

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ALEXANDRA EMANUELE COITINHO  
INGRID SANDRI CARAFINI DE SOUZA**

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE CRUSTINA EM HEPATOPÂNCREAS  
DO CAMARÃO *Penaeus vannamei* APÓS DESAFIO BACTERIANO**

**PALOTINA**

**2023**

**ALEXANDRA EMANUELE COITINHO  
INGRID SANDRI CARAFINI DE SOUZA**

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE CRUSTINA EM HEPATOPÂNCREAS  
DO CAMARÃO *Penaeus vannamei* APÓS DESAFIO BACTERIANO**

Artigo apresentado ao curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adriana Fiorini Rosado

**Palotina**

**2023**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS  
Rua Pioneiro, 2153, - - Bairro Jardim Dallas, Palotina/PR, CEP 85950-000  
Telefone: 3360-5000 - <http://www.ufpr.br/>

#### Ata de Reunião

Ao primeiro dia do mês de dezembro do ano de 2023, às dezesseis horas e trinta minutos, na sala 13 do Bloco Seminário da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "**Expressão gênica diferencial de Crustina em hepatopâncreas do camarão *Penaeus vannamei* após desafio bacteriano**" apresentado pela discente **Ingrid Sandri Carafini de Souza**, orientada pela Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, a orientadora e Presidente da Banca concedeu a palavra à discente, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Defesa Oral, os quais passaram a arguir a discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Defesa Oral, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído à discente as seguintes notas: Prof. Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester, nota 97 (noventa e sete), Prof. Dr. Fabio Rogério Rosado, nota 100: (cem), e Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado, nota: 98 (noventa e oito). A nota final da discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi 98 (noventa e oito). Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA FIORINI ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 05/12/2023, às 14:12, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **FABIO ROGERIO ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 05/12/2023, às 14:13, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **EDUARDO LUIS CUPERTINO BALLESTER, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 05/12/2023, às 14:58, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **6245864** e o código CRC **FE40C30E**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS  
Rua Pioneiro, 2153, - - Bairro Jardim Dallas, Palotina/PR, CEP 85950-000  
Telefone: 3360-5000 - <http://www.ufpr.br/>

#### Ata de Reunião

Ao primeiro dia do mês de dezembro do ano de 2023, às dezesseis horas e trinta minutos, na sala 13 do Bloco Seminário da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "**Expressão gênica diferencial de Crustina em hepatopâncreas do camarão *Penaeus vannamei* após desafio bacteriano**" apresentado pela discente **Alexandra Emanuele Coitinho**, orientada pela Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, a orientadora e Presidente da Banca concedeu a palavra à discente, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Defesa Oral, os quais passaram a arguir a discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Defesa Oral, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído à discente as seguintes notas: Prof. Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester, nota 97 (noventa e sete), Prof. Dr. Fabio Rogério Rosado, nota 100: (cem), e Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado, nota: 98 (noventa e oito). A nota final da discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi 98 (noventa e oito). Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA FIORINI ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 05/12/2023, às 14:09, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **FABIO ROGERIO ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 05/12/2023, às 14:09, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **EDUARDO LUIS CUPERTINO BALLESTER, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 05/12/2023, às 14:57, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **6245747** e o código CRC **3415316A**.

## EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE CRUSTINA EM HEPATOPÂNCREAS DO CAMARÃO *Penaeus vannamei* APÓS DESAFIO BACTERIANO

ALEXANDRA EMANUELE COITINHO

INGRID SANDRI CARAFINI DE SOUZA

### RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo analisar e detalhar o perfil transcricional de um gene associado à produção de peptídeo antimicrobiano em camarões *Penaeus vannamei* após a injúria séptica provocada pela bactéria *Aeromonas hydrophila*. A imunocompetência dos animais parece ser significativamente reduzida devido ao estresse ambiental causado por contaminantes. Os peptídeos antimicrobianos desempenham um papel fundamental na primeira barreira de defesa do organismo em diversas espécies animais. Entre esses peptídeos, as crustinas destacam-se como a maior e mais diversificada família de PAMs em crustáceos. A *A. hydrophila* é um agente causador de doenças zoonóticas. Para análises do desafio imunológico foi testada a resposta de um grupo de adultos de *P. vannamei*. As amostras deste grupo foram avaliadas em triplicata nos tempos 0, 12 e 24 horas. O RNA total foi extraído dos hepatopâncreas utilizando o kit de extração *SV Total RNA Isolation* (Promega). A síntese do cDNA foi feita através da concentração de RNA total extraído, padronizada uma concentração de aproximadamente 100 ng de RNA, para todas as amostras testadas. Para a análise da expressão da Crustina foram utilizados *primers* de análise da expressão gênica da Crustina, tipo III. O cDNA sintetizado foi amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) convencional, as amostras de cDNA foram também amplificadas, com os mesmos *primers*, por PCR quantitativa (qPCR). Os melhores resultados obtidos no tempo 24 horas, com um aumento de duas vezes a mais em comparação aos não desafiados, já no tempo 12 horas houve aumento de 0,5% comparado com os não desafiados.

Palavras-chaves: Crustinas, PCR, *Aeromonas hydrophila*.

## 1 INTRODUÇÃO

O camarão tem se destacado significativamente no cenário global da aquicultura, consolidando-se como um dos produtos pesqueiros mais relevantes. Essa ascensão deve-se ao seu considerável valor econômico, aliado ao elevado teor nutritivo e à aceitação favorável por parte dos consumidores. A criação de camarões de água doce surgiu como um dos principais impulsionadores do crescimento da aquicultura em escala global. Destacam-se entre as espécies mais criadas o *Macrobrachium nipponense* (DE HAAN, 1849), com produção concentrada principalmente na China, e o *Macrobrachium rosenbergii* (DE MAN, 1879), criado em diversas nações, sobretudo na Ásia (NEW, 2010). No entanto, o *L. vannamei* é especialmente proeminente na carcinicultura global, contribuindo com cerca de 50% da produção total de crustáceos criados em todo o mundo (FAO, 2003).

A criação de camarões destinados ao consumo humano, seja de água salgada ou doce, destaca-se como um setor econômico significativo na produção de alimentos, principalmente devido à presença das proteínas disponíveis na carne de camarão (AYISI et al., 2017). O camarão é reconhecido como uma das principais *commodities* entre os produtos aquícolas (BALLESTER et al., 2017).

O camarão-da-pata-branca, cientificamente denominado *P. vannamei*, é uma espécie pertencente à ordem Decapoda e à família Penaeidae. Ele é nativo da costa leste do Oceano Pacífico, estendendo-se desde a região de Tumbes, no Peru, até a região de Sonora, no México (PÉREZ FARFANTE & KENSLEY, 1997). Assim como outros camarões peneídeos, o *P. vannamei* é categorizado como onívoro, alimentando-se de fitoplâncton e zooplâncton durante seus estágios larvais e pós-larvais. Essa espécie é reconhecida por sua capacidade de osmorregulação, sendo considerada eurihalina, o que significa que ela pode tolerar variações rápidas e amplas na salinidade do ambiente em que habita (SALIM, 2002).

A produção de camarão criado destaca-se pela atenção à qualidade da água. Frequentemente, as fazendas de camarão captam água com parâmetros de qualidade inferiores às águas que são liberadas. Isso significa que a água é capturada, tratada, utilizada no Criação, removida dos tanques para unidades de tratamento e, posteriormente, lançada no meio ambiente ou reaproveitada. No entanto, são escassas as pesquisas realizadas com o intuito de estabelecer a relação entre os diversos parâmetros de manutenção das criações, o nível de estresse dos animais e

a propensão a infecções virais em crustáceos marinhos. (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000). As criações, que se concentram cada vez mais nas regiões costeiras, enfrentam o impacto decorrente de diversas atividades de origem humana, podendo, eventualmente, ser afetadas por resíduos provenientes dessas atividades. Dessa forma, vários problemas que surgem nas criações, como crescimento inadequado, estresse e ocorrência de doenças, têm sido relacionados a essa condição. (ROCH, 1999).

A imunocompetência dos animais parece ser significativamente reduzida devido ao estresse ambiental causado por contaminantes, indicado pelo surgimento ou aumento na prevalência de doenças (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000). As investigações iniciais sobre a imunidade local e intestinal em camarões tiveram início nos primeiros anos do século XXI. Esses estudos pioneiros, utilizando técnicas transcriptômicas, identificaram o primeiro conjunto de genes associados ao sistema imunológico em órgãos como brânquias e hepatopâncreas. (GROSS et al., 2001; ROBALINO et al., 2007). Nesse cenário, os peptídeos antimicrobianos têm se mostrado fortemente promissores para o desenvolvimento de estratégias otimizadas no controle e combate a enfermidades nas criações (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2016). Os PAMs são efetores essenciais na resposta imune inata na maioria dos organismos. Essas moléculas agem contra um ampla gama de microrganismos, incluindo bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, fungos e algumas espécies virais e protozoários (BACHERE, 2000). Em camarões peneídeos (Decapoda: Penaeidae), várias famílias de PAMs foram identificadas, incluindo as penaeidinas (DESTOUMIEUX et al., 1997), as crustinas (BARTLETT et al., 2002), fator anti-lipopolissacarídeo - ALF (SOMBOONWIWAT et al., 2005).

As crustinas são peptídeos antimicrobianos peculiares na imunidade dos crustáceos em nível estrutural. Ao contrário de outros PAMs codificados por genes descritos em crustáceos, as crustinas pertencem a um grupo de proteínas que possuem um domínio *Whey Acidic Protein* (WAP) em sua estrutura. De fato, uma das características marcantes é a presença de um domínio WAP conservado na região C-terminal do peptídeo maduro. O domínio WAP é um motivo protéico de 50 resíduos aminoácidos que possuem oito resíduos de cisteína conservados envolvidos em quatro ligações dissulfeto intramoleculares. A ligação dissulfeto interna cria uma estrutura compacta que, em última análise, forma um arranjo tridimensional típico, descrito no PROSITE como *four-disulfide core* ou 4-DSC (SMITH et al., 2008).

A identificação de genes semelhantes à crustina em *P. vannamei* é importante para estudos sobre a utilização desses peptídeos para o desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos.

Portanto, o trabalho caracterizou o perfil transcricional de um gene relacionado com a produção de peptídeo antimicrobiano, Crustina do tipo III, que apresenta um alto valor de expressão em trato digestório de crustáceos, em camarões *P. vannamei*, submetido a injúria séptica causada por *A. hydrophila*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O surgimento de diversas doenças infecciosas e o ataque de patógenos representam uma ameaça à cultura de camarões. Embora antibióticos e desinfetantes ainda sejam as abordagens convencionais predominantes para o controle de infecções bacterianas em incubatórios de camarão, é crucial desenvolver rapidamente técnicas alternativas de controle que sejam ecologicamente sustentáveis, como, por exemplo, estratégias de controle biológico. O objetivo é preservar a saúde dos animais e mitigar os impactos negativos dessas ameaças à indústria do camarão (NHAN et al., 2010). A interação dos sistemas imunológicos naturalmente presentes nos organismos é crucial para a eliminação de agentes patogênicos. Nas criaturas invertebradas, distintas classes de patógenos desencadeiam a ativação da resposta imunológica inata de maneiras diversas (MACHADO et al., 204).

A nível global, a priorização do controle de doenças tornou-se crucial para garantir de uma forma ecologicamente sustentável e economicamente viável a produção de camarões. Em grande medida, a durabilidade dessa produção está intrinsecamente ligada ao equilíbrio entre: (I) a qualidade do ambiente, (II) a prevenção de doenças por meio de diagnósticos e levantamentos epidemiológicos dos agentes patogênicos, e (III) o estado de saúde dos camarões. Por fim, a aquicultura de camarão também está condicionada à seleção de animais resistentes a doenças (BACHÈRE, 2000).

A glândula do intestino médio dos peneídeos, também conhecida como hepatopâncreas, encontra-se na região cefalotórax e é composta por dois lóbulos simétricos, podendo representar até 6% da massa corporal desses animais. Consiste em cerca de cem túbulos cegos que desembocam em câmaras conectadas à porção pilórica do estômago. Dentro desses túbulos, podem ser identificadas áreas de

diferenciação celular e áreas responsáveis pela secreção de enzimas e absorção de nutrientes. Essas enzimas são liberadas no estômago, onde se distribuem ao longo do lúmen do intestino médio, formando um gradiente de concentração (ALEXANDRE et al., 2014).

O hepatopâncreas desempenha funções cruciais no metabolismo, abrangendo o armazenamento de substâncias de reserva, a digestão e absorção de nutrientes, a manutenção de reservas minerais e substâncias orgânicas, o metabolismo de lipídeos e carboidratos, a distribuição das reservas armazenadas durante o período de intermuda, o catabolismo de compostos orgânicos, e a síntese e secreção de enzimas digestivas (CECCALDI, 1997). Além disso, destaca-se no sistema imunológico como um local crucial para a produção e secreção de imunofatores na hemolinfa.

Assim como acontece em insetos vetores (mosquitos, flebotomíneos, barbeiros), o trato gastrointestinal de camarões (em especial a região medial do intestino) é considerada uma importante via de acesso para agentes infecciosos. No entanto, apesar dos recentes avanços na caracterização do sistema imune de crustáceos, a grande maioria dos estudos está essencialmente voltada para as respostas de defesa clássicas, que ocorrem na hemolinfa. O conhecimento sobre a imunidade intestinal de crustáceos ainda é muito limitado e um maior entendimento sobre a fisiologia e a capacidade imunológica do intestino é necessário devido ao fato de ser um dos principais sítios da entrada de patógenos (SILVEIRA, 2016).

Os peptídeos antimicrobianos desempenham um papel crucial na primeira linha de defesa do hospedeiro em diversas espécies de animais. Sua importância na imunidade inata está relacionada à capacidade de atuar sem uma alta especificidade ou memória imunológica. Além disso, devido ao seu tamanho reduzido, esses peptídeos são facilmente sintetizados sem a necessidade de células ou tecidos especializados, e podem se difundir rapidamente até o local da infecção. Diversos peptídeos microbianos demonstram uma notável seletividade em relação a procariontes, exibindo baixa toxicidade para células eucarióticas. Esse fenômeno tem impulsionado a pesquisa e exploração desses peptídeos como possíveis novos antibióticos. Além de sua utilidade comercial ou quimioterápica, os peptídeos microbianos oferecem uma maneira proveitosa de examinar e pesquisar a imunidade inata nos âmbitos bioquímico e molecular (RELF et al., 1999). Nos crustáceos, especialmente nos decápodes, diferentes famílias de PAMs, incluindo peneidinas, fatores anti-lipopolissacarídeos, crustinas, estilicinas, etc., foram identificados e

caracterizados (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2016; ROSA e BARRACCO, 2010; TASSANAKAJON et al., 2010; TASSANAKAJON et al., 2015).

Uma bactéria patogênica com ampla distribuição no ambiente aquático é a *A. hydrophila*, essas bactérias são caracterizadas como Gram-negativas, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos, apresentando uma forma de bastonete, movimentação por meio de um único flagelo, e são positivas para catalase e oxidase, além de fermentadoras de glicose. A temperatura ideal para o crescimento é em torno de 28°C, embora algumas variantes possam prosperar em temperaturas tão baixas quanto -0,1°C. Sua tolerância à salinidade é limitada, sendo assim, a *A. hydrophila* é comumente encontrada em locais como lagos e rios de água doce, bem como em sistemas de esgoto (DASKALOV, 2006; SAMAYA PAULRAJ et al., 2020).

A *A. hydrophila* é um agente causador de doenças zoonóticas, ou seja, podem ser transmitidas entre animais e humanos, sendo a água um significativo meio de contaminação, é conhecida por ser um patógeno oportunista, o que significa que pode causar infecções em indivíduos com sistemas imunológicos comprometidos ou em condições de saúde precárias (DASKALOV, 2006; PEIXOTO et al., 2012). As infecções por *A. hydrophila* podem se manifestar de diversas formas, incluindo gastroenterite, infecções de pele e tecidos moles, bem como infecções respiratórias. A ingestão de água ou alimentos contaminados, especialmente frutos do mar crus ou mal cozidos, é uma das vias de transmissão comuns dessas bactérias para os seres humanos. Epidemias provocadas pela *A. hydrophila* estão associadas a modificações na vulnerabilidade do hospedeiro, frequentemente desencadeadas por alterações no ambiente (SAMAYANPAULRAJ et al., 2020).

Nos camarões, assim como em outros invertebrados, há presença de imunidade inata, que é não específica, mas caracterizada por uma complexidade significativa na ativação de vias metabólicas relacionadas à resposta imunológica, a estrutura fundamental do sistema imunológico dos camarões para o reconhecimento e combate de organismos estranhos se assemelha à imunidade observada em insetos (WANG et al., 2014; CHANG, et al., 2018).

O sistema imunológico presente nos invertebrados é capaz de desencadear respostas de defesa contra microrganismos patogênicos, podendo ser categorizado como imunidade humoral ou celular (LI; XIANG, 2013). No caso do camarão, assim como em outros invertebrados, sua proteção contra doenças bacterianas e virais baseia-se fundamentalmente no sistema imune inato. Os componentes celulares e

humorais desempenham um papel crucial nas respostas imunológicas, sendo essenciais no reconhecimento e subsequente eliminação dos patógenos invasores (RAJKUMAR et al., 2017).

As células do camarão reconhecem patógenos invasores através do processo de imunidade inata, que envolve o reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs). Os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes nas células do camarão têm a capacidade de identificar esses PAMPs (CRUVINEL et al., 2010). Quando um PAMP é detectado, desencadeia uma resposta imunológica, ativando as defesas do camarão contra o patógeno invasor (LI; XIANG, 2013; MUSTHAQ; KWANG, 2014; TASSANAKAJON et al., 2018).

Os camarões estão equipados com diversas PRRs capazes de identificar patógenos, desencadeando assim a imunidade inata. O reconhecimento realizado por esses PRRs inicia a ativação do sistema profenoxidase (proPO) no sistema imunológico, sendo a especificidade da cascata proPO dependente dos PRRs (TASSANAKAJON et al., 2018). Patógenos de maior porte, como parasitas, provocam uma resposta imunológica celular, notavelmente por meio do encapsulamento (WANG; WANG, 2013).

Crustinas representam a maior e mais diversa família de PAMs em crustáceos (MATOS e ROSA, 2022). Historicamente as crustinas foram uma das primeiras famílias de PAMs codificados por genes identificados em crustáceos. São peptídeos/polipeptídeos antimicrobianos (6-22 kDa) secretados e ricos em ligações dissulfeto, contendo um domínio conservado (WAP) em sua extremidade C-terminal (RELF et al., 1999).

Bartlett e colaboradores (2002) identificaram sequências homólogas em duas espécies de camarões peneídeos (*L. vannamei* e *L. setiferus*) e então cunharam o termo 'crustina', uma nomenclatura que se tornou universalmente usada para a descrição de moléculas semelhantes em outros crustáceos.

Durante o curso da evolução, o motivo WAP parece ter fornecido uma estrutura molecular adequada para o surgimento de proteínas envolvidas em diversas funções, incluindo a participação no sistema imunológico e como moléculas antimicrobianas (BARRETO et al., 2022).

A classificação das crustinas em diferentes tipos é baseada principalmente na região variável N-terminal de peptídeos maduros, pois a região WAP C-terminal é idêntica em todos os tipos de crustinas, representado um domínio funcional (SMITH

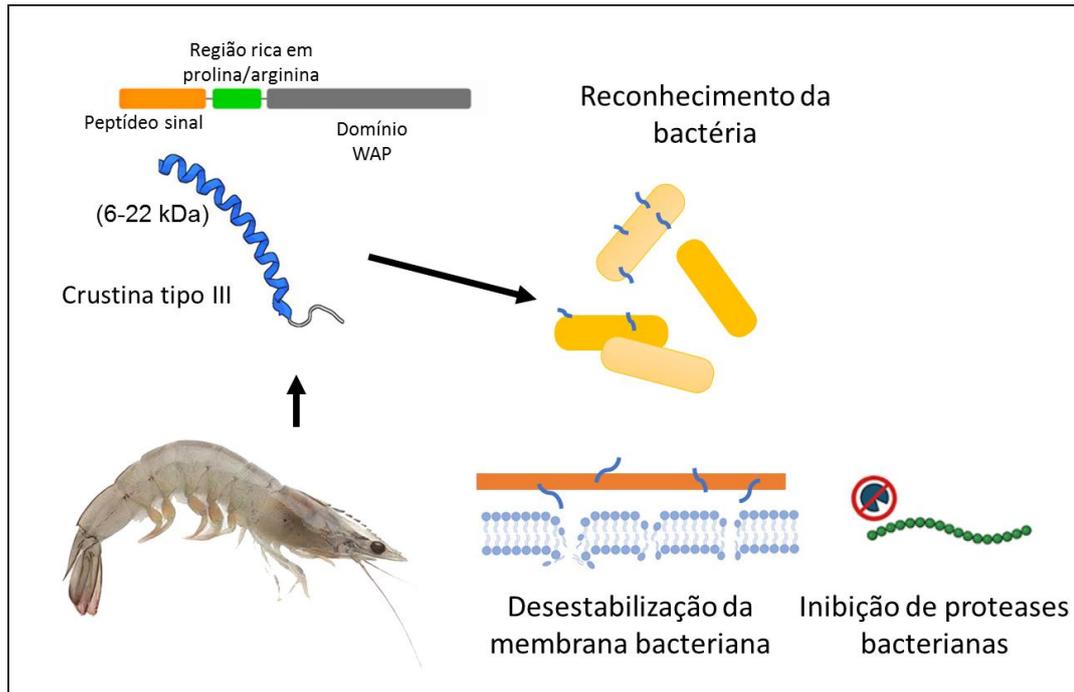
et al., 2008). Apesar da proposição de diferentes sistemas de classificação ao longo dos últimos anos, todos se basearam essencialmente nesse aspecto.

As crustinas do tipo I são caracterizadas pela presença de um peptídeo sinal seguido por um domínio de tamanho variável contendo quatro resíduos de cisteína, conservados dispostos em posições específicas à montante do domínio WAP e são encontradas predominantemente em crustáceos da subordem Pleocyemata, como caranguejos, lagostas, camarões de água doce e lagostins. Alguns estudos também os relataram em camarões peneídeos, decápodes da subordem Dendrobranchiata (JIANG et al., 2015; DONPUSA et al., 2015).

As crustinas do Tipo II, por outro lado, têm um domínio hidrofóbico altamente polimórfico à frente do domínio rico em cisteína também encontrado nas crustinas do Tipo I e foram amplamente encontradas entre camarões peneídeos (subordem Dendrobranchiata), mas também podem ser encontradas em alguns crustáceos da subordem Pleocyemata (JIRAVANICHPAISAL et al., 2007; SPERSTAD et al., 2009).

As crustinas do Tipo III (FIGURA 1) podem conter domínios N-terminais curtos enriquecidos em resíduos de prolina/arginina, mas carecem do domínio rico em glicina típico das crustinas do Tipo II e do domínio rico em cisteína encontrado nas crustinas do Tipo I e do Tipo II (AMPARYUP et al., 2008; JIA et al., 2008; JIMÉNEZ-VEGA et al., 2004). São encontradas em crustáceos pertencentes à subordem Pleocyemata, como lagostas, caranguejos e alguns camarões e Dendrobranchiata, consideradas clados monofiléticos que substituem as antigas subordens Reptantia e Natantia (TASSANAKAJON et al., 2015). Estudos tem demonstrado que os PAMs podem atuar no nível da membrana microbiana, através da inserção e desestabilização da membrana, levando à liberação de conteúdo citoplasmático. Esta habilidade deriva da combinação e propriedades de seus elementos físico-químicos elementares e a composição química de superfícies microbianas.

FIGURA 1 - ESQUEMA DO PRINCIPAL MECANISMO DE AÇÃO ANTIMICROBIANA DA CRUSTINA



Fonte: As Autoras (2023). Adaptado de Wang et al. (2021) e Barreto et al. (2022)

As membranas de muitos microrganismos exibem fosfolipídios carregados negativamente e grupos principais voltados para a face externa, enquanto células de organismos multicelulares podem expor fosfolipídios nessa face e segregar aqueles com uma natureza negativa no folheto intracelular (MATSUZAKI e KATSUMI, 2019). O contraste entre as superfícies desses dois tipos de células está subjacente ao clássico mecanismo de PAMs: a superfície carregada negativamente das bactérias atrai os PAMs através de forças eletrostáticas, que é seguida pela inserção desses peptídeos em bicamadas lipídicas mediadas por porções hidrofóbicas, comprometendo irreversivelmente as funções da membrana. Embora represente um mecanismo clássico de morte microbiana, outros mecanismos de ação, incluindo atividade em alvos intracelulares, também foram propostos. Nesse último caso, os PAMs são translocados através da membrana microbiana e atuam em alvos específicos, promovendo a inibição de processos metabólicos essenciais, como produção da parede celular ou síntese de proteínas e ácidos nucleicos (AISENBREY et al., 2019).

Apesar do seu perfil estrutural marcadamente diferente em comparação com as crustinas dos Tipos I a III, as proteínas semelhantes ao inibidor da proteinase leucocitária secretora (SLPI), foram incluídas como um quarto grupo de crustinas e designadas como Tipo IV (também conhecidas como proteínas contendo domínio

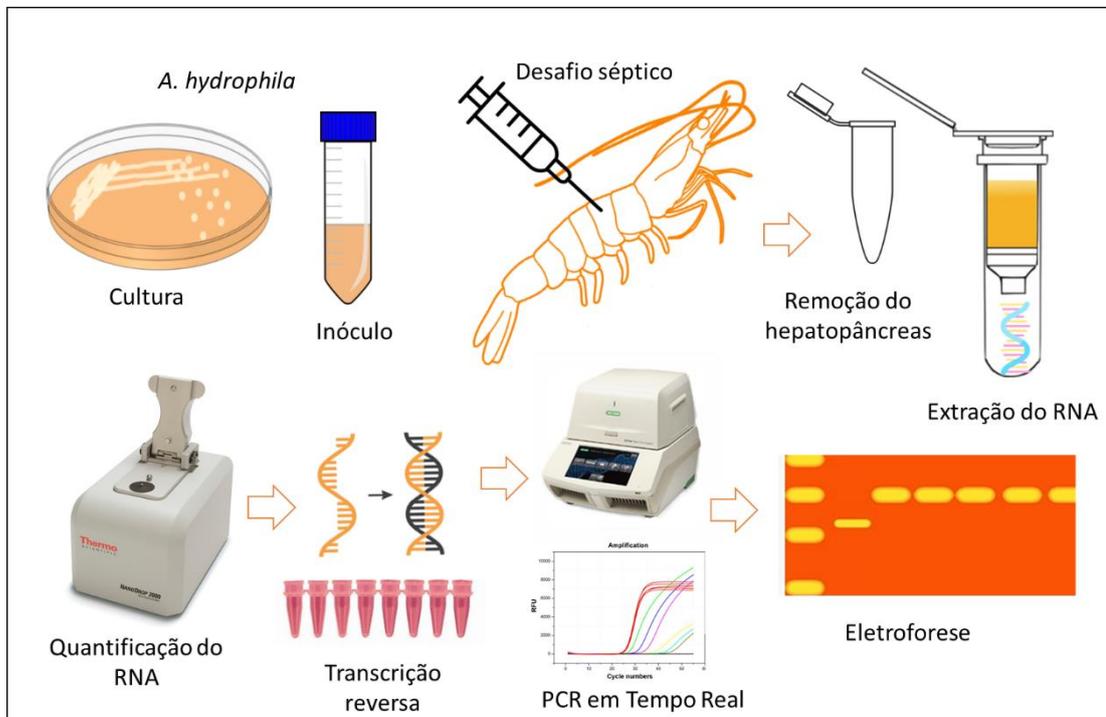
duplo WAP ou DWD). Finalmente, Tassanakajon e colaboradores (2015) adaptaram o sistema de classificação incluindo um quinto grupo, Tipo V. As crustinas do Tipo V foram identificadas em formigas (insetos himenópteros) e exibiram uma arquitetura molecular semelhante à das crustinas do Tipo I, diferindo devido à presença de um domínio estrutural rico em resíduos aromáticos antes do domínio rico em cisteína. Até o momento, este é o único grupo de crustáceos encontrado fora do Subfilo Crustácea. O papel das crustinas como efetores imunológicos não representa somente suas propriedades antimicrobianas. As crustinas, como acontece na maioria dos crustáceos, podem ser expressas e armazenadas em hemócitos circulantes (células especializadas na resposta imune) (SMITH et al., 2008).

Quanto à expressão de crustinas após desafio bacteriano, é bem conhecido que pode ocorrer após infecção com diferentes tipos de microrganismos, incluindo bactérias Gram positivas e Gram negativas. Em relação ao local de expressão das crustinas em crustáceos, embora alguns autores defendam uma inquestionável origem hemocítica, transcritos de crustina também foram encontrados em vários outros tecidos/órgãos (por exemplo, brânquias, intestinos, hepatopâncreas, órgãos hematopoiéticos e gônadas) de animais desafiados e não desafiados, sugerindo que os genes da crustina podem ser constitutivamente expressos em uma ampla gama de tecidos (BARRETO et al., 2022).

### **3 METODOLOGIA**

As etapas do procedimento experimental estão ilustradas na Figura 2.

FIGURA 2 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS ETAPAS DO EXPERIMENTO



Fonte: As Autoras (2023).

### 3.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO PROJETO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

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

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente randômico, composto por três repetições por tratamento. Os tratamentos foram submetidos em triplicata para os tempos 0, 12 e 24 horas, onde (C) é o controle séptico sem desafio da *A. hydrophila*: C.T0(1), C.T0(2), C.T0(3), C.T12(1), C.T12(2), C.T12(3), C.T24(1), C.T24(2), C.T24(3). Já o experimental (E) foi desafiado com *A. hydrophila*: E.T0(1), E.T0(2), E.T0(3), E.T12(1), E.T12(2), E.T12(3), E.T24(1), E.T24(2), E.T24(3), considerando tempo (T) e triplicata (1, 2, 3). Cada tratamento permaneceu acondicionado e distribuído em baldes com capacidade de 20 litros. Nos baldes foram

colocados em média 2,5 litros de água proveniente do Criação e para cada balde a aeração fornecida foi forçada por meio de oxigenadores.

Os animais permaneceram de forma individualizada acondicionados em cada balde durante o experimento. A qualidade da água foi monitorada no Criação e no momento das coletas foram realizados controle da temperatura por meio de termômetro e de pH através do equipamento de pHmetro de bancada. Os animais foram alimentados com ração comercial uma vez ao dia. O peso de todos os animais e o peso dos hepatopâncreas foram obtidos no momento das coletas.

### 3.2 DESAFIO SÉPTICO

Os exemplares de camarão da espécie *L. vannamei* utilizados nos experimentos foram capturados de sistemas de criação 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 é proveniente de projetos anteriores realizados pela nossa equipe. A bactéria foi reativada em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), a partir de estoque armazenado no mesmo meio de criação contendo 15% de glicerol, a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após a observação do crescimento bacteriano, colônias isoladas foram obtidas em ágar PCA (Plate Counting Ágar) e Ágar Cetrimide, meio de cultura seletivo para bactérias do gênero *Pseudomonas*, mas que permite o crescimento de *A. hydrophila*.

Para o preparo do inóculo, colônias isoladas em PCA foram ressuspensas em solução salina (NaCl 0,90%). A concentração bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 625 nm, para a densidade óptica entre 0,08 e 0,1 (correspondente a aproximadamente  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL) no momento da aplicação nos animais desafiados.

Após a aclimação dos animais nos baldes, foi injetado intraperitonealmente 10  $\mu\text{L}$  da solução contendo o inóculo ajustado em cada animal desafiado (experimental) e 10  $\mu\text{L}$  de solução salina (NaCl 0,90%) nos animais do grupo controle (não desafiados), de forma que todos os grupos estiveram sujeitos a condições de manipulação e estresse semelhantes. Após a injeção, a primeira coleta foi realizada (tempo 0 horas) e as demais foram realizadas nos tempos previstos do experimento (12 e 24 horas).

O peso dos animais foi obtido antes da retirada do hepatopâncreas, além disso, a temperatura e o pH de cada balde foram aferidas. Os hepatopâncreas foram extraídos, pesados, armazenados em microtubos de 1,5 mL e mantidos em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o momento da extração do RNA total.

### 3.3 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DO HEPATOPÂNCREAS

O RNA total foi extraído dos hepatopâncreas utilizando o *kit* de extração *SV Total RNA Isolation* (Promega®) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do RNA foi observada através de eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TBE 1x (Tris-base 90 mM; Ácido bórico 90 mM; EDTA 2mM pH 8,0) corado com Safer (Kasvi). Após a corrida eletroforética, o gel foi fotodocumentado utilizando o equipamento Loccus Biotecnologia L.PIX. A concentração e pureza do RNA extraído foram determinadas através da leitura de absorbância em espectrofotômetro (NanoDrop® 2000 - Thermo Scientific).

### 3.4 SÍNTESE DO cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total extraído utilizando 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 100 ng de RNA, para todas as amostras testadas.

Para a reação de síntese do cDNA, foram adicionados em microtubos com capacidade de 200  $\mu\text{L}$ , um total de 4  $\mu\text{L}$  de RNA, 0,5  $\mu\text{g}$  de *primers* randômicos. A mistura foi incubada 5 minutos a  $70^{\circ}\text{C}$  em termociclador (*Applied Biosystems*, modelo 2720), para eliminar *self annealing* do RNA, e na sequência, mantido por 5 minutos em banho de gelo. A partir dos 5  $\mu\text{L}$  dessa reação, foram adicionados 15  $\mu\text{L}$  do mix contendo (4  $\mu\text{L}$  do tampão 5x, 1,2  $\mu\text{L}$  mM  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 1,0  $\mu\text{L}$  dNTP Mix, 0,5  $\mu\text{L}$  inibidor de RNAase, 1,0  $\mu\text{L}$  da enzima *GoScript™ Reverse Transcriptase* e água livre de nucleases para completar 15  $\mu\text{L}$ , totalizando uma reação final de 20  $\mu\text{L}$ . A reação foi realizada em termociclador usando o seguinte programa: 5 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$  e 60 minutos a  $42^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5 ESCOLHA DOS INICIADORES

Foram utilizados *primers* específicos para a análise da expressão gênica da Crustina, tipo III-4, que apresenta um alto valor de expressão em trato digestório de crustáceos, demonstrados na Tabela 1, sendo o gene 18S como o gene de referência (LI et al., 2020).

TABELA 1 - INICIADORES UTILIZADOS NA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL

<i>Forward primer (5'-3')</i>	<i>Reverse primer (5'-3')</i>	Gene	Amplicon (pb)	Ta °C
GGAAATCCAGTCCGGCACTCT	AAGCAGCGGTCCCAGCAA	Crustina	128 pb	56°C
TATACGCTAGTGGAGCTGGAA	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT	18 S	147 pb	56°C

FONTE: As autoras (2023).

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

O cDNA sintetizado foi amplificado por PCR convencional, realizada em um volume final de 20 µL contendo no mix de reação: 0,8 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,25 µL de mix de dNTP (40 mM), 1,25 µL dos iniciadores *primers* senso (*forward*) e antissenso (*reverse*) a 10 µM, 4µL de tampão de reação 5x, 1U da enzima *Taq* DNA Polimerase (GoTaq G2 - Promega®) (5U/ul), água ultrapura para completar a reação e 2 µL de cDNA. As reações de PCR foram realizadas em termociclador 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 56°C, tanto para o gene Crustina quanto para o gene 18S, 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 3% em tampão TAE 1x (Tris-Base 40 mM, Ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM pH 8,0), corados com brometo de etídeo (0,1µg/mL) e os *amplicons* foram comparados com padrão molecular de 100pb (Ludwig Biotecnologia). Após a corrida eletroforética, o gel foi fotodocumentado.

### 3.7 PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

A partir do cDNA sintetizado, foi amplificado por PCR em tempo real (qPCR) utilizando o *kit GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega®), em triplicata. Um total de 4µL do cDNA, diluído aproximadamente 1:1 em água ultrapura, foi misturado com 10µL de *GoTaq® qPCR Master Mix*, 1 µM de cada um dos oligonucleotídeos (*primers*) *forward* e *reverse* para cada gene e água livre de nucleases para completar 20 µL. A reação foi realizada em termociclador para PCR em tempo real CFX96™ (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 56°C por 30 segundos e extensão de 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 SCHMITTGEB, 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.

Através dos resultados de expressão gênica 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 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PARÂMETROS DA ÁGUA E DADOS MORFOMÉTRICOS DOS CAMARÕES

Os dados resultantes do experimento, incluindo informações sobre a água de Criação, temperatura, pH, os pesos médios dos camarões e hepatopâncreas estão descritos na Tabela 2.

Comparando esses dados com os resultados obtidos em um experimento prévio realizado pela nossa equipe, com o camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* (BORDIGNON, 2023), verificamos que os valores de pH e temperatura estão muito próximos. Entretanto segundo a literatura o pH ótimo para a criação de

camarão *P.vannamei* seria entre 7,0 a 8,5 (BOYD, 2001). Já o peso do hepatopâncreas foi consideravelmente menor, em comparação com os dados obtidos pela autora (variando de 1,1 a 1,7g).

O peso observado nesse trabalho do camarão *L. vannamei* também foi menor (entre 6 e 7,6 g), comparando com os dados de *M. roosembergii* (16,8 a 24 g). Os animais foram monitorados durante todo o ensaio do desafio séptico. Cada balde continha um número maior de camarões, do que o necessário para as triplicatas, pois alguns camarões morreram durante o experimento e foram substituídos.

TABELA 2 - DADOS DA CRIAÇÃO E MORFOMETRIA DOS ANIMAIS UTILIZADOS

Tratamento	Temperatura da água de Criação	pH da água de Criação	Peso do hepatopâncreas (em gramas)	Peso do camarão (em gramas)
Controle – Tempo 0	21,9	6,3	0,3	6,7
Inoculado – Tempo 0	22,0	6,4	0,2	6,7
Controle – Tempo 12	21,9	6	0,3	6,0
Inoculado – Tempo 12	21,1	6,8	0,2	7,3
Controle – Tempo 24	21,5	7,3	0,3	7,3
Inoculado – Tempo 24	21	7,7	0,3	7,6

FONTE: As Autoras (2023)

#### 4.2 PERFIL DE EXPRESSÃO DO GENE DA *Crustina*, APÓS DESAFIO BACTERIANO

A quantidade de RNA total extraído das amostras variou entre 71,20 e 467,00 ng/ul. O cDNA foi sintetizado utilizando 100 ng do RNA e amplificado, por PCR convencional e PCR em Tempo Real, com os *primers* para *Crustina* e gene referência (18S). Para cada RNA total extraído dos 18 camarões (3 controle tempo 0 horas, 3 desafiados tempo 0 horas, 3 controle tempo 12 horas, 3 desafiados tempo 12 horas, 3 controle tempo 24 horas e 3 desafiados tempo 24 horas) foi realizada três reações de cDNA. As primeiras duas reações foram utilizadas para a realização da PCR

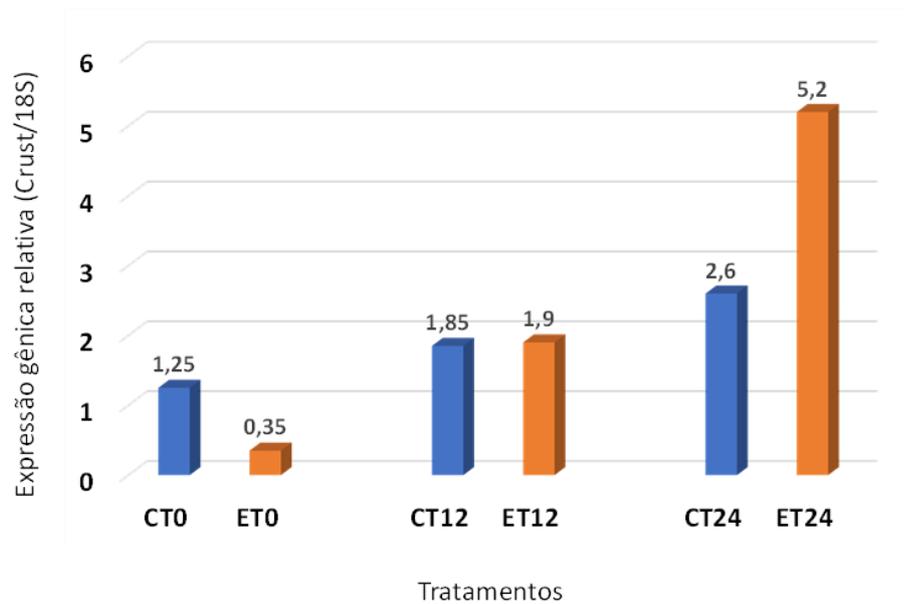
convencional e visualização através de eletroforese em gel de agarose, para padronização das condições de PCR. O terceiro cDNA produzido foi amplificado através de PCR em Tempo Real, em triplicata, totalizando 54 reações para os *primers* da Crustina e 54 reações para o gene referência (18S).

Dessas, algumas amostras da triplicata foram negativas para amplificação, sendo desconsideradas no estudo. Após a obtenção dos valores de Ct (cycle threshold) pelo equipamento, foi obtida uma média entre as triplicatas das reações e entre as triplicatas dos ensaios. O Ct 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.

Os valores de Ct foram utilizados para o cálculo de delta delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ), que corresponde à diferença entre o delta Ct da amostra e o delta Ct do controle e por fim, os valores foram utilizados para o 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, e na sequência comparado ao grupo controle (LIVAKA e SCHMITTGENB, 2001). Os valores foram plotados em um gráfico, para cada amostra experimental, e mostram o quanto um gene foi mais ou menos expresso em relação ao controle.

Os resultados da expressão gênica diferencial da Crustina, nas condições experimentais analisadas, estão representados na Figura 3. Observou-se que a máxima expressão ocorreu após 24 horas de exposição à *A. hydrophila*, resultando em um aumento de 2x em comparação com o controle (camarões não desafiados) no mesmo período. Não houve diferença significativa na expressão da Crustina entre animais desafiados e não desafiados após 12 horas de exposição. 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*.

FIGURA 3 - EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE Crustina EM *P. vannamei*



LEGENDA: Expressão gênica da Crustina, em *L. vannamei*, após injeção com *A. hydrophila* por 0, 12 e 24 horas, respectivamente. C: Controle: camarões não inoculados. E: Experimental: camarões inoculados com a bactéria. FONTE: As autoras (2023).

Em um trabalho recente desenvolvido pela nossa equipe foi observado que em hepatopâncreas de *M. rosenbergii* desafiado com *A. hydrophila* 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. Funcionalmente, as crustinas representam diversas moléculas exibindo múltiplas funções biológicas. Estudos *in vitro* utilizando uma forma recombinante de Crustinas demonstraram que essas moléculas são principalmente ativas contra bactérias Gram positivas e, em menor grau, contra bactérias Gram negativas e leveduras (MATOS e ROSA, 2022). *A. hydrophila* é uma bactéria Gram negativa.

Neste trabalho, após uma intensa revisão de literatura, optou-se por analisar a expressão de uma Crustina do tipo III-4, que apresentou, em um estudo realizado por LI e colaboradores (2020) uma maior expressão no hepatopâncreas de *L. vannamei*, comparando com outros órgãos como epiderme, estômago, guelra,

intestino, hemócitos, órgão linfático, dentre outros. Além disso, estudos recentes demonstraram que Crustinas do tipo III, expressas por expressão heteróloga, apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (revisão em BARRETO et al., 2022). Foi observado também que Crustinas dos tipos III e IV apresentam atividade como inibidoras de proteases, função que parece estar associada com o domínio WAP, da sua estrutura. Proteases microbianas podem atuar como um mecanismo de defesa da própria bactéria. O potencial de inibir proteases bacterianas pelo PAMs impede com que os microrganismos inibam a ação antimicrobiana dos PAMs (ZASLOFF e MATSUZAKI, 2019).

Du et al. (2015), reportaram que uma Crustina recombinante Tipo III rLvSWD de *L. vannamei* mostrou atividades anti proteolíticas sobre proteases bacterianas e propriedades aderentes em bactérias Gram positivas e Bactérias Gram negativas. Por outro lado, crustinas do tipo III do camarão *Marsupenaeus japonicus* e *Procambarus clarkii*, uma espécie de lagostin, demonstraram apresentar apenas efeitos anti proteolíticos, sendo desprovido de ação antimicrobiana (DU et al., 2009 e DU et al., 2010).

Uma das vantagens dos PAMs é sua atuação no nível de membrana das células microbianas, pois é mais difícil para os microrganismos adquirirem resistência a essas moléculas, pois uma reorganização, através de mutações, da estrutura da membrana celular é bem mais complicada.

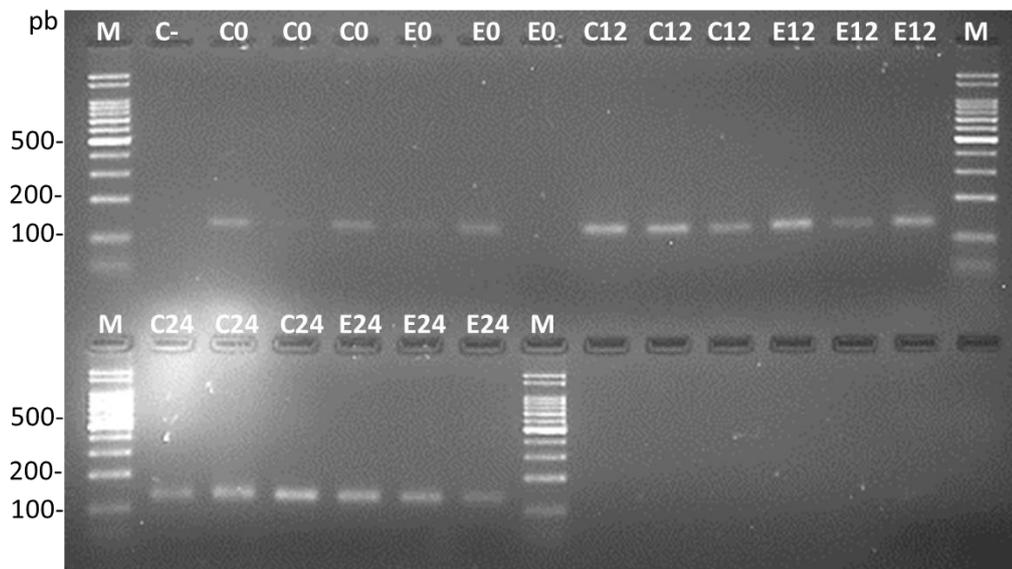
Crustinas e peptídeos semelhantes (crustin like) podem ser encontrados em várias espécies de camarões (TASSANAKAJON et al., 2018). No camarão de água doce *M. rosenbergii*, a expressão de Crustina do tipo I foi verificada após desafio com os vírus (IHHNV e WSSV) e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (AROCKIARAJ et al., 2013; TASSANAKAJON et al., 2018). Rao e colaboradores (2016), observaram, através de análise transcriptômica, uma diminuição da expressão de Crustinas após desafio com o vírus da mancha branca. 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.

Li e colaboradores (2020), observaram, através de análise de expressão gênica, um nível de expressão relativamente alto de diversos tipos de Crustina em tecidos alvo de *L. vannamei*. Após essa observação, os autores realizaram o desafio séptico dos camarões com a bactéria *Vibrio parahaemolyticus* e o vírus WSSV. Após o desafio, houve uma expressão aumentada em diferentes momentos, principalmente após 3, 12 e 24 horas de contato com os microrganismos e exibiram tendências semelhantes em camarões após infecção por *V. parahaemolyticus* e o vírus, exceto

para o gene *Ib-1*, que teve a expressão gênica diminuída após infecção com *V. parahaemolyticus* e aumentada, após infecção com o WSSV

Para confirmar a amplificação específica do cDNA para Crustina, os produtos de amplificação da PCR em Tempo Real foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 3% (FIGURA 4). Foi possível observar a presença de uma única banda, de 128 pb. A PCR em Tempo Real foi realizada em triplicata, para cada amostra. No entanto, foram adicionadas no gel apenas as amostras com valores positivos na amplificação.

FIGURA 4 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 3% DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE RT-qPCR DO GENE DA Crustina



LEGENDA: C-: Triplicatas dos produtos de amplificação da crustina (128 pb): C0 (Controle tempo 0 horas), C12 (Controle tempo 12 horas), C24 (Controle tempo 24 horas), E0 (Inoculado tempo 0 horas), E12 (Inoculado tempo 12 horas), E24 (Inoculado tempo 24 horas). M: Padrão de peso molecular de 100 pb. FONTE: As Autoras (2023).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base nos argumentos apresentados, este estudo foi conduzido com o objetivo de analisar a expressão gênica do peptídeo antimicrobiano Crustina, no hepatopâncreas de *P.vannamei*. Foram considerados animais submetidos e não

submetidos ao desafio por *A. hydrophila*, em diferentes períodos de contato do camarão com a bactéria.

As técnicas empregadas neste trabalho foram apropriadas e conseguiram evidenciar que o hepatopâncreas foi capaz de expressar a Crustina, regulando a expressão gênica em diferentes momentos avaliados nos animais desafiados. A expressão máxima ocorreu após o período de 24 horas de exposição *A. hydrophila*, com um aumento de 2x em comparação com o controle de 24 horas (camarão não desafiado). Enquanto para o controle e desafiado após 12 horas não houve diferença significativa entre eles.

Portanto, o gene Crustina permaneceu ativo com alto valor de expressão quando os tratamentos controle 12 e 24 horas (não desafiado com a bactéria) foram submetidos. Ou seja, é um indicativo que a Crustina que está presente em *P. vannamei* pode não ser ativo contra *A. hydrophila*.

Como perspectivas futuras, pretende-se em trabalhos posteriores testar diferentes tipos do gene da Crustina, visto que existem 34 genes codificadores do tipo Crustina em *P. vannamei*. Avaliar também outros tipos de tecido, como a hemolinfa do camarão e testar outras espécies de microrganismos em condições ambientais diferentes.

## REFERÊNCIAS

AISENBREY, C., et.al. The mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides refined by novel concepts from biophysical investigations (Ed.). **Antimicrobial Peptides Basics for Clinical Application**, v. 1117, p. 33–64, 2019.

ALEXANDRE, D., et al. Spatial distribution of digestive proteinases in the midgut of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) indicates the existence of endo-ectoperitrophic circulation in Crustacea. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, v. 172-173, p. 90–5, 2014.

AMPARYUP, P., et al. Molecular cloning genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Molecular Immunology**, v. 45. n. 4, 2008.  
*Antimicrobial Peptides Basics for Clinical Application*, v.1117, p. 9–16, 2019.

BACHÈRE, E. Shrimp immunity and disease control. **Aquaculture**, v.191, p. 3-11, 2000.

BARRETO, C.; MATOS, G. M.; ROSA, R. D. On the wave of the crustin antimicrobial peptide family: From sequence diversity to function. **Fish Shellfish Immunol Reports**. p.7-3, 2007.

BARTLETT, T. C. B. J. et.al. Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*, **Marine Biotechnology**, v. 4, n. 3, p .278–293, 2002.

BRASIL. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas – SEBRAE. **Aquicultura e pesca: camarões**. Relatório Completo. Estudo de Mercado SEBRAE/ESPM, p. 1-136, 2008.

BOYD. C. E. Composição da água e manejo do viveiro de camarão. **Revista ABCC**. n. 1 p. 17-19, 2001.

BULET, P., et.al. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **Journal Biological Chemistry**, v. 272, n. 45, 1997.

CECCALDI, H. J. Anatomy and physiology of the digestive system. Crustacean Nutrition. **Baton Rouge: World Aquaculture Society**, p. 261–291, 1997.

CRUVINEL, W. DE M.; MESQUITA, J. D.; ARAÚJO, J. A. P., et al. Immune system – Part I: Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Brazil Journal of Rheumatol**, v. 50, n. 4, p. 434–447, 2010.

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

DESTOUMIEX, D., et.al .Penaeids, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **Journal Biological Chemistry**, v. 272, n. 45, 1997.

DESTOUMIEX-GARZÓN, et.al. Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease. **Philosophical Transactions of The Royal Society B**, v. 371, 2016.

DESTOUMIEX-GARZON, et.al.Crustacean immunity. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. **Journal Biological Chemistry**, v. 276, n. 50, 2001.

DU, Z. Q., et.al. A double WAP domain (DWD)-containing protein with proteinase inhibitory activity in Chinese white shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Comparative Biochemistry Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology**. v. 154, n. 2, 2009.

DU, Z. Q., et.al. A single WAP domain (SWD)-containing protein with antipathogenic relevance in red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, **Fish Shellfish Immunol**. v. 28, n. 1 p. 134–142, 2010.

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 and Comparative Immunology**, v. 25, n. 7, p. 565–577, 2001.

HENDGES, F. B. **EXPRESSÃO GÊNICA DE PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO DO HEPATOPÂNCREAS DE CAMARÃO *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) POR RT-PCR SEMI-QUANTITATIVA DESAFIADO COM *Aeromonas hydrophila***. 2021. 43 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2021.

HUYNH, TRUONG-GIANG et al. White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing *Sargassum hemiphyllum* var. *chinense* powder and its extract showed increased immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. **Fish & Shellfish Immunology**, p. 286-293, 2011.

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. 1, n. 4, p.2 46–259, 2008.

JIMÉNEZ-VEGA, F., et.al. A single WAP domain-containing protein from *Litopenaeus vannamei* hemocytes, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 314, n. 3 p. 681–687, 2004.

KLAUDATUS, S. Observations on the growth of juveniles of *Penaeus kerathurus* (Forsk.) at different stocking densities and varying ecological conditions. **Studies and Reviews**, v. 57, p. 93-100, 1980

LE MOULLAC, G.; HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. **Aquaculture**, v. 191, p. 121-131, 2000.

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, S., et.al. Molecular and Functional Diversity of Crustin-Like Genes in the Shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Marine Drugs**, v. 7, n. 361, p. 13-18, 2020.

MACHADO, P R L., et al. Mecanismos de resposta imune às infecções Immune response mechanisms to infections. **An bras Dermatol**. p. 647-664, 204

MATOS, G. M.; ROSA, R. D. On the silver jubilee of crustacean antimicrobial peptides. **Reviews in Aquaculture**, v. 14, p. 594–612, 2022.

MATSUZAKI, K.; KATSUMI, M. Membrane permeabilization mechanisms: **Memoires Muséum National d'Histoire Naturelle**, p. 233, 1997.

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.

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.

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

PEIXOTO, L. J. S., et al. *Aeromonas* spp.: fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 3, p. 453-461, 2012.

PÉREZ FARFANTE, I.; KENSLEY, B. Penaeoid and Segestoid Shrimps and Perspective. **Antimicrobial Peptides Basics for Clinical Application**, v. 1117, p. 3–6, 2019.

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.

RELF, J. M.; CHISHOLM, J. R.; KEMP, G. D.; SMITH, V. J. Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5- kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, p. 350–357, 1999.

ROCH, P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. **Aquaculture**, v. 172, p. 125-145, 1999.

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

SALIM, J. Panorama da carcinicultura potiguar: sua importância e perspectivas de crescimento. **Revista Panorama da Aquicultura**, v. 12, n. 69, p. 38-40, 2002.

SILVEIRA, A. S. **AVALIAÇÃO DO PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA IMUNIDADE INTESTINAL DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei***. 2016. 96 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

SMITH, V. J.; FERNANDES, J. M. O.; KEMP, G. D.; HAUTON, C. Crustins: Enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. **Developmental e Comparative Immunology**, v.32, p. 758–772, 2008.

SOMBOONWIWAT, K., et al. Recombinant expression and anti-microbial activity of antilipoplysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Developmental e Comparative Immunology**, v. 29, n.10, p. 841–51, 2005.

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

TASSANAKAJON, A., et al. Antimicrobial Peptides in Penaeid Shrimp. **Marine Biotechnology**, v.12, p. 487–505, 2010.

TASSANAKAJON, A.; SOMBOONWIWAT, K.; AMPARYUP, P. Sequence diversity and evolution of antimicrobial peptides in invertebrates. **Developmental e Comparative Immunology**, n. 48, p. 324–341, 2015.

WANG, Y.; ZHANG, J.; SUN, Y.; SUN, L. A Crustin from Hydrothermal Vent Shrimp: Antimicrobial Activity and Mechanism. **Marine Drugs**, v. 176, n. 3, p. 23-19, 2021.

ZASLOF, M.; MATSUZAKI, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms: my