

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLÁVIA BORDIGNON HENDGES

EXPRESSÃO GÊNICA DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE *Macrobrachium rosenbergii* (DE MAN, 1879) SUBMETIDO À DESAFIO SÉPTICO COM *Aeromonas hydrophila*

PALOTINA

2023

FLÁVIA BORDIGNON HENDGES

EXPRESSÃO GÊNICA DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE *Macrobrachium rosenbergii* (DE MAN, 1879) SUBMETIDO A DESAFIO SÉPTICO COM *Aeromonas hydrophila*

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Rogério Rosado

Coorientador: Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas

PALOTINA

2023

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.  
Biblioteca UFPR Palotina.

H497 Hendges, Flávia Bordignon  
Expressão gênica de peptídeos antimicrobianos de  
*Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879) submetido a  
desafio séptico com *Aeromonas hydrophila*  
/ Flávia Bordignon Hendges. – Palotina, PR, 2023.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná,  
Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em Educação em  
Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Rogério Rosado.

Coorientador: Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas.

1. Aquicultura. 2. RT-PCR. 3. Sistema imunológico.  
I. Rosado, Fabio Rogério. II. Seixas, Flavio Augusto Vicente.  
III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 639.3

Bibliotecária: Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653



## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **FLÁVIA BORDIGNON HENDGES** intitulada: **EXPRESSÃO GÊNICA DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE *Macrobrachium rosenbergii* (DE MAN, 1879) SUBMETIDO À DESAFIO SÉPTICO COM *Aeromonas hydrophila*.**, sob orientação do Prof. Dr. FÁBIO ROGÉRIO ROSADO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 28 de Julho de 2023.

Assinatura Eletrônica

08/08/2023 17:48:01.0

FÁBIO ROGÉRIO ROSADO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

02/08/2023 08:34:54.0

TANIA SILA CAMPIONI MAGON

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

01/08/2023 17:35:04.0

EDUARDO LUIS CUPERTINO BALLESTER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

01/08/2023 22:21:19.0

JOSÉ LUIS DA CONCEIÇÃO SILVA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

07/08/2023 09:25:37.0

ADRIANA FIORINI ROSADO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

A Deus  
As razões da minha vida: Leonel e Vicente  
Aos meus pais,

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Início agradecendo de forma especial a DEUS, pelo dom da vida e pela oportunidade de poder correr atrás dos meus sonhos e concluir mais esta etapa, sempre estando ao meu lado e no comando de tudo.

À Universidade Federal do Paraná, instituição de ensino superior público e de qualidade, que foi minha casa durante muitos anos da minha trajetória acadêmica.

À Fundação Araucária pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, em parceria com a Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, que propiciou a base da pesquisa científica aqui realizada.

Aos servidores técnicos da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, por toda ajuda durante a realização desta pesquisa e principalmente por disponibilizar os laboratórios e equipamentos que eram necessários.

Ao Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal e aos professores Dr<sup>a</sup>. Luciana Grange e Dr. Marco Antônio Bacellar Barreiros, por todo auxílio e apoio durante meu doutorado, me receberam como aluna durante o estágio em docência, permitiram que eu pudesse acompanhar suas aulas teóricas e práticas e também ministrar as minhas, sempre mantendo as portas do seu laboratório abertas para que essa pesquisa pudesse acontecer. Vocês são fantásticos!

Ao meu Coorientador Professor Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas uma pessoa excepcional, com valiosas contribuições para este trabalho e que disponibilizou seu laboratório e a infraestrutura da UEM para a realização da pesquisa. Infelizmente devido a pandemia não pude aproveitar a oportunidade em todo o seu potencial, mas sou grata por toda orientação e auxílio.

Ao Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA), da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, onde meu doutorado realmente aconteceu. Obrigada por me acolherem, foi maravilhoso me tornar parte desta equipe que tanto admiro! Espero poder ter contribuído com o grupo de alguma forma, compartilhando conhecimentos, dividindo bancada e as batalhas do dia-dia, da mesma forma que muitos contribuíram comigo! Essa equipe é Show!

Ao Laboratório Multiusuário – LABCA do Campus Toledo da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela parceria e pelas análises realizadas.

À cada professor do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular do setor Palotina da UFPR, por todo conhecimento transmitido durante a minha caminhada, seja em sala de aula nas disciplinas ou em conversas informais.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Fabio Rogério Rosado e a maravilhosa Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado, por toda orientação recebida nestes anos de convivência. Sem vocês, não seria possível colher os frutos deste trabalho! Obrigada por acreditarem em mim, em meu potencial e pela oportunidade de poder fazer acontecer essa pesquisa! Obrigada de coração por todos os ensinamentos, incentivos, motivações e amizade! Vocês são professores incríveis com um conhecimento gigantesco e uma grande paixão pelo ensinar! Admiro muito vocês, e algum dia espero poder ser uma pequena parte do que são para mim. Obrigada por toda dedicação! Com toda certeza são pessoas como vocês que fazem a Ciência acontecer em nosso país.

Ao Professor Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester por sempre disponibilizar os animais necessários para a pesquisa, desde a fase dos testes e ensaio piloto até a fase final, e por todo o suporte com os camarões, seja com informações, orientações no manejo e com auxílio na aclimatação dos experimentos. Obrigada professor por cada conversa, correções em minhas bancas e indicações de bibliografias.

Aos ICs que tive a oportunidade de partilhar a realização deste trabalho. Ao Paulo Daniel Apolinário que me acompanhou por um breve tempo na minha entrada no doutorado e me ensinou como fazer um gel de poliacrilamida e ao Victor Donatti Machado que permaneceu mais tempo comigo nesta pesquisa com quem pude desde partilhar conhecimentos científicos até cultivar camarão. Obrigada por toda ajuda no laboratório.

Aos meus colegas do programa de Pós-graduação, por partilharmos muitas disciplinas juntos e tanto sofremos na realização das nossas pesquisas. Agradeço em especial a Cassia Rosana Rambo, Cinthia Façanha Wendel, Fernanda Cristina Buraslan Neves Pereira e Gabrielle Caroline Peiter, pela amizade que construímos e por todos os momentos juntas, os congressos e simpósios. Vocês tornaram a caminhada mais agradável e divertida!

Ao meu querido esposo, Leonel, por ser uma parte fundamental e tão importante na minha vida! Agradeço você por seu apoio incondicional, por se fazer presente em todos os momentos sempre ao meu lado, me incentivando a estudar e a buscar mais e mais, me fazendo acreditar que sou capaz de muito mais do que imagino, mesmo quando nem eu acreditava! Obrigada por toda ajuda em cada etapa da realização deste trabalho, desde ir comigo ao laboratório nos finais de semana para não me deixar sozinha até na formatação deste trabalho. Este trabalho foi possível de ser concretizado pois você estava ao meu lado

sempre me incentivando, dando apoio ou um ombro amigo para me lamentar quando tudo estava ruindo. Obrigada por dividir a vida comigo, você torna os meus dias mais leves! Sou grata pelo seu companheirismo de sempre, amizade, paciência, compreensão, alegria e amor. Te amo! Obrigada por ter feito dos meus sonhos o NOSSO sonho! Obrigada meu amor pela nossa linda família! Amo você e nosso bebê mais que tudo! Vocês que me motivam a continuar e ser cada dia melhor! Esta conquista também é de vocês e por vocês!

Aos meus pais Pedro e Nelci Bordignon que sempre me incentivaram a alcançar caminhos cada vez mais distantes e seguir em frente na constante busca pelo conhecimento. Obrigada pelo apoio em mais uma etapa importante da minha vida, por entenderem quando não era possível estarmos juntos e principalmente por serem os responsáveis pela minha educação, mostrando sempre que a honestidade e humildade são virtudes essenciais! Às minhas irmãs Daniela e Débora por todo apoio e sempre estarem ao meu lado! Obrigada família por todo amor e por amarem e cuidarem do Vicente!

A todos que contribuíram para a execução desta Tese de alguma forma auxiliaram ou ensinaram. Agradeço também por todas as palavras de apoio e incentivo durante a minha trajetória. Minha gratidão a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“O que eu penso a respeito da vida  
É que um dia ela vai perguntar  
O que é que eu fiz com meus sonhos? ”

## RESUMO

A aquicultura vem ganhando destaque no cenário atual. A produção de camarão, principalmente de água doce, são atividades em expansão devido ao importante valor econômico. A espécie *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879), conhecido como camarão gigante de água doce, destaca-se por ser um dos crustáceos mais importantes economicamente por possuir elevado valor de mercado, e dessa forma, é produzido em larga escala em diferentes partes do mundo. Em seu ambiente de produção, o camarão está exposto a uma infinidade de microrganismos benéficos ou patogênicos que podem onerar os sistemas de produção fazendo com que a cultura do camarão esteja ameaçada. Pequenas cadeias de aminoácidos denominados de peptídeos antimicrobianos (PAMs) são secretados e reagem de forma ativa no combate a infecções adversas e são eficientes na eliminação dos patógenos. O hepatopâncreas é um órgão essencial presente nos invertebrados, considerado como fonte de moléculas imunes. Este trabalho teve como objetivo avaliar e comparar a expressão de genes para PAMs, no hepatopâncreas de camarões adultos de *M. rosenbergii* em resposta a injúria séptica com a bactéria *Aeromonas hydrophila* nos tempos de 0, 12 e 24 horas após inoculação. Os experimentos foram realizados na Universidade Federal do Paraná (UFPR – Setor Palotina). Os animais foram avaliados quanto ao tempo de coagulação da hemolinfa como parâmetro para avaliar a sanidade dos animais utilizados nos experimentos. A bactéria *A. hydrophila* foi avaliado por testes bioquímicos e morfológicos, sendo caracterizada como *A. hydrophila* com teste negativo para indol. Nas análises moleculares, o perfil transcricional de genes relacionados com os PAMs foram analisados através da técnica de RT-PCR quantitativa e semi-quantitativa e as proteínas do órgão foram extraídas e visualizadas em gel de poliacrilamida. O gene da  $\beta$ -actina, utilizado como normalizador da expressão gênica demonstrou estar presente em todas as condições testadas. Os resultados indicaram que os genes, *Pellino-1* e *ALF-6* foram expressos em maior quantidade com 12 horas após desafio séptico com a bactéria, enquanto para *Crustina* na presença da bactéria, houve a repressão do gene (tempo 12 e 24 horas após inoculação). O gene *ALF-6* apresentou uma super expressão com *fold change* de 17x, apontando um papel específico no combate a infecção causada por *A. hidrophila*. Portanto, foi possível observar em nosso trabalho que o hepatopâncreas foi capaz de expressar os PAMs aqui estudados, regulando a expressão dos genes nos diferentes tempos avaliados para os animais desafiados, como esperado, validando a presença de um sistema imunológico respondendo a infecções por organismos patogênicos, como a *A. hydrophila*. Faz-se necessários estudos complementares através de técnicas bioquímicas mais sofisticadas, para que a imunologia de *M. rosenbergii* possa ser mais bem compreendida.

Palavras-chave: Aquicultura. Sistema imunológico. RT-PCR.

## ABSTRACT

Aquaculture has been gaining prominence in the current scenario. Shrimp production, mainly freshwater, is an expanding activity due to its important economic value. The species *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879), known as giant freshwater shrimp, stands out for being one of the most economically important crustaceans for having a high market value, and therefore, it is cultivated on a large scale in different parts of the world. In their production environment, shrimp are exposed to a multitude of beneficial microorganisms or pathogens that can burden production systems, making shrimp culture endangered. Small chains of amino acids called antimicrobial peptides (AMPs) are secreted and react actively to combat adverse infections and are efficient in eliminating pathogens. The hepatopancreas is an essential organ present in invertebrates, considered as a source of immune molecules. This work aimed to evaluate and compare the expression of genes for AMPs in the hepatopancreas of adult *M. rosenbergii* shrimp in response to septic injury with the bacterium *Aeromonas hydrophila* at 0, 12 and 24 hours after inoculation. The experiments were carried out at the Universidade Federal do Paraná (UFPR – Setor Palotina). The animals were evaluated regarding the hemolymph clotting time as a parameter to assess the health of the animals used in the experiments. The bacterium *A. hydrophila* was evaluated by biochemical and morphological tests, being characterized as *A. hydrophila* with negative test for indole. In the molecular analyses, the transcriptional profile of genes related to the AMPs were analyzed using the quantitative and semi-quantitative RT-PCR technique and the organ proteins were extracted and visualized on a polyacrylamide gel. The  $\beta$ -actin gene, used as a gene expression normalizer, proved to be present in all conditions tested. The results indicated that the genes *Pellino-1* and *ALF-6* were expressed in greater quantity 12 hours after septic challenge with the bacteria, while for *Crustina* in the presence of the bacteria, there was gene repression (time 12 and 24 hours after inoculation). The ALF-6 gene showed an overexpression with a fold change of 17x, pointing to a specific role in combating the infection caused by *A. hydrophila*. Therefore, it was possible to observe in our work that the hepatopancreas was able to express the AMPs studied here, regulating gene expression at different times evaluated for the challenged animals, as expected, validating the presence of an immune system responding to infections by pathogenic organisms, such as *A. hydrophila*. Complementary studies are necessary through more sophisticated biochemical techniques, so that the immunology of *M. rosenbergii* can be better understood

Keywords: Aquaculture. Immune system. RT-PCR.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PRINCIPAIS PAÍSES PRODUTORES DE <i>Macrobrachium rosenbergii</i> .....	25
FIGURA 2 – EXEMPLARES DA ESPÉCIE <i>Macrobrachium rosenbergii</i> .....	26
FIGURA 3 – DESCRIÇÃO DA MORFOLOGIA EXTERNA DE <i>Macrobrachium rosenbergii</i> .....	29
FIGURA 4 - SUBTIPOS MORFOLÓGICOS DE MACHOS <i>Macrobrachium rosenbergii</i> ....	31
FIGURA 5 - FÊMEAS DE <i>Macrobrachium rosenbergii</i> .....	32
FIGURA 6 - TIPOS ESTRUTURAIS DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS .....	38
FIGURA 7 - MODELO PROPOSTO DE MECANISMOS DE AÇÃO DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS .....	50
FIGURA 8 - VISUALIZAÇÃO A FRESCO DOS TÚBULOS DO HEPATOPÂNCREAS .....	52
FIGURA 9 - HEPATOPÂNCREAS DE <i>Macrobrachium rosenbergii</i> .....	52
FIGURA 10 - ENSAIOS BIOQUÍMICOS REALIZADOS COM O ISOLADO <i>A. hydrophila</i>	63
FIGURA 11 – TESTE DA CATALASE .....	64
FIGURA 12 - COLORAÇÃO DE GRAM PARA O ISOLADO DE <i>Aeromonas hydrophila</i> ...	65
FIGURA 13 - CRESCIMENTO EM MEIO SELETIVO TCBS PARA O ISOLADO DE <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	65
FIGURA 14 - ELETROFORESE DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DO cDNA DOS GENES PARA PAMs .....	70
FIGURA 15 - EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE PELLINO–1 EM <i>M. rosenbergii</i>	71
FIGURA 16 - EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE ALF- 6 EM <i>M. rosenbergii</i> .....	72
FIGURA 17 - EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE CRUSTINA EM <i>Macrobrachium rosenbergii</i> .....	75
FIGURA 18 - ELETROFORESE SDS-PAGE DE PROTEÍNAS TOTAIS .....	77

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - TAXONOMIA DO GÊNERO <i>Macrobrachium</i> .....	22
---	----

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS JÁ DESCRITOS NA LITERATURA EM DIFERENTES ESPÉCIES DE CAMARÃO (em ordem cronológica). .....	41
TABELA 2 - INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE EXPRESSÃO GÊNICA EM <i>Macrobrachium rosenbergii</i> . .....	58
TABELA 3 - RESULTADOS DOS ENSAIOS BIOQUÍMICOS, REALIZADOS PARA O ISOLADO DE <i>Aeromonas hydrophila</i> . .....	62
TABELA 4 - RESULTADOS DOS ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS, REALIZADOS PARA O ISOLADO DE <i>Aeromonas hydrophila</i> . .....	64
TABELA 5 - PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS, PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO, PARA O ISOLADO DE <i>Aeromonas hydrophila</i> . .....	67
TABELA 6 - TEMPO DE COAGULAÇÃO DA HEMOLINFA PARA <i>Macrobrachium rosenbergii</i> DESAFIADOS E NÃO DESAFIADOS.....	68
TABELA 7 - DADOS DO CULTIVO E MORFOMETRIA DOS ANIMAIS UTILIZADOS.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

® – Marca registrada

% – Por cento

°C – Graus Celsius

$\Delta\Delta C_T$  – Método CT Comparativo, 2(-Delta Delta C(T))

ALFs – Fatores anti-lipopolissacarídeos

$\beta$ GRPs – Proteínas de Reconhecimento de beta-1, 3-glucana

BC – *Blue Claw*

BG – Beta-glucana

cDNA – DNA complementar

cm – Centímetros

DNA – Desoxirribonucleotídeo

dNTP - Desoxirribonucleotídeo Fosfato

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

IHHNV – Vírus Necrose Hipodérmica Infecciosa e Hematopoiética

g – Força G

kDa – Quilodalton

LPS – Lipopolissacarídeo

mL – Mililitros

mM – Milimolar

mm – Milímetros

$\mu$ L – Microlitros

MH – Müller-Hinton

NaCl – Cloreto de Sódio

NK – Célula *Natural Killer*

ng/ $\mu$ L – Nanogramas por Microlitros

nm – Nanômetros

OC – *Orange Claw*

PAMs – Peptídeos Antimicrobianos

PAMPs – Padrões Moleculares Associados aos Patógenos

pb – Pares de Base

PBS – Tampão Fosfato Salino

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PGRPs – Proteínas de Reconhecimento de Peptideoglicano

pH – Potencial Hidrogenônico

pI – Ponto Isoelétrico

PRRs – Receptores de Reconhecimento de Padrões

proPO – Sistema Profenoloxidase

p/v – Porcentagem em peso

RNA – Ribonucleotídeo

RNase – Ribonuclease

RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil- sulfato de sódio (SDS)

SM – *Small Male*

TBE – Tampão Tris/Borato/EDTA

TCH – Tempo de Coagulação da Hemolinfa

TCA – Ácido Tricloroacético

TCBS – Tiosulfato-Citrato-Bile-Sacarose

TSA – *Tryptic Soy Agar*

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

WAP – *Whey Acidic Protein* (proteína ácida do soro de leite)

WSSV – *White Spot Syndrome Virus*

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	17
2	OBJETIVOS .....	20
2.1	OBJETIVO GERAL .....	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	21
3.1	O GÊNERO <i>Macrobrachium</i> .....	21
3.2	INTRODUÇÃO DE ESPÉCIES EXÓTICAS OU ESPÉCIES INVASORAS .....	23
3.3	ESPÉCIE <i>Macrobrachium rosenbergii</i> .....	25
3.4	MORFOLOGIA DA ESPÉCIE <i>Macrobrachium rosenbergii</i> .....	28
3.5	O SISTEMA IMUNOLÓGICO DO CAMARÃO.....	32
3.6	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (PAMs) .....	36
3.7	MECANISMO DE AÇÃO DOS PAMs .....	48
3.8	HEPATOPÂNCREAS .....	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
4.1	LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA.....	54
4.2	COLETA DOS CAMARÕES E OBTENÇÃO DO MICRORGANISMO .....	54
4.3	CARACTERIZAÇÃO DE <i>A. hydrophila</i> .....	54
4.4	DESAFIO SÉPTICO DOS CAMARÕES .....	56
4.5	COAGULAÇÃO DA HEMOLINFA.....	57
4.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	57
4.6.1	COLETA DOS TECIDOS.....	57
4.6.2	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA .....	57
4.6.3	ESCOLHA DOS INICIADORES.....	58
4.6.4	PCR CONVENCIONAL ( <i>End point</i> ) APÓS TRANSCRIÇÃO REVERSA .....	59
4.6.5	PCR EM TEMPO REAL.....	59
4.7	SDS-PAGE DAS PROTEÍNAS DO HEPATOPÂNCREAS.....	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO ISOLADO BACTERIANO.....	62
5.2	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA) .....	66
5.3	TEMPO DE COAGULAÇÃO DA HEMOLINFA (TCH).....	68
5.4	PARÂMETROS DA ÁGUA E DADOS MORFOMÉTRICOS DOS CAMARÕES.....	69

5.5 PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES <i>Pellino-1</i> , <i>ALF6</i> e <i>Crustina</i> , APÓS DESAFIO BACTERIANO. ....	69
5.6 PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DO HEPATOPÂNCREAS.....	
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
REFERÊNCIAS .....	79

## 1 INTRODUÇÃO

O cultivo de camarão para consumo humano (camarão marinho ou de água doce) vem sendo evidenciado como um importante setor econômico para a produção de alimentos, devido principalmente, as proteínas disponíveis presentes na carne de camarão (AYISI et al., 2017). O camarão é considerado uma das principais *commodities*, dentre os produtos aquícolas (BALLESTER et al., 2017). O camarão vem obtendo destaque no mercado mundial aquícola, como um dos mais importantes produtos pesqueiros, devido ao elevado valor econômico agregado ao produto, além de possuir grande teor nutritivo e aceitabilidade pelos consumidores (NEW, 2010). A criação de camarão (denominada de carcinicultura) vêm apresentando grande crescimento nos últimos anos, principalmente em países emergentes, onde esta atividade é responsável por desempenhar importante papel socioeconômico contribuindo com a geração de renda em nível regional e nacional (MACHADO et al., 2018). Segundo dados da FAO (2021), em 2019 através da aquicultura, foram produzidos 10,5 milhões de toneladas de crustáceos, incluindo o camarão.

Um dos principais fatores que tem contribuído para o acentuado crescimento da aquicultura mundial é o cultivo de camarões de água doce. Dentre as principais espécies mais cultivadas destacam-se *Macrobrachium nipponense* (De Haan, 1849), produzida principalmente na China, e *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879), cultivada em vários países, principalmente nos asiáticos (NEW, 2010).

O Brasil ocupa a terceira posição de maior produtor de camarão na América Latina (TAHIM; DAMACENO; ARAÚJO, 2019). A carcinicultura brasileira apresentou para o ano de 2021 uma produção total de 78,6 mil toneladas de camarão criado em cativeiro apontando um crescimento de 18,1% maior que a quantidade indicada no ano anterior. Este montante foi responsável pela geração de um capital de 1,6 bilhão de reais, com um crescimento de 15,0% em relação a 2020 (IBGE, 2021). Dos 26 estados (e o Distrito Federal) brasileiros, o camarão de água doce é cultivado em 19 estados, sendo o Espírito Santo o principal local de cultivo destes animais que são comercializados em todas as regiões brasileiras (VALENTI et al., 2021).

A busca pela segurança alimentar por parte dos consumidores é cada vez maior, assim, é imprescindível a seleção e avaliação dos alimentos do ponto de vista da qualidade, visando atender as legislações alimentares (HAIDER et al., 2011;

TAHIM; DAMACENO; ARAÚJO, 2019). Produtos derivados de camarão de água doce aparecem em menor quantidade nos mercados, devido a rápida perda de qualidade que ocorre pela degradação e deterioração dos ácidos graxos insaturados, através de processos oxidativos, microbianos e por autólise (HAIDER et al., 2011; NGUYEN et al., 2019).

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 é considerada adequada para cultivo segundo os autores Nguyen et al. (2019), pois apresenta boas taxas de crescimento e sobrevivência. No Brasil é a principal espécie de água doce cultivada, sendo produzida em pequenas propriedades espalhadas pelo país, a maioria dos sistemas de produção brasileiros utiliza comumente o cultivo em tanques escavados (ou viveiros) (VALENTI et al., 2021).

O interesse pela cultura torna-se maior à medida que as tecnologias de criação e padronização de técnicas de cultivo avançam o que acaba por atrair investimentos tanto públicos quanto privados. Sendo assim, o controle das doenças, bem como, a prevenção tornam-se indispensáveis para manter o setor aquícola em desenvolvimento (CHAND; SAHOO, 2006; TAHIM; DAMACENO; ARAÚJO, 2019). A aquicultura é vista como uma atividade muito imprevisível, pois apresenta riscos maiores e mais significativos do que outras atividades (VALENTI et al., 2021).

Bactérias e vírus são os principais agentes causadores de infecções na cultura do camarão, o surgimento de inúmeras doenças infecciosas e o ataque de patógenos tem limitado o sucesso da produção, fazendo com que a atividade esteja ameaçada (REECE et al., 2015; CHOOBERT et al., 2023). As doenças infecciosas são, portanto, um dos principais problemas encontrados que podem interferir diretamente na qualidade, resultando em baixo rendimento e mortalidades em massa (NHAN et al., 2010).

Antibióticos e desinfetantes ainda são as metodologias convencionais mais utilizadas para o controle de infecções bacterianas nas Larviculturas 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 imune das células e tecidos do corpo, presente naturalmente nos organismos, interage para que ocorra a eliminação dos agentes patogênicos. Diferentes classes de patógenos são responsáveis pela ativação da resposta imune inata, presente nos organismos invertebrados, de forma distinta. A presença de patógenos faz com que as células imunes secretem pequenas cadeias de aminoácidos, denominados 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).

PAMs são moléculas peptídicas que apresentam atividades antimicrobianas e/ou imunomoduladoras, atuando como importantes efetores imunológicos para a defesa dos organismos podendo eliminar os agentes invasores de modo seletivo, através da perda da integridade da membrana das células alvo (FAN et al., 2020; PHUKET et al., 2023). Em crustáceos, PAMs foram capazes de promover a eliminação de bactérias (PHUKET et al., 2023).

Novas alternativas para combate de agentes infecciosos que sejam menos propensos à resistência bacteriana têm sido buscadas. Dessa forma, os PAMs destacam-se como um antibiótico natural que possui modos de ação específicos e por sua vez, distintos dos antibióticos convencionais, capazes de matar microrganismos (PHUKET et al., 2023).

PAMs surgem como potenciais agentes terapêuticos, fornecendo possibilidades para tratamentos de surtos de doenças, utilizados como uma nova estratégia de biocontrole. Porém seu uso na aquicultura de camarão, como alternativa aos antibióticos, ainda permanece como um importante desafio (PHUKET et al., 2023).

Neste cenário, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a resposta imunológica do camarão de água doce *M. rosenbergii*, por meio da caracterização do perfil de transcricional de alguns genes relacionados com a produção de PAMs em um órgão envolvido com a resposta imunológica deste camarão, quando submetido a injúria séptica causada por *Aeromonas hydrophila*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar o perfil transcricional de genes relacionados com a resposta imunológica, envolvidos na produção de PAMs do camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii*, no hepatopâncreas da espécie antes e após desafio séptico com *Aeromonas hydrophila*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar se os genes Pellino-1, Alf-6 e Crustina relacionados ao sistema imunológico de *M. rosenbergii* são expressos no hepatopâncreas;
- Analisar a modulação desses genes no hepatopâncreas frente a um desafio microbiano;
- Comparar o perfil transcricional dos genes expressos no hepatopâncreas de camarões experimentalmente infectados com *Aeromonas hydrophila* com animais não desafiados.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. O GÊNERO *Macrobrachium*

No grupo dos crustáceos, existem aproximadamente 70.000 espécies vivas descritas e estima-se que há muitas ainda desconhecidas, porém o que torna o grupo um dos mais apreciados dentre os invertebrados é a presença de membros como lagostas, caranguejos e camarões, além disso, exibem uma variada diversidade de formas e dimensões, podendo ser encontrados em todas as profundidades e em habitats contendo águas doce, salgada ou salobra (BRUSCA; MOORE; SHUSTER, 2018). Dentre esta heterogeneidade de espécies, encontramos o gênero *Macrobrachium* (Bate, 1868) que se destaca pela sua grande relevância econômica, ampla distribuição geográfica e pela presença de um grande número de espécies (PILEGGI; MANTELATTO, 2012; ROCHA, 2005).

Conforme descrito por De Grave e Frasen (2011), dentro deste gênero estão descritas 243 espécies de ocorrência mundial. A maior riqueza de *Macrobrachium* pode ser encontrada na região do Pacífico, porém no continente americano já foi registrada a ocorrência de mais 55 espécies diferentes, e destas, 20 são encontradas em território brasileiro, compreendendo grande importância econômica, servindo como alimentos para a população (MANTELATTO et al., 2008).

A classificação taxonômica do gênero *Macrobrachium* está no quadro a seguir (QUADRO 1).

QUADRO 1 - TAXONOMIA DO GÊNERO *Macrobrachium*

Reino: Animalia (Metazoa)
Filo: Arthropoda
Subfilo: Crustacea
Classe: Malacostraca
Subclasse: Eumalacostraca
Superordem: Eucarida
Ordem: Decapoda
Subordem: Pleocyemata
Família: Palaemonidae
Gênero: <i>Macrobrachium</i> Bate, 1888

Fonte: Adaptado de ITIS (2018); BRUSCA; MOORE; SHUSTER (2018).

Segundo Rocha (2005), todos os macrocrustáceos (como é o caso do gênero *Macrobrachium*) estão agrupados dentro da classe dos Malacostraca, e na ordem dos decápodes estão os animais que possuem carapaça bem desenvolvida contendo uma câmara branquial. Nesta ordem também é possível identificar quase todos os membros como exemplos de: caranguejo, camarão, lagosta ou lagostim, além de serem os eumalacóstracos mais conhecidos (BRUSCA; MOORE; SHUSTER, 2018). *Macrobrachium* é o maior gênero da família Palaemonidae (NEW, 2002).

O gênero *Macrobrachium* habita principalmente ambientes de água doce, e pode ser encontrado em regiões como lagos, rios, pântanos, valas de irrigação, canais, lagoas e estuários. Nos estágios iniciais de desenvolvimento, a maioria das espécies demanda de águas salobras, incluindo áreas conectadas ao mar direta ou indiretamente (NEW, 2002). Segundo Wowor e colaboradores (2009), poucas espécies de *Macrobrachium* não vivem em água doce, sendo confinadas a habitarem lugares costeiros, como estuários e lagoas. Assim, este gênero de crustáceos é um importante exemplo de distribuição de linhagens globalmente, tanto em águas tropicais quanto em subtropicais (PILEGGI; MANTELATTO, 2010).

Algumas condições ambientais em que cada espécie vive, como a temperatura, interferem diretamente no ciclo de vida, variando o tempo gasto entre as fases de crescimento e tamanho máximo atingido pela espécie (NEW, 2002). Durante os estágios do ciclo de vida das espécies de *Macrobrachium*, esses organismos podem fazer uso de diferentes fontes de alimentos (WOWOR et al., 2009), sendo que

dentre os camarões de água doce, a maioria é catador ou detritívoro, atuando na reciclagem de material orgânico nos ecossistemas, outros ainda, podem ser predadores de invertebrados e vertebrados (WOWOR et al., 2009; WOWOR; CAI; NG, 2004).

Devido à importância atribuída ao gênero *Macrobrachium*, muitas espécies foram inseridas em outras partes do mundo, fora de sua localização e habitat natural, este fato ocorreu em um primeiro momento para fins de pesquisa (NEW, 2002). A introdução de linhagens vivas de *Macrobrachium* com a finalidade de utilização aquícola também ocorreu, e com isso, algumas espécies acabaram escapando dos ambientes de instalações da criação e estabeleceram-se em locais fora de sua faixa nativa de distribuição, tornando-se espécies invasoras nos ambientes exóticos (ANGER, 2013).

### 3.2 INTRODUÇÃO DE ESPÉCIES EXÓTICAS OU ESPÉCIES INVASORAS

Segundo a definição dada pelos autores Barbieri e Melo (2006), espécies exóticas podem ser organismos ou materiais biológicos destes, como por exemplo: sementes, ovos e esporos, que tenham a capacidade de se propagarem, habitando um novo ambiente em que antes estas espécies não existiam.

Espécies exóticas podem ser introduzidas em um novo ambiente de forma acidental ou proposital, e na maioria das vezes esta introdução é relacionada as atividades antrópicas como o que ocorre com o transporte marítimo e fluvial (água de lastro dos navios), cultivo de novas espécies pela aquicultura, canais de navegação, ou até mesmo a bioincrustação presente nas estruturas navais podem ser locais de vinculação destas espécies (TAVARES; MENDONÇA, 2004).

Os problemas relacionados ao estabelecimento de novas espécies são os impactos que estes novos organismos podem causar à biota e ao ecossistema como um todo, havendo a ocorrência de competição pelo mesmo habitat e/ou alimentos com as espécies nativas e também a presença de patógenos antes inexistente (BARBIERI; MELO 2006).

Apesar disto, o sucesso na colonização de novos ambientes não é atingido por todos os organismos exóticos, poucos terão êxito na colonização, e ainda, das diversas espécies introduzidas mundialmente pode-se dizer que somente algumas

tornaram-se pragas efetivamente, que pôde levar a problemas ecológicos, sanitários ou ainda socioeconômicos (TAVARES; MENDONÇA, 2004; BARBIERI; MELO 2006).

No Brasil, numerosas espécies incomuns foram introduzidas na costa brasileira, dentre estas, têm-se o registro de pelo menos 18 espécies de crustáceos decápodes marinhos e dulcícolas exóticos, somente duas povoando água doce (TAVARES; MENDONÇA, 2004; BARBIERI; MELO 2006). Destas espécies, apenas cinco mantêm populações reprodutivamente ativas, como é o caso da espécie *M. rosenbergii* (BARBIERI; MELO 2006).

Conforme encontrado na base de dados de espécies exóticas invasoras do Brasil (Base de Dados I3N, 2004) *M. rosenbergii* é considerada como uma espécie exótica em território brasileiro, sendo que a criação deste camarão no país se expandiu nos anos 80 (TAVARES; MENDONÇA, 2004).

Apesar de haver 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), de acordo com os autores Freire e Silva (2008) não são encontradas informações científicas que mensurem possíveis impactos ocasionados pela espécie. Além disso, em um estudo realizado por Salazar et al. (2005), onde os autores promoveram cruzamentos entre machos e fêmeas das espécies de *M. rosenbergii* e *M. acanthurus* por inseminação artificial e por cópula controlada tentando evidenciar um cruzamento que poderia ocorrer em ambiente natural e levar a desequilíbrios ambientais devido a alteração na genética dos organismos, os autores encontraram ovos fertilizados porém os mesmos não foram capazes de progredir em seu desenvolvimento, concluindo que o isolamento reprodutivo e a falta de zigotos viáveis são barreiras que impedem o cruzamento natural nessas espécies.

Reforçando essa mesma ideia, Magalhães e colaboradores (2005) afirmam que para a espécie *M. rosenbergii* não foram encontrados relatos de sucesso de reprodução na natureza, e ainda, como a espécie foi introduzida em diversas localidades, não há relatos de efeitos negativos como danos econômicos ou impactos ambientais, relacionados a inserção desta espécie (NEW, 2002; MAGALHÃES et al., 2005).

### 3.3 ESPÉCIE *Macrobrachium rosenbergii*

O atual nome científico desta espécie foi dado em 1959, quando a nomenclatura de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879) foi universalmente aceita, antes disso, recebeu nomes como *Palaemon carcinus*, *Palaemon dacqueti* e *Palaemon rosenbergii* (NEW, 2002).

Conhecido também como camarão gigante de água doce ou gigante da Malásia, esta espécie 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).

FIGURA 1 - PRINCIPAIS PAÍSES PRODUTORES DE *Macrobrachium rosenbergii*



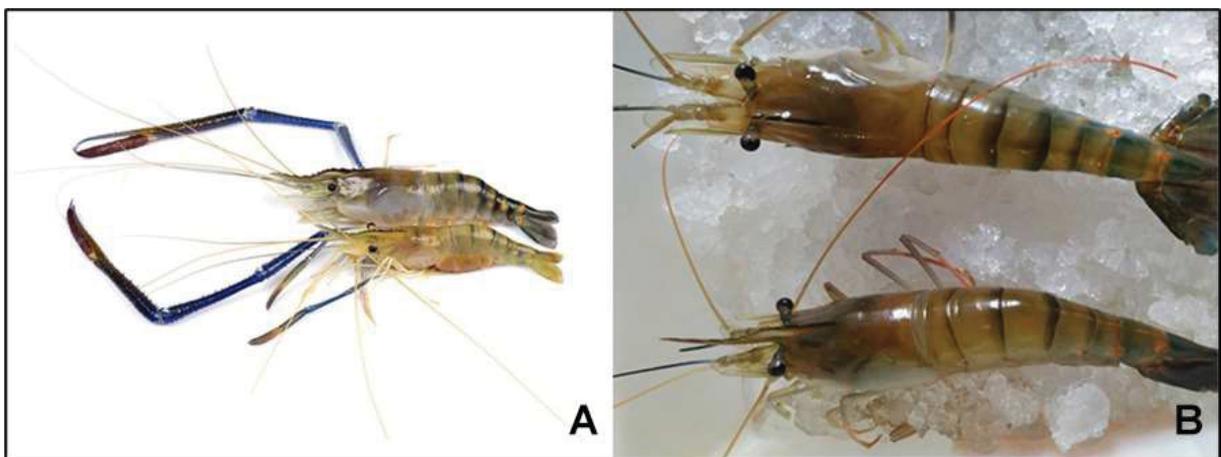
FONTE: FAO Fishery Statistics (2006).

LEGENDA: Áreas demonstradas na cor alaranjada, representam a ocorrência da espécie.

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 (FIGURA 1) (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 inserção de *M. rosenbergii* em reservatórios foi bem-sucedida e atualmente é a espécie mais favorecida para cultivo e exploração. Além disso, *M. rosenbergii* foi uma das primeiras espécies a serem conhecidas cientificamente, devido apresentar importância promissora (NEW, 2002). Na imagem abaixo (FIGURA 2), é possível observar características da espécie.

FIGURA 2 – EXEMPLARES DA ESPÉCIE *Macrobrachium rosenbergii*



FONTE: (A) Laboratório Acquamarão (2016); (B) A autora (2019).

LEGENDA: Na imagem (A), observa-se macho (maior) e fêmea (menor) lado a lado e em (B) imagem capturada no laboratório do NEMA – UFPR.

A criação em cativeiro de *M. rosenbergii* foi possível a partir do início dos anos 1960, quando em 1961 o pesquisador Shao-Wen Ling pertencente a FAO, por meio do Instituto de Pesquisa Pesqueira Marinha localizado na Malásia, fez uma importante descoberta para o desenvolvimento larval da espécie, em que nos estágios iniciais, as larvas necessitam condições de águas salobras para sua sobrevivência, algo até o momento inédito, pois exemplares adultos desta espécie poderiam ser capturados em águas totalmente doces e distantes em até 160 km de águas salgadas (NEW et al., 2010). A partir deste marco, a cultura rapidamente se espalhou gerando interesse mundial nesta espécie e em apenas 10 anos, na maioria dos países asiáticos, além das Américas, Europa e África houve início de projetos de pesquisa e desenvolvimento (NEW et al., 2010). Inicialmente, a espécie foi transferida de sua localização natural e inserida em outras partes do mundo para fins de pesquisa, porém tornou-se a espécie mais utilizada na aquicultura comercial e devido a isto, foi levada a diversas localidades (NEW, 2002).

Em 1965, *M. rosenbergii* chegou ao Havaí através de pós-larvas vindas da Malásia, e a partir deste momento, foi introduzido com a finalidade de cultivo, em praticamente todos os continentes (NEW, 2002). 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), a espécie obteve sucesso em sua introdução.

Algumas espécies podem preferir, para seu desenvolvimento, condições de rios de águas limpas, outras, 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 e 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). O ciclo de vida de *M. rosenbergii* compreende as fases de ovo, larval, pós-larva e adultos. As larvas de *M. rosenbergii* passam por 11 estágios de desenvolvimento antes de sofrerem metamorfose tornando-se pós-larvas, e em seguida adultos (NEW, 2002).

A criação em cativeiro da espécie apresenta limitações para seu desenvolvimento, como a agressividade observada por meio de canibalismo, resultando em perdas aos sistemas de produção relacionadas a mortalidade como também as baixas taxas de crescimento. A fase de muda é o período em que os camarões estão mais expostos ao canibalismo, ou seja, quando há a troca da carapaça rígida que os envolve, devido ao crescimento dos crustáceos ocorrer de maneira descontínua por meio de mudas periódicas (BRUGIOLO et al., 2007).

Além de serem mais susceptíveis ao canibalismo, a muda no ciclo de vida do camarão é uma etapa crítica onde, o exoesqueleto antigo é substituído por um novo exoesqueleto macio embaixo, por um processo de metamorfose. Este estágio é essencial e responsável pela absorção de água nos tecidos de *M. rosenbergii*, para

que os eles possam aumentar seu tamanho. Assim, *M. rosenbergii*, é influenciado pelo ambiente de modo que sua sobrevivência pode ser moldada por questões ambientais, favorecendo ou não sua capacidade de tornar-se adulto, bem como sua permanência e sobrevivência no ambiente (TIRUVAYIPATI; BHASSU, 2016).

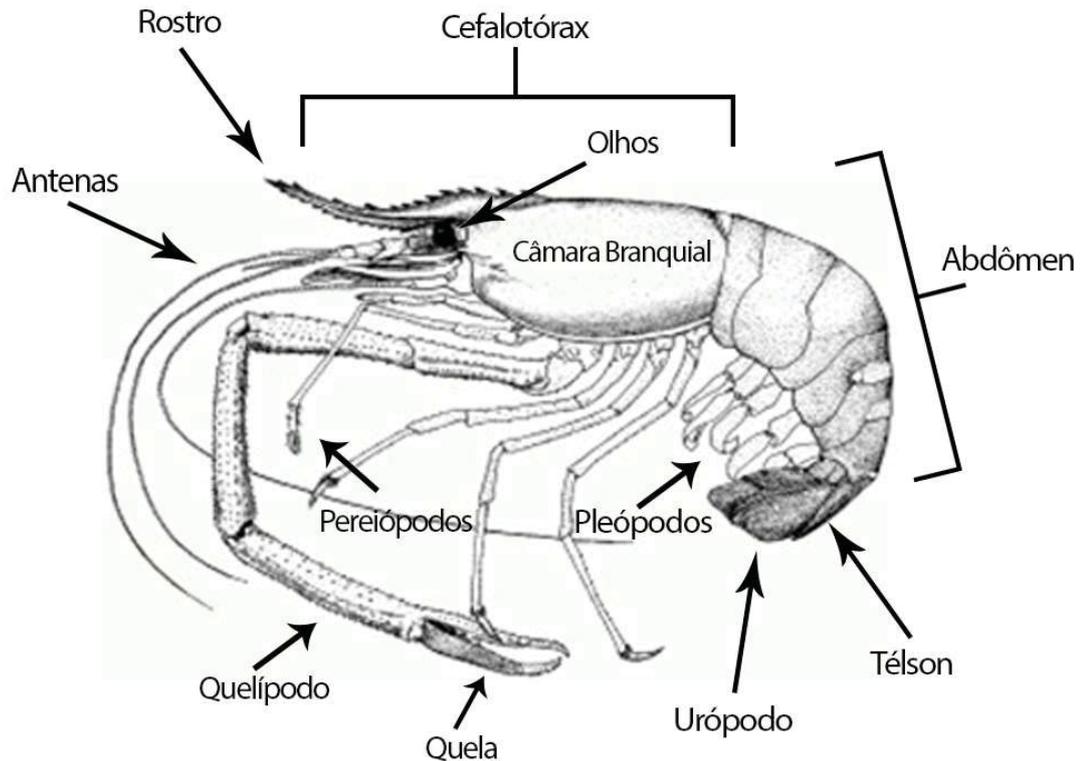
Devido particularmente a algumas características como taxa de crescimento rápida, ciclo de produção curto, elevado valor econômico de exportação e demanda no mercado, a expansão de camarão no mercado a nível mundial ampliou-se rapidamente (AYISI et al., 2017). Porém, o camarão de água doce vem sendo ameaçado pelo surgimento de inúmeras doenças e ataque de patógenos, como por exemplo, as doenças virais reconhecidas globalmente como uma grave ameaça a atividade (REECE et al., 2015; QIU et al., 2019). Assim, estudos envolvendo o sistema imunológico das espécies de camarão de água doce são necessários para que novos métodos para controle e minimização das perdas de produção através de doenças infecciosas, possam ser desenvolvidos (RAO et al., 2016), pois, através do sistema imune ocorre a interação das células e tecidos do corpo para que o agente patogênico possa ser eliminado (REECE et al., 2015).

#### 3.4 MORFOLOGIA DA ESPÉCIE *Macrobrachium rosenbergii*

Nos ambientes aquáticos, *M. rosenbergii* pode ser encontrado nos fundos de rios, lagos, reservatórios e estuários, fazendo parte da macrofauna bentônica. Para sua locomoção a curtas distâncias, utiliza-se do batimento dos pleópodos (apêndices abdominais) e 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).

Conforme observado na Figura 3, o corpo desta espécie é dividido em duas partes distintas, sendo elas cefalotórax e abdômen.

FIGURA 3 – DESCRIÇÃO DA MORFOLOGIA EXTERNA DE *Macrobrachium rosenbergii*



FONTE: Adaptado de FAO Fishery Statistics (2006).

O cefalotórax é formado por segmentos (cefálicos e torácicos) que formam a carapaça (constituída de quitina). Anterior a carapaça, localiza-se o rostro, caracterizado por ser uma estrutura longa e possuir um espinho serrilhado, com 8 -14 dentes (dorsais e ventrais). Abaixo do rostro (à direita e à esquerda), estão os olhos pedunculados (PINHEIRO; HEBLING, 1998; NEW, 2002).

As antenas (apêndices sensoriais) localizados na cabeça, possuem a função de reconhecimento, olfato e equilíbrio. Na base das antenas está o estatocisto responsável pela percepção do equilíbrio durante a natação e locomoção. Logo atrás, encontra-se a boca, um par de mandíbulas e dois pares de maxilas que possuem a função de mastigação dos alimentos. As maxilas são responsáveis por segurar e manipular o alimento, passando-o às mandíbulas, além de auxiliar na limpeza das brânquias e corrente respiratória. Os pereiópodos podem ter função de ataque, defesa e apreensão dos alimentos por serem quelados (possuem um tipo de pinça na extremidade), já os pereiópodos não quelados servem para locomoção (PINHEIRO; HEBLING, 1998).

A parte abdominal é articulada e recoberta por placas (transversal: tergo, ventral: externo ligadas por placas laterais denominadas pleuras). É formada por seis somitos (apêndices abdominais), sendo que do primeiro ao quinto recebem o nome de pleópodos e sendo estes: o primeiro e o segundo pares utilizados para atividades sexuais e natação, terceiro, quarto e quinto pares possuem função natatória e o sexto par formam os urópodos que, juntamente com o télson (estrutura pontiaguda) originam o leque caudal, auxiliando no rápido deslocamento dos animais (PINHEIRO; HEBLING, 1998).

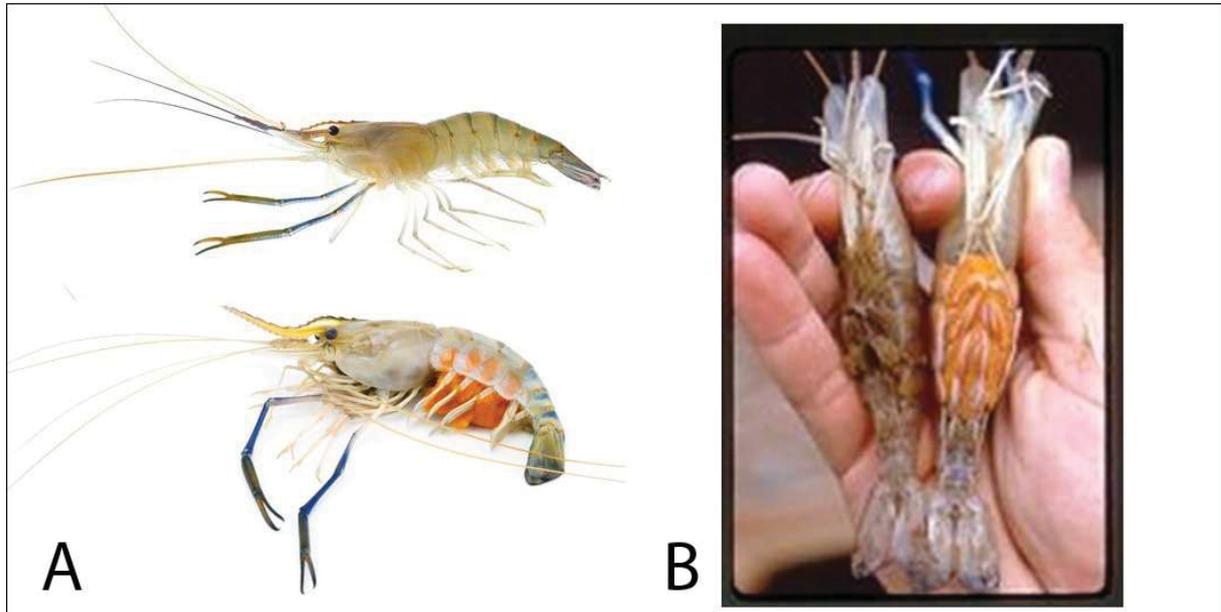
Apresentam geralmente o corpo esverdeado a um cinza acastanhado, antenas azuladas e os quelípodes podem ser azuis ou alaranjados. Os machos de *M. rosenbergii* podem chegar a um comprimento corporal total de 33cm e as fêmeas adultas até 29cm, esta medida é realizada da ponta do rostró até a ponta do télson (NEW, 2002). Os machos da espécie são agrupados em três morfotipos distintos, representados na Figura 4, sendo eles: machos pequenos (SM – “*Small Male*”) apresentando quelas pequenas, finas e quase translúcidas, são férteis e com comportamento ativo; machos que possuem pinça alaranjada (OC – “*Orange Claw*”) possuindo alta taxa de crescimento e baixa atividade nas gônadas possuindo comportamento agressivo com as fêmeas; e machos com garra azul profundo (BC – “*Blue Claw*”) estes são os machos maiores e dominantes, possuem pinças longas na tonalidade de azul escuro, são agressivos com outros machos, territorialistas e mais lentos. Independentemente do tamanho, os machos BC dominam os machos OC e suprimem o crescimento de SM. Os machos SM podem se transformar em OC, sendo que a via normal para o desenvolvimento segue: SM → OC → BC (NEW, 2002; FAO, 2006).

FIGURA 4 - SUBTIPOS MORFOLÓGICOS DE MACHOS *Macrobrachium rosenbergii*

FONTE: Laboratório Acquamarão (2016).

As fêmeas adultas da espécie apresentam tamanho menor do que os machos adultos, além disso, nos machos os quelípodos também são maiores e mais grossos (NEW, 2002). As fêmeas possuem o abdômen mais largo que os machos e pleuras maiores, onde estas se prolongam para baixo do abdômen recobrando parcialmente as extremidades, formando assim uma câmara incubadora abdominal e nesta câmara serão depositados os ovos no período de desenvolvimento embrionário (PINHEIRO; HEBLING, 1998).

Fêmeas maduras são facilmente detectadas, pois os ovários são observados como grandes massas de cor alaranjada que ocupa uma grande parte do cefalotórax (dorsal e lateral) (FIGURA 5).

FIGURA 5 - FÊMEAS DE *Macrobrachium rosenbergii*

FONTE: (A) Laboratório Acquamarão (2016); (B) FAO Fishery Statistics (2006).

LEGENDA: Na imagem à esquerda (A), está representada uma fêmea portando ovos em estágio inicial (imagem inferior) e fêmea madura. À direita (B) são apresentadas duas fêmeas ovadas, e a mudança de coloração dos ovos (alaranjado para acinzentado).

As fêmeas, dependendo do seu tamanho, podem transportar uma quantidade de 5.000 até 100.000 ovos. A coloração dos ovos é alaranjada e permanece nessa cor até próximo de dois a três dias antes da eclosão, tornando-se acinzentados no início do desenvolvimento embrionário (FAO, 2006).

### 3.5 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 formadoras 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). Surto causado 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, como as vias *Toll-like* e *IMD* (TASSANAKAJON et al., 2018). Bactérias Gram-negativas como *A. hydrophila*, e algumas Gram-positivas, tais como *Bacillus* e *Listeria*, ativam a via *IMD*, sendo que a resposta desta via a desafios bacterianos é rápida, e eficaz contra patógenos de replicação rápida, como bactérias (KLEINO; SILVERMAN, 2014). A via *Toll-like* pode ser ativada em resposta a infecções por bactérias Gram-positivas ou fungos (RAO et al., 2018).

As vias *Toll-like* e *IMD* são de extrema importância para responder as infecções bacterianas, sejam elas causadas por gêneros Gram-positivos ou Gram-negativos (WANG et al., 2019). Ambas as vias realizam o reconhecimento de microrganismos e imunógenos, após esta etapa são transmitidos sinais de infecção para que assim ocorra a ativação da síntese de peptídeos antimicrobianos e algumas outras moléculas do sistema imunológico para eliminação do agente patogênico (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.

O desencadeamento de uma resposta imunológica eficiente torna-se crucial para a sobrevivência das espécies (MUSTHAQ; KWANG, 2014). O sistema imunológico caracteriza-se por ser um complexo sistema constituído de barreiras mucosas, fatores humorais e células especializadas na defesa do hospedeiro contra patógenos (NETEA; QUINTIN, VAN DER MEER, 2011).

Os camarões, assim como todos os outros organismos vivos, demandam de um sistema imunológico expressivo para sua proteção contra o ataque de patógenos (WANG et al., 2014). Diferentes rotas podem ter sido tomadas no decorrer da evolução dos sistemas imunológicos de vertebrados e invertebrados, que culminaram em sistemas funcionalmente similares, permitindo a proteção reagindo a estímulos (KURTZ; ARMITAGE, 2006), dessa forma, é possível obter uma melhor resposta imunológica através de menores custos energéticos (CONTRERAS-GARDUÑO et al., 2016). Em camarão, assim como outros invertebrados, ocorre a presença de imunidade inata (não específica) porém, apresentando grande complexidade na ativação de rotas metabólicas relacionadas à resposta imunológica. A estrutura básica do sistema imunológico do camarão para o reconhecimento e eliminação dos organismos estranhos, assemelha-se à imunidade apresentada nos insetos (WANG et al., 2014; CHANG, et al., 2018). A imunidade inata envolve respostas relativamente inespecíficas no hospedeiro com a ativação de células e moléculas imunes para controlar a infecção, ao passo que na imunidade adaptativa (encontrada em vertebrados) respostas imunes podem ser induzidas de forma específica e com capacidade de memória que se baseia no reconhecimento de proteínas estranhas (antígenos) desencadeando a produção de proteínas de resposta no hospedeiro (anticorpos) (PUDGERD, et al., 2019). Em insetos, o sistema imunológico tem sido bem estudado, principalmente no organismo modelo *Drosophila melanogaster* (mosca-da-fruta), porém em crustáceos, incluindo o camarão, as informações são escassas (TASSANAKAJON et al., 2013).

O sistema imunológico nos invertebrados pode desencadear respostas de defesa frente a microrganismos patogênicos, este mecanismo pode ser classificado como imunidade humoral ou celular (LI; XIANG, 2013). Assim como em outros invertebrados, o camarão é dependente basicamente do sistema imune inato para sua proteção contra doenças bacterianas e virais, sendo que, os componentes celulares

e humorais das respostas imunológicas desempenham função crucial no reconhecimento e conseqüentemente eliminação dos patógenos invasores (RAJKUMAR et al., 2017). Para ambas as respostas imunológicas, primeiramente ocorre o reconhecimento dos objetos estranhos ao organismo (WANG; WANG, 2013).

Nas respostas imunológicas classificadas como celulares, se encontram as reações de fagocitose, formação de nódulos, encapsulação e apoptose. As repostas humorais abrangem a síntese e liberação de proteínas imunes como os peptídeos antimicrobianos (PAMs), cascata de profenoloxidase (proPO) e de coagulação, inibidores de proteinases, fatores semelhantes a citocinas, lectinas e ativação de vias de sinalização, como por exemplo as vias existentes em camarão: Dscam, Toll e IMD (TASSANAKAJON et al., 2013; MUSTHAQ; KWANG, 2014).

As células do camarão identificam patógenos invasores ativando sua imunidade inata através do reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) detectado pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (LI; XIANG, 2013; MUSTHAQ; KWANG, 2014; TASSANAKAJON et al., 2018). Existem vários grupos de PRRs, classificados de acordo com o tipo específico de PAMPs que eles reconhecem, alguns exemplos de PRRs incluem as proteínas de reconhecimento de peptídeo glicano (PGRPs) e as proteínas de reconhecimento de Beta-glucanas com cadeia principal do tipo (1-3) apresentando ramificações do tipo (1-6), comuns em paredes celulares de diversos tipos de fungos ( $\beta$ GRPs) (RAO et al., 2018; XIA et al., 2018). Os camarões possuem algumas PRRs que detectam patógenos, sendo capazes de desencadear a imunidade inata, pois o reconhecimento efetuado pelos PRRs irá desencadear a ativação imunológica do sistema profenoloxidase (proPO), e por sua vez, a especificidade da cascata proPO é dependente dos PRRs (TASSANAKAJON et al., 2018). Patógenos grandes, como por exemplo parasitas, desencadeiam a resposta imunológica celular na forma de encapsulamento (WANG; WANG, 2013).

As respostas de defesa da imunidade inata são mediadas através de cascatas de proteínas constitutivas, e também por algumas reações celulares que podem envolver os fagócitos (monócitos, macrófagos, neutrófilos) ou células *natural killers* (NK) (NETEA; QUINTIN; VAN DER MEER, 2011).

As respostas imunológicas nos crustáceos ocorrem principalmente na hemolinfa (SOMBOONWIWAT et al., 2006). Macromoléculas presentes na hemolinfa dos camarões são responsáveis por mediar as respostas humorais, sendo que as

respostas mais importantes são: coagulação da hemolinfa, síntese de melanina pelo sistema proPO e formação de peptídeos antimicrobianos (PAMs) circulantes (TASSANAKAJON et al., 2018).

Os crustáceos possuem um exoesqueleto formado por quitina, que atua como uma barreira primária essencial contra a entrada de patógenos, além disso, esta estrutura auxilia na manutenção da hemolinfa e na integridade do tecido. Porém se ocorrer algum dano ao exoesqueleto, as propriedades da barreira de proteção são rompidas e pode ocorrer perda da hemolinfa (TASSANAKAJON et al., 2013). A cascata de coagulação faz com que o extravasamento da hemolinfa nos locais onde ocorreu a lesão seja interrompido, assim como também evita a dispersão dos patógenos invasores pelo corpo dos crustáceos (LI; XIANG, 2013). A coagulação no local da lesão ocorre rapidamente, sendo considerada como uma importante resposta imunológica (TASSANAKAJON et al., 2013). A hemolinfa dos crustáceos é composta por células, água, sais inorgânicos e proteínas dissolvidas, dentre as quais a hemocianina (proteína relacionada ao transporte de oxigênio) é encontrada abundantemente (SÖDERHÄLL, 2016).

Imediatamente após a entrada de patógenos, a resposta do sistema imunológico é a síntese de várias proteínas e peptídeos que são armazenados e liberados no momento da infecção. Posterior a isso, torna-se necessário uma nova biossíntese das proteínas, com duas possíveis finalidades: continuar a defesa contra patógenos ou restaurar as proteínas de defesa, levando a mudanças na expressão dos genes conforme a resposta progride (SOMBOONWIWAT et al., 2006).

### 3.6 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, sendo eficazes contra bactérias, fungos e vírus (RICILUCA, 2016; FLEGEL, 2019). Diversas propriedades relacionadas ao potencial de modulação da resposta imune, são atribuídas aos PAMs envolvidas com a defesa dos organismos (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 em todo o mundo biológico, estando amplamente distribuídos (RICILUCA, 2016; HUANG; REN, 2020).

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-lipopolissacarídeos) e a stylicina (peptídeo derivado da hemocianina) (TASSANAKAJON et al., 2013; TASSANAKAJON et al., 2018). Os PAMs catiônicos apresentam carga líquida positiva em pH fisiológico, este fato se deve à presença de uma maior quantidade de resíduos de aminoácidos carregados positivamente, como a arginina e lisina, do que resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico (carregados negativamente) (BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004).

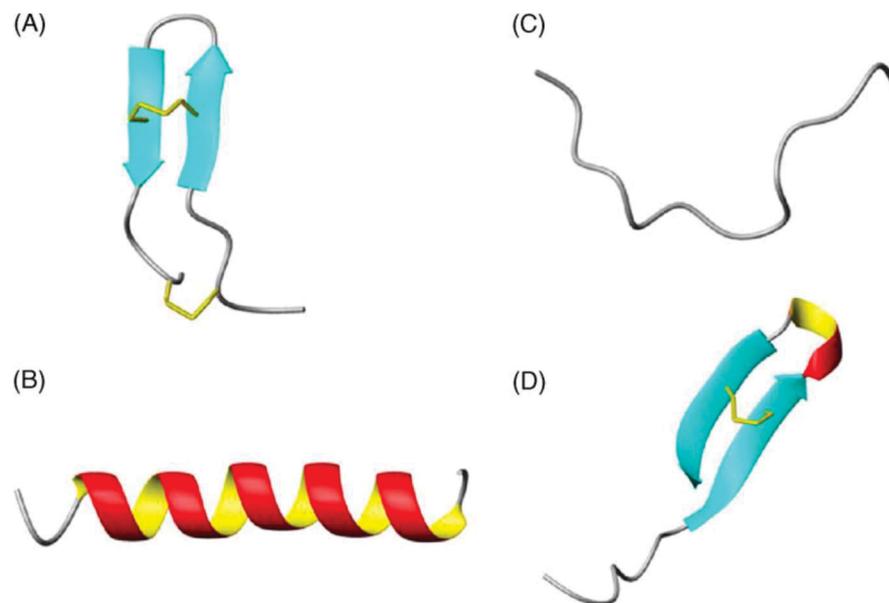
Os PAMs são produzidos como proteínas precursoras, ficando armazenados nos hemócitos e após uma indução de resposta imunológica são liberados (PASUPULETI; SCHMIDTCHEN; MALMSTEN, 2012; TASSANAKAJON et al., 2013; TASSANAKAJON et al., 2018). Evidências sugerem que os PAMs podem desempenhar função vital na imunidade, seja diretamente por meio da ação antibacteriana ou atuando em por meio das respostas imunes inatas e adaptativas (TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012). PAMs são encontrados em grande quantidade em crustáceos, sendo que o potencial antibacteriano é atribuído a estes peptídeos (GE et al., 2018).

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 líquida 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 e a 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). Os PAMs tornam-se ativos após a clivagem proteolítica das proteínas e/ou peptídeos precursores, e quando em contato com membranas aniônicas dos patógenos a maioria dos PAMs tendem-se a dobrar-se em estruturas anfipáticas mais comumente encontradas na natureza na forma de  $\alpha$ -hélice e / ou  $\beta$ -folha (POWERS; HANCOCK, 2003; SRUTHY et al., 2019). Conforme representado na Figura 6, estão os tipos de estruturas conformacionais que os PAMs podem ser encontrados.

FIGURA 6 - TIPOS ESTRUTURAIS DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS



FONTE: Powers e Hancock (2003).

LEGENDA: Na imagem (A)  $\beta$ -Folha (taquiplesina), (B)  $\alpha$ -hélice (magainina), (C) Estendida (indolicidina), (D) Volta (thantina). Em amarelo, estão indicadas as pontes de dissulfeto. Figura desenhada no programa MOLMOL.

Peptídeos  $\beta$ -Folha caracterizam-se por apresentarem a presença de uma folha antiparalela, geralmente estabilizada por ligações dissulfeto (FIGURA 6-A). Na classe  $\alpha$ -hélice, os peptídeos são caracterizados por frequentemente exibirem uma ligeira curvatura no centro da molécula e pela conformação de  $\alpha$ -hélice (FIGURA 6-B). Peptídeos estendidos possuem alto conteúdo de aminoácidos como a prolina e / ou glicina e por essa razão, carecem de estruturas secundárias, formando estruturas finais (FIGURA 6-C). Na classe de volta (*loop*) os peptídeos possuem uma estrutura em formato de alça, possibilitada pela presença de uma ligação simples (FIGURA 6-D) (POWERS; HANCOCK, 2003).

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).

Nos camarões, a infecção por microrganismos é capaz de regular positivamente a produção dos PAMs, sendo que as substâncias presentes nas superfícies microbianas, como os lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias gram-negativas, peptidoglicanos de bactérias gram-positivas e beta-glucanas de fungos ligam-se às proteínas receptoras de reconhecimento de padrões do camarão responsáveis por mediar a resposta de defesa (FLEGEL, 2019).

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, do qual apresentam potencial emprego na aquicultura no combate a 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). Um grande número de famílias pertencente a classe dos PAMs, já foram caracterizados geneticamente em espécies de camarão (ROSA; BARRACCO, 2010; TASSANAKAJON et al., 2013; TASSANAKAJON et al., 2018). Na tabela abaixo (TABELA 1), estão listados diversos trabalhos onde PAMs de diferentes espécies de camarão foram identificados e descritos.

TABELA 1 - PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS JÁ DESCRITOS NA LITERATURA EM DIFERENTES ESPÉCIES DE CAMARÃO (em ordem cronológica).

(continua)

<b>Espécie de camarão</b>	<b>PAMs descritos</b>	<b>Como os PAMs foram identificados</b>	<b>Referência</b>
<i>Penaeus vannamei</i>	3 formas de Penaeidinas (Pen-1, Pen-2, Pen-3)	Caracterização bioquímica, e clonagem de cDNA dos peptídeos antimicrobianos purificados sem infecção experimental	DESTOUMIEUX et al. (1997)
<i>Litopenaeus vannamei</i> e <i>Litopenaeus setiferus</i>	1 forma de Penaeidina (Penaeidina-4C)	Análises de filogenética das sequências e clonagem da panaedina	CUTHBERTSON et al. (2002)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	4 formas de Histonas (H2A, H2B, H3 e H4)	Investigação proteômica das histonas dos hemócitos	PATAT et al. (2004)
<i>Penaeus monodon</i>	1 forma de ALF (ALFPm3)	Através de abordagem genômica (expressão recombinante na levedura <i>Pichia pastoris</i> )	SOMBOONWIWAT et al. (2005)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Lisozima	Camarões desafiados com <i>Vibrio campbellii</i>	BURGE et al. (2007)
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	1 proteína única WAP domínio SWD ou Crustinas tipo III (Fc-SWD)	Camarões desafiados com <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Vibrio anguillarum</i>	JIA et al (2008)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	2 formas de ALFs (ALF1 e ALF2)	“Knockdown” da expressão do gene para ALF1 e desafio com patógenos: fúngico ( <i>Fusarium oxysporum</i> ), viral (WSSV) ou bacteriano ( <i>Vibrio penaeicida</i> )	VEGA et al. (2008)

TABELA 1 - PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS JÁ DESCRITOS NA LITERATURA EM DIFERENTES ESPÉCIES DE CAMARÃO (em ordem cronológica).

(continuação)

Espécie de camarão	PAMs descritos	Como os PAMs foram identificados	Referência
<i>Penaeus monodon</i>	3 formas de proteína única WAP domínio SWD ou Crustinas tipo III (SWDPm1, SWDPm2 e SWDPm3)	Injeção de <i>Staphylococcus aureus</i> inativado, solução salina de camarão (SSS), WSSV ou apenas meio de cultura	AMPARYUP; DONPUDSA; TASSANAKAJON, (2008)
<i>Litopenaeus stylirostris</i>	1 proteína Stylicina (Ls-Stylicin1)	Através de abordagem genômica (expressão recombinante na bactéria <i>Escherichia coli</i> )	ROLLAND et al. (2010)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	3 formas de ALFs (designadas como MrALF5, MrALF6 e MrALF7)	Camarões desafiados com <i>Escherichia coli</i> , <i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e WSSV	REN et al. (2012)
<i>Penaeus monodon</i>	2 formas de Crustinas (CrustinPm1 e crustinPm7)	Propriedades de ligação de crustinas em células bacterianas e componentes da parede celular	KRUSONG et al. (2012)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	1 proteína Crustina (MrCrS)	Camarões desafiados com vírus necrose hipodérmica infecciosa e hematopoiética (IHHNV) e vírus WSSV, e com bactérias: <i>Aeromonas hydrophila</i> e <i>Enterococcus faecium</i>	AROCKIARAJ et al (2013)
<i>Macrobrachium nipponense</i>	5 formas de ALFs (designados como MnALF1 a 5 )	Camarões infectados com <i>Aeromonas hydrophila</i>	WANG et al. (2015)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Peptídeo derivado da Hemocianina (PvHct)	Através da obtenção por síntese química e caracterização da estrutura tridimensional	PETIT et al. (2016)

TABELA 1 - PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS JÁ DESCRITOS NA LITERATURA EM DIFERENTES ESPÉCIES DE CAMARÃO (em ordem cronológica).

(conclusão)

<b>Espécie de camarão</b>	<b>PAMs descritos</b>	<b>Como os PAMs foram identificados</b>	<b>Referência</b>
<i>Litopenaeus vannamei</i>	1 proteína única WAP domínio SWD ou Crustinas tipo III (LvSWD3)	Camarões desafiados com <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> e WSSV	YANG et al. (2018a)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Peptídeo derivado da Hemocianina (peptídeo L1)	Aplicado abordagem de bioinformática e análises experimentais da estrutura	YANG et al. (2018b)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	4 formas de Penaeidinas (BigPEN, PEN2, PEN3 e PEN4)	Camarões infectados com <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i> ou WSSV	XIAO et al. (2018)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	2 formas de Stylicinas (Lvan- Stylicin1 e Lvan- Stylicin2)	Camarões desafiados com <i>Vibrio harveyi</i> e WSSV	FARIAS et al. (2019)

FONTE: A autora (2020).

Encontra-se disponível atualmente uma base de dados (<https://aps.unmc.edu/>), 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).

Os PAMs surgem como uma nova classe de antibióticos produzidos de forma natural pelos organismos, tornando-os uma alternativa promissora para novos medicamentos contra patógenos diversos, pois possuem mecanismos de ação

antimicrobiana diferenciada, devido à sua potência e capacidade mais segura de neutralizar ou eliminar patógenos quando comparado aos antibióticos tradicionais existentes, desta forma, podem ser utilizados no combate de infecções causadas por microrganismos resistentes (ZUCCA; SCUTERA; SAVOIA, 2011; RAVICHANDRAN et al., 2016). Nos últimos anos, o aumento de cepas patogênicas resistentes a medicamentos, têm se agravado principalmente para a aquicultura, ampliando a busca por novos e mais eficientes PAMs (RAVICHANDRAN et al., 2016).

Nos crustáceos, a maioria dos peptídeos já identificados são catiônicos, conferindo potencial terapêutico e amplo espectro de atividade antimicrobiana, assim, vários peptídeos catiônicos possuem aplicação em estudos clínicos (ROSA; BARRACCO, 2010; RAVICHANDRAN et al., 2016). Para distinguir o hospedeiro dos patógenos invasores, os PAMs utilizam como principal mecanismo de diferenciação a carga elétrica das moléculas da membrana (FAN et al., 2020).

O modo que os PAMs atuam é determinado principalmente pela a sua conformação estrutural, carga e anfipaticidade. Primeiramente acontece uma interação eletrostática entre os peptídeos e as paredes celulares e / ou membranas bacterianas e fúngicas carregadas negativamente, neste ponto ocorre um estágio de transição em que, a afinidade da ligação entre os PAMs e os microrganismos invasores é alterada através de mudanças em suas conformações geométricas, logo após o peptídeo insere-se permeabilizando as membranas celulares microbianas através de sua porção hidrofóbica (ROSA; BARRACCO, 2010; FAN et al., 2018).

Peptídeos mais bem caracterizados e identificados atualmente, são provenientes de espécies cultivadas, como por exemplo o camarão marinho, isto se deve principalmente a questões econômicas de interesses na cultura (ROSA; BARRACCO, 2010). PAMs são produzidos pelo sistema de defesa imunológica sob o estímulo de condições externas, sendo um mecanismo importante para organismos feridos ou infectados por patógenos, principalmente em invertebrados (RAVICHANDRAN et al., 2016; HUANG; REN, 2020). PAMs acumulam-se na hemolinfa, a síntese e secreção dos peptídeos são induzidas por microrganismos invasores (FENG; HUO; SHI, 2018).

Em camarão, PAMs são produzidos principalmente nos hemócitos (TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015), porém, no hepatopâncreas também ocorre a produção de moléculas imunes (GROSS et al., 2001). Na espécie *M. rosenbergii*, o hepatopâncreas é um importante órgão imune,

pois no momento em que a infecção patogênica se sucede, diversas proteínas relacionadas à imunidade são expressas neste órgão, além disso, o aumento da expressão dos componentes imunes no hepatopâncreas, pode ser alterado por vários patógenos e/ou por imunoestimulantes (KUMARESAN et al., 2017).

De acordo com os autores Rosa e Barracco (2010), existem 15 famílias de PAMs já identificadas em crustáceos. Dentre estas famílias de PAMs já descritas na literatura, as mais importantes para a realização deste trabalho serão detalhadas a seguir, como as crustinas que são classificadas em três grupos principais (tipos I-III) (SMITH et al., 2008). Existem ainda crustinas tipo IV e tipo V, porém de acordo com os autores Tassanakajon, Somboonwiwat e Amparyup (2015) as crustinas tipo IV em camarão possuem atividades de inibidoras de proteinase, portanto, sem atividade antimicrobiana, e para espécies de caranguejo apresentam atividades de inibidor de proteinase e de crescimento antibacteriano, já as crustinas tipo V não são encontrados em crustáceos ou em outras espécies de invertebrados. As *crustinas* são definidas como PAMs catiônicos, ricos em cisteína, apresentam tamanho de 7–14 kDa e geralmente possuem pI na faixa de 7,0 a 8,7, estão presentes nos crustáceos ocorrendo amplamente em todos decápodos, além disso, contém um domínio WAP da proteína ácida do soro de leite no terminal carboxila, possuindo oito resíduos de cisteína conservados em arranjo formando uma estrutura compactada. ‘WAP’ refere-se a uma família de proteínas que foram originalmente descobertas na fração de soro de leite de mamífero – *whey acidic protein* (SMITH et al., 2008).

Os três tipos de crustinas descritos diferem estruturalmente na sequência do sinal (ou sequência líder) que ocorre no N-terminal e o domínio WAP na extremidade carboxila. Entre a sequência sinal e o domínio WAP a região é variável, porém em decápodos os arranjos são amplamente conservados. Nos crustáceos, as crustinas são expressas pelos hemócitos circulantes e apresentam propriedades antibacterianas, principalmente contra bactérias Gram-positivas (SMITH et al., 2008).

Outra classe de PAMs, os ALFs são caracteristicamente peptídeos anfipáticos e que apresentam ampla atividade antimicrobiana para microrganismos, incluindo bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas), fungos e alguns vírus (TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT; AMPARYUP, 2015). Possuem dois resíduos de cisteína altamente conservados formando uma alça dissulfeto estável que ajudam a estabilizar a molécula, em um *cluster* altamente conservado de resíduos carregados (TASSANAKAJON et al., 2013). Técnicas recentes de sequenciamento foram

aplicadas para camarão a fim de obter informações sobre a diversidade de ALFs nas espécies. Em sua estrutura primária, ALF contém uma região N-terminal hidrofóbica e um domínio de ligação ao LPS das bactérias (LPS-BD), nos ALF catiônicos estão presentes um conjunto de resíduos de aminoácidos carregados positivamente (como lisina e arginina) e para os ALF aniônicos mantém resíduos de aminoácidos carregados negativamente. Ainda, com base em sua estrutura tridimensional, acredita-se que a porção de ligação LPS-BD possa ser o único responsável envolvido na atividade biológica deste peptídeo (TASSANAKAJON et al., 2018). ALFs de camarão já foram testados com diversos microrganismos e tiveram suas atividades biológicas e antimicrobianas caracterizadas (TASSANAKAJON et al., 2011).

A massa molecular calculada para os peptídeos de ALFs maduros de camarão é de aproximadamente 11 kDa e possuem um pI teórico variando de 6,10 a 10,29; além disso, contém geralmente 97 a 98 resíduos de aminoácidos (TASSANAKAJON et al., 2011). Existem diversos tipos de ALFs já caracterizados, variando conforme a espécie. Em camarão peneídeo, as ALFs foram agrupadas em cinco grupos (A-E) de acordo com a diversidade das sequências de LPS-BD (TASSANAKAJON et al., 2018). Tassanakajon e colaboradores (2011), compararam no camarão sequências peptídicas maduras de ALFs e obtiveram três grupos (Grupos I, II e III) baseados no grau de homologia das sequências.

Típico de camarões pertencente à família dos peneídeos, os PAMs penaeídeos possuem este nome em referência a família e foram descritas possuindo atividades antifúngicas e antibacterianas (DESTOUMIEUX et al., 1997). Xiao et al. (2018), trabalhando com camarão da espécie *Litopenaeus Vannamei*, relataram que este PAM possui mecanismos contra o vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), atuando como um efetor antiviral. Caracteristicamente, são PAMs catiônicos de 5 a 7 kDa, possuem um domínio amino-terminal e domínio carboxílico-terminal rico em prolina e cisteína respectivamente (SMITH et al., 2008). Penaeídeos possuem capacidade de ligação à quitina, sendo uma propriedade essencial não somente para a atividade antifúngica, mas também para a montagem da quitina nos crustáceos ou na cicatrização de feridas como por exemplo conferindo proteção ao camarão durante o ciclo de muda, podendo dessa forma, apresentar possíveis aplicações para a aquicultura (DESTOUMIEUX et al., 2000).

A última classe de PAMs aqui relatada, refere-se aos PAMs derivados da hemocianina. A hemocianina é uma proteína grande, contendo no camarão

aproximadamente 75 kDa, apresenta como função nos crustáceos o transporte de oxigênio, contém várias subunidades e cobre. São produzidas no hepatopâncreas e depois liberadas no plasma de moluscos e artrópodes, assim, é a proteína mais abundantemente encontrada na hemolinfa e sua fração de proteína total no plasma é representada por mais de 95% (ROSA; BARRACCO, 2010; JIEWKOK; TSUKIMURA; UTARABHAND, 2015; YANG et al.; 2018b).

Em um trabalho realizado por Destoumieux-Garzón et al. (2001), com camarão das espécies *L. vannamei* e *L. stylirostris*, encontraram três peptídeos derivados de hemocianina a partir do plasma, sendo: PvHct proveniente de *L. vannamei* e PsHct1, PsHct2 de *L. stylirostris* todos os PAMs exibiram atividade fortemente antifúngica contra diversas cepas filamentosas avaliadas. Os PAMs da hemocianina podem ser induzidos ou ativados no plasma através de estímulos com injeção microbiana. Estes peptídeos são derivados da parte C-terminal da hemocianina onde não há ligação com o cobre e são moléculas aniônicas com massas moleculares variando de 2,7 kDa (PvHct), 7,9 kDa (PsHct1) e 8,3 kDa (PsHct2). (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2001; ROSA; BARRACCO, 2010).

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). Os PAMs tornam-se ativos após a clivagem proteolítica das proteínas e/ou peptídeos precursores, e quando em contato com membranas aniônicas dos patógenos a maioria dos PAMs tendem-se a dobrar-se em estruturas anfipáticas de  $\alpha$ -hélice e/ou  $\beta$ -folha (SRUTHY et al., 2019).

De forma a proporcionar uma imunidade efetiva ao hospedeiro, os PAMs estão intimamente relacionados na sinalização de eventos, incluindo a iniciação, desenvolvimento, polarização, magnitude e amplificação dos mecanismos de defesa. Na última década, intensificou-se a busca pela compreensão dos mecanismos de ação dos peptídeos envolvidos com a defesa levando à descrição de uma infinidade de novos PAMs relacionados aos patógenos. Os PAMs apresentam uma homologia de sequência limitada, porém com uma ampla gama de estruturas secundárias, apesar de suas propriedades físicas gerais semelhantes. Aplicações bem-sucedidas

dos PAMs no tratamento de infecções e de imunomodulação demonstram que essa classe apresenta possível potencial terapêutico (TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012).

PAMs isolados de camarão aplicados como aditivos alimentares visando aumentar a imunidade das espécies de camarão mostra-se como uma estratégia promissora no combate as infecções. Outra técnica para o controle de doenças na aquicultura é a de super-expressão regulada de genes que codificam PAMs em camarões transgênicos, visto que estes genes são interessantes do ponto de vista da resistência a patógenos graves (TASSANAKAJON et al., 2011).

No ambiente de criação do camarão estão presentes uma variedade de microrganismos, que podem entrar em contato com o interior do animal através das brânquias e do sistema digestivo, além da ocorrência de danos causados pelo manejo que os torna expostos a patógenos oportunistas e dessa forma, há a necessidade de secreção dos PAMs para proteção efetiva contra as infecções graves. A atividade de cada PAM difere entre as diferentes famílias existentes, e como já mencionado no decorrer deste trabalho, estes peptídeos exibem um amplo espectro de atividade em relação a várias linhagens de microrganismos. 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 tendo efeitos de prevenção e profilaxia representando uma alternativa aos antibióticos 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).

### 3.7 MECANISMO DE AÇÃO DOS PAMs

A morte das células induzida por peptídeos pode ocorrer rapidamente, alguns peptídeos possuem a capacidade de matar seletivamente bactérias em 15–90 minutos (BROGDEN, 2005). Para distinguir o organismo hospedeiro dos patógenos invasores, os PAMs utilizam como principal mecanismo de diferenciação a carga elétrica das moléculas. Nos mamíferos, o colesterol é responsável por manter a rigidez e a

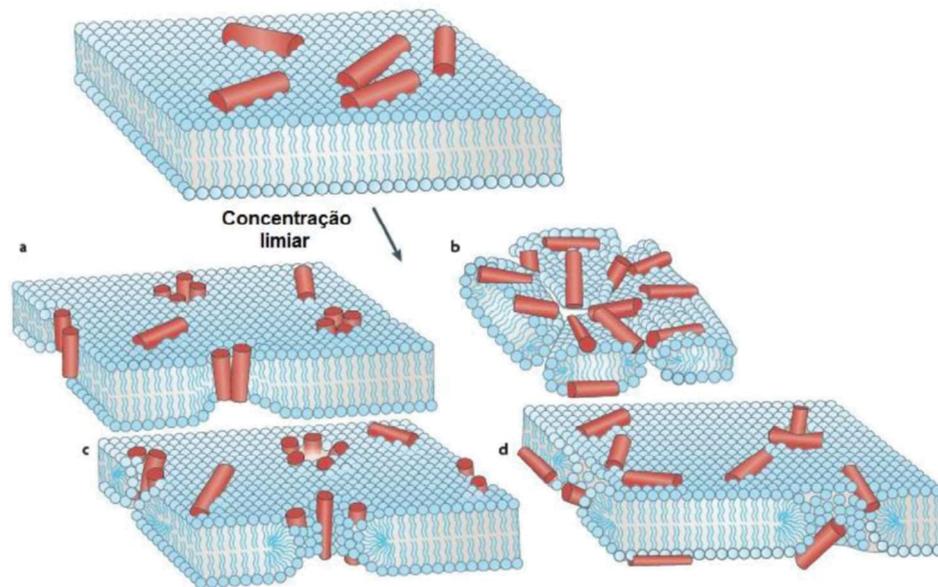
elasticidade da membrana celular e dessa forma, pode impedir a intercalação dos PAMs (FAN et al., 2020).

Inicialmente os PAMs devem ser atraídos até as superfícies bacterianas, devido a presença de ligações eletrostáticas entre os peptídeos aniônicos ou catiônicos e as paredes celulares e/ou membranas bacterianas e fúngicas (BROGDEN, 2005; ROSA; BARRACCO, 2010; FAN et al., 2018). PAMs catiônicos atraem-se primeiro pelas cargas negativas existentes no envelope externo das bactérias Gram-negativas (como por exemplo pelos grupos fosfato em LPS) e em Gram-positivas pelos ácidos teicóicos. Dessa forma, quando os PAMs estão localizados próximo a membrana dos microrganismos, antes que possam interagir com a membrana devem atravessar os polissacarídeos capsulares (LPS em bactérias Gram-negativas e ácidos teicóico e ácidos lipoteicóicos em bactérias Gram-positivas) (BROGDEN, 2005).

Após a atração pelas superfícies, ocorre um estágio de transição em que, a afinidade da ligação entre os PAMs e os microrganismos invasores é alterada através de mudanças em suas conformações geométricas, logo após o peptídeo insere-se permeabilizando as membranas celulares microbianas através de sua porção hidrofóbica (ROSA; BARRACCO, 2010; FAN et al., 2018). PAMs possuem natureza anfipática e essa característica é essencial para a permeabilização da membrana de microrganismos, pois as regiões hidrofóbicas podem interagir diretamente com os componentes lipídicos da membrana, e as regiões hidrofílicas interagem com os fosfolípidios presentes na membrana (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006).

Diferentes modelos foram propostos buscando elucidar como ocorre a inserção de PAMs na membrana bacteriana através da formação de poros transmembrana resultando na permeabilização (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006). A seguir, na Figura 7, modelos de mecanismo de ação de PAMs apresentado por Melo, Ferre e Castanho (2009), onde foram propostos quatro modos de ação pelos quais PAMs podem interromper a bicamada da membrana durante a ligação, estão demonstrados.

FIGURA 7 - MODELO PROPOSTO DE MECANISMOS DE AÇÃO DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS



FONTE: Melo, Ferre e Castanho (2009).

LEGENDA: (A) Modelo *Barrel-stave*, (B) Modelo *Carpet*, (C) Formação de Poro Toroidal, (D) Formação de Poro Toroidal desordenado.

No primeiro modelo de poro *Barrel-stave* (FIGURA 7-A), os PAMs, após a ocorrência da interação eletrostática com a membrana externa do microrganismo, inserem-se perpendicularmente na bicamada, associando-se e formando um poro. O conteúdo intracelular extravasa através desses poros o que leva a morte do organismo invasor (MELO; FERRE; CASTANHO, 2009; RICILUCA, 2016).

Os PAMs são adsorvidos a bicamada dos microrganismos, no modelo de *Carpet* (Figura 7-B), de forma a membrana ficar totalmente coberta pelo peptídeo, como um tapete. Após atingirem uma concentração crítica, os peptídeos agem danificando a membrana produzindo efeito semelhante a um detergente, desintegrando e formando micelas, causando a morte dos microrganismos (BROGDEN, 2005; MELO; FERRE; CASTANHO, 2009; RICILUCA, 2016).

No poro toroidal (FIGURA 7-C), após a ocorrência de interações com os fosfolipídios de membrana, os PAMs formam um complexo agregado com moléculas de água. Este complexo é responsável pela indução e formação temporária de canais transmembranas e nesses canais pode ocorrer a passagem de íons, moléculas de grande massa molecular e inclusive, o próprio peptídeo, sem alterações na estrutura da membrana. Diferentemente do modelo de barril, no modelo toroidal os peptídeos estão sempre associados com as cabeças polares dos fosfolipídios, mesmo quando

inseridos de forma perpendicular ao plano da bicamada lipídica (MELO; FERRE; CASTANHO, 2009; RICILUCA, 2016).

O último modelo, de poro toroidal desordenado é uma modificação recente no modelo anterior de poro toroidal, onde é proposto que sejam formadas conformações menos rígidas da orientação do peptídeo (MELO; FERRE; CASTANHO, 2009; RICILUCA, 2016).

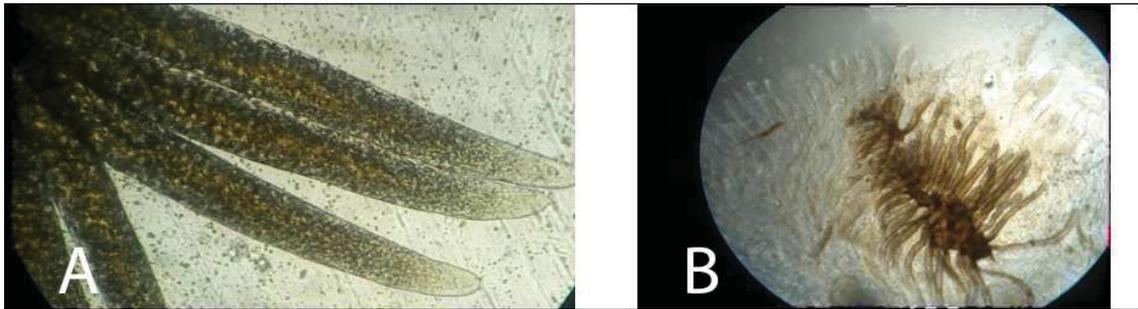
Os PAMs também podem atuar de forma a inativar os ácidos nucleicos e proteínas citoplasmáticas causando a morte dos microrganismos (BROGDEN, 2005). Mesmo possuindo um sítio de ação diferente da membrana plasmática, todos os peptídeos devem interagir com a membrana para chegar ao local de destino (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006).

### 3.8 HEPATOPÂNCREAS

O sistema digestivo dos decápodes é formado pelo intestino anterior (esôfago e proventrículo), intestino médio, contendo uma região tubular associada à glândula intestinal (hepatopâncreas) e intestino posterior, que inclui o reto e o ânus. Para os crustáceos, o hepatopâncreas é um órgão bastante importante pois, é considerado como a maior glândula digestiva que estes animais possuem representando de 2 a 6% do peso corporal total do animal. Nos decápodes, é o principal órgão do sistema digestivo e é formado por uma série de túbulos que terminam às cegas (NUNES; BRAGA; CAMARGO-MATHIAS, 2014).

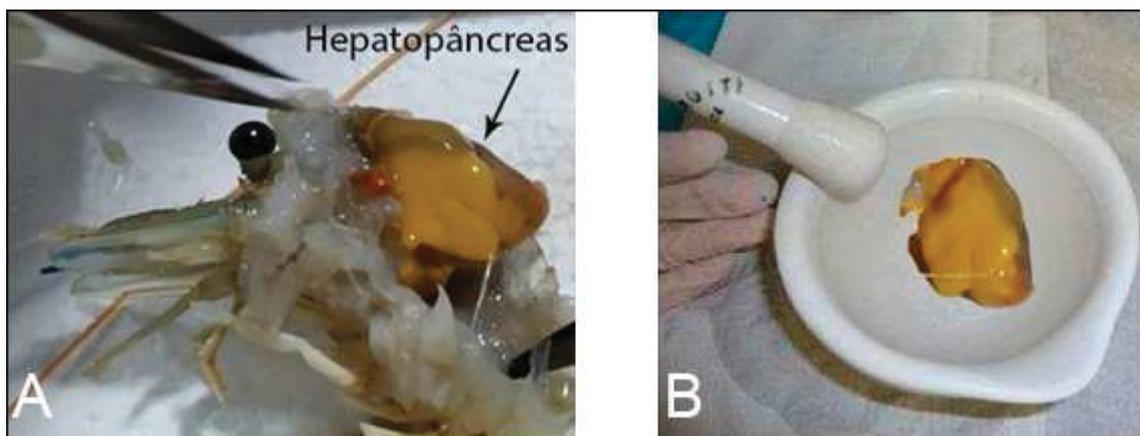
Em *M. rosenbergii*, Silva et al. (2018), observaram o aspecto histológico do hepatopâncreas e descreveram como sendo composto por um conjunto de túbulos cegos (FIGURA 8) que se conectam por meio de um tecido conjuntivo constituído por fibras de colágeno, ao tubo digestivo principal e estão imersos na hemolinfa, onde foi possível identificar três regiões morfológicamente diferentes (denominadas de: proximal, média e distal) contendo cinco tipos de células (E, M, R, F e B) e diferentes proporções celulares entre as regiões dos túbulos. Na figura 8 observa-se um hepatopâncreas com aspectos normais em camarão saudável (Figura 8-A) e um hepatopâncreas de um camarão acometido de vibriose (FIGURA 8-B).

FIGURA 8 - VISUALIZAÇÃO A FRESCO DOS TÚBULOS DO HEPATOPÂNCREAS



FONTE: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO – ABCC (2017).  
 LEGENDA: Em (A) apresentando túbulos saudáveis e em (B) com necrose severa causada por *Vibrio* sp. Ampliação de 4X.

O hepatopâncreas apresenta diferentes funções como por exemplo, digestão de alimentos através da secreção de enzimas digestivas, absorção de nutrientes, armazenamento dos produtos obtidos pela digestão e de substâncias úteis de reserva, principalmente na forma de glicogênio e remoção de material residual na forma de fezes. Apresenta diferentes níveis de complexidade estrutural e de função nos mais diversos crustáceos (SILVA et al., 2018). Consiste em duas glândulas anexas ao aparelho digestivo (NEW, 2002). Na figura abaixo (Figura 9), é possível observar o órgão em *M. rosenbergii*.

FIGURA 9 - HEPATOPÂNCREAS DE *Macrobrachium rosenbergii*

FONTE: A autora (2019).  
 LEGENDA: Em (A) observa-se o aspecto e localização do órgão em *M. rosenbergii* visto lateralmente e em (B) observa-se o hepatopâncreas dentro de um almofariz (gal) de porcelana após retirada completa do órgão de *M. rosenbergii*.

As imagens foram capturadas no laboratório do NEMA – UFPR.

É considerado um órgão vital, pois possui funções imunológicas e de metabolismo (XING et al., 2022). Conforme relatado por Pan et al. (2005), no

hepatopâncreas são produzidos fatores relacionados a resposta imune, sendo um local primário de síntese desses compostos. A hemocianina é o transcrito mais abundantemente encontrado no hepatopâncreas (PAN et al., 2005). As células epiteliais presentes no hepatopâncreas são importantes fontes de moléculas imunes (FAN et al., 2016).

Nos camarões peneídeos, o hepatopâncreas é indicado como um órgão crucial no sistema imunológico destes invertebrados (PAN et al., 2005).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório do Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Setor Palotina.

### 4.2 COLETA DOS CAMARÕES E OBTENÇÃO DO MICRORGANISMO

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 *A. hydrophila* utilizada no desafio séptico dos camarões foi isolada de águas residuais de abatedouro bovino, e foi gentilmente cedida pela professora Dra. Eliane Hermes.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DE *A. hydrophila*

A bactéria *A. hydrophila* foi previamente identificada através de sequenciamento genético da região codificante do RNA ribossomal 16S (16S rDNA), em um trabalho prévio (HASELROTH et al., 2021).

Testes bioquímicos, antibiograma e cultivo em meios seletivos e/ou diferenciais foram realizados para a caracterização fenotípica do isolado. Os testes bioquímicos empregados foram Lactose gelatina, MIO (Motilidade, Indol e Ornitina), SIM (Sulfeto de Hidrogênio, Indol e Motilidade), LMI (Lisina, Motilidade e Indol) e Citrato (Laborclin®). Também foram analisados os potenciais da bactéria para produção de catalase (teste da catalase em lâmina).

Para a realização de todos os ensaios foram utilizadas colônias de até 24 horas de *A. hydrophila* cultivadas 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 e continham controle negativo. 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.

A característica morfotintorial da bactéria foi verificada por coloração de Gram e a capacidade de cultivo nos meios de cultura ágar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bile-Sacarose), ágar MacConkey e ágar Cetrimide, foi analisada.

O antibiograma foi realizado para a determinação do perfil de susceptibilidade, do isolado de *A. hydrophila*, a alguns antibióticos, através da técnica de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966), por meio de disco-difusão. Para o ajuste do inóculo, algumas colônias de uma cultura recente foram ressuspensas em solução salina estéril (NaCl 0,9% p/v) 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 Müller-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 (Norfloxacina 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 18 horas e na sequência a leitura dos resultados foi realizada.

#### 4.4 DESAFIO SÉPTICO DOS CAMARÕES

Para o experimento, foram utilizados indivíduos adultos da espécie *M. rosenbergii*, apresentando comportamento e coloração normais, sem lesões e com integridade de apêndices. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente randômico, composto por três repetições por tratamento. Os tratamentos foram: controle tempo zero (C0) e animais infectados por *A. hydrophila* tempo zero (T0), controle tempo 12 horas (C12) e animais infectados por *A. hydrophila* com 12 horas após infecção (T12), controle tempo 24 horas (C24) e animais infectados por *A. hydrophila* com 24 horas após infecção (T24). Cada tratamento permaneceu acondicionado de forma individualizada durante o experimento 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. 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 (MS TecnoPON). Os animais foram alimentados com ração comercial permanecendo nessas condições por 36 horas antes do início do experimento, para adaptação. O peso de todos os animais e dos hepatopâncreas foram obtidos no momento das coletas.

Para a padronização da carga microbiana a ser utilizada no desafio séptico, colônias recentes de *A. hydrophila*, cultivadas em TSA, foram ressuspensas em solução salina (NaCl 0,9% p/v). O inóculo foi ajustado através de leitura 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 camarões a serem desafiados.

Após a aclimação dos animais nos baldes, foi injetado intraperitonealmente, com auxílio de uma seringa de 1ml com agulha ultrafina (8,0mm X 0,30mm), 30µL da solução contendo as bactérias em cada animal desafiado e 30µL 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).

## 4.5 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 (13×0,4 mm) acoplada a uma seringa estéril de 5mL sem a utilização de anticoagulantes. Primeiramente os camarões da espécie *M. rosenbergii* foram pesados em balança digital e os valores foram registrados. Na sequência, uma pequena quantidade de hemolinfa (aproximadamente 500µL) 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.

## 4.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

### 4.6.1 COLETA DOS TECIDOS

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 *RNAlater Stabilization Solution*® (Invitrogen) e mantidos em freezer (-20°C) até posterior utilização, onde as amostras seguiram para análises de extração de RNA total e de proteínas totais.

### 4.6.2 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. Como a concentração de RNA total extraído foi variável, foi padronizada uma concentração de aproximadamente 400 ng de RNA, para todas as amostras testadas.

Para a reação de síntese do cDNA foram adicionados em microtubos com capacidade de 200µL, o máximo de 4µL de RNA, 0,5 µg de *primers* randômicos. A mistura foi incubada 5 minutos a 70°C em termociclador (*Applied Biosystems*, modelo 2720), para eliminar *self annealing* do RNA, e na sequência, mantido por 5 minutos em banho de gelo. Aos 5µL dessa reação foram adicionados 15µL do mix contendo (4µL do tampão 5x, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM do mix de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), 20 unidades de Inibidor de RNase, 1µL da enzima *GoScript™ Reverse Transcriptase* e água livre de nucleases para completar 20µL. A reação foi realizada em termociclador usando o seguinte programa: 5 minutos a 25°C e 60 minutos a 42°C.

#### 4.6.3 ESCOLHA DOS INICIADORES

Para as análises de expressão gênica foram escolhidos genes responsáveis pela expressão de PAMs em *M. rosenbergii*, com base na literatura científica (REN et al. 2012; AROCKIARAJ et al., 2013; RAVICHANDRAN et al., 2016). O gene para *β-actina* (GANGNONNGIW et al., 2020) foi utilizado como normalizador da expressão gênica. Os iniciadores utilizados para a análise estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 - INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE EXPRESSÃO GÊNICA EM *Macrobrachium rosenbergii*.

<i>Primer</i>	<i>Primer forward (5'-3')</i>	<i>Primer reverse primer (5'-3')</i>	<i>PAM</i>	<i>Tamanho do amplicon</i>
<i>MrALF6</i>	GCCTTTTTTTCGTCTTCTCCG	GGCACCTCACTTCTGCTTTGT	<i>ALF6</i>	195 pb
<i>MrPeli-1</i>	CGTCTGTGGAGGACAACTTAC	GCCAAGCATCACCTCAAGTA	<i>Pellino-1</i>	123 pb
<i>MrCrs</i>	AACGACTTCAAGTGCTTCGGGTCT	AAGCTTAGTGGTTTGCAGACGTGC	<i>Crustina</i>	80 pb
<i>Mr Actin</i>	CCCAGAGCAAGAGAGGTA	GCGTATCCTTCGTAGATGGG	Controle	300 pb

FONTE: A Autora (2020).

#### 4.6.4 PCR CONVENCIONAL (*End point*) APÓS TRANSCRIÇÃO REVERSA

O cDNA sintetizado foi amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) convencional, realizada em um volume final de 20µL contendo no mix de reação: 0,8µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,25µL de mix de dNTP (40 mM), 1,25µL dos iniciadores (*primers*) senso (*forward*) e antissenso (*reverse*) a 10 µM, 4µL de tampão de reação 5x, 1U da enzima *Taq* DNA Polimerase (5U/ul), 12,2µL de água ultrapura e 5µL 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 (0,1µg/mL) e os *amplicons* foram comparados com padrão molecular de 100 pb (Ludwig Biotecnologia), para confirmação do tamanho, em pares de bases dos *amplicons* e especificidade das reações. Após a corrida eletroforética (110 Volts por aproximadamente 30 minutos), o gel foi fotodocumentado utilizando o equipamento Locus Biotecnologia L.PIX.

#### 4.6.5 PCR EM TEMPO REAL

As amostras de cDNA foram também amplificadas, com os mesmos *primers*, por PCR quantitativa (qPCR) utilizando o *kit GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega). A transcriptase reversa foi inativada incubando os tubos a 70°C por 15 minutos. Um total de 4µL do cDNA foi misturado com 10µL de *GoTaq® qPCR Master Mix*, 1 µM de cada um dos oligonucleotídeos (*primers*) *forward* e *reverse* para cada gene (TABELA 2) e água livre de nucleases para completar 20µL. A reação foi realizada em termociclador para PCR em tempo real CFX96TM (Bio-Rad). As condições de ciclagem foram: 94°C por 2 minutos, para ativação da enzima e 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 60 segundos.

Os resultados das expressões gênicas foram avaliados conforme cálculo de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , uma forma de quantificação relativa, em que o gene de interesse é normalizado primeiramente com a expressão do gene referência (*housekeeping*), e

na sequência comparado ao grupo controle (LIVAKA e SCHMITTGENB, 2001), onde Ct (*threshold cycle*) é o ciclo da PCR em tempo real, no qual a amplificação atinge a fase logarítmica, representando a diferença de expressão entre gene alvo e controle endógeno de uma determinada amostra e delta delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) corresponde à diferença entre o delta Ct da amostra e o delta Ct do controle.

Para investigar a produção de PAMs, *M. rosenbergii* após a inoculação de *A. hydrophila* foi avaliada através de qRT-PCR, a expressão dos genes *ALF6*, *Pellino-1* e *Crustina* frente ao gene  $\beta$ -*Actina* (*housekeeping*) responsável pela síntese de actina, que não varia sua expressão independentemente da exposição ou não do camarão a bactéria. Através dos resultados de expressão do gene para a  $\beta$ -*Actina* foi possível padronizar os dados pelo cálculo de  $\Delta\Delta Ct$  e obter resultados mais precisos e exatos da comparação da expressão gênica de animais tratados e não tratados.

#### 4.7 SDS-PAGE DAS PROTEÍNAS DO HEPATOPÂNCREAS

Hepatopâncreas coletados de dois animais independentes, de cada tratamento, foram submetidos à extração de proteínas totais, e o perfil eletroforético foi analisado através de SDS-PAGE (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante), de acordo com protocolo proposto por Fan et al. (2016).

Para a extração, os órgãos coletados foram macerados em solução tampão fosfato (PBS 0,01%), o líquido obtido foi transferido para microtubos com capacidade de 1,5mL e centrifugados a 12.000g por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram transferidas cuidadosamente para tubos cônicos de 15mL e as proteínas foram precipitadas com solução de acetona/TCA na proporção de 3:1 e os tubos mantidos a 4°C por 45 minutos. As amostras foram centrifugadas novamente e o precipitado proteico ressuspendido em tampão de extração, após total evaporação da acetona.

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford, utilizando o reagente da Sigma-Merck®, de acordo com as instruções do fabricante. Foi realizada primeiramente uma curva de calibração com albumina sérica, com concentrações variando de 0,25 a 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de proteínas. A concentração das proteínas foi determinada a partir das medidas de absorvância, em espectrofotômetro (VIS, modelo IL-226-NM-BI) no comprimento de onda de 595 nm.

Os perfis proteicos unidimensionais de cada amostra de proteína foram analisados por SDS-PAGE a 14%, em sistema de eletroforese vertical Mini-

PROTEAN® Tetra Cell (Biorad), sob condições redutoras, utilizando sistema de tampão descontínuo de Laemmli (1970) e Studier (1973). O gel de empilhamento foi preparado a uma concentração de 5% de acrilamida/bis-acrilamida, 125 mM de Tris-HCl pH 6,8; 0,1% de SDS, 0,1% persulfato de amônio e 0,1% de TEMED. O gel de separação foi realizado com 14% de acrilamida/bisacrilamida, 375 mM de Tris-HCL pH 8,8, 0,1% de SDS, 0,1% persulfato de amônio e 0,1% de TEMED. Foi utilizado tampão de eletroforese Tris-Glicina 1x (2,5 mM de Tris, 19,2 mM de Glicina e 0,01% de SDS).

Aproximadamente 10 µg de proteínas totais extraídas foi misturada com tampão de amostra 2x (0,25 M Tris-HCL pH 6.8, 50% glicerol, 0,05% azul de bromofenol contendo β-mercaptoetanol) na proporção 1:1 e a mistura foi fervida em banho-maria a 70°C, por 5 minutos, para desnaturação das proteínas. Após uma rápida centrifugação (*spin*), o conteúdo total foi aplicado nos poços dos géis. Foi utilizado o padrão de tamanho molecular (*Prestained Multicolor Protein Ladder* 15-180 kDa - Neobio).

As condições de eletroforese foram 50 Volts e 20 mA por 30 minutos para o empilhamento, seguido de 70 Volts e 40 mM por aproximadamente 4 horas, para a separação eletroforética ou até que a marca do corante do tampão de amostra atingisse o final do gel. A eletroforese foi realizada em temperatura ambiente.

Após a corrida, os géis foram lavados com água destilada, para a remoção do SDS, fixados em solução de fixação (40% metanol, 7% ácido acético) por 20 minutos. Foram realizados dois géis, corados com Coomassie blue G-250, durante aproximadamente 24 horas. A descoloração dos géis foi realizada com água destilada, até a remoção da coloração e fundo e destaque das bandas de proteínas. Os géis foram mantidos em solução de fixação (40% metanol, 7% ácido acético) e fotodocumentados em luz branca em transiluminador de led (Kasvi).

## 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 3 e Figura 10.

TABELA 3 - 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).

LEGENDA: + Resultado positivo;

- Resultado negativo

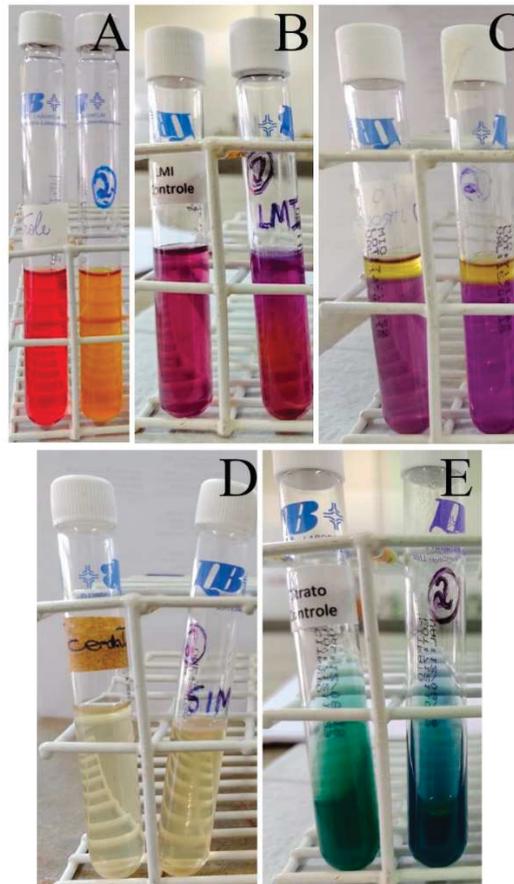
O isolado testado foi capaz de liquefazer a gelatina, no meio Lactose gelatina. Esse meio é normalmente utilizado para detectar espécies de *Clostridium* spp. em amostras de alimentos. Para o isolado em estudo, o principal objetivo foi verificar a capacidade de liquefazer a gelatina, uma característica 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 verde (citrato) 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 10 - 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 reativo 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 na cepa isolada, produzindo água e oxigênio (FIGURA 11).

FIGURA 11 – TESTE DA CATALASE



FONTE: A Autora (2021).

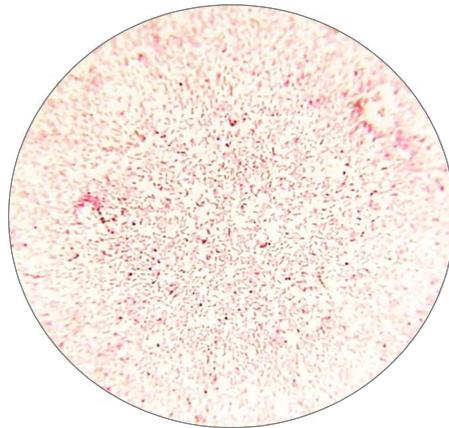
Os ensaios microbiológicos realizados para o isolado *A. hydrophila* são apresentados abaixo na Tabela 4 e Figuras 12 e 13.

TABELA 4 - RESULTADOS DOS ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS, REALIZADOS PARA O ISOLADO DE *Aeromonas hydrophila*.

Testes Microbiológicos	Propriedades de <i>Aeromonas hydrophila</i>
Características morfotintoriais	Bacilo Gram-negativo
Crescimento em meio seletivo (TCBS)	Sim

FONTE: A Autora (2021).

FIGURA 12 - COLORAÇÃO DE GRAM PARA O ISOLADO DE *Aeromonas hydrophila*



FONTE: A Autora (2021).

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

FIGURA 13 - 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 13. 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.

Nos demais meios testados (Ágar MacConkey e Cetrimide) a bactéria *A. hydrophila* foi capaz de demonstrar crescimento conforme o esperado, pois o meio MacConkey é seletivo apenas para o crescimento de microrganismos Gram-negativos e o Cetrimide seletivo para gêneros como *Pseudomonas* e *Aeromonas*.

## 5.2. TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)

Os resultados do perfil de susceptibilidade a antibióticos estão apresentados na Tabela 5.

TABELA 5 - 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 sensibilidade aos antibióticos: Amicacina, Ácido Nalidíxico da classe das fluoroquinolonas, Norfloxacina 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)

Na Tabela 6, 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 6 - TEMPO DE COAGULAÇÃO DA HEMOLINFA PARA *Macrobrachium rosenbergii* DESAFIADOS E NÃO DESAFIADOS

Tratamento	TCH (média 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 e sem indicativos de infecção microbiana.

#### 5.4. PARÂMETROS DA ÁGUA E DADOS MORFOMÉTRICOS DOS CAMARÕES

Na Tabela 7 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 do hepatopâncreas).

TABELA 7 - DADOS DO CULTIVO E MORFOMETRIA DOS ANIMAIS UTILIZADOS

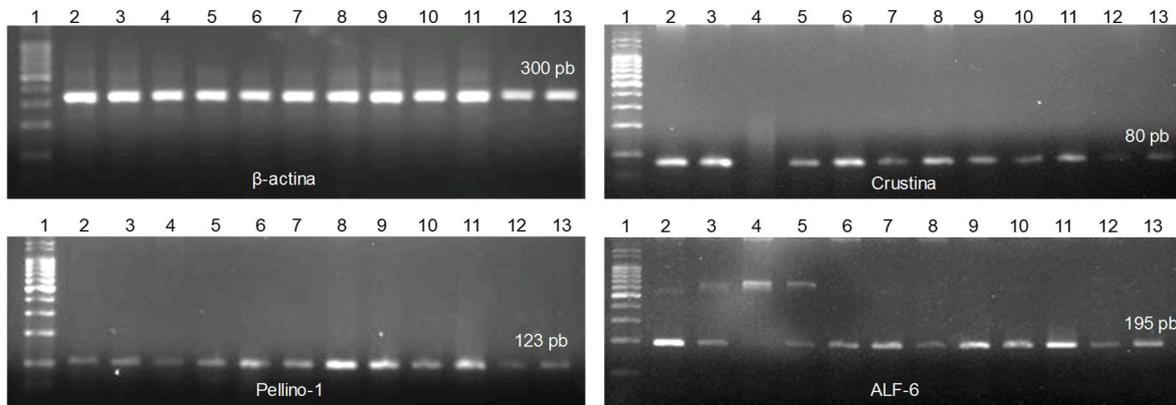
Tratamento	Temperatura da água de cultivo	pH da água de cultivo	Peso do Hepatopâncreas (em gramas)	Peso do Camarão (em gramas)
Controle – Tempo 0	24°C	7,23	1,2	16,8
Inoculado – Tempo 0			1,7	21,5
Controle – Tempo 12	22°C	7,74	1,3	20,8
Inoculado – Tempo 12			1,6	23,1
Controle – Tempo 24	22°C	7,55	1,3	24,0
Inoculado – Tempo 24			1,1	22,8

FONTE: A Autora (2021).

#### 5.5 PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES *Pellino-1*, *ALF6* e *Crustina*, APÓS DESAFIO BACTERIANO.

Para fins de comparação, o cDNA obtido para os três genes alvo analisados e gene normalizador (*β-actina*) foram amplificados através de PCR convencional (FIGURA 14) e quantitativa (qPCR) (FIGURAS 15 a 17). A eletroforese dos produtos de amplificação por PCR convencional comprovou que os *amplicons* apresentaram tamanhos, em pares de bases, de acordo com o esperado (*Pellino-1*: 123 pb, *β-actina*: 300 pb, *ALF-6*: 195 pb, e *Crustina*: 80 pb). Não foi realizada a análise semi-quantitativa da intensidade das bandas nos géis, pois os dados da qPCR foram suficientes para se estimar os níveis de expressão dos genes. No entanto, foi possível observar, ao se realizar a análise visual dos géis, que a intensidade das bandas foi compatível com os níveis de expressão de cada gene, obtidos por qRT-PCR.

FIGURA 14 - ELETROFORESE DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DO cDNA DOS GENES PARA PAMs



LEGENDA: As amostras de 1 a 13, referem-se a: **1:** Padrão de peso molecular de 100pb; **2:** Controle (tempo 0); **3:** Controle (tempo 0); **4:** Inoculado (tempo 0); **5:** Inoculado (tempo 0); **6:** Controle (tempo 12); **7:** Controle (tempo 12); **8:** Inoculado (tempo 12); **9:** Inoculado (tempo 12); **10:** Controle (tempo 24); **11:** Controle (tempo 24); **12:** Inoculado (tempo 24); **13:** Inoculado (tempo 24).

FONTE: A Autora (2021).

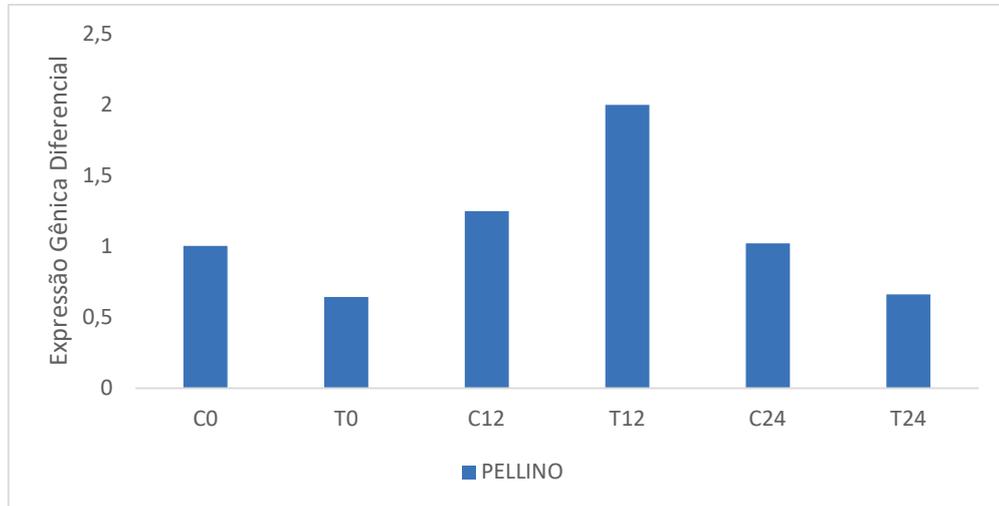
A técnica de qPCR mede a intensidade de expressão de um determinado gene de uma amostra sob condições biológicas específicas. Esta medida é expressa em Ciclos (Ct) de PCR, um valor relativo que representa o número do ciclo em que a quantidade de DNA amplificado atinge o nível limite. Por causa da variabilidade entre experimentos o Ct precisa ser normalizado. A expressão diferencial é feita gene a gene, comparando os valores de Ct normalizados ( $\Delta Ct$ ) e das replicatas entre dois grupos de amostras (duas condições). Como em cada ciclo de PCR (valor Ct) a quantidade de DNA é duplicada, o Ct está em escala logarítmica e inversamente proporcional à quantidade de material genético. Portanto,  $\Delta Ct$ s altos representam baixa expressão enquanto genes com expressão aumentada, apresentam  $\Delta Ct$ s baixos. Comparando os valores normalizados ( $\Delta Ct$ ) de duas condições, é possível calcular o *fold change* da expressão ( $-\Delta\Delta Ct$ ).

Os valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  foram calculados para cada gene e condições experimentais e correspondem ao número de vezes em que a transcrição gênica aumentou ou diminuiu no hepatopâncreas nos animais desafiados com a bactéria, em relação aos não desafiados, e em relação ao tempo de desafio. Valores de *fold change* acima de 2 indicam aumento e valores abaixo de 0,5, diminuição na expressão gênica.

Conforme demonstrado na Figura 15, é possível observar que quando o desafio séptico é aplicado ocorre uma maior expressão do gene *Pellino-1* com 12

horas após a infecção somente nos camarões desafiados demonstrando uma ativação do sistema imunológico em resposta ao desafio bacteriano (*fold change* de 2).

FIGURA 15 - EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE PELLINO-1 EM *M. rosenbergii*



FONTE: A Autora (2021).

LEGENDA: Expressão gênica do gene *Pellino-1*, em *M. rosenbergii*, infectado com *A. hydrophila* por 0, 12 e 24 horas, respectivamente.

Ravichandran et al. (2016), verificaram que o gene *Pellino-1* 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 *E. coli* com 0, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas pós injeção e observaram que houve uma expressão induzida com 6 horas e um aumento gradual depois com 12 e 24 horas diminuindo gradualmente às 48 horas e atingindo o nível basal às 72 horas. Assim, os autores concluem que a expressão de *Pellino-1* quando em condições de desafio bacteriano é dependente do tempo, o que pode ser baseado na patogênese dos organismos no hospedeiro. Em seus resultados, os autores provaram que a modulação da expressão gênica de *Pellino-1* após o desafio séptico foi regulada de forma positiva, possuindo função na imunidade inata, corroborando com os resultados aqui encontrados.

Li e colaboradores (2014), trabalhando com camarão da espécie *Litopenaeus vannamei*, relataram que após os desafios séptico com vírus da síndrome da mancha branca, *V. parahaemolyticus* e *S. aureus*, o peptídeo Pellino pode ser regulado positivamente o que sugere uma resposta imunológica aos desafios bacterianos indicando que o Pellino pode ser responsável pela ativação de vias do sistema imunológico. Além disso, o silenciamento gênico (*knockdown*) do *Pellino* pode diminuir

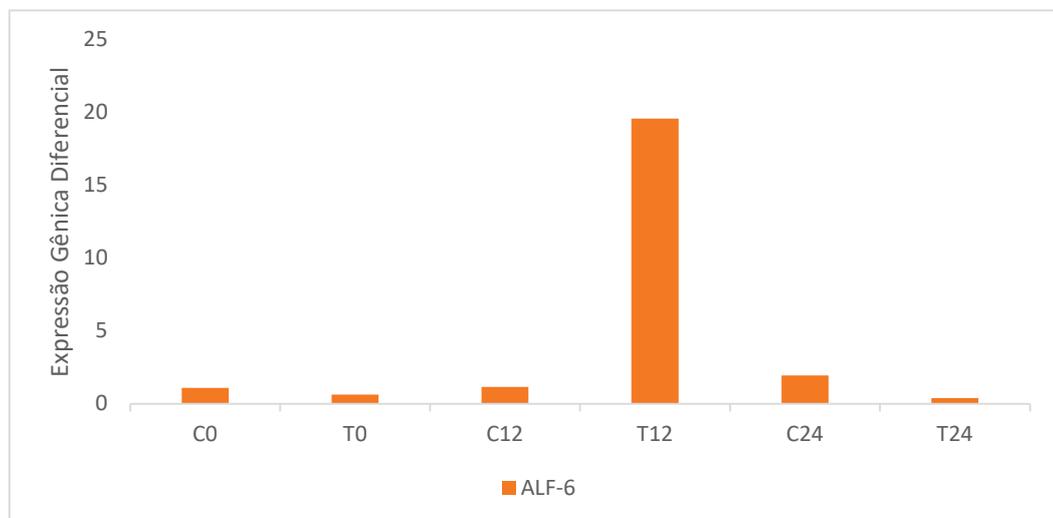
significativamente a expressão de PAMs e aumentar a mortalidade de camarões causada por desafio utilizando bactérias Gram-negativas como *V. parahaemolyticus*. Segundo os autores, isto demonstra a capacidade do Pellino em atuar positivamente durante as respostas imunes protegendo contra patógenos.

A expressão diferencial do gene *Pellino-1* apresentou melhor resposta nos animais infectados por *A. hydrophila* com 12 horas pós infecção, onde houve um aumento na expressão do gene comparado ao controle no mesmo período (tempo 12 horas). Nestas condições, o gene *Pellino-1* apresentou “valor de expressão” T12= 1,9982 comparado ao valor de C12= 1,2496.

Estes resultados podem indicar uma modulação intrincada nos mecanismos de controle de expressão gênica do gene *Pellino-1*, visto que após 12 horas da inoculação, o gene parece ser estimulado, no entanto, após 24 horas, os níveis de expressão retornam a condições parecidas com as encontradas no tempo 0. Este comportamento poderia ser relacionado com um mecanismo de defesa que é altamente estimulado e responde ao ataque do patógeno, através da regulação positiva de *Pellino-1* nas primeiras 12 horas. Após a resposta imunológica inicial os níveis dos produtos gênicos de *Pellino-1* retornam a condições próximas às condições basais (tempo = 0 horas).

Outro gene estudado, *ALF-6*, o perfil de expressão do gene está demonstrado abaixo na Figura 16.

FIGURA 16 - EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE ALF- 6 EM *M. rosenbergii*



FONTE: A Autora (2021).

LEGENDA: Expressão gênica do gene *ALF-6*, em *M. rosenbergii*, infectado com *A. hydrophila* por 0, 12 e 24 horas, respectivamente.

É possível observar que o gene *ALF-6* foi super expresso, com um *fold-change* de 17x, após 12 h de contato com *A. hydrophila* quando comparado com as amostras inoculadas tempo 0 h. Nas amostras submetidas ao desafio séptico por 24h, houve um decréscimo na expressão do gene. Resultados semelhantes foram observados por Ren e colaboradores (2012) em um estudo de desafio de *M. rosenbergii* com a bactéria Gram-negativa *Vibrio anguillarum*. Esses autores analisaram ALFs da espécie *M. rosenbergii* em resposta ao desafio séptico com *E. coli*, *V. anguillarum*, *S. aureus*, e vírus da mancha branca (WSSV) e em seus resultados obtiveram que o gene *ALF-6* foi detectado em maior quantidade presente no hepatopâncreas da espécie, além disso, quando os desafios foram aplicados eles observaram que em resposta ao desafio com *E. coli* o gene foi regulado negativamente em 12h comparado ao tempo 24h, o desafio com *V. anguillarum* demonstrou uma expressão aumentada do tempo 2 ao 12h reduzindo nas 24h. Quando desafiado com *S. aureus* o gene apresentou o nível mais alto com 24h e no desafio com WSSV atingiu o nível mais alto com 12h.

Para o gene *ALF-6* de *M. rosenbergii*, os do grupo tratado (infectados por *A. hydrophila*) após 12 horas da infecção apresentaram um pico demonstrando um aumento da expressão gênica quando comparado ao tratamento controle. Este comportamento é similar ao apresentado para o gene *Pellino-1* descrito no tópico anterior, inclusive em relação ao tempo de expressão. Nas condições estudadas, o gene *ALF-6* apresentou “valor de expressão” T12= 19,5605 comparado ao valor de C12= 1,1472, mostrando um elevado valor de expressão após o tempo 12 horas, sendo aparentemente da ordem de 17 vezes, quando comparado com os animais controle, após 12 horas.

Os ALFs se caracterizam por serem PAMs eficientes e de amplo espectro de ação, que apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus. Desempenham importante atividade no sistema imunológico inato de crustáceos e são denominados 'fatores anti-LPS' por demonstrarem função imunomoduladora (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2016; JIANG et al., 2015). A capacidade de neutralização do LPS atribuída aos ALFs, confere ampla função antimicrobiana para inibir bactérias (principalmente Gram-negativas) (WANG et al., 2014b). Fazem parte dos ALFs uma diversificada família de PAMs, possuindo características aniônicas ou catiônicas. (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2016).

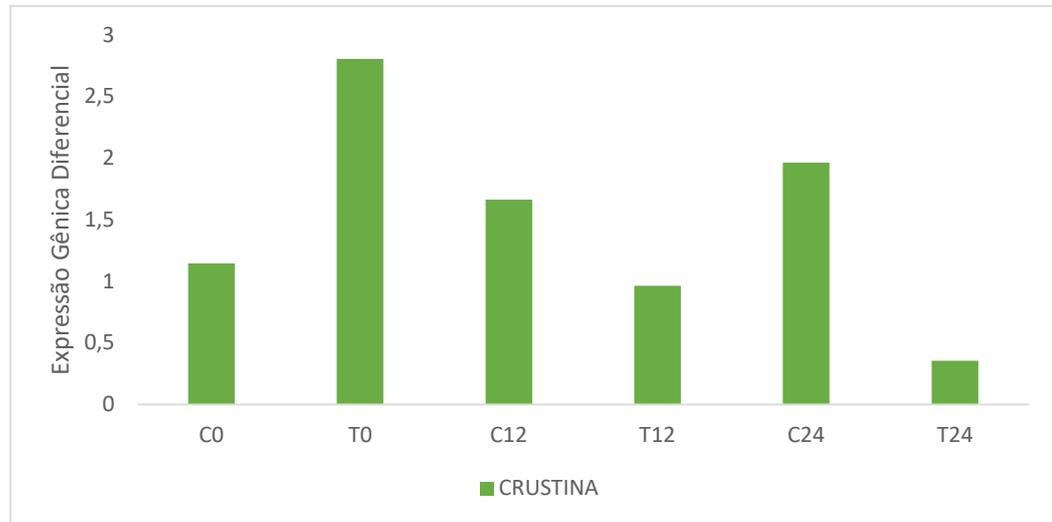
Em camarão, os ALFs formam uma grande e diversificada família. 5 grupos já foram encontrados e caracterizados, sendo eles: ALF-A (polipeptídeos aniônicos e catiônicos de 11,4-11,5 kDa), ALF-B (polipeptídeos altamente catiônicos de 10,6-11,2 kDa), ALF-C (polipeptídeos catiônicos polipeptídeos de 11-11,3 kDa), ALF-D (polipeptídeos altamente aniônicos de 10,7-10,8 kDa) e ALF-E (polipeptídeos aniônicos e catiônicos de 11,4-12,5 kDa) (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2016; JIANG et al., 2015). Estes grupos, foram definidos com base nas sequências de aminoácidos, características de seus sítios de ligação de lipopolissacarídeos e nos valores de pI previstos para cada ALF. Os Grupos A–C e E têm fortes propriedades antibacterianas e de ligação aos microrganismos, já no Grupo D são encontradas apenas ligações fracas ao LPS e baixa atividade antimicrobiana (JIANG et al., 2015; SMITH; DYRYNDA, 2015).

No Grupo A estão os peptídeos aniônicos e catiônicos, nos Grupos B e C são localizados apenas peptídeos catiônicos, que diferem entre si no número de íntrons nos genes que os codificam, e em sua distribuição tecidual. O grupo D difere dos outros grupos na medida em que contém apenas peptídeos fortemente aniônicos (SMITH; DYRYNDA, 2015). *ALF-6* pertence ao Grupo C (JIANG et al., 2015).

Wang e colaboradores (2014b) trabalhando com o plasma de camarão kuruma (*Marsupenaeus japonicus*), encontraram PAMs denominados de ALF4, ALF5 e ALF6. Quando os autores realizaram o silenciamento gênico de ALF4 e ALF6, puderam notar que os dois PAMs são os maiores responsáveis pela inibição da proliferação bacteriana na hemolinfa, visto que a microbiota da hemolinfa proliferou significativamente em animais contendo o gene silenciado.

Como observado após 24 horas, os níveis de expressão de *ALF-6* retornaram aos níveis próximos ao basal, da mesma forma que para *Pellino-1*. O aumento e a queda nas concentrações de *ALF-6* parecem ser bastante abruptos necessitando a avaliação dos níveis de expressão em tempos intermediários entre 12 e 24 horas após a infecção dos animais para a confirmação desta hipótese. Este não é o objeto deste trabalho, que consiste em uma avaliação preliminar da expressão dos genes de PAMs, mas pode representar uma possibilidade de estudos para trabalhos futuros sobre o comportamento deste gene.

Para o gene da Crustina, a expressão diferencial é mostrada na Figura 17.

FIGURA 17 - EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE CRUSTINA EM *Macrobrachium rosenbergii*

FONTE: A Autora (2021).

LEGENDA: Expressão gênica do gene *Crustina*, em *M. rosenbergii*, infectado com *A. hydrophila* por 0, 12 e 24 horas, respectivamente.

Analisando o gene *Crustina*, é possível notar que houve um aumento na expressão do gene para o tratamento inoculado com a bactéria no tempo 0 horas quando comparado ao controle no mesmo período. Para os demais tratamentos inoculados (tempo 12 e 24 horas) houve um declínio gradativo nos níveis expressos do gene. No controle tempo 12 horas, o gene apresentou uma elevação na expressão, sendo que no tempo 24 horas houve um maior acréscimo nos níveis do gene quando comparado ao controle tempo 0. Isto pode estar em conformidade com o encontrado por Rao e colaboradores (2016), em que os autores relataram que a *Crustina* em *M. rosenbergii* teve sua expressão reprimida.

Estas respostas podem indicar que a *Crustina* permaneceu ativa com alto valor de expressão quando não houve a presença da bactéria (tratamentos controle – C12 e C24). O que pode ser um indicativo de que o tipo de *Crustina* presente nessa espécie de camarão pode não ser ativo contra bactérias gram-negativas, ou mais precisamente contra *A. hydrophila*.

As *Crustinas* e sequências semelhantes a estas são encontradas em muitas espécies de camarões (TASSANAKAJON et al., 2018). Em *M. rosenbergii*, uma *Crustina* do tipo I foi reportada sendo expresso em resposta contra vírus (IHHNV e WSSV) e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, possuindo apenas atividade

bactericida contra uma bactéria Gram-negativa *Edwardsiella* sp. (AROCKIARAJ et al., 2013; TASSANAKAJON et al., 2018).

Corroborando com esses dados, Rao et al. (2016), trabalhando com três membros de PAMs observou que durante um desafio séptico lisozimas e ALFs foram significativamente reguladas para cima, enquanto as Crustinas foram significativamente reguladas para baixo. Segundo estes autores, esta regulação pode indicar que esta isoforma de Crustina (Tipo I) encontrada em *M. rosenbergii* pode não ser necessária para a defesa imunológica nesta espécie de camarão.

## 5.6 PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS DO HEPATOPÂNCREAS

As amostras de hepatopâncreas dos animais de todas as condições experimentais foram submetidas à extração de proteínas totais e o perfil eletroforético está apresentado na Figura 18. O objetivo principal dessa análise foi fazer uma análise visual e comparar as intensidades das bandas de baixo tamanho molecular (entre 15 e 30 kDa), compatível com peptídeos.

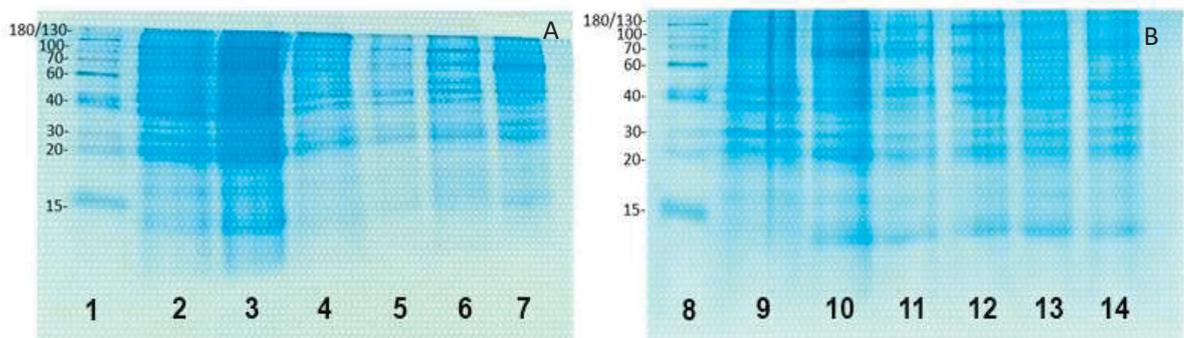
A concentração das proteínas de cada amostra foi padronizada para que todas as amostras tivessem a mesma concentração. Comparando-se com as bandas do padrão, foi possível observar bandas abaixo de 15 e acima de 180 kDa.

O tamanho médio, em quilodaltons, dos peptídeos Pellino-1, Crustina e ALF-6 são de 50, 12 e 11 kDa, respectivamente.

Os géis A e B apresentam o perfil de bandas de proteínas extraídas de dois animais de cada tratamento, apresentando um padrão de bandas similar entre os tratamentos. Como a análise realizada foi apenas qualitativa, não foi possível caracterizar possíveis peptídeos e nem estabelecer uma comparação na intensidade das bandas. Para isso, futuras análises deverão ser realizadas, como a técnica de *Western blot*, utilizando anticorpos monoclonais para detecção dos peptídeos Crustina, Pellino e ALF6. Estão disponíveis, para venda, o anticorpo Pellino 1/2 Anticorpo (F-7): sc-271065. Para os outros dois PAMs, não foi encontrado, até o momento anticorpos comerciais disponíveis.

No entanto, sabendo-se que os tamanhos aproximados desses peptídeos é em torno de 12 kDa, as bandas com esse tamanho aproximado poderão ser excisadas do gel, os peptídeos tripsinolisados e caracterizados por espectrometria de massas, como MALDI-ToF.

FIGURA 18 - ELETROFORESE SDS-PAGE DE PROTEÍNAS TOTAIS



FONTE: A Autora (2023).

LEGENDA: As amostras de 1 a 14, referem-se a: **Gel A:** **1.** Padrão de peso molecular; **2.** Controle (tempo 0); **3.** Inoculado (tempo 0); **4.** Controle (tempo 12); **5.** Inoculado (tempo 12); **6.** Controle (tempo 24); **7.** Inoculado (tempo 24). **Gel B:** **8.** Padrão de peso molecular; **9.** Controle (tempo 0); **10.** Inoculado (tempo 0); **11.** Controle (tempo 12); **12.** Inoculado (tempo 12); **13.** Controle (tempo 24); **14.** Inoculado (tempo 24). FONTE: A Autora (2023). Os géis A e B são referentes de experimentos em duplicata.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em vista dos argumentos aqui apresentados, este trabalho foi desenvolvido buscando a análise da expressão gênica de peptídeos antimicrobianos (*Pellino-1*, *ALF-6* e *Crustina*) 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 os PAMs, regulando a expressão dos genes 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*.

Estudos futuros serão necessários para melhor compreensão do sistema imunológico da espécie em questão, através da aplicação de diferentes técnicas como o MALDI-TOF ou *Western blot*.

Assim, com conhecimento suficiente do sistema de resposta do hospedeiro, torna-se possível selecionar ou até mesmo projetar moléculas sintéticas que possam ser adicionadas à alimentação dos animais de criação como o camarão, e estas moléculas poderiam se ligar a receptores selecionados, o que resultaria na regulação positiva do PAM de interesse para defesa contra um patógeno específico ou grupo de patógenos.

## REFERÊNCIAS

- 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.
- 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.
- AMPARYUP, P.; DONPUDSA, S.; TASSANAKAJON, A. Shrimp single WAP domain (SWD)-containing protein exhibits proteinase inhibitory and antimicrobial activities. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 32, n. 12, p. 1497-1509, 2008.
- 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.
- AROCKIARAJ, J. et al. Crustin, a WAP domain containing antimicrobial peptide from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: immune characterization. **Fish & shellfish immunology**, v. 34, n. 1, p. 109-118, 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO – ABCC. Curso análises a fresco, 2017. Disponível em: <<https://abccam.com.br/2017/10/analises-a-fresco-o-que-sao-qual-a-metodologia-o-que-observar-e-como-interpretar-qual-sua-importancia-para-a-prevencao-e-controle-de-enfermidades-no-cultivo-do-l-vannamei/apostila-curso-analise-a-fresco-na-carcinicultura/>>. Acesso em 06 mar 2020.
- 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.
- BARBIERI, E.; MELO, G. A. S. Biodiversidade: ocorrência da espécie exótica *Litopenaeus Vannamei* (Boone, 1931) no complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape-Ilha Comprida. **O Mundo da Saúde**, v. 30, n. 4, p. 654-659, 2006.
- 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 I3N de Espécies Exóticas Invasoras do Brasil, Instituto Hórus de Desenvolvimento e Conservação Ambiental, Florianópolis – SC. Disponível em <<http://bd.institutohorus.org.br/www>>. Acesso em: 24 jan. 2020.

BASE DE DADOS dos Peptídeos Antimicrobianos, Department of pathology and microbiology, UNMC – University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE. Disponível em <<https://aps.unmc.edu/>>. 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.

BRUGIOLO, S. S. S. et al. Canibalismo em fêmeas de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) (Crustacea, Palaemonidae): efeito da retirada das quelas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, p. 153-157, 2007.

BRUSCA, R. C.; MOORE, W.; SHUSTER, S. M. **Invertebrados**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. **Nature reviews microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238-250, 2005.

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

BURGE, E. J. et al. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. **Fish & shellfish immunology**, v. 22, n. 4, p. 327-339, 2007.

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.

CHANG, Y. H. et al. What vaccination studies tell us about immunological memory within the innate immune system of cultured shrimp and crayfish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 80, p. 53-66, 2018.

CHOMWONG, S. et al. Two host gut-derived lactic acid bacteria activate the proPO system and increase resistance to an AHPND-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus* in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 89, p. 54-65, 2018.

CHOOBERT, C. et al. A novel tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) gene from *Macrobrachium rosenbergii* involved in antibacterial defense against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, 2023.

CONTRERAS-GARDUÑO, J. et al. Insect immune priming: ecology and experimental evidences. **Ecological entomology**, v. 41, n. 4, p. 351-366, 2016.,

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.

CUTHBERTSON, B. J. et al. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. **Immunogenetics**, v. 54, n. 6, p. 442-445, 2002.

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

De GRAVE, S.; FRANSEN, C. H. J. M. Carideorum catalogus: the recent species of the dendrobranchiate, stenopodidean, procarididean and caridean shrimps (Crustacea: Decapoda). **Zoologische Mededelingen Leiden**, v. 85, n. 9, p. 195-589, 2011.

DESTOUMIEUX, D. et al. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 45, p. 28398-28406, 1997.

DESTOUMIEUX, D. et al. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 57, n. 8-9, p. 1260-1271, 2000.

DESTOUMIEUX - GARZÓN, D. et al. Crustacean immunity antifungal peptides are generated from the c terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 50, p. 47070-47077, 2001.

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. et al. Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 371, n. 1695, p. 20150300, 2016.

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

FAN, L. et al. Comparative proteomic identification of the hepatopancreas response to cold stress in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 454, p. 27-34, 2016.

FAN, X. et al. Ib-AMP4 insertion causes surface rearrangement in the phospholipid bilayer of biomembranes: Implications from quartz-crystal microbalance with dissipation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1860, n. 2, p. 617-623, 2018.

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.

- FARIAS, N. D. et al. *Litopenaeus vannamei* stylicins are constitutively produced by hemocytes and intestinal cells and are differentially modulated upon infections. **Fish & shellfish immunology**, v. 86, p. 82-92, 2019.
- FENG, P. et al. Effect of dietary *Tenebrio molitor* protein on growth performance and immunological parameters in *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, p. 734247, 2019.
- FENG, X. W.; HUO, J. L.; SHI, X. Z. Myeloid leukemia factor participates in the antibacterial immune reaction of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. **Invertebrate Survival Journal**, v. 15, n. 1, p. 203-209, 2018.
- FLEGEL, T. W. A future vision for disease control in shrimp aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 50, n. 2, p. 249-266, 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](https://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2019_USBcard/booklet/web_cb7874t.pdf)>. Acesso em: 03 ago. 2022.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. Fishery Statistics – Cultured Aquatic Species Information Programme. *Macrobrachium rosenbergii*. 2006. Disponível em: <[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Macrobrachium\\_rosenbergii/en#tcNA003F](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Macrobrachium_rosenbergii/en#tcNA003F)>. Acesso em: 10 de out de 2020
- FREIRE, J. L.; SILVA, B. B. da. Aspectos sócio-ambientais das pescarias de camarões dulciolas (*Macrobrachium amazonicum* Heller, 1862 e *Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879) (Decapoda, Palaemonidae) na região Bragantina-Pará-Brasil. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, v. 21, n. 1, 2008.
- GANGNONNGIW, W. et al. In experimental challenge with infectious clones of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV), MrNV alone can cause mortality in freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). **Virology**, v. 540, p. 30-37, 2020.
- 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.
- GE, Q. et al. Immune response of *Exopalaemon carinicauda* infected with an AHPND-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus*. **Fish & shellfish immunology**, v. 74, p. 223-234, 2018.
- GROSS, P. S. et al. 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 & Comparative Immunology**, v. 25, n. 7, p. 565-577, 2001.

- 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.
- HASELROTH, K. J. et al. Effectiveness of *Aeromonas hydrophila* for the removal of oil and grease from cattle slaughterhouse effluent. **Journal of Cleaner Production**, v. 287, p. 125533, 2021.
- HUANG, Y.; REN, Q. Research progress in innate immunity of freshwater crustaceans. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 104, p. 103569, 2020.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 49, p.1-12, 2021. Disponível em <[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2021\\_v49\\_br\\_informativo.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2021_v49_br_informativo.pdf)>. Acesso em: 10 dez. 2022.
- 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.
- ITIS – Integrated Taxonomic Information System. *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). **Integrated Taxonomic Information System**, Reston, Virginia. 2018. Disponível em: <[https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=96343#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=96343#null)>. Acesso em: 10 de out de 2020.
- 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.
- JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 3, p. 491-511, 2006.
- JIA, Y. P. et al. A single whey acidic protein domain (SWD)-containing peptide from fleshy prawn with antimicrobial and proteinase inhibitory activities. **Aquaculture**, v. 284, n. 1-4, p. 246-259, 2008.
- JIANG, H. et al. A new group of anti-lipopolysaccharide factors from *Marsupenaeus japonicus* functions in antibacterial response. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 48, n.1, p. 33-42, 2015.

JIEWKOK, A.; TSUKIMURA, B.; UTARABHAND, P. Purification and Molecular Cloning of Hemocyanin from *Fenneropenaeus Merguensis*: Response to *Vibrio Harveyi* Exposure. **Journal of Crustacean Biology**, v. 35, n. 5, p. 659-669, 2015.

KLEINO, A.; SILVERMAN, N. The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 42, n. 1, p. 25-35, 2014.

KRUSONG, K. et al. A comparative study of antimicrobial properties of crustinPm1 and crustinPm7 from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 36, n. 1, p. 208-215, 2012.

KUMARESAN, V. et al. Impacts of environmental and biological stressors on immune system of *Macrobrachium rosenbergii*. **Reviews in Aquaculture**, v. 9, n. 3, p. 283-307, 2017.

KURTZ, J.; ARMITAGE, S. A. O. Alternative adaptive immunity in invertebrates. **Trends in immunology**, v. 27, n. 11, p. 493-496, 2006.

LABORATÓRIO ACQUAMARÃO. Disponível em: <<http://acquamarao.com.br/>>. Acesso em: 25 abr. 2020.

LABORCLIN. **Kit Enterobactérias**. 2019. Disponível em <[https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/05/kit\\_enterobacterias\\_bula\\_25012019.pdf](https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/05/kit_enterobacterias_bula_25012019.pdf)>. Acesso em: 15 nov. 2021.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

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.

LI, C. et al. Pellino protein from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* positively regulates NF- $\kappa$ 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.

LIVAKA, K. J.; SCHMITTGENB, T. D.; Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MACHADO, I. DA S. et al. Desempenho do camarão *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae), em diferentes densidades. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 11, n. 1, p. 29-37, 2018.

MAGALHÃES, C. et al. Exotic species of freshwater decapod crustaceans in the state of São Paulo, Brazil: records and possible causes of their introduction. **Biodiversity & Conservation**, 14.8: 1929-1945, 2005.

MANTELATTO, F. L. et al. First record and extension of the known distribution of the inland prawn, *Macrobrachium aracamuni* Rodríguez, 1982 (Decapoda, Palaemonidae) in Brazil. **Crustaceana**, v. 81, n. 2, p. 241-246, 2008.

MELO, M., FERRE, R. CASTANHO, M. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 245–250, 2009.

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.

MUSTHAQ, S. K. S.; KWANG, J. Evolution of specific immunity in shrimp – A vaccination perspective against white spot syndrome virus. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 46, n. 2, p. 279-290, 2014.

NETEA, M. G.; QUINTIN, J.; VAN DER MEER, J. W. M. Trained immunity: a memory for innate host defense. **Cell Host & Microbe**, v. 9, n. 5, p. 355-361, 2011.

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. **Freshwater prawns: biology and farming**. 1. ed. 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  $\beta$ -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.

NUNES, E. T.; BRAGA, A. A.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Histochemical study of the hepatopancreas in adult females of the pink-shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* Latreille, 1817. **Acta histochemica**, v. 116, n. 1, p. 243-251, 2014.

PAN, D. et al. Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 29, n. 2, p. 103-112, 2005.

PATAT, S. A. et al. Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 23-24, p. 4825-4833, 2004.

- 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.
- PETIT, V. W. et al. A hemocyanin-derived antimicrobial peptide from the penaeid shrimp adopts an alpha-helical structure that specifically permeabilizes fungal membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1860, n. 3, p. 557-568, 2016.
- PILEGGI, L. G.; MANTELATTO, F. L. Molecular phylogeny of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae), with emphasis on the relationships among selected American species. **Invertebrate Systematics**, v. 24, n. 2, p. 194-208, 2010.
- PILEGGI, L. G.; MANTELATTO, F. L. Taxonomic revision of doubtful Brazilian freshwater shrimp species of genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae). Iheringia. **Série Zoologia**, v. 102, n. 4, p. 426-437, 2012.
- 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.
- POWERS, J. P. S.; HANCOCK, R. E. W. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides**, v. 24, n. 11, p. 1681-1691, 2003.
- PHUKET, T. R. Na et al. Antibacterial activity and immunomodulatory role of a proline-rich antimicrobial peptide SpPR-AMP1 against *Vibrio campbellii* infection in shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 132, p. 108479, 2023.
- PUDGERD, A. et al. The hematopoietic organ of *Macrobrachium rosenbergii*: Structure, organization and immune status. **Fish & shellfish immunology**, v. 88, p. 415-423, 2019.
- QIU, L. et al. First Description of a Natural Infection with Shrimp Hemocyte Iridescent Virus in Farmed Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium Rosenbergii*. **Viruses**, 11, 354, 2019.
- RAJKUMAR, T. et al. Ontogenetic changes in the expression of immune related genes in response to immunostimulants and resistance against white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 76, p. 132-142, 2017.

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.

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.

RAO, X. J. et al. Immune functions of insect  $\beta$ GRPs and their potential application. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 83, p. 80-88, 2018.

REECE, J. B. et al. **Biologia de Campbell**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

REN, Q. et al. Three different anti-lipopolysaccharide factors identified from giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Fish & shellfish immunology**, v. 33, n. 4, p. 766-774, 2012.

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.

ROCHA, O. **Águas doces**. Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira, v. 2, p. 13-52, 2005.

ROLLAND, J. L. et al. Stylicins, a new family of antimicrobial peptides from the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 6, p. 1269-1277, 2010.

ROSA, R. D.; BARRACCO, M. A. Antimicrobial peptides in crustaceans. **Invertebrate Survival Journal**, v. 7, n. 2, p. 262-284, 2010.

SALAZAR, G. et al. Hibridación entre los Camarones de río *Macrobrachium rosenbergii* (De man) y *M. acanthurus* (Wiegmann). ¿ Es posible?. **Interciencia**, v. 30, n. 8, p. 501-505, 2005.

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, M. A. S. et al. Histomorphologic characterization of the hepatopancreas of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 5, p. 1539-1546, 2018.

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.

SMITH, V. J. et al. Crustins: enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 32, n. 7, p. 758-772, 2008.

SMITH, V. J.; DYRYNDA, E. A. Antimicrobial proteins: from old proteins, new tricks. **Molecular immunology**, v. 68, n. 2, p. 383-398, 2015.

SÖDERHÄLL, I. Crustacean hematopoiesis. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 58, p. 129-141, 2016.

SOMBOONWIWAT, K. et al. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 29, n. 10, p. 841-851, 2005.

SOMBOONWIWAT, K. et al. Differentially expressed genes in hemocytes of *Vibrio harveyi*-challenged shrimp *Penaeus monodon*. **Journal of biochemistry and molecular biology**, v. 39, n. 1, p. 26, 2006.

SRUTHY, K. S. et al. A histone H2A derived antimicrobial peptide, Fi-Histin from the Indian White shrimp, *Fenneropenaeus indicus*: Molecular and functional characterization. **Fish & shellfish immunology**, v. 92, p. 667-679, 2019.

STUDIER, F. William. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **Journal of molecular biology**, v. 79, n. 2, p. 237-248, 1973.

TAHIM, E. F.; DAMACENO, M. N.; ARAÚJO, I. F. de. Trajetória tecnológica e sustentabilidade ambiental na cadeia de produção da carcinicultura no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 57, p. 93-108, 2019.

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.; SOMBOONWIWAT, K.; AMPARYUP, P. Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 48, n. 2, p. 324-341, 2015.

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

TAVARES, M.; MENDONÇA JR, J. B. Introdução de crustáceos decápodes exóticos no Brasil: uma roleta ecológica. Água de lastro e bioinvasão. **InterCiência**, Rio de Janeiro, p. 59-76, 2004.

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.

VALENTI, W. C. et al. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, v. 19, p. 100611, 2021.

VEGA, E. de la. et al. Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (LvALF): a broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection. **Molecular immunology**, v. 45, n. 7, p. 1916-1925, 2008.

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.

XIA, X. et al. Insect C-type lectins in innate immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 83, p. 70-79, 2018.

XIAO, B. et al. Penaeidins are a novel family of antiviral effectors against WSSV in shrimp. **BioRxiv**, p. 467571, 2018.

XING, Q. et al. Evaluation of cold tolerance and gene expression patterns associated with low-temperature stress in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture Reports**, v. 24, 2022.

WANG, P. H. et al. Antiviral defense in shrimp: from innate immunity to viral infection. **Antiviral Research**, v. 108, p. 129-141, 2014.

WANG, X. W.; WANG, J. X. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 39, n. 1-2, p. 27-38, 2013.

WANG, X. W. et al. A shrimp C-type lectin inhibits proliferation of the hemolymph microbiota by maintaining the expression of antimicrobial peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 17, p. 11779-11790, 2014b.

WANG, W. et al. WSV181 inhibits JAK/STAT signaling and promotes viral replication in *Drosophila*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 92, p. 20-28, 2019.

WANG, Y. et al. Identification of five anti-lipopolysaccharide factors in oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. **Fish & shellfish immunology**, v. 46, n. 2, p. 252-260, 2015.

WOWOR, D.; CAI, Y.; NG, P. K.L. Crustacea: Decapoda, Caridea. **The Freshwater Invertebrates of the Malaysian Region**, p. 337-357, 2004.

WOWOR, D. et al. Evolution of life history traits in Asian freshwater prawns of the genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) based on multilocus molecular phylogenetic analysis. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 52, n. 2, p. 340-350, 2009.

YANG, L. et al. A single WAP domain (SWD)-containing protein with antiviral activity from Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 73, p. 167-174, 2018a.

YANG, S. et al. Prediction and characterization of a novel hemocyanin-derived antimicrobial peptide from shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Amino acids**, v. 50, n. 8, p. 995-1005, 2018b.

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 Access Publisher**, 6: p.123 – 164. 2011.