez que os diferentes métodos de manejo e padrão de formação de resistência a antimicrobianos, não permitem padronizar os tratamentos.

5.3 TEMPO DE COAGULAÇÃO DA HEMOLINFA (TCH)

A Tabela 5, são apresentadas as médias dos resultados encontrados para o ensaio de tempo de coagulação da hemolinfa realizado em triplicata para cada tratamento em animais analisados desafiados e não desafiados com *A. hydrophila*.

TABELA 5 – TEMPO DE COAGULAÇÃO DA HEMOLINFA PARA *M. rosenbergii* DESAFIADOS E NÃO DESAFIADOS.

Tratamento	TCH (em segundos)
Controle – Tempo 0	12
Inoculado – Tempo 0	10
Controle – Tempo 12	10
Inoculado – Tempo 12	18
Controle – Tempo 24	9
Inoculado – Tempo 24	20

FONTE: A Autora (2021).

De acordo com os autores Costa e Martins, (2009), são poucos os dados encontrados na literatura sobre tempo de coagulação avaliado por gotejamento contra lâminas, isso se deve ao fato desse método ser utilizado de modo empírico. Como padrão encontrado na literatura, as amostras de hemolinfa para indicativo de sanidade de camarões é considerado o tempo de 20 segundos para coagulação da hemolinfa (PEREGRINO, 2005). Dentro deste parâmetro indicativo de 20 segundos, podemos observar que as amostras inoculadas coletadas e analisadas nos tempos 12 e 24 horas após a injeção são as que apresentam valores mais próximos do limite da sanidade, demonstrando que os animais observados possuíam evidências de infecção presente na hemolinfa, devido ao maior tempo de resposta do sistema imunológico. Já para as amostras controle em todos os tempos, os animais mantiveram os valores do TCH próximos ao início do experimento (tempo 0) o que indica que os camarões utilizados neste experimento possuíam um sistema imunológico ativo e eficaz.

5.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E EXPRESSÃO DE PELLINO-1

As amostras de hepatopâncreas para todos os tratamentos tiveram o RNA total extraído para posterior reação de cDNA e expressão do gene Pellino-1 e β -actina. Na Tabela 6 estão dispostos os dados obtidos durante o experimento, sendo eles dados da água de cultivo (como temperatura e pH), dados dos animais (pesos médios dos camarões e hepatopâncreas) e valores médios da concentração RNA Total.

Partindo-se das amostras da reação de cDNA, foi realizada a PCR convencional após transcrição reversa, onde, os produtos de amplificação de cada gene (Pellino-1 e β -actina) foram visualizados por eletroforese em gel de agarose. A expressão do gene para a β -actina foi utilizado como normalizador da expressão dos PAMs visto que é um gene constitutivo (*housekeeping*) e deve, portanto, estar sendo expresso continuamente.

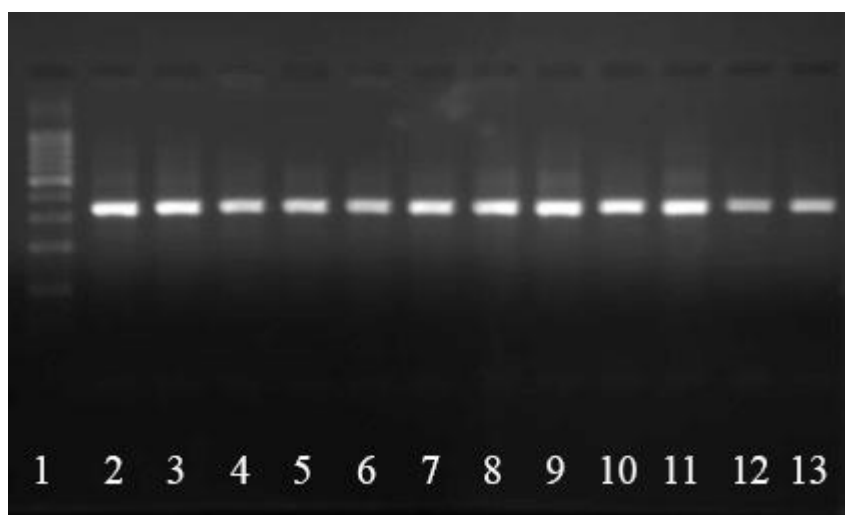
TABELA 6 – DADOS DO CULTIVO, ANIMAIS UTILIZADOS E DA QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL EM EQUIPAMENTO NANODROP®.

Tratamento	Temperatura da água de cultivo	pH da água de cultivo	Peso do Hepatopâncreas (em gramas)	Peso do Camarão (em gramas)	Médias da concentração RNA Total (ng/μl)
Controle – Tempo 0	24°C	7,23	1,2	16,8	511,15
Inoculado – Tempo 0			1,7	21,5	264,13
Controle – Tempo 12	22°C	7,74	1,3	20,8	460,10
Inoculado – Tempo 12			1,6	23,1	456,40
Controle – Tempo 24	22°C	7,55	1,3	24,0	612,28
Inoculado – Tempo 24			1,1	22,8	773,43

FONTE: A Autora (2021).

A Figura 5 demonstra o perfil eletroforético dos produtos de amplificação por PCR para o gene da β -actina e a Figura 6 refere-se ao PAM Pellino-1.

FIGURA 5 – ELETROFORESE DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DA B-ACTINA.



FONTE: A Autora (2021).

LEGENDA: As amostras de 1 a 13, referem-se a:

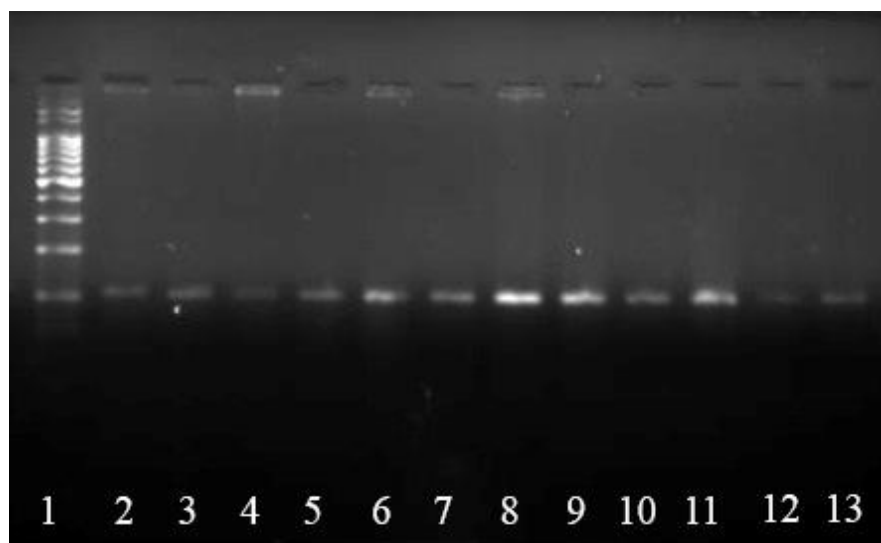
- 1 – Padrão de peso molecular de 100pb;
- 2 – Amostra controle (tempo 0);
- 3 – Amostra controle (tempo 0);
- 4 – Amostra inoculado (tempo 0);

- 5 – Amostra inoculado (tempo 0);
- 6 – Amostra controle (tempo 12);
- 7 – Amostra controle (tempo 12);
- 8 – Amostra inoculado (tempo 12);
- 9 – Amostra inoculado (tempo 12);
- 10 – Amostra controle (tempo 24);
- 11 – Amostra controle (tempo 24);
- 12 – Amostra inoculado (tempo 24);
- 13 – Amostra inoculado (tempo 24).

Lin e Redies (2012), afirmam que genes *housekeeping* são genes necessários para a manutenção das funções básicas das células e são expressos em quase todas as células de um organismo. São utilizados como normalizadores da expressão gênica, pois, podem ser expressos de forma invariável em diferentes condições experimentais, servindo como referências internas. Ainda segundo os autores, o gene da β -actina é comumente empregado como controle interno em estudos quantitativos de mRNA ou de expressão de proteínas, devido a capacidade de ser expresso de forma estável e constitutiva em níveis elevados na maioria dos tecidos e células de diferentes espécies em todas as amostras sob investigação.

Corroborando com os autores citados, neste trabalho os dados apresentados na Figura 5 para o gene da β -actina, demonstram sua expressão em todas as condições testadas (animais controle e desafiados) e em todos os tempos experimentais (0, 12 e 24 horas), demonstrando a expressão deste gene continuamente de forma constitutiva, contribuindo para a manutenção das células do camarão *M. rosenbergii*. Após 24 de infecção, a expressão de β -actina passou a ser menor comparando aos tempos 0 e 12, tanto para o controle, quanto para inoculado, porém o gene continuou a ser expresso.

FIGURA 6 – ELETROFORESE DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DO PAM PELLINO-1.



FONTE: A Autora (2021).

LEGENDA: As amostras de 1 a 13, referem-se a:

- 1 – Padrão de peso molecular de 100pb;
- 2 – Amostra controle (tempo 0);
- 3 – Amostra controle (tempo 0);
- 4 – Amostra inoculado (tempo 0);
- 5 – Amostra inoculado (tempo 0);
- 6 – Amostra controle (tempo 12);
- 7 – Amostra controle (tempo 12);
- 8 – Amostra inoculado (tempo 12);
- 9 – Amostra inoculado (tempo 12);
- 10 – Amostra controle (tempo 24);
- 11 – Amostra controle (tempo 24);
- 12 – Amostra inoculado (tempo 24);
- 13 – Amostra inoculado (tempo 24).

Ravichandran et al. (2016), verificaram que o gene Pellino pode ser expresso em vários tecidos de camarões saudáveis de *M. rosenbergii*, apresentando moderada expressão no hepatopâncreas. Os autores aplicaram o desafio séptico com bactérias gram-negativas da espécie *Escherichia coli* com 0, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas pós injeção e observaram que houve uma expressão induzida com 6 horas e aumentou gradual depois com 12 e 24 horas diminuindo gradualmente às 48 horas e atingiu o nível basal às 72 horas. Assim, os autores concluem que a expressão de Pellino quando em condições de desafio bacteriano é dependente do tempo, o que pode ser baseado na patogênese dos organismos no hospedeiro.

Li e colaboradores (2014), trabalhando com camarão da espécie *Litopenaeus vannamei*, relataram que após os desafios séptico com vírus da síndrome da mancha branca, *Vibrio parahaemolyticus* e *Staphylococcus aureus*,

o peptídeo Pellino pode ser regulado positivamente o que sugere uma resposta imunológica aos desafios bacterianos, assim como o silenciamento (*Knockdown*) gênico do Pellino pode diminuir significativamente a expressão de PAMs e aumentar a mortalidade de camarões causada por desafio utilizando bactérias gram-negativas como *Vibrio parahaemolyticus*.

Os resultados encontrados neste trabalho para o gene Pellino (Figura 6), estão de acordo com os autores citados, em que, quando aplicado o desafio séptico com *A. hydrophila* houve uma maior expressão do gene com 12 horas após a infecção (amostras 8 e 9) somente em camarões desafiados demonstrando uma ativação do sistema imunológico em resposta ao desafio bacteriano.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Em vista dos argumentos aqui apresentados, este trabalho foi desenvolvido buscando a análise da expressão gênica do peptídeo antimicrobiano (Pellino-1) no hepatopâncreas de *M. rosenbergii*, em animais com ou sem desafio por *A. hydrophila*, sob diferentes tempos de contato do camarão com a bactéria.

As técnicas aqui utilizadas foram adequadas e puderam demonstrar que o hepatopâncreas foi capaz de expressar Pellino-1, regulando a expressão do gene nos diferentes tempos avaliados para os animais desafiados, como esperado, validando a presença de um sistema imunológico respondendo a infecções por organismos patogênicos. Além disso, pode-se observar através do teste de coagulação da hemolinfa que no início dos experimentos todos os animais obtidos do sistema de criação eram animais saudáveis

Quanto a bactéria utilizada, através da caracterização morfológica e bioquímica podemos concluir que o isolado aqui utilizado era da espécie *Aeromonas hydrophila*.

A expressão de outros PAMs está sendo realizada e será concluída em breve e será, juntamente com a análise da expressão do gene Pellino, realizada de forma quantitativa, por PCR em Tempo Real.

REFERÊNCIAS

- AL-SHALAH, L. A. M. The study characters of *Aeromonas hydrophila* on some media. **Mesopotamia Environmental Journal**, n. Special Issue C, p. 121-129, 2017.
- ALMEIDA, H. O. **Identificação de peptídeos antimicrobianos de folhas de berinjela para o controle de patógenos de plantas**. 2007. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- ANGER, K. Neotropical *Macrobrachium* (Caridea: Palaemonidae): on the biology, origin, and radiation of freshwater-invading shrimp. **Journal of Crustacean Biology**, v. 33, n. 2, p. 151-183, 2013.
- AYISI, C. L. et al. Recent Studies Toward the Development of Practical Diets for Shrimp and Their Nutritional Requirements. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 24, n. 3, p. 109-117, 2017.
- BALLESTER, E. L. C. et al. Productive performance of juvenile freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* in biofloc system. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 9, p. 4748-4755, 2017.
- BARCELLOS, L. J. G. et al. *Aeromonas hydrophila* em *Rhamdia quelen*: aspectos macro e microscópico das lesões e perfil de resistência a antimicrobianos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 3, p. 355-363, 2018.
- BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Imunologia de crustáceos com ênfase em camarões. **Laboratório de Imunologia Aplicada à Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil**, 2007.
- BASE DE DADOS dos Peptídeos Antimicrobianos, Department of pathology and microbiology, UNMC - University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE. Disponível em <<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>>. Acesso em: 26 abr. 2020
- BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.
- BLANCK, D. V. et al. Isolation and characterization of SNPs within HSC70 gene in the freshwater prawn *Macrobrachium amazonicum*. **Conservation Genet Resour**, v. 5, n. 3, p. 631-633, 2013.
- BLANCK, D. V. et al. SNPs within HSC70 gene are associated to growth traits in the Amazon River prawn. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 11, n. 3, p. 210-219, 2016.

BULET, P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological reviews**, v. 198, n. 1, p. 169-184, 2004.

CAETANO, I. S.; QUEIROZ, E. S. M. Peptídeos Antimicrobianos como Ferramenta Biotecnológica. **Artigo de Revisão**, p. 1-7. 2014.

CHAND, R. K.; SAHOO, P. K. Effect of nitrite on the immune response of freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* and its susceptibility to *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 258, n. 1-4, p. 150-156, 2006.

COSTA, A. M.; MARTINS, P. C. C. Análise da contagem total de hemócitos e capacidade coagulante da hemolinfa do camarão *litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) em cultivos com ocorrência de necrose muscular. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 4, p. 545-551, 2009.

DASKALOV, H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. **Food control**, v. 17, n. 6, p. 474-483, 2006.

DÍAZ, R. A. J.; et al. Sensibilidad antimicrobiana en bacterias de origen ambiental. **Higiene y Sanidad Ambiental**, v. 6, p.150-159, 2006.

FAN, X. et al. A facile method to classify clinic isolates with a turn-off sensor array based on graphene oxide and antimicrobial peptides. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 307, p. 127607, 2020.

FENG, P. et al. Effect of dietary *Tenebrio molitor* protein on growth performance and immunological parameters in *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, p. 734247, 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO, 2021. **FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2019**. Rome. Disponível em <https://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2019_USBcard/booklet/web_cb7874t.pdf>. Acesso em: 03 dez. 2021.

GAZOLA-SILVA, F. F.; MELO, S. G.; VITULE, JR S. *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda: Palaemonidae): possível introdução em um rio da planície litorânea paranaense (PR, Brasil). **Acta Biológica Paranaense**, v. 36, 2007.

HAIDER, M. N. et al. Quality assessment of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in ice storage condition collected from selected farms and depots. **Progressive Agriculture**, v. 22, n. 1–2, p. 139–149. 2011.

HAMEED, A. S. S. Viral infections of *Macrobrachium* spp.: Global status of outbreaks, diagnosis, surveillance, and research. **The Israeli Journal of Aquaculture**, v. 61, p. 240–247, 2009.

HUANG, Y.; REN, Q. Research progress in innate immunity of freshwater crustaceans. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 104, p. 103569, 2020.

IKETANI, G. et al. The history of the introduction of the giant river prawn, *Macrobrachium cf. rosenbergii* (Decapoda, Palaemonidae), in Brazil: New insights from molecular data. **Genetics and molecular biology**, v. 34, n. 1, p. 142-151, 2011.

JARIYAPONG, P. et al. Hematopoietic tissue of *Macrobrachium rosenbergii* plays dual roles as a source of hemocyte hematopoiesis and as a defensive mechanism against *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus infection. **Fish & shellfish immunology**, v. 86, p. 756-763, 2019.

LABORCLIN. **Kit Enterobactérias**. 2019. Disponível em <https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/05/kit_enterobacterias_bula_25012019.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2021.

LI, C. et al. Pellino protein from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* positively regulates NF- κ B activation. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 44, n. 2, p. 341-350, 2014.

LI, F.; XIANG, J. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 39, n. 1-2, p. 11-26, 2013.

LIN, J.; REDIES, C. Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. **Development genes and evolution**, v. 222, n. 6, p. 369-376, 2012.

MOURIÑO, J. L. P. et al. Isolamento de *Aeromonas hydrophila* em girinos de rã-touro na metamorfose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 8, p. 1325-1327, 2006.

NEW, M. B. Farming freshwater prawns: a manual for the culture of the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). **FAO Fisheries Technical Paper**, n. 428. 212p. 2002.

NEW, M. B. et al. (Ed.). **Freshwater prawns: biology and farming**. Oxford, Wiley-Blackwell, 2010.

NGUYEN, T. M. T. et al. Study on biochemical divergences of the meat and egg of freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). **Food Science & Nutrition**, 2019.

NHAN, D. T. et al. The effect of poly β -hydroxybutyrate on larviculture of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, v. 302, n. 1-2, p. 76-81, 2010.

- NOMURA, H. **Criação de camarões**. 2. ed. Campinas, SP: Papirus, 1986.
- PASUPULETI, M.; SCHMIDTCHEN, A.; MALMSTEN, M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. **Critical reviews in biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 143-171, 2012.
- PEIXOTO, L. J. S. et al. *Aeromonas* spp.: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v. 79, n. 3, p. 453-461, 2012.
- PEREGRINO, L. H. Importância da utilização de análises presuntivas como ferramenta de prevenção e controle de enfermidades no camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. **Revista da ABCC**, Natal, 3: 47-51, 2005.
- PINHEIRO, M. A. A.; HEBLING, N. J. Biologia de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). In VALENTI, WC. (Ed.), **Carcinicultura de água doce: Tecnologia para Produção de Camarões**, São Paulo: FAPESP, p. 21- 46, 1998.
- PUDGERD, A. et al. The hematopoietic organ of *Macrobrachium rosenbergii*: Structure, organization and immune status. **Fish & shellfish immunology**, v. 88, p. 415-423, 2019.
- RAVICHANDRAN, G. et al. Pellino-1 derived cationic antimicrobial prawn peptide: bactericidal activity, toxicity and mode of action. **Molecular immunology**, v. 78, p. 171-182, 2016.
- REECE, J. B. et al. **Biologia de Campbell**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.
- RIBEIRO, P. A. P.; LOGATO, P. V. R. Criação de camarões de água doce (*Macrobrachium rosenbergii*). Boletim de Extensão – Editora UFLA, n.26, 2002. Disponível em: <<http://www.editora.ufla.br/index.php/component/phocadownload/category/56-boletins-de-extensao?download=1105:boletinxensao>>. Acesso em: 27 set. 2021.
- RAO, R. et al. A transcriptome study on *Macrobrachium rosenbergii* hepatopancreas experimentally challenged with white spot syndrome virus (WSSV). **Journal of invertebrate pathology**, v. 136, p. 10-22, 2016.
- RICILUCA, K. C. T. **Peptídeos bioativos do plasma de *Acanthoscurria rondoniae***. 2016. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ROSA, R. D.; BARRACCO, M. A. Antimicrobial peptides in crustaceans. **Invertebrate Survival Journal**, v. 7, n. 2, p. 262-284, 2010.
- SAMAYANPAULRAJ, V. et al. Identification and characterization of virulent *Aeromonas hydrophila* Ah17 from infected *Channa striata* in river Cauvery and

in vitro evaluation of shrimp chitosan. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 2, p. 1272-1283, 2020.

SILVA, T. A. da; BALLESTER, E. L. C.; CUNICO, A. M. First records of non-native species Malaysian prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda: Palaemonidae) in an important South American hydrographic system. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 32, 2020.

TASSANAKAJON, A. et al. Cationic antimicrobial peptides in penaeid shrimp. **Marine biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 639-657, 2011.

TASSANAKAJON, A. et al. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. **Fish & shellfish immunology**, v. 34, n. 4, p. 954-967, 2013.

TASSANAKAJON, A. et al. Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 80, p. 81-93, 2018.

TEIXEIRA, V.; FEIO, M. J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Progress in lipid research**, v. 51, n. 2, p. 149-177, 2012.

TIRUVAYIPATI, S.; BHASSU, S. Host, pathogen and the environment: the case of *Macrobrachium rosenbergii*, *Vibrio parahaemolyticus* and magnesium. **Gut pathogens**, v. 8, n. 1, p. 15, 2016.

UEMURA, E. H., 2019. **Lactose Gelatina**. Laborclin. Disponível em <<https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/11/510100-LACTOSE-GELATINA-10mL-TB16X150-10TB-2.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2021.

VOGEL, L. et al. Efeito da temperatura da água em cultivo de camarões de água doce *Macrobrachium rosenbergii* (DE MAN, 1879) e *Macrobrachium amazonicum* (HELLER, 1862). In: VI JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, v. 1 n. 6, 2016, Chapecó, **Anais...** Chapecó, 2016.

ZUCCA, M.; SCUTERA, S.; SAVOIA, D. Antimicrobial peptides: new frontiers in the therapy of infections. Drug Development - A Case Study Based Insight into Modern Strategies. **INTECH Open Acess Publisher**, 6: p.123 – 164. 2011.