

ANANICE BONA

**PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO POLICLONAL CONTRA A PROTEÍNA VIRAL
RECOMBINANTE VP28 PARA IMUNODETECÇÃO DO VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA
BRANCA (WSSV)**

Orientadora: Prof.^a Dra. Luciane Maria Perazzolo

Co-orientadora: MSc. Cristhiane Guertler

Florianópolis, Julho de 2013.

BONA, A.

Produção de um anticorpo policlonal contra a proteína viral recombinante VP28 para imunodeteção do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV).

Florianópolis, SC, 2013.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Aquicultura)
43p.

1. WSSV, *Litopenaeus vannamei*, proteína recombinante, anticorpo policlonal.

**PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO POLICLONAL CONTRA A PROTEÍNA VIRAL
RECOMBINANTE VP28 PARA IMUNODETECÇÃO DO VÍRUS DA SÍNDROME DA
MANCHA BRANCA (WSSV)**

Prof.^a Dra Luciane Maria Perazzolo

Coordenadora do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura

Banca Examinadora:

MSc. Cristhiane Guertler

Universidade Federal de Santa Catarina

MSc. Talita da Silva Jeremias

Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que diretamente ou indiretamente colaboraram para que o esforço de todos esses anos fosse concluído. Especialmente gostaria de agradecer:

A minha orientadora Luciane Perazzolo, sou muito grata pela oportunidade da conclusão de um trabalho importante para a ciência e a Aquicultura, pela orientação e também pelo conhecimento adquirido em todos esses anos de convivência. Te desejo muitas felicidades!

A minha orientadora Cristhiane, que além de me orientar, se tornou uma grande amiga. Fico muito feliz por ter convivido contigo durante todos esses anos, aprendi muito ao seu lado, sentirei saudades. Desejo um caminho cheio de alegrias e realizações. Sucesso amiga!

A professora Margherita Barraco, pelo conhecimento, oportunidade de conviver, simpáticas conversas sobre o laboratório e o mundo. Sempre conhecendo um pouco mais da ciência contigo.

Ao Dr. Claudio Humberto Mejía-Ruí, por ter cedido gentilmente a proteína utilizada em nosso trabalho, sem ela esse trabalho não teria nem começado. Muito grata.

Ao professor Aguinaldo Roberto Pinto que colaborou prestativamente nas imunizações dos camundongos, mostrando amor ao trabalho e a ciência, e também disponibilizou as dependências do seu laboratório para alguns testes.

A querida Mariana Borsa, que tive o grande prazer de conhecer no decorrer deste trabalho. Sempre esteve disposta a me ajudar, com muita dedicação e capricho. Te desejo muito sucesso Nana, você é uma grande pessoa.

A professora Talita da Silva Medeiros, por sua paciência em me ensinar tudo sobre imunohistoquímica. Mesmo sua área não sendo a de camarões, mostrou-se sempre dedicada e prestativa para conhecer e me ajudar. Agradeço muito Talita.

A todos os integrantes do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (os que estão hoje presentes e também todos que já passaram), posso dizer com plena certeza que todos me ensinaram algo em relação à vida e à ciência.

Aos meus grandes amigos, Engenheiros de Aquicultura, Bárbara, Gi, Amábile (agradeço minhas amigas pelo convívio diário, feliz e cheio de novidades), Mari (colega, amiga e companheira), Jenny (querida, companheira e aventureira, uma amiga que como eu, está a procura de aventuras pelo

mundo, saudade!), Linoquinha (amiga querida, agradeço pelas infinitas risadas), aos queridos meninos, Chicão, Doug, Marcinho, Evandro, Ique, Gringo, George, Tim, teacher Jerko, e todos os meus amigos, colegas e “cacos” da faculdade. Realmente foi um momento muito feliz da minha vida.

A todos os meus amigos (novos e antigos) que tanto me fazem feliz e deixam o meu dia melhor (não tenho como escrever o nome de todos, quem me conhece sabe... minha memória não ajuda). Só tenho a agradecer e quero todos ao meu lado até o fim da vida. Amo vocês!

A toda minha família, aos meus avós, tios, primos, especialmente meus pais, Marcia e Julio, fundamentais na minha vida, obrigada pelo amor e apoio. Mãe e vó Ana, sem vocês eu não seria nada, sou muito grata pelo amor e dedicação diária por mim e pela vida. Família sem vocês nada seria possível, e meus sonhos futuros, difíceis de concretizar.

Ao meu amor, meu amigo, que deixa meus dias mais coloridos, quero agradecer pelo companheirismo, carinho, alegria e tudo que contempla nosso amor. Espero caminhar todos os dias ao seu lado. Te amo Gui!

RESUMO

A carcinicultura mundial vem enfrentando sérios problemas de ordem sanitária, especialmente de origem viral, sendo a principal virose a síndrome da mancha branca. Diagnosticar precocemente camarões infectados por vírus, especialmente o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), é essencial para que medidas de contenção sejam rapidamente tomadas a fim de limitar/bloquear a dispersão do patógeno. Além disso, análises sobre patologias em crustáceos necessitam detectar o WSSV a nível tecidual, sendo necessário o uso de anticorpos específicos. Anticorpos comerciais são geralmente onerosos e, em vista disso, a produção *in loco* de anticorpos pode ser uma alternativa interessante e econômica. No presente estudo um anticorpo policlonal para detectar o WSSV em camarões *Litopenaeus vannamei* foi produzido a partir de injeções em camundongos (n=5), com solução contendo a proteína recombinante VP28 (VP28r), proteína esta presente no envelope do WSSV. Os camundongos foram imunizados com 5 doses de VP28r: 2 doses subcutâneas (10 µg), 2 doses via intraperitoneal (20 µg) e 1 dose final via intraperitoneal (33 µg), cada uma com intervalos de 10 dias cada. A primeira imunização foi suplementada com Adjuvante Completo de Freund e a segunda com Adjuvante Incompleto de Freund. A titulação de anticorpos anti-VP28r foi verificada através do teste de ELISA indireto. Para as análises de especificidade do anticorpo produzido, camarões *L. vannamei* (10-12g) foram desafiados com diferentes concentrações de WSSV (inóculos diluídos a 10^{-1} , 10^{-5} , 10^{-8}), sendo, contudo apenas o hepatopâncreas e tecidos adjacentes dos camarões injetados com a maior carga viral (10^{-1}) utilizados para análises de histologia e imunohistoquímica. Através da histologia, foi comprovado que o tecido do camarão contaminado estava com sinais degenerativos possivelmente associados à infecção viral. Contudo, nas análises de imunohistoquímica, nenhuma reatividade foi encontrada entre o anti-soro VP28r (1/10 e 1/200) e o tecido de camarões infectados, indicando uma baixa especificidade dos anticorpos policlonais produzidos. Em vista disto, novos ensaios devem ser realizados visando a produção de anticorpos mais específicos, no caso monoclonais, a partir de uma nova fonte de proteína recombinante VP28 produzida.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, WSSV, anti-VP28 recombinante, imunohistoquímica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sala de ensaios bioquímicos do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura.

Figura 2: Espécime de camarão *Litopenaeus vannamei*.

Figura 3: (a) Morfologia do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). (b) Microscopia eletrônica do vírus WSSV em destaque, as setas pretas, indicam o apêndice caudal (tamanho= 250 nm).

Figura 4: Espécime *Litopenaeus vannamei* apresentando manchas brancas no exoesqueleto provenientes da infecção por WSSV.

Figura 5: Modelo tridimensional do complexo de proteína da membrana e do nucleocapsídeo de WSSV. (A) Detalhe do envelope viral com as localizações das proteínas do WSSV e das interações dos complexos entre VP19, VP24, VP26, VP28, VP37, VP38A, VP51A, VP51C e WSV010. As hélices transmembranares são apresentadas como cilindros. Também é mostrado a oligomerização de VP19, VP24, VP51A (dímeros), VP26 e VP28 (trímeros). (B) Micrografia eletrônica-contraste negativo. (a) Vírus intacto e (b) Nucleocapsídeo viral. O tamanho de ambos são de 100 nm. (C) Nucleocapsídeo. Cada forma globular possui 12 nm de diâmetro, e corresponde a uma única molécula de VP664. Dímeros ou trímeros de VP664 (delineado em branco) estão organizados nos anéis empilhados que podem ser vistos em microscopia eletrônica. Fonte: CHANG et al., 2010.

Figura 6: Esquema representativo e simplificado de uma reação entre antígeno-anticorpo primário-anticorposecundário. O anticorpo primário reconhece e se liga ao antígeno do tecido sendo analisado, sendo posteriormente reconhecido pelo anticorpo secundário conjugado à avidina-biotina.

Figura 7: Porcentagem da mortalidade cumulativa dos animais em cada tratamento durante 12 dias.

Figura 8: Eletroforese em gel de agarose (1%) representando os produtos amplificados por nested-PCR, com amostras de DNA genômico de animais infectados com WSSV nas diluições de 10^{-5} , 10^{-1} , 10^{-8} . A análise foi feita utilizando-se iniciadores preconizados pela OIE (fragmento de 941 pb). **M:** marcador de peso molecular.

Figura 9: Exemplo de ELISA para avaliar a reatividade do anticorpo-antígeno em microplacas. (1) Controle negativo (CN), (2) Soro imune camundongos S1, (3) Soro imune camundongos S2, teste realizado em duplicatas. As diluições na microplaca são de 200 a 409.600. Observa-se que a coloração da solução mostra-se reativa até a diluição 12.800.

Figura 10: Titulação de anticorpos anti-VP28 em camundongos imunizados, através da técnica de ELISA. Controle negativo (CN): soro de camundongo não-imunizado; Camundongos (S1 e S2): soros de camundongos imunizados com VP28r.

Figura 11: Análise de Histologia. Cortes histológicos do hepatopâncreas de camarão controle em microscopia de luz (A e B) e cortes do hepatopâncreas de um camarão contaminado com o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) (C e D).

Figura 12: Análise de Imunohistoquímica. Corte histológico com contra-coloração do hepatopâncreas de um camarão contaminado pelo Vírus da Síndrome da Mancha Branca, incubado com o anticorpo comercial VP664 (1/10) (A, B), indicando presença do WSSV no tecido. Corte controle com tampão PBS (C), ou soro imune anti-VP28r (D).

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS - 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico)
ACF – Adjuvante Completo de Freund
AIF - Adjuvante Incompleto de Freund
BSA – Soro albumina bovina
C₂H₆O – Etanol
C₂H₄O₂ - Ácido etanóico
DAB - Diaminobenzidina
DMSO – Dimetilsulfoxido
DNA - Ácido desoxirribonucléico
dsRNA – RNA dupla fita
ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
g – grama(s)
h – hora (s)
HE - Hematoxilina-Eosina
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
Ig – Imunoglobulina(s)
IHHNV - Vírus da necrose infecciosa hipodermal e hematopoiética
IMNV – Vírus da mionecrose infecciosa
LPS – Lipopolissacarídeos
L – Litro(s)
OIE – Organização mundial para a saúde animal
M – Molar
NaCl – Cloreto de sódio
NaH₂PO₄ – Fosfato monossódico
Na₂PO₄ – Fosfato dissódico
mg – miligrama
min – minuto(s)
ml – mililitro(s)
mM – milimolar
ng – nanograma(s)
nm – nanômetros
PAM - Peptídeos antimicrobianos
PAMPs - Padrões moleculares expressos especificamente nos patógenos
PO – Enzima fenoloxidase
pb – Pares de bases
PBS – Solução tamponada de fosfato
PCR – Reação em cadeia da polimerase
proPO – pró-fenoloxidase
PRPs – Proteínas de reconhecimento padrão
p/v – porcentagem massa/volume
qPCR - PCR em Tempo Real
ROIs – Espécies reativas de oxigênio
RNI - Espécies reativas de nitrogênio
RNA - Ácido ribonucleico
RT-PCR – reação de transcrição reversa
s – segundo(s)
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida
t - toneladas
Tris – Hidroximetil aminometano
Triton - Etilenoglicoleter
TSV – Vírus da síndrome de Taura
Vp28r – Proteína recombinante vp28
YHV - Vírus da cabeça amarela
µg – micrograma
µl – microlitro
x g – força gravitacional
WSS – Síndrome da mancha branca
WSSV – Vírus da mancha branca
λ – lambda

DESCRIÇÃO DO LABORATÓRIO

O presente trabalho foi desenvolvido como parte do estágio no Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA) durante o período de julho de 2010 a maio de 2013. O LIAA (Fig.1) está localizado no Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG), no Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O LIAA foi criado em 1991 e atualmente é coordenado pela Prof. ^a Dra. Luciane Maria Perazzolo.

As linhas de pesquisa desenvolvidas no LIAA têm por objetivo principal conhecer o sistema imune de invertebrados, em especial de animais aquáticos de importância para Aquicultura, visando um maior sucesso dos cultivos através da prevenção e controle de infecções. Os principais objetivos específicos incluem: (1) a caracterização do sistema imune de diferentes espécies de interesse para Aquicultura, (2) a busca de marcadores hemato-imunológicos que reflitam as condições de saúde dos animais e que auxiliem no monitoramento das condições ambientais, (3) a busca de compostos imunostimulantes, (4) identificação de moléculas antimicrobianas e antivirais com potencial terapêutico em crustáceos e moluscos, (5) uma maior compreensão sobre a filogenia do sistema imune.



Figura 1. Sala de ensaios bioquímicos do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Panorama Atual da Carcinicultura.....	1
1.2	Síndrome da Mancha Branca.....	3
1.3	Considerações sobre o sistema imune dos crustáceos.....	5
1.4	Métodos de diagnósticos das viroses em camarões.....	6
2.	OBJETIVOS.....	10
2.1	Objetivo geral.....	10
2.2	Objetivos específicos.....	10
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1	Solubilização da proteína viral recombinante VP28.....	11
3.2	Imunização dos camundongos e obtenção do soro imune anti-vp28r.....	11
3.3	Teste de Reatividade e Titulação dos Anticorpos por ELISA.....	12
3.4	Preparo do inóculo com WSSV.....	12
3.5	Camarões e Desafio com o Vírus da Síndrome da Mancha Branca.....	13
3.6	Coleta de tecidos dos animais para análises moleculares e histológicas.....	13
3.7	Extração de DNA genômico e detecção do WSSV através da amplificação por PCR.....	14
3.8	Preparo das lâminas.....	14
3.9	Análises histológicas.....	15
3.10	Análises Imunohistoquímicas.....	15
4.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1	Mortalidade dos animais infectados com WSSV.....	17
4.2	Detecção do DNA viral (WSSV) nos tecidos dos animais por PCR.....	17
4.3	Titulação dos Anticorpos Policlonais produzidos por ELISA.....	18
4.4	Análises Histológicas.....	21
4.5	Análises de Imunohistoquímica.....	22
5.0	CONCLUSÃO.....	26
6.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

1.1. PANORAMA ATUAL DA CARCINICULTURA

A aquicultura tem se mostrado uma ótima alternativa para suprir a estagnação que, a pesca extrativista e a procura comercial da indústria alimentícia, vêm trazendo para o mercado atual. Desta forma, a produção de organismos em cativeiro tem aumentado significativamente em todo mundo. Enquanto a produção mundial de captura tem se mantido constante, a produção da aquicultura tem crescido exponencialmente nos últimos 50 anos, sendo atualmente o setor de produção animal com maior incremento na produção. A produção da aquicultura mundial de organismos aquáticos, incluindo peixes, crustáceos, moluscos e outros animais aquáticos destinados ao consumo, alcançaram cerca de 52,5 milhões de toneladas em 2008 (FAO, 2010).

Em 2006, dentre as 50 nações que atuaram na produção de camarões, os países asiáticos detiveram cerca de 90% desses produtos comercializados mundialmente, sendo a China a principal produtora (FAO, 2006). O Brasil obteve a sétima posição, com uma produção de 65 mil toneladas, exportando para diversos países como: França, Espanha, Japão, Holanda, Portugal e os Estados Unidos (LOPES; BALDI; CÁRDENAS, 2008).

Dados atuais mostram que, dentre as diversas atividades aquícolas a mais produtiva mundialmente é a carcinicultura marinha, ou seja, o cultivo em cativeiro de camarões marinhos. Esta atividade gerou a maior renda em relação a outros cultivos, como de salmão e carpa, sendo portanto considerada a mais importante *commodity* comercializada, e correspondendo a 15,4% da renda total gerada na produção de pescado (FAO, 2009). Atualmente as principais espécies de camarões marinhos cultivados são os peneídeos *Litopenaeus vannamei* (2.720.929t), *Penaeus monodon* (781.582t) e *Litopenaeus japonicus* (56.739t). Na carcinicultura, o camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, representa cerca de 95% da produção total na América Latina e 67% da produção mundial (FAO, 2008).

O cultivo de camarões marinhos teve sua origem no Sudeste Asiático, mas nos seus moldes atuais surgiu na década de 30 do século XX, quando cientistas japoneses iniciaram os seus trabalhos de larvicultura com a espécie *Marsupenaeus japonicus* (ROSEMBERRY, 1992).

No Brasil, a carcinicultura teve início durante a década de 80 com a introdução do peneídeo *Marsupenaeus japonicus* no Nordeste, mas ele não se adaptou às condições brasileiras (BARBIERI e OSTRENSKY, 2002). Seguiram-se então tentativas para a domesticação das espécies nativas *Litopenaeus schmitti* (OSTRENSKY, 1997) e *Farfantepenaeus paulensis* (WASIELESKY, 2000) nas regiões Sul e Sudeste, e *Farfantepenaeus subtilis* no Norte e Nordeste (TAVARES e SANTOS, 2006). No entanto, a baixa produtividade e lucratividade destas espécies levaram à desativação das fazendas. Na mesma época, a espécie *Litopenaeus vannamei* foi introduzida no país, primeiramente na região Nordeste e depois em Santa Catarina (1998) por pesquisadores da UFSC

(Universidade Federal de Santa Catarina) e EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Estado de Santa Catarina), com o intuito de viabilizar a atividade no Estado.

O *Litopenaeus vannamei* (Figura 2), também conhecido como camarão branco, possui uma ampla distribuição geográfica, apresentando excelentes características zootécnicas, como rusticidade no manejo, boa conversão alimentar, rápido crescimento, facilidades na reprodução em cativeiro, além de poder ser cultivado em águas oligohalinas crescendo em ambientes com salinidade variando de 0,5 a 40 de salinidade (NUNES, 2001). Além disso, em função de sua típica coloração esbranquiçada esta espécie apresenta uma alta aceitação no mercado mundial.

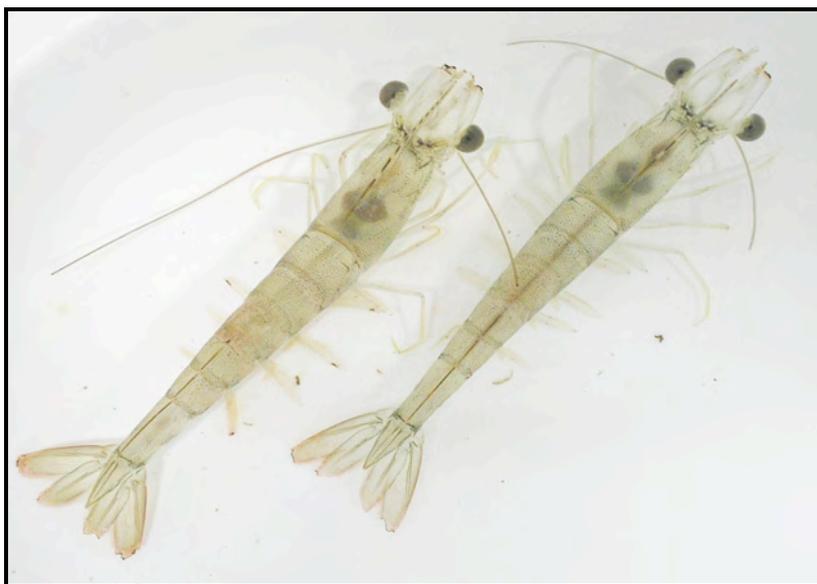


Figura 2: Espécime de camarão *Litopenaeus vannamei*.

Atualmente, a carcinicultura vem enfrentando sérios desafios em todo mundo, especialmente àqueles relacionados às enfermidades e à degradação ambiental. No entanto, a intensificação dos cultivos na maioria das vezes não leva em conta os aspectos ecológicos e fisiológicos dos animais (BACHÈRE, 2000), tendo como consequência o surgimento de enfermidades entre os animais e a degradação ambiental (BORGHETTI; OSTRENSKY; BORGHETTI, 2003). Sabe-se também que, fatores ambientais potencialmente estressores, como alterações nos parâmetros físico-químicos da água, a presença de metais pesados, pesticidas agrícolas e poluentes no ambiente, podem alterar o sistema imune dos camarões, debilitando-os e propiciando a instalação de doenças (LE MOULLAC e HAFFNER, 2000). Além disso, a água dos cultivos abriga naturalmente inúmeros micro-organismos potencialmente patogênicos, e, uma vez instalada a doença, a transmissão entre os animais é rapidamente veiculada (BOYD, 1979).

Os camarões podem ser alvos de ataques de parasitas, fungos, bactérias ou vírus, muitos destes são patógenos que podem causar sérias perdas econômicas aos cultivos. As principais enfermidades realmente ameaçadoras para a carcinicultura mundial são as viroses. Os vírus são os patógenos mais comumente encontrados na água do mar, estando presentes na quantidade de até 10

bilhões/L, sendo muitos deles capazes de infectar vários organismos (FUHRMAN, 1999). As principais viroses que podem causar enfermidades em crustáceos peneídeos cultivados são: o vírus da necrose infecciosa hipodermal e hematopoiética (IHHNV, do inglês *Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis*), com início nos anos 80 nas Américas; o vírus da cabeça amarela (YHV, do inglês *Yellow Head Virus*), na Ásia; o vírus da síndrome de Taura (TSV, do inglês *Taura Syndrome Virus*), nas Américas; o vírus da mancha branca (WSSV, do inglês *White Spot Syndrome Virus*), que atingiu proporções gigantescas, iniciando pela Ásia, no início dos anos 90, atingindo as Américas, no final dos anos 90, e por fim o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV, do inglês *Infectious Myonecrosis Virus*), em 2002 no Nordeste brasileiro (NUNES et al., 2004; FLEGEL, 2006; BONAMI, 2008; LIGHTNER, 2011).

No caso do Brasil, duas viroses causaram sérios prejuízos para a carcinicultura nos últimos anos. No Nordeste, o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) causou alta mortalidade nos cultivos (NUNES et al., 2004). No Sul do país, a virose que atingiu os cultivos catarinenses no final de 2004, foi a síndrome da mancha branca (WSS, do inglês *White Spot Syndrome*) cujo agente etiológico é o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV).

1.2. SÍNDROME DA MANCHA BRANCA

A síndrome da mancha branca (WSS) representa a mais ameaçadora e devastadora enfermidade para o cultivo de camarões em todo o mundo detectada até o momento (*vide* revisão de LIGHTNER, 2011), além de atacar em vários tecidos do animal (*vide* revisão de ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008), compromete seriamente o sistema imunológico do animal, uma vez que se replica em suas células imunocompetentes ou hemócitos (WANG et al., 2002).

A WSS foi detectada pela primeira vez em 1992-1993, em cultivos de Taiwan, de onde se espalhou rapidamente para a maioria dos países produtores de camarões (CAI et al., 1995; FLEGEL, 1997; ROSEMBERRY, 2002). Mortalidades massivas podem ocorrer em um período muito curto, sendo que em casos mais severos podem chegar a 100% entre 2 a 7 dias após a detecção dos sinais clínicos (CHOU et al., 1995; CHANG et al., 1999).

O WSSV é um vírus envelopado, baciliforme e pertence ao gênero *Whispovirus* e à família *Nimaviridae* (MAYO, 2002a,b) que infecta especialmente as células de origem ectodermal e mesodermal, incluindo células da epiderme, brânquias, intestino (CHANG et al., 1996), órgão linfóide (DURAND et al, 1996; CHANG et al, 1998), músculo, coração (KOU et al., 1998), gônadas (LO et al., 1997), hemócitos e células associadas ao sistema nervoso central (RAJENDRAN et al., 1999; WANG et al., 1999). (Figura 3)

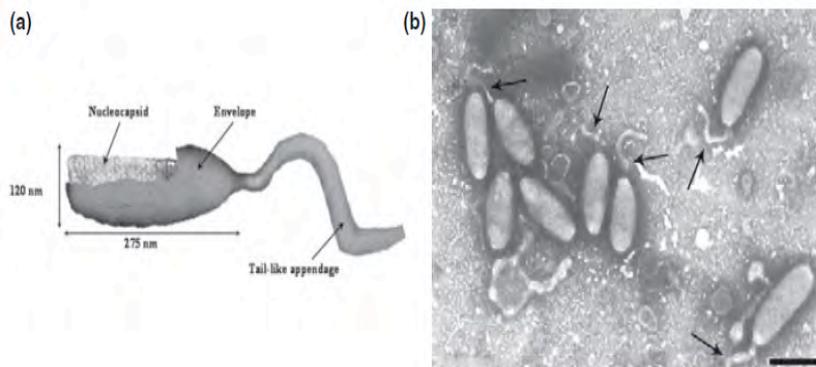


Figura 3: (a) Morfologia do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). (b) Microscopia eletrônica do vírus WSSV em destaque, as setas pretas indicam o apêndice caudal (tamanho= 250 nm). Fonte: Durand et al., 1996.

Além de atacar vários tecidos do animal, a doença compromete seriamente o sistema imunológico, atingindo principalmente os hemócitos granulares para a sua replicação (WANG et al., 2002).

A WSS geralmente se manifesta quando ocorre um desequilíbrio no cultivo, advindo, de altas densidades populacionais, má preparação do solo, baixa qualidade de água, excesso de matéria orgânica no solo e mudanças bruscas na temperatura da água (BUCHELI e GARCIA, 2005; SEIFFERT et al., 2005; PEREIRA et al., 2006).

Foi constatado que a temperatura da água influencia profundamente a expressão da doença em *L. vannamei* infectados com WSSV (VIDAL et al., 2001; GRANJA et al, 2003). Estes autores descobriram que temperaturas acima de 32°C fazem com que o WSSV não se desenvolva em *L. vannamei*, mas quando este mesmo camarão for resfriado a uma temperatura de 25°C, a doença se manifesta rapidamente com mortalidade de 100%.

Os principais sinais clínicos da enfermidade são o surgimento de calcificações brancas arredondadas na parte interna do exoesqueleto do rostro, atividade errática do camarão na periferia do viveiro, redução rápida no consumo de alimento, atividade metabólica reduzida e coloração avermelhada no corpo (BUCHELI e GARCIA, 2005).

As manchas brancas, cuja presença denomina a enfermidade (Figura 4), são decorrentes de depósitos de sais de cálcio na epiderme cuticular dos camarões infectados. No entanto, o mecanismo de formação destas manchas ainda é pouco conhecido, mas sabe-se que a infecção por WSSV pode provocar uma disfunção do epitélio subcuticular do animal, resultando assim no acúmulo dos sais de cálcio (WANG et al., 1999).



Figura 4: *Litopenaeus vannamei* apresentando manchas brancas no exoesqueleto provenientes da infecção por WSSV. Fonte: <http://shrimpdiseases.wordpress.com/wssv/> 11.06.2013

1.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE O SISTEMA IMUNE DOS CRUSTÁCEOS

O sistema imunológico dos animais está dividido em Imunidade Inata ou Natural, e Imunidade Adaptativa ou Adquirida, sendo que ambas apresentam reações humorais e celulares de defesa.

Os crustáceos, por serem invertebrados, apresentam apenas a imunidade inata, não possuindo memória imunológica e conseqüentemente não produzindo anticorpos antígeno-específicos. Sendo assim, fica inviável a produção de vacinas para estes animais. Todavia, é preciso ressaltar que embora possuam um sistema de defesa mais primitivo, os crustáceos foram capazes de sobreviver ao longo do tempo, resistindo a inúmeros patógenos presentes no meio aquático, o que demonstra a eficiência do seu sistema imune (LIU et al., 2009).

Os principais mecanismos de defesa atualmente reconhecidos nos invertebrados incluem: (a) um sistema fagocítico e de encapsulamento; (b) a produção de moléculas líticas e microbicidas como as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio; (c) sistemas antimicrobicidas mediados por peptídeos antimicrobianos; (d) a melanização mediada pelo sistema de ativação da pró-fenoloxidase (proPO); (e) o sistema de coagulação da hemolinfa; (f) o reconhecimento e aglutinação celular mediada por lectinas; (g) os sistemas antivirais mediados por RNA de interferência, citocinas análogas a interferons, apoptose e autofagia (JIRAVANICHPAISAL et al., 2006; LIU et al., 2009; PERAZZOLO, ROSA E BARRACO, 2012).

A primeira etapa de defesa dos crustáceos envolve o reconhecimento dos agentes infecciosos por proteínas/receptores de reconhecimento de padrões (PRPs, do inglês *Pattern Recognition Proteins*), situados na membrana dos hemócitos ou dissolvidos no plasma e que reconhecem padrões moleculares expressos especificamente nos patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), e que estão ausentes no hospedeiro. As principais PRPs caracterizadas em crustáceos reconhecem os seguintes PAMPs: lipopolissacarídeos (LPS) da superfície de bactérias Gram-negativas, peptidoglicanas de parede de bactérias Gram-positivas, β -

glicanas da parede de fungos e o RNA dupla fita (dsRNA, do inglês *Double-Stranded RNA*), produzido por vários vírus durante a sua replicação no hospedeiro (LEE e SÖDERHÄLL, 2002).

O reconhecimento do agente invasor desencadeia a ativação dos hemócitos que podem migrar para os sítios de infecção, onde realizam a fagocitose e/ou a formação de agregados celulares densos em torno das partículas invasoras (nódulos e/ou cápsulas). Os patógenos podem, então, ser neutralizados ou destruídos através de diferentes mecanismos, incluindo: a liberação de enzimas degradativas, a ativação dos componentes do sistema pró-fenoloxidase (proPO) e a produção de compostos citotóxicos, como as espécies reativas de oxigênio (ROIs) e nitrogênio (RNIs).

Além disso, os hemócitos de crustáceos produzem diferentes proteínas e/ou peptídeos antimicrobianos (PAM), que apresentam uma atividade microbicida rápida e potente contra um amplo espectro de micro-organismos, incluindo bactérias, fungos filamentosos, leveduras, e em alguns casos também contra vírus e protozoários (BACHÈRE et al., 2004; REDDY et al., 2004).

O sistema pró-fenoloxidase (proPO) é de suma importância no sistema de defesa do camarão. Este pode ser ativado por componentes da superfície de micro-organismos, como os LPS, peptidoglicanos e β -glicanas, resultando numa série de reações proteolíticas em cascata, que levam a ativação da enzima fenoloxidase (PO) responsável pela reação de melanização, como observado em camarões *Farfantepenaeus paulensis* (PERAZZOLO; BARRACO, 1997). Durante este processo ocorre a produção de moléculas altamente tóxicas como as quinonas e espécies reativas de oxigênio, que levam a neutralização e/ou destruição dos patógenos invasores. A avaliação da atividade da enzima PO constitui um dos parâmetros imunológicos mais importantes na avaliação da condição de saúde de camarões (RODRÍGUEZ e LE MOULLAC, 2000; BARRACO et al., 2008).

1.4. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICOS DAS VIROSES EM CAMARÕES

Atualmente, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de caracterizar e analisar a função de proteínas do WSSV, especialmente àquelas do envelope viral que estão diretamente associadas à adesão e entrada do vírus na célula hospedeira, sendo elas: VP19, VP26, VP28, VP68, VP281 E VP466 (VAN HULTEN et al., 2000; WU et al., 2005). Inúmeras pesquisas demonstraram que as proteínas VP26, VP24 e VP15 localizam-se no nucleocapsídeo enquanto que VP28 e VP19 estão localizadas no envelope viral do WSSV (Figura 5).

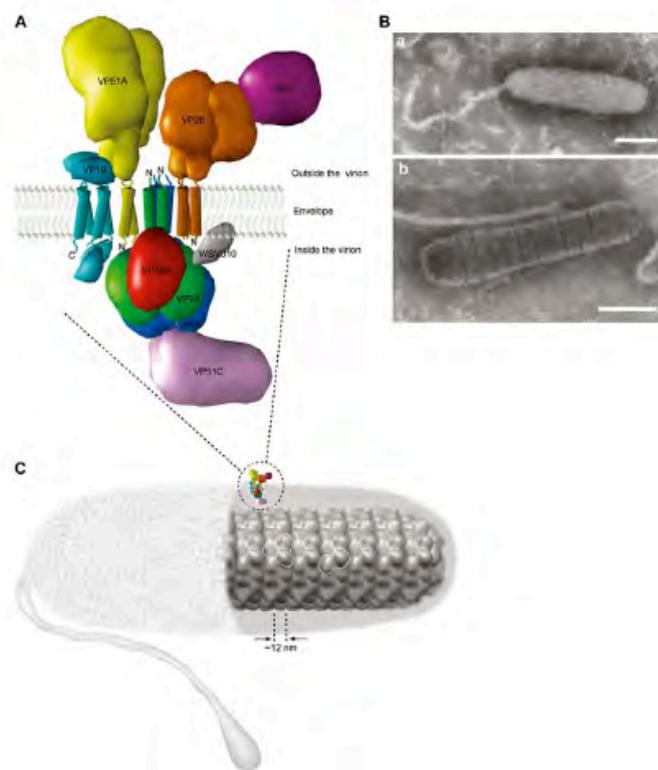


Figura 5: Modelo tridimensional do complexo de proteína da membrana e do nucleocapsídeo de WSSV. (A) Detalhe do envelope viral com as localizações das proteínas do WSSV e das interações dos complexos entre VP19, VP24, VP26, VP28, VP37, VP38A, VP51A, VP51C e WSV010. As hélices transmembranares são apresentadas como cilindros. Também é mostrado a oligomerização de VP19, VP24,VP51A (dímeros), VP26 e VP28 (trímeros). (B) Micrografia eletrônica-contraste negativo. (a) Vírus intacto e (b) Nucleocapsídeo viral. O tamanho de ambos são de 100 nm. (C) Nucleocapsídeo. Cada forma globular possui 12 nm de diâmetro, e corresponde a uma única molécula de VP664. Dímeros ou trímeros de VP664 (delineado em branco) estão organizados nos anéis empilhados que podem ser vistos em microscopia eletrônica. Fonte: CHANG et al., 2010.

Dentre as proteínas virais, a VP28 é a mais abundante do envelope viral e está envolvida na adesão do WSSV às células do hospedeiro, além de interagir com proteínas intracelulares do hospedeiro, tais como a Rab7-GTPase (SRITUNYALUCKSANA et al., 2006), a proteína de choque térmico HSP70 (XU et al., 2009) e o transdutor de sinal e ativador de transcrição STAT (LIU et al., 2007). Em função disto, sua sequência aminoacídica e molecular (gene) são utilizadas em estudos para produzir “vacinas” de bloqueamento físico, ou para conferir proteção antiviral nos animais usando técnica de RNA de interferência (RNAi) (JOHNSON; VAN HULTEN; BARNES, 2008; KUMAR et al., 2008).

O desenvolvimento de técnicas eficientes de diagnóstico é essencial para evitar a disseminação de vírus causadores de patógenos em camarões, com o intuito de evitar grandes perdas na produção destes animais.

Os métodos de diagnóstico utilizados para a detecção de doenças infecciosas em crustáceos ou para a detecção de seus agentes etiológicos baseiam-se em sinais clínicos, métodos de microscopia óptica e eletrônica, exames histológicos, testes imunológicos usando anticorpos policlonais ou monoclonais, ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e imunohistoquímica (SEIBERT et al., 2010) e métodos moleculares como hibridização *in situ* e PCR utilizando sondas e iniciadores específicos para genes virais (LIGHTNER, 2011).

No exame histológico, cortes de tecido do camarão são corados com hematoxilina e eosina e observados ao microscópio óptico comum (BELL; LIGHTNER, 1988) sendo que as principais manifestações histológicas visualizadas no tecido de camarão infectado pelo WSSV são hipertrofia celular e nuclear, além de inclusões intracelulares eosinofílicas e necrose tecidual (PANTOJA; LIGHTNER, 2003; RAJENDRAN et al., 2005).

Uma das técnicas moleculares comumente utilizadas para diagnosticar WSSV em camarões é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*). Esta reação consiste em ser altamente específica e sensível, sendo considerada padrão na detecção do WSSV (POULOS et al., 2001). Tapay, Nadala e Loh (1999) desenvolveram uma das inúmeras metodologias de PCR disponíveis para detectar WSSV, na qual utilizaram iniciadores específicos para amplificar um DNA codificante para uma proteína viral. Atualmente, vários autores utilizam uma técnica suplementar feita em PCR em Tempo Real (qPCR, do inglês *Real-Time quantitative PCR*), por meio da quantificação das partículas virais (ZHU; QUAN, 2012).

No caso das técnicas imunológicas, que utilizam como princípio a interação antígeno-anticorpo para a titulação de anticorpos, utiliza-se o teste de ELISA, e para a detecção *in situ* do WSSV utiliza-se, por exemplo, imunohistoquímica. Estes ensaios utilizam anticorpos poli e/ou monoclonais produzidos contra proteínas de envelope ou estruturais do WSSV (POULOS et al., 2001; LIU et al., 2002; YOGANANDHA et al., 2004; WANG et al., 2008). Liu et al. (2002) padronizaram uma reação de ELISA para detecção do WSSV, que utiliza anticorpos monoclonais direcionados contra diferentes epítomos da proteína VP28. A interação antígeno-anticorpo faz com que os anticorpos reconheçam a proteína VP28 constituinte do envelope do WSSV, e como resultado desta interação, ocorra uma reação colorimétrica nos poços. Este teste se torna comparável a PCR, pois é sensível e específico, diagnosticando pequenas quantidades virais presentes no hemolinfa.

Dentre as várias reações imunoenzimáticas desenvolvidas para detecção do WSSV encontra-se a metodologia elaborada por Chen, Wang e Shih (2002) que emprega três anticorpos diferentes. Este ensaio utiliza um anticorpo monoclonal direcionado contra um epítomo da proteína VP28, um anticorpo policlonal anti-WSSV e um terceiro anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com peroxidase. A característica diferencial do ELISA é a capacidade de avaliar indiretamente as partículas virais presentes no soro imune através da comparação da leitura da densidade óptica com uma curva padrão pré-definida. Embora se tenha usado esta técnica para quantificar partículas virais, atualmente a técnica universalmente usada é por qPCR (ZHU; QUAN, 2012). A técnica da ELISA é especialmente ainda utilizada para titular os anticorpos produzidos.

Uma importante análise que possibilita a localização exata do vírus no hospedeiro é a imunohistoquímica, que se baseia na interação do anticorpo com o epítipo ao qual foi produzido, no caso, a região da proteína viral, permitindo identificar especificamente a distribuição do WSSV em diferentes órgãos e tecidos do camarão.

Apesar de técnicas moleculares e de demais imunoenaios - tais como imunodot-*blot* e *Western-blot* - serem mais facilmente aplicados, os dados conferidos pela imunohistoquímica permitem identificar especificamente a distribuição do vírus em diferentes órgãos e tecidos do camarão. Interessantemente, observou-se que sítios de replicação do WSSV podem estar localizados em áreas restritas ao inóculo viral (baixas doses de vírus, DL30) o que pode facilmente fornecer resultados falso-negativos por PCR quando tecidos não infectados do animal são amostrados (CANTELLI, L., 2009).

Os anticorpos utilizados para a detecção específica podem ser de dois tipos: policlonais ou monoclonais. Estes últimos normalmente são considerados mais específicos. Os anticorpos policlonais resultam de injeções de um antígeno peptídico em animais e, por conseguinte, a um estímulo de resposta imune secundária, sendo que os anticorpos são isolados a partir do soro imune. Deste modo, os anticorpos policlonais são uma mistura heterogênea de anticorpos capazes de reconhecer epítipos distintos (ABBAS; LICHTMAN, 2009).

Os anticorpos também podem ser classificados como reagentes primários ou secundários. Os primários são sintetizados contra um antígeno determinado e são tipicamente não-conjugados (não-marcados). Já os anticorpos secundários são normalmente comerciais, sintetizados contra as imunoglobulinas do animal que os gerou, e podem ser, por exemplo conjugados à avidina biotina (Figura 6).

Este trabalho teve por objetivo, produzir anticorpos policlonais contra a proteína do envelope viral do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), VP28, visando a imunodeteção do vírus em tecidos de camarões *Litopenaeus vannamei*. Além das técnicas de diagnóstico exemplificadas nesse trabalho, sendo a de PCR a mais comumente utilizada em laboratório, é também importante identificar onde o vírus está agindo no animal, mais especificamente em qual tecido ocorre o maior comprometimento, que está debilitando o seu sistema imunológico. Como ideal deste trabalho, buscamos fazer a técnica de PCR para o diagnóstico da infecção viral nos camarões, partindo para a análise de histologia, onde será visualizada a infecção do vírus no tecido do animal e por fim a análise de imunohistoquímica, que visa a imunodeteção no tecido do animal contaminado com o vírus através da marcação com o anticorpo produzido, em camundongos, o anti-VP28r.

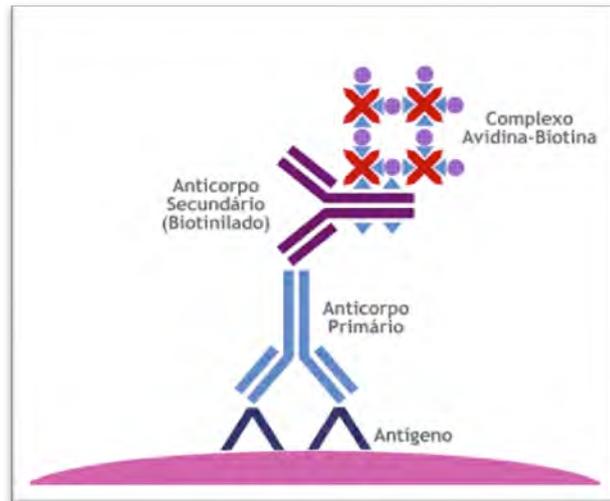


Figura 6: Esquema representativo e simplificado de uma reação entre antígeno-anticorpo primário-anticorposecundário. O anticorpo primário reconhece e se liga ao antígeno do tecido sendo analisado, sendo posteriormente reconhecido pelo anticorpo secundário conjugado à avidina-biotina. Fonte: <http://www.anticorpos.com.br/exames/imuno-histoquimica.aspx> 24.06.2013

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Produzir anticorpos policlonais contra a proteína do envelope viral do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), VP28, visando imunodeteção do vírus em tecidos de camarões *Litopenaeus vannamei*.

2.2. ESPECÍFICOS

1. Produzir anticorpos policlonais, em camundongos, contra a proteína recombinante VP28-WSSV;
2. Avaliar a reatividade e determinar o título de anti-VP28r presentes no soro-imune, através do teste de ELISA;
3. Desafiar camarões adultos *L. vannamei* com diferentes diluições do inóculo de WSSV (10^{-1} , 10^{-5} , 10^{-8});
4. Avaliar a presença do vírus em tecidos do camarão (hepatopâncreas e tecidos adjacentes do cefalotórax) através de PCR e análises histológicas.
5. Identificar a presença do WSSV em tecidos dos camarões, infectados experimentalmente, utilizando o anticorpo produzido através de análises de imunohistoquímica;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. SOLUBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA VIRAL RECOMBINANTE VP28

A proteína recombinante VP28 do WSSV (VP28r) utilizada neste estudo para produzir anticorpos policlonais foi gentilmente cedida pelo Dr. Claudio Humberto Mejía-Ruíz do Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, México. A VP28r foi produzida segundo metodologia descrita em Silva, J. A. M. (2007). Após chegar ao LIAA (Laboratório de Imunologia Aplicado à Aquicultura), a VP28r foi solubilizada em DMSO a uma concentração final de 1%. Sendo esta solução utilizada nas imunizações dos camundongos, como descrito a seguir.

3.2. IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS E OBTENÇÃO DO SORO IMUNE ANTI-VP28r

Para a obtenção de um soro imune contendo os anticorpos policlonais dirigidos contra a VP28r foram realizadas imunizações em camundongos machos, da espécie *Mus musculus*, isogênicos da linhagem BALB/c, mantidos no biotério setorial do Departamento de Imunologia e Parasitologia do CCB/UFSC, sob padrão sanitário convencional, com água e alimento. O fornecimento dos camundongos e as imunizações foram feitos em colaboração com o Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto, do Laboratório de Imunologia Aplicada (LIA, MIP-CCB), da Universidade Federal de Santa Catarina.

Foram realizadas cinco imunizações em 5 animais com intervalo de 10 dias entre elas, sendo injetados 10 µg VP28r nas duas primeiras imunizações/ animal, 20 µg VP28r nas terceira e quarta imunizações, e por fim, 33 µg VP28r na última imunização. A solução imune foi preparada com VP28r em presença 20 mM Tris, 150 mM NaCl (pH7,2). Todos os animais receberam 100µl da solução de VP28r sendo a primeira imunização suplementada com Adjuvante Completo de Freund (ACF) e a segunda imunização com Adjuvante Incompleto de Freund (AIF), ambas soluções comerciais (Sigma Aldrich). O Adjuvante induz a inflamação, causando uma resposta imune mais potente e deixando a solução mais densa no momento do preparo. As duas primeiras injeções foram sob via subcutânea e as três últimas sob via intraperitoneal.

Passados 7 dias da quarta imunização, os animais foram sangrados por punção no plexo retro-orbital, após anestesia por cloridrato de cetamina (Dopalen) e cloridrato de xilazina (Rompum). O sangue foi mantido por 1 h a 4-8°C para deixar coagular e o soro imune obtido após homogeneização do coágulo e centrifugação a 1000 x g por 10 min a 4°C.

Após 7 dias, os camundongos foram submetidos a um novo reforço intraperitoneal com 33 µg de VP28r, sem auxílio de Adjuvante, caracterizando a quinta e última imunização. Por fim, um novo teste de ELISA foi realizado a fim de saber o título final de anticorpos obtidos nestes

camundongos. O soro imune obtido (1 mL), foi aliquoteado (200µl) e mantidos a -20°C até o momento do uso.

3.3. TESTE DE REATIVIDADE E TITULAÇÃO DOS ANTICORPOS POR ELISA

O soro imune obtido foi testado em diluições seriadas (1/200 a 1/4.096) por ensaio imunossorvente de ligação de enzimas – ELISA (ENGVALL; PEARLMANN, 1972) para verificar a reatividade e os títulos de anticorpos produzidos, como descrito a seguir.

Inicialmente, poços de uma microplaca (Costar) foram sensibilizadas com 50 ng da VP28r diluída em solução tamponada de carbonato/bicarbonato 0,05 M (pH 9,6), com um volume final de 200 µl/poço, seguida por incubação a 37°C durante 3 h.

Após incubação, a microplaca foi lavada cinco vezes com PBS (Na_2PO_4 9,1 mM NaH_2PO_4 1,7 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2), contendo 0,05% de Tween 20.

A seguir, foi realizado o bloqueio das ligações inespecíficas com 3% de BSA (Soro Albumina Bovina) em PBS-Tween 0,05%, seguida por incubação da placa *overnight* a 4°C. Em seguida, nova lavagem com PBS-Tween 0,05% foi realizada, conforme acima descrito.

A incubação com os anticorpos primários contidos no soro imune foi realizada mediante a incubação de 100 µl do soro, diluídos em PBS-BSA 3% e PBS-Tween 0,05%, a partir de uma diluição seriada de 1:200, incubados por 1 h a 37°C, sem agitação. As análises foram feitas em duplicata para cada soro imune. Como controle das reações, o soro imune foi substituído por um soro pré-imune, coletado de camundongos não imunizados.

Após a incubação com o anticorpo primário, nova lavagem foi feita, como acima descrito. A seguir 100 µl de anticorpo secundário anti-imunoglobulina total de camundongo conjugado a peroxidase, diluído seriadamente com PBS Tween 0,05% a partir de 1: 2.500, por 1 h a 37°C. Após uma hora, mais uma lavagem com 200 µl de PBS-Tween, por cinco vezes.

A revelação foi feita pela adição de 100 µl/poço de solução substrato–cromógeno, constituída de H_2O_2 (35%), ABTS (2,2'-azino-bis(ácido3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (10%) diluídos em tampão citrato (0,027M pH 4), na proporção de (1ml de tampão: 20 µl de ABTS: 1 µl de H_2O_2). A leitura foi feita em leitora (Tecan) a uma densidade óptica de λ 405 nm.

3.4. PREPARO DO INÓCULO COM WSSV

A solução de inóculo de WSSV foi preparada segundo metodologia adaptada de Prior et al. (2003). Brevemente, o tecido muscular de camarões mortos diagnosticados com WSSV foi homogeneizado em tampão (Tris 10 mM, NaCl 330 mM, pH 7,4) (1:10 p/v) e em seguida centrifugado a 2.000 xg, por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi centrifugado a 9.000 xg, por 10 min a 4°C, filtrado (0,45 µm) e armazenado em nitrogênio líquido. Simultaneamente, um inóculo livre de

WSSV foi preparado seguindo a mesma metodologia, porém com a utilização de músculo de animais diagnosticados como WSSV negativo, por PCR.

3.5. CAMARÕES E DESAFIO COM O VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA

Utilizou-se neste estudo camarões livres de patógenos, machos e fêmeas da espécie *Litopenaeus vannamei* (n=8, peso médio= 10 – 12 g) fornecidos pelo Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram transportados para o laboratório de bioensaios da Epagri (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina), na unidade de Tubarão (SC) e mantidos em caixas de 50L contendo água salgada filtrada e aeração constante, recebendo alimentação uma vez ao dia com ração comercial. A qualidade da água dos aquários foi monitorada diariamente, sendo avaliado salinidade, temperatura, pH e oxigênio dissolvido. Aproximadamente 50% da água dos aquários foi renovada diariamente.

A infecção com o inóculo viral foi feito por meio de injeção intramuscular. Para tal, 50 µl de 3 diferentes diluições do WSSV (10^{-1} , 10^{-5} e 10^{-8}) foram injetados em 6 animais (n=2/inóculo) entre o 1º e 2º segmentos dorsais. Como controle negativo da contaminação, foram utilizados 2 animais diagnosticados por PCR como WSSV negativo.

3.6. COLETA DE TECIDOS DOS ANIMAIS PARA ANÁLISES MOLECULARES E HISTOLÓGICAS

Após 15 dias do início da inoculação dos animais com WSSV, procedeu-se à coleta e fixação dos tecidos dos animais para análises posteriores de diagnóstico da infecção viral (PCR), análises histológicas e de imunohistoquímica.

No caso das análises de imunohistoquímica, os animais foram perfundidos, na região do cefalotórax, bilateralmente, em camarões vivos porém em estágios avançados da infecção por WSSV (apresentando natação errática, coloração avermelhada), com 10 ml de solução de Davidson (C₂H₆O 31%, formalina 22%, C₂H₄O₂ 12%, pH 3,0-4,0) seguido de lavagens com etanol 70% para remoção do fixador até a estabilização do pH em 6,5 (ANDRADE; REDMAN; LIGHTNER, 2008). Paralelamente, procedeu-se igualmente com animais controle, não previamente infectados com WSSV.

Em seguida, os animais foram colocados individualmente em frascos de vidro contendo 200 ml da solução de Davidson, sendo armazenados nesta solução por no máximo 72 h. Após, os mesmos foram transferidos para uma solução de etanol 50% onde ficaram armazenados até o processamento histológico dos tecidos.

Para o diagnóstico molecular do WSSV (PCR) retirou-se 3 pléopodes de cada animal morto, que foram armazenados em etanol 70%.

3.7. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO E DETECÇÃO DO WSSV ATRAVÉS DA AMPLIFICAÇÃO POR PCR

A extração do DNA genômico dos pléopodes foi realizada conforme protocolo do reagente DNAzol (Invitrogen). Brevemente, tecido de pléopodes lavados em água livre de RNase foram macerados com a ajuda de um pistilo e foi acrescentado o DNAzol (1ml/100mg tecido). Após centrifugação (10.000 *xg* por 10 min a 4°C), o sobrenadante (DNA) foi precipitado com etanol 100%. Finalmente, o DNA foi lavado com etanol 75%, seco a temperatura ambiente e solubilizado em água livre de DNase e RNase. A pureza das amostras foi avaliada em espectrofotômetro ($A_{260/280nm}$) (NanoVue, GE General Electric Healthcare) e a integridade do DNA foi verificada através da amplificação do gene da proteína constitutiva actina (fragmento de 800 pb), utilizando os iniciadores **AV1Fw**: 5'TAATCCACATCTGCTGGAAGGTGG3' e **AV2Rw**: 5'TCACCAACTGGGATGACATGG3' sob as condições de PCR de 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos (94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min), e 72°C durante 10 min.

A amplificação das sequências de DNA correspondentes ao WSSV foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase em dois passos (*nested* PCR), utilizando-se os iniciadores recomendados pela OIE (2009): **WSSV146Fw1**: 5'ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG3'; **WSSV146Rv1**: 5'TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACG3' (fragmento 1447pb); e **WSSV146Fw2**: 5'GTAAGTGGCCCTTCCATCTCCA3'; **WSSV146Rv2**: 5'TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT3' (fragmento 941pb). As condições de PCR para **WSSV146** foram 94°C por 4 min, 55°C por 1 min, 72°C por 2 min, seguido por 39 ciclos (94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min), e 72°C durante 5 min. A confirmação ou não da presença de sequências gênicas referentes ao vírus nos animais analisados foi confirmada através da visualização em fotodocumentador (UV) dos fragmentos de tamanho esperado em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídeo (0,5µg/ml).

3.8. PREPARO DAS LÂMINAS

Apenas tecidos do cefalotórax foram processados. Para tal, o exoesqueleto foi cuidadosamente removido e o tecido mole fixado em formol 10% por 72 h. Após este período, as amostras foram desidratadas em uma série decrescente de etanol (100, 90, 80 e 70%), por 1 h cada e, em seguida, diafanizadas em dois banhos de xilol por 1 h cada. A inclusão das amostras em parafina ocorreu em 3 etapas, nas duas primeiras submersões, as amostras foram colocadas por 1 h cada em parafinas distintas e armazenadas em uma estufa com temperatura média de 59°C e, por fim, em outra parafina *overnight*. Na sequência as amostras já podem ser submetidas a cortes de 7 µm, em

micrótomo. As lâminas foram armazenadas em caixas apropriadas e em temperatura ambiente, até utilização para as análises histológicas e de imunohistoquímica.

3.9 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

As análises histológicas foram feitas a partir da coloração do tecido com Hematoxilina-Eosina (HE) as amostras foram diafanizadas em xilol (xilol I e xilol II) 5 min cada, reidratadas em uma série crescente de etanol (70, 80, 90 e 100%) 5 min cada e lavadas com água destilada, durante 15 min. Logo após, as amostras foram coradas com eosina durante 8 min, lavadas com água corrente, coradas com hematoxilina durante 2 min e lavadas por 5 minutos. Para finalizar, as amostras coradas foram desidratadas em séries decrescentes de etanol e xilol (100, 90, 80, 70%, xilol I e xilol II) por 5 min cada, montadas com Entelan e visualizadas em microscópio Olympus IX71. As imagens foram analisadas e capturadas com a câmera Olympus DP71.

3.10. ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICAS

Para a reação de imunohistoquímica, primeiramente tecidos em lâmina foram diafanizados 15 min, reidratadas em uma série crescente de etanol (70, 90, 80 e 100%) 10 min cada e lavadas com água destilada, durante 15 min. Logo após, as lâminas foram lavadas por 25 min com PBS (0,1 M e pH 7,4) acrescido de 0,025% de Triton 100 para que não ocorram ligações com sítios inespecíficos. Em seguida, as amostras foram incubadas com H₂O₂ 0,1% Triton por 10 min a 20° C, para que ocorra a inativação das peroxidases endógenas. As amostras foram novamente lavadas com PBS contendo 0,025% de Triton100, e os sítios inespecíficos foram bloqueados com BSA 1% por 1h a 20°C.

Em seguida, os cortes foram incubados com soro imune anti-VP28r (1/10 e 1/200) ou com anticorpos policlonais, anti-VP664 WSSV (*Rabbit polyclonal to White Spot Syndrome Virus VP664*, Abcam, 1/10 e 1/200), *overnight* a 4°C. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS Tween 1%, por 20 min a 20°C e incubadas por 1h a 20°C com o anticorpo secundário respectivo: anti-IgG camundongo ou anti-IgG de coelho, ambos conjugados à biotina.

As amostras foram lavadas com PBS Tween 0,1%, por 20 min e incubadas com estreptavidina conjugada com peroxidase, durante 30 min. Decorrido o tempo, as lâminas foram lavadas com PBS Tween 0,1% por 10 min.

A revelação foi realizada por reação colorimétrica com diaminobenzidina (DAB), através da incubação, por cerca de 2 min, das amostras com solução de DAB a 1% em PBS acrescida de H₂O₂, em local protegido da luz. Para interromper a reação, foi realizada lavagem com PBS durante 5 min. Após a revelação, as amostras foram contra-coradas com solução de hematoxilina, por 30 s, lavadas em água corrente e visualizadas em microscópio Olympus IX71. As imagens foram analisadas e capturadas com a câmera Olympus DP71.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MORTALIDADE DOS ANIMAIS INFECTADOS COM WSSV

Os animais desafiados com as diluições (10^{-1} , 10^{-5} e 10^{-8}) mostraram-se 100% infectados pelo WSSV, comprovadamente detectado por PCR. Conforme apresentado na Figura 7, os animais infectados com o inóculo de WSSV 10^{-1} apresentaram mortalidade de 100% em 5 dias, sendo que neste diluição, no primeiro dia 50% dos camarões já estavam mortos, na diluição 10^{-5} estes obtiveram mortalidade de 100% entre o sexto e sétimo dia e, no último grupo testado, o inóculo 10^{-8} os animais continuaram até o final do experimento, 12 dias, com camarões ainda sobreviventes da infecção. Estes animais sobreviventes ao vírus podem ter resistido ao período do experimento sem mortalidades, mas são portadores do vírus como foi comprovado através da PCR (item 4.2). Em cultivos isso acontece constantemente, por exemplo, animais são portadores do vírus, mas não morrem rapidamente, mas caso aconteça um desequilíbrio no cultivo como, falta de alimento, aumento na densidade de animais, piora na qualidade da água, ocasionará a morte desses animais portadores do vírus.

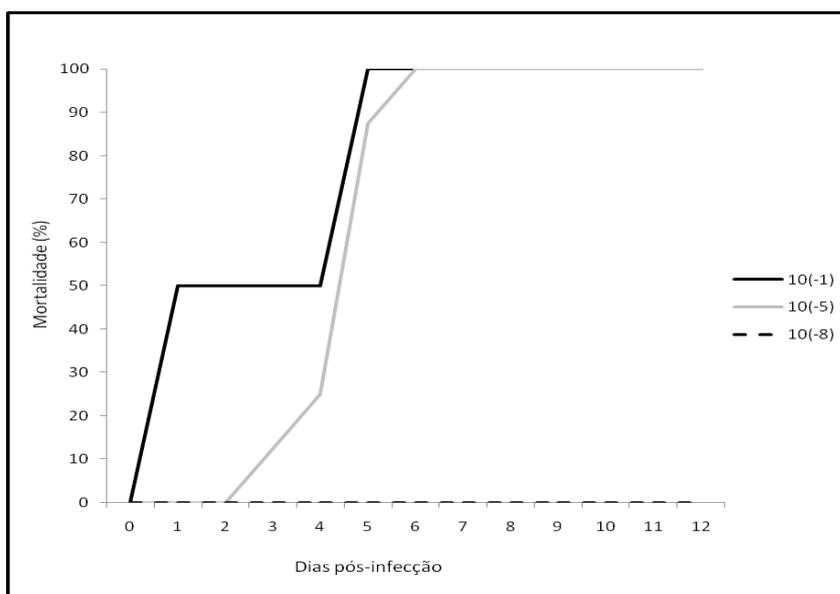


Figura 7: Porcentagem da mortalidade cumulativa dos animais em cada tratamento durante 12 dias (n=2 animais/infecção).

4.2. DETECÇÃO DO DNA VIRAL (WSSV) NOS TECIDOS DOS ANIMAIS POR PCR

A presença de WSSV foi detectada em 100% de todos os animais desafiados com diferentes diluições do inóculo viral, através de PCR convencional (um passo e dois passos - *nested*

PCR) (Figura 8), o que confirmou que a mortalidade dos animais foi resultante da inoculação com o vírus.

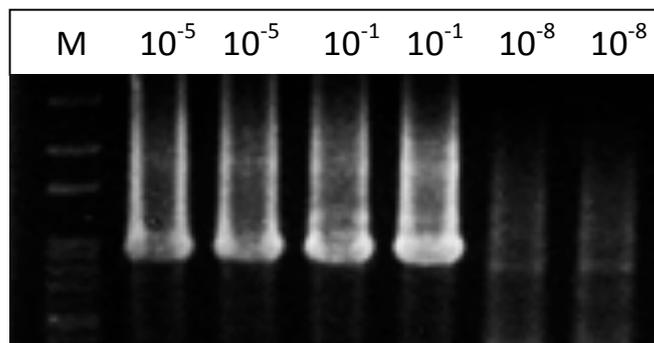


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose (1%) representando os produtos amplificados por nested-PCR, com amostras de DNA genômico de animais infectados com WSSV nas diluições de 10^{-1} , 10^{-5} , 10^{-8} . A análise foi feita utilizando-se iniciadores preconizados pela OIE (fragmento de 941 pb para os animais 10^{-8} e 1447 pb para os animais 10^{-1} e 10^{-5}). **M:** marcador de peso molecular.

Como resultado do desafio dos camarões com as diferentes diluições do inóculo viral com WSSV foram selecionados os animais injetados com a maior carga viral (inóculo 10^{-1}) para processamento dos tecidos para análises histológicas e imunohistoquímicas. Estes camarões foram escolhidos, pois apresentaram mortalidade de 100% em 5 dia, caracterizando uma forte infecção e, detectado também através da técnica de PCR, onde a banda mostrou-se mais evidente, comprovando a contaminação severa por WSSV.

4.3. TITULAÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS PRODUZIDOS POR ELISA

A resposta imune anti-VP28r foi avaliada através de 5 camundongos da espécie *Mus musculus*, linhagem BALB/c que receberam 5 doses da proteína VP28r, com diferentes quantidades em μg (1° a 5° dose). Sendo consideradas positivas as reações com absorbâncias três vezes maiores que as determinadas pelos controles negativos representando pelo título do soro de camundongos não-imunizados. Dois soros imunes foram produzidos (S1 e S2) a partir da coleta dos animais para cada soro, sendo que o título de anticorpos na maior diluição onde o anticorpo ainda apresentou reatividade com o antígeno (VP28r) foi de 1:12.800 (Figura 9 e 10). Também para visualização da reação antígeno-anticorpo, a Figura 9, mostra a coloração em cada poço em relação à diluição e a absorbância encontrada no teste. Métodos colorimétricos são importantes para proporcionar uma fácil interpretação do diagnóstico. Os valores encontrados são considerados extremamente baixos, indicando uma reatividade mínima com a proteína recombinante produzida. Por exemplo, anticorpos policlonais produzidos contra IMNV apresentaram uma titulação de 1:1.611.200 (BORSA, 2009). Por essa baixa reatividade encontrada no soro imune produzido, hipóteses podem ser levantadas em

relação ao método que esta foi produzida e também a escolha desta proteína, a VP28, para este experimento. Sendo que no envelope viral do WSSV, muitas outras proteínas são encontradas.

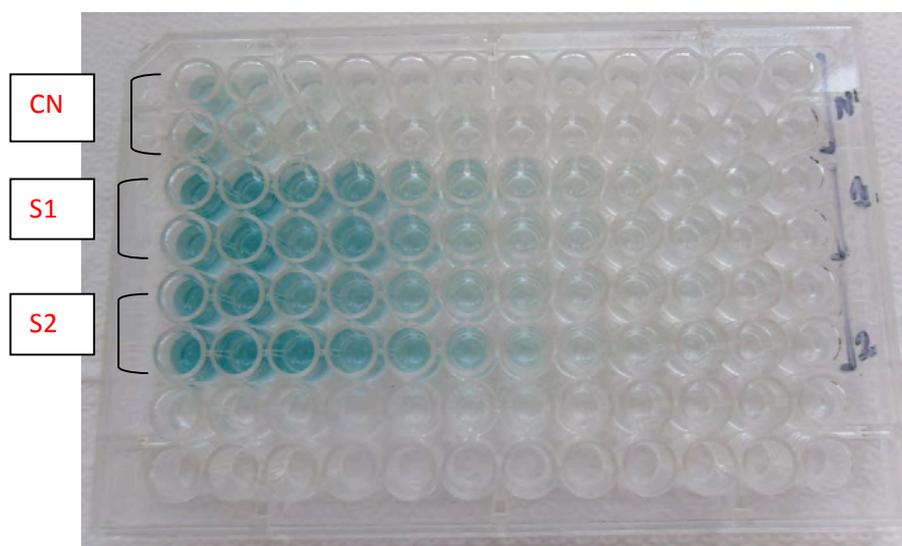


Figura 9: Exemplo de ELISA para avaliar a reatividade do anticorpo-antígeno em microplacas. (CN) Controle negativo, (S1) Soro imune camundongos, (S2) Soro imune camundongos, teste realizado em duplicatas. As diluições na microplaca são de 200 a 409.600. Observa-se que a coloração da solução mostra-se reativa até a diluição 12.800.

As duas primeiras imunizações foram suplementadas com adjuvante completo ou incompleto de Freund, respectivamente. Adjuvantes são utilizados em teste de ELISA porque eles auxiliam na indução da resposta imunológica, uma vez que são reconhecidos por componentes da resposta inata que, posteriormente, ativarão linfócitos da resposta adaptativa (STILLS, 2005). Esses adjuvantes auxiliam na indução da resposta imune por três mecanismos: i) liberação lenta do antígeno de interesse; ii) veiculação do transporte do antígeno pelo sistema linfático às células imunoefetoras; iii) interação com células apresentadoras de antígeno, como macrófagos e células dendríticas.

Titulação de anticorpos anti-VP28 em camundongos imunizados com VP28r

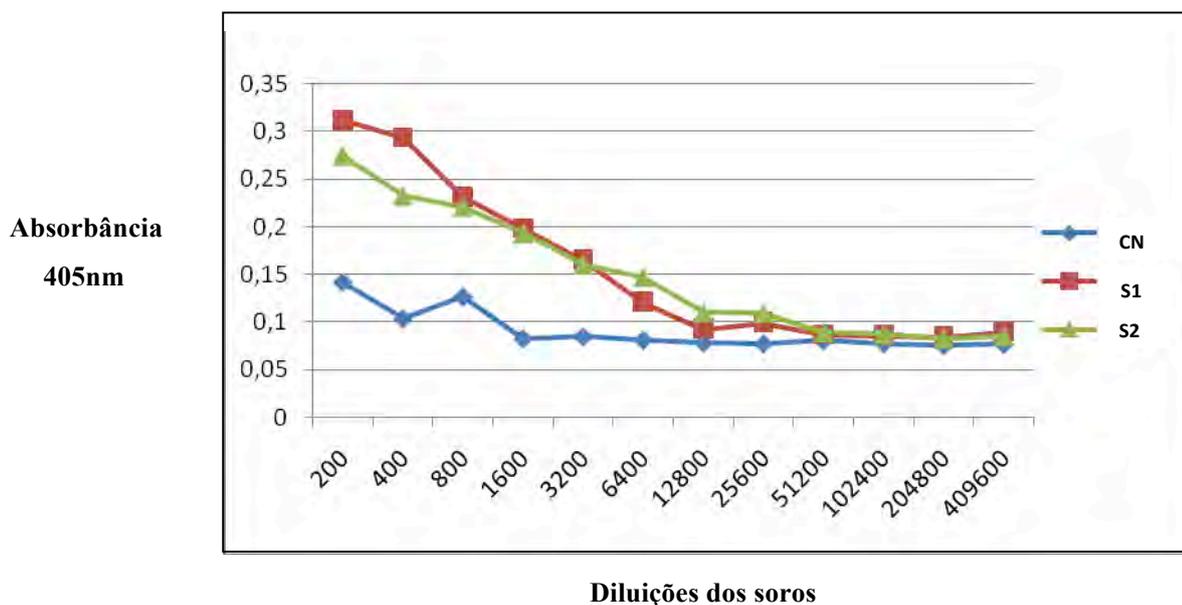


Figura 10: Titulação de anticorpos anti-VP28 em camundongos imunizados, através da técnica de ELISA. Controle negativo (CN): soro de camundongo não-imunizado; Camundongos (S1 e S2): soros de camundongos imunizados com VP28r.

Normalmente os anticorpos monoclonais apresentam uma maior especificidade e reatividade com seus antígenos, que os anticorpos policlonais. Comparativamente, pode-se dizer que anticorpos monoclonais apresentam alta especificidade e afinidade, pois apresentam identificação de um único epítipo, possui alta homogeneidade, maior facilidade de caracterização e reduzida variabilidade de lote para lote, como não ocorre com os policlonais. Por outro lado, as desvantagens de utilizar anticorpos monoclonais são o preço oneroso de produção, há o reconhecimento de um só epítipo de um antígeno e esse epítipo pode estar danificado; se o soro não for produzido contra o epítipo específico do antígeno que se quer detectar e se existirem outros antígenos com esse epítipo, poderá ocorrer um resultado falso-positivo (ABBAS; LICHTMAN, 2005). O preço oneroso de produção e dificuldades técnicas foram os motivos para que no presente estudo se produzissem anticorpos policlonais e não monoclonais.

Poucos são os trabalhos na literatura sobre a produção de anticorpos policlonais contra proteínas virais de interesse para a carcinicultura. Podem ser encontrados trabalhos sobre a produção de anticorpos monoclonais contra vírus de camarões, como IHNV, WSSV, TSV e YHV, utilizando como antígenos para imunizações vírus purificados ou então proteínas recombinantes correspondentes a porções estruturais do capsídeo ou envelope viral.

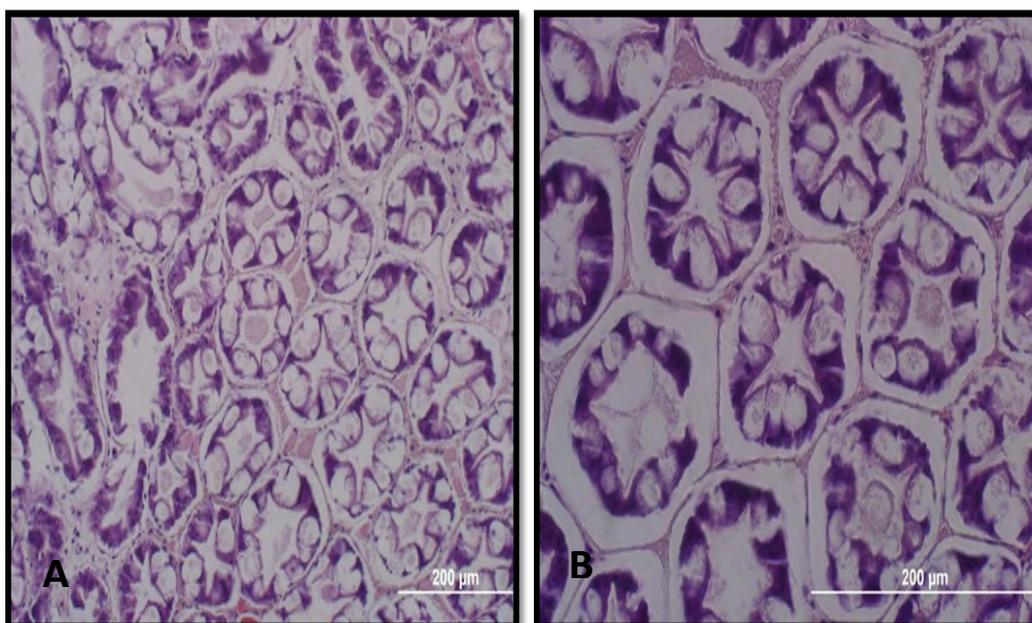
Dentre as imunoglobulinas produzidas contra vírus de camarões encontradas na literatura, os anticorpos da classe IgG, subclasses $\gamma 1$ ou $\gamma 2$ são os mais comuns (POULOS et al., 1994; SITHIGORNGUL et al., 2000; POULOS et al., 2001; ANIL et al., 2002; ERICKSON et al., 2002;

LIU et al., 2002; CHAIVISUTHANGKURA et al., 2004; WANG et al., 2008). Anticorpos IgM podem reagir não especificamente com tecidos de camarões não infectados, apresentando resultados falso-positivos (SITHIGORNGUL et al., 2000). Anticorpos IgG apresentam a vantagem de possuírem maior afinidade e especificidade, além de menor probabilidade de reações cruzadas em imunoenaios (LIGHTNER; REDMAN, 1998). No presente trabalho não foi possível determinar a classe e subclasses dos anticorpos gerados, sendo, contudo provável se tratarem da classe IgG.

4.4. ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Para as análises histológicas foram utilizados os animais fixados em Solução de Davidson e depois armazenados em etanol 50%. Cortes histológicos dos camarões infectados com inóculo WSSV 10^{-1} e controle foram processados para conferir a qualidade do tecido do animal no hepatopâncreas. As lâminas coradas com HE (Hematoxilina-Eosina) foram analisadas, verificando que nos animais controle (A e B), o hepatopâncreas estava, em geral, com as células preservadas em subtúbulos, já nos animais infectados (C e D), os túbulos apresentavam células disformes sugerindo a presença de uma enfermidade degenerativa, no caso à infecção por WSSV (Figura 11). No entanto, não foi observado, nem no hepatopâncreas nem em tecidos adjacentes, corpos de inclusão, que caracterizam uma infecção por WSSV.

Nesta forma os resultados obtidos nas análises histológicas caracterizam que esta técnica, além de simples e barata, pode ser utilizada como complemento à análise molecular de PCR (Figura 11) no diagnóstico de doenças que afetam o tecido de animais, como pela WSSV.



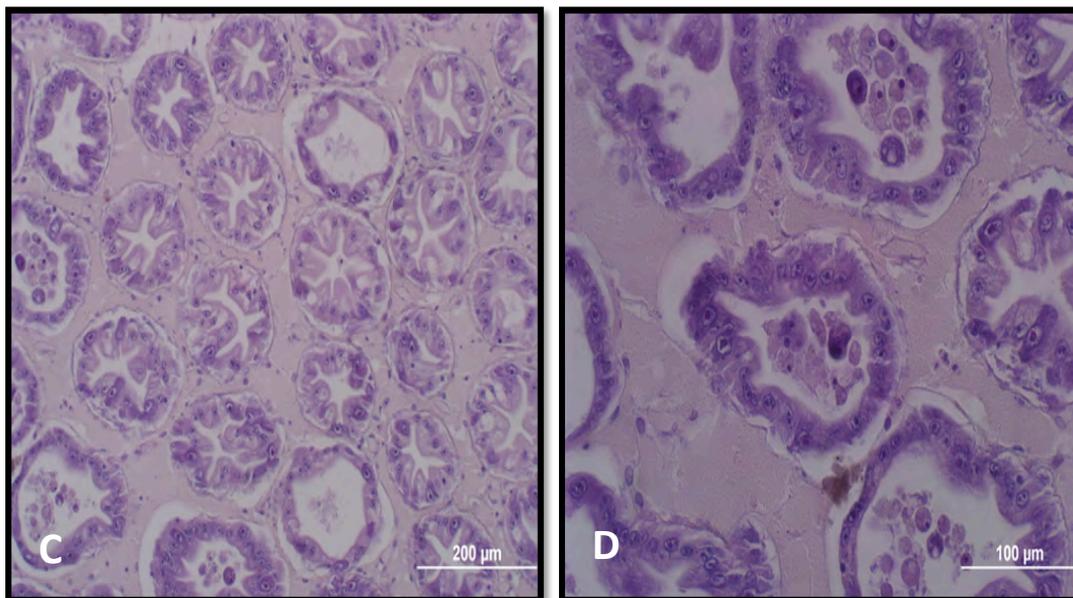


Figura 11: Análise de Histologia. Cortes histológicos do hepatopâncreas de camarão controle em microscopia de luz (A e B) e cortes do hepatopâncreas de um camarão contaminado com o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) (C e D).

5. ANÁLISES DE IMUNOHISTOQUÍMICA

As análises de imunohistoquímica foram realizadas a fim de verificar se o soro imune produzido continha anticorpos policlonais anti-VP28 capazes de se ligarem e reconhecerem *in situ* a proteína VP28 do WSSV.

Foram utilizadas lâminas com cortes de hepatopâncreas de camarões infectados com WSSV na diluição 10^{-1} , com perfeita adesão do tecido na lâmina. Conforme mostrado na Figura 12 (A e B) observa-se claramente que o anticorpo comercial anti-VP664, utilizado como controle positivo da reação com a proteína do WSSV, foi capaz de marcar a lâmina com o tecido contaminado por WSSV. Já no tecido controle, ao contrário, não houve marcação (C). No entanto o anticorpo produzido, anti-VP28r, não foi capaz de marcar o tecido contaminado por WSSV (D), na concentração utilizada.

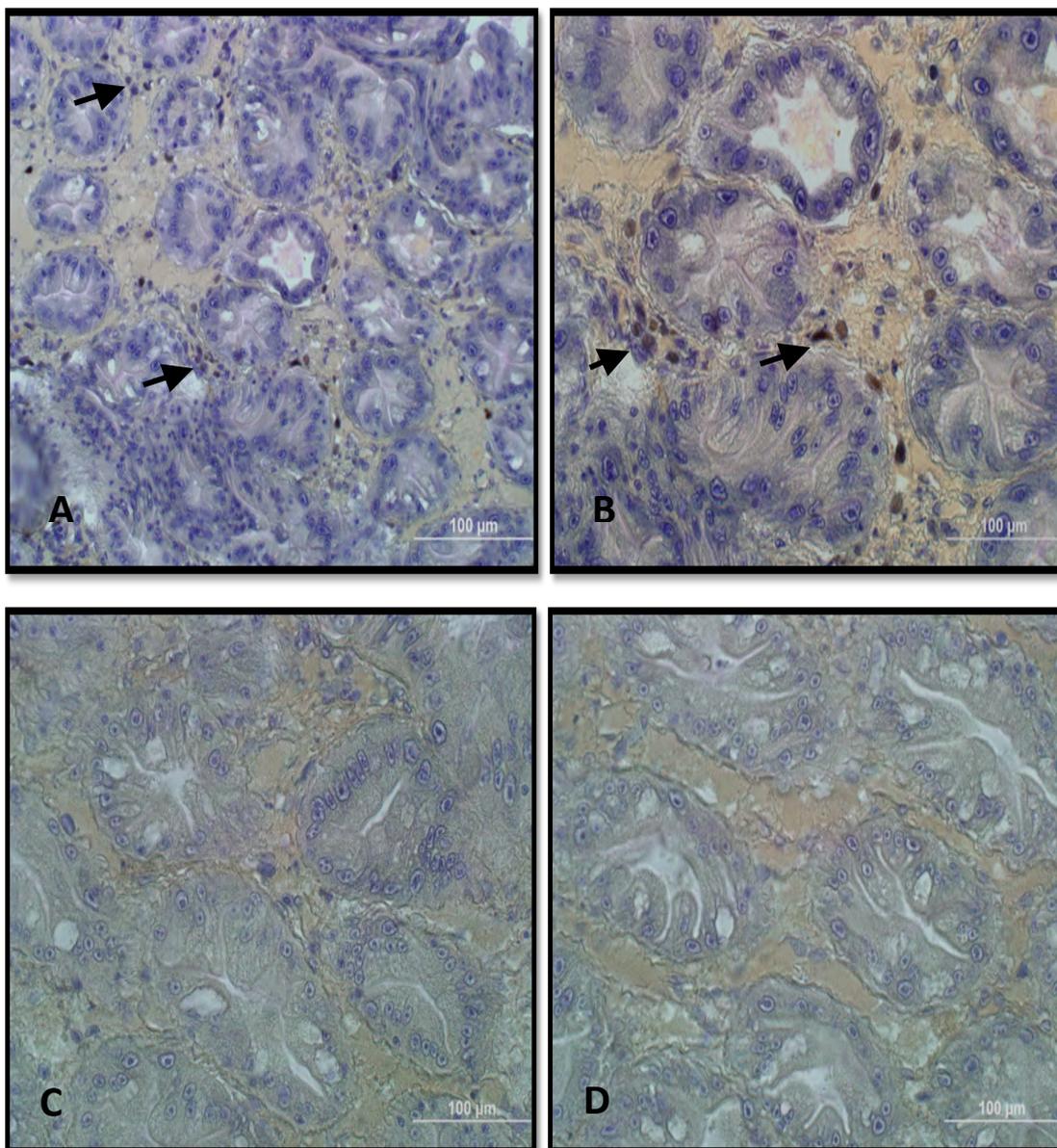


Figura 12: Análise de Imunohistoquímica. Corte histológico com contra-coloração do hepatopâncreas de um camarão contaminado pelo Vírus da Síndrome da Mancha Branca, incubado com o anticorpo comercial VP664 (1/10) (A, B), indicando presença do WSSV no tecido. Corte controle com tampão PBS (C), ou soro imune anti-VP28r (D).

A proteína que serviu de antígeno para produzir o anticorpo comercial é a VP664. Esta proteína se localiza no nucleocapsídeo do WSSV (Figura 5) constitui-se de uma cadeia de polipeptídeos gigante que funciona como uma proteína estrutural e, devido ao seu tamanho, é considerada a maior proteína isolada de camarão (LEU et al., 2005).

No decorrer deste trabalho, podemos perceber que a utilização de anticorpos para a detecção do vírus é uma técnica onerosa, sofisticada e que exige tempo e recursos para repetir novos ensaios. Caso não sejam obtidos anticorpos potentes nas primeiras análises, como ocorreu neste

estudo, é essencial a repetição de novos ensaios com diluições e concentrações diferentes para que ocorra uma comparação de resultados.

Primeiramente, foram encontradas dificuldades neste estudo associadas, por exemplo, com a insolubilidade da proteína recombinante, que pode ter levado à sua perda, gerando, conseqüentemente pouca quantidade de imunizações e proteína injetada nos camundongos. Em trabalhos futuros que sejam de mesma finalidade, seria importante fazer testes com as outras proteínas presentes no envelope viral, buscando maior afinidade, para assim encontrar uma maior titulação.

Os resultados aqui descritos indicam que esses problemas poderiam talvez ser contornados se:

1. Produção de uma nova proteína recombinante viral com menor grau de hidrofobicidade para facilitar sua solubilização e minimizar a perda de material neste procedimento.
2. padronização das quantidades (μg) da proteína recombinante utilizada nas imunizações dos camundongos, visando uma maior titulação de anticorpos no soro imune;
3. obtenção de maior volume de soro imune produzido, possibilitando assim repetir análises que não deram resultados consistentes e uma maior quantidade de testes de imunohistoquímica em diferentes tecidos do animal;
4. padronização de maiores tempos de incubação e maior concentração do anticorpo testado durante o procedimento de imunohistoquímica;
5. diminuição na concentração de agentes que aumentem a especificidade do sinal (Tween), entre outros, uma vez que o anticorpo produzido não teve alta reatividade;
6. além do acima descrito, não há disponibilidade grande de material bibliográfico utilizando anticorpos policlonais para diagnóstico de viroses em camarões, possibilitando assim comparações das técnicas utilizadas;
7. maiores informações sobre imunohistoquímica utilizando anticorpos policlonais em tecidos de camarões contaminados com WSSV, sendo que a grande maioria dos trabalhos utilizam anticorpos monoclonais;

A padronização de técnicas de ELISA e imunohistoquímica são fundamentais para técnicas como estas consideradas ferramentas alternativas para a detecção do vírus da mancha branca de camarões.

Podemos concluir com este trabalho, que através da histologia, foi comprovado que o tecido do camarão contaminado estava com sinais degenerativos possivelmente associados à infecção viral. Contudo, nas análises de imunohistoquímica, nenhuma reatividade foi encontrada entre o anti-soro VP28r (1/10 e 1/200) e o tecido de camarões infectados, indicando uma baixa especificidade dos anticorpos policlonais produzidos. Em vista disto, novos ensaios devem ser realizados visando a produção de anticorpos mais específicos, no caso monoclonais, a partir de uma

nova fonte de proteína recombinante VP28 produzida, ou selecionar outra proteína viral com menor grau de hidrofobicidade.

5.0. CONCLUSÃO

Dentro das condições utilizadas neste trabalho, o anticorpo soro imune produzido não foi suficiente para a imunodeteção do WSSV. Em vista disto, novos ensaios devem ser realizados visando à produção de anticorpos mais específicos, no caso monoclonais, a partir de uma nova fonte de proteína recombinante VP28 produzida. Sugere-se também, que modificações sejam realizadas, conforme descrito anteriormente, visando resultados positivos e padronizações de técnicas de ELISA e imunohistoquímica que são ferramentas alternativas para a detecção do vírus da mancha branca de camarões, entre outras viroses. É importante salientar que resultados negativos, também são resultados e que engrandecem a ciência trazendo dados para futuros experimentos. Buscando resultados importantes para a ciência e a aquicultura, este trabalho considera-se uma preliminar de novos experimentos que terão continuidade no laboratório. Como aprendizado deste trabalho, leva-se o conhecimento de novas análises refinadas absorvidas pelos alunos e laboratório e, principalmente, a importância de técnicas que disponibilizam diagnósticos precisos, rápidos e eficazes.

6.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H. *Imunologia Celular & Molecular*. 5 ed. Rio de Janeiro (RJ): **ELSEVIER**, 2005. 580p.

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H. *Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico*. 3 ed. Rio de Janeiro (RJ): **ELSEVIER**, 2009. Xii, 314p.

ANIL, T.M.; SHANKAR, K.M.; MOHAN, C.V. Monoclonal antibodies developed for sensitive detection and comparison of white spot syndrome virus isolates in India. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 51, p. 67-75, 2002.

ANDRADE, T. P. D.; REDMAN, R. M.; LIGHTNER, D.V. Evaluation of the reservation of shrimp samples with Davidson's AFA fixative for infectious myonecrosis virus (IMNV) in situ hybridization. **Aquaculture**, v. 278, p. 179–183, 2008.

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

BACHÈRE, E. et al. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 149-168, 2004.

BARBIERI, R.C.J; OSTRENSKY, A.N. **Camarões marinhos**: Engorda. 1. ed. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002, 352p.

BARRACCO, M.A; PERAZZOLO, L.M; ROSA, R.D. Inmunologia del camarón. *In*: VIELKA, M.Q; CUÉLLAR-ANJEL, J. (Eds.), **Guía Práctica de Patología y Inmunología de Camarones Penaeidos**, CYTED, pp. 169-224, 2008.

BELL, T. A.; LIGHTNER, D.V. A handbook of normal penaeid shrimp histology. **World Aquaculture Society**, special publication, n.1, 1988.

BONAMI J-R. Shrimp Viruses. *In*: MAHY, B.W.J; VAN REGENMORTEL, M.H.V. (Eds.), **Encyclopedia of Virology**, Oxford: Elsevier, 2008, pp. 567-576.

BORGHETTI, N.R.B.; OSTRENSKY, A. BORGHETTI, J.R. AQUICULTURA: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. Curitiba: **Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais**, 2003. 12p.

BORSA, M. Produção de Anticorpos Monoclonais Contra um Fragmento Recombinante da Proteína Estrutural do Capsídeo do Vírus da Mionecrose Infeciosa de Camarões. **Trabalho de Conclusão de Curso**. 77p. 2009. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BOYD, C.E. Water quality in Warm water fish ponds. **Opelika: Craftmaster Printers Inc.**, 1979, 359p.

BUCHELI, P.; GARCIA, F. O vírus da síndrome da mancha branca. **Revista panorama da aqüicultura**, v. 87, p. 43-49, jan/fev. 2005.

CAI, S.L. et al. Epidemiological studies on the explosive epidemic disease of prawn in 1993-1994. **Journal of Fish China**, v. 19, p. 112–117, 1995.

CANTELLI, L.; Avaliação do Efeito de Polissacarídeos Sulfatados da Macroalga *Gracilaria birdiae* Sobre as Condições de Imunocompetência de Camarões *Litopenaeus vannamei* Infectados com o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV). 2009. 68p. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

COVARRUBIAS, M. S. M. Enfermedades del Camarón. Detección Mediante Análisis en Fresco e Histopatología. México: **Trillas**, p. 180, 2010.

CHAVISUTHANGKURA, P.; TANGKHABUANBUTRA, J.; LONGYANT, S.; SITHIGORNGUL, W.; RUKPRATANPORN, S.; MENASVETA, P.; CHEN, Z. J.; CHOU, H.Y. et al. Pathogenicity of a baculovirus infection causing White spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 23, p. 165-173, 1995.

CHAVISUTHANGKURA, P.; TANGKHABUANBUTRA, J.; LONGYANT, S.; SITHIGORNGUL, W.; RUKPRATANPORN, S.; MENASVETA, P.; SITHIGORNGUL, P. Monoclonal antibodies against a truncated viral envelope protein (VP28) can detect white spot syndrome virus (WSSV) infections in shrimp. **Science Asia**, v. 30, p. 359-363, 2004.

CHANG, P.S. et al. Identification of white spot syndrome virus associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 27, p. 131–139, 1996.

CHANG, P. S. et al. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crabs and lobsters by in situ hybridization. **Aquaculture**, v. 164, n. 1-4, p. 233–242, 1998.

CHANG, C. F. et al. Effect of dietary beta-1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 36, p.163–8, 1999.

CHANG, Y. S. et al. A 3D Model of the Membrane Protein Complex Formed by the White Spot Syndrome Virus Structural Proteins. **PLoS ONE**, v.5, e10718, 2010.

CHEN, Z. J.; WANG, C. S.; SHIH, H.H. An assay for quantification of white spot syndrome virus using a capture ELISA. **Journal of Fish Diseases**, v.25, p.249-251, 2002.

CHOU, H.Y. et al. Pathogenicity of a baculovirus infection causing White spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 23, p. 165-173, 1995.

DURAND S., LIGHTNER D.V., NUNAN L.M., REDMAN R.M., MARI J.& BONAMI J.R. Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 27, 59–66, 1996.

DURAND, S.; LIGHTNER, D. V. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. **Journal of Fish Diseases**, v.25, n.7, p.381-389, 2002.

ENGVALL, E.; PEARLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. **The Journal of Immunology**, v. 109(1), p. 129-135, 1972.

ERICKSON, H.S.; ZARAIN-HERZBERG, M.; LIGHTNER, D.V. Detection of Taura syndrome virus (TSV) strain differences using selected diagnostic methods: diagnostic implications in penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 52, p. 1-10, 2002.

ESCOBEDO-BONILLA, C.M. et al. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, v. 31, p. 1–18, 2008.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The State of World aquaculture**. FAO Fisheries Technical Paper 500, Rome, 2006, 134 p.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The State of World Fisheries and Aquaculture**, Roma: SOFIA, 2008, 21p.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **El estado mundial de la pesca y acuicultura**, Roma: SOFIA, 2010, 40p.

FUHRMAN, J.A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. **Nature**, v. 399, p. 541-8, 1999.

FLEGEL, T.W. Special topic review: major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 13, p. 433–442, 1997.

FLEGEL, T.W. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. **Aquaculture**, v. 258, p. 1-33, 2006.

GELDERBLOM H.R. & MÄNNEL, A. **Diagnostic electron microscopy in infectious diseases: up date 2003**. *Microsc. Microanal.*, 9 (suppl.3):432-3, 2003.

GRANJA, C.B., ARANGUREN, L.F., VIDAL, O.M., ARAGON, L., SALAZAR, M. Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*. **Dis. Aquat. Org.** 54, 73–78, 2003.

HAYAT, M.A. & MILLER, S.E. **Negative Staining**. Mc. Graw-Hill Publ. Company. New York, 1990.

JIRAVANICHPAISAL, P; LEE, B.L; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**, v. 211, p. 213-236, 2006.

JOHNSON, K.N.; VAN HULTEN, M.C.; BARNES, A.C. “Vaccination” of shrimp against viral pathogens: phenomenology and underlying mechanisms. **Vaccine**, v. 26, p. 4885-4892, 2008.

KOU, G.T. et al, Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. *In*: FLEGEL, T.W.I (Ed). **Advances in Shrimp Biotechnology** National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, **Bangkok**: Publicação, p. 267–271, 1998.

KUMAR, S.R. et al. Immunological responses of *Penaeus monodon* to DNA vaccine and its efficacy to protect shrimp against white spot syndrome virus (WSSV). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 24, p. 467-478, 2008.

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

LEE, S.Y; SÖDERHÄLL, K. Early events in crustacean innate immunity. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 12, n. 5, p. 421-437, 2002.

LEU, J.H.; TSAI, J.M.; WANG, H.C.; WANG, A.H.C.; WANG, C.H.; KOU, G.H. & LO, C.F. The unique stacked rings in the nucleocapsid of the White Spot Syndrome Virus virion are formed by the major structural Protein VP664, the largest viral structural protein ever found. **J. Virol.**, 79(1):140-9, 2005.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. Shrimp disease and current diagnosis methods. **Aquaculture**, v. 164, p. 201–220, 1998.

LIGHTNER, D.V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. **J. Invertebr. Pathol.**, 106: 110-130, 2011.

LIU, W.; WANG, Y.T.; TIAN, D.S.; YIN, Z.C.; KWANG, J. Detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp by means of monoclonal antibodies (MAbs) specific to an envelope protein (28 kDa). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 49, p. 11-8, 2002.

LIU, W.J. et al. White spot syndrome virus annexes a shrimp STAT to enhance expression of the immediateearly gene iel1. **Journal of Virology**, v. 81, p. 1461-1471, 2007.

LIU, H.; SÖDERHÄLL, K.; JIRAVANICHPAISAL, P. Antiviral immunity in crustaceans. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 27, p. 79-88, 2009.

LO, C.F. et al. Detection and tissue tropism of White spot Baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with special emphasis on reproductive organs. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 30, p. 53-72, 1997.

LOPES, F.; BALDI, M.; CÁRDENAS, L. Parceria no agronegócio dacarcinicultura na perspectiva da imersão estrutural: o caso da Camanor Produtos Marinhos Ltda. **Revista de Administração e Contabilidade da Unisinos**, São Leopoldo, v. 5, n. 2, p. 96-108, maio/ago. 2008.

MAYO, M.A. Virus taxonomy – Houston 2002. **Arch. Virol.** 147 (5), 1071–1076, 2002a.

MAYO, M.A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. **Arch. Virol.** 14 (8), 1655–1656, 2002b.

NUNES, A. J. P. O cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei* em águas oligohalinas. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 11, p. 37-51, 2001.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P.C.C.; GESTEIRA, T.C.V. Carcinicultura ameaçada: Produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). **Panorama da Aqüicultura**, 14: 37-51, 2004.

OIE (World Organization for Animal Health). **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2009**. Paris: OIE, 2009.

OIE [World organisation for animal health](http://www.oie.int/eng/en_index.htm). **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2006**. Disponível em <http://www.oie.int/eng/en_index.htm>. Acesso em 18/06/2013

OSTRENSKY, A. **Estudos para viabilização dos cultivos comerciais de camarões marinhos no litoral do Estado do Paraná, Brasil**. 1997. 235p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

PANTOJA, C. R.; LIGHTNER, D. V. Similarity between the histopathology of white spot syndrome virus and yellow head syndrome virus and its relevance to diagnosis of YHV disease in the Americas. **Aquaculture**, v.218, p.47-54, 2003.

PERAZZOLO, L. M.; BARRACO, M. A. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. **Development & Comparative Immunology**, v. 21, n. 5, p. 385-395, 1997.

PERAZZOLO, L.M.; ROSA, R.R.; BARRACO, M.A. **Defesas Antivirais em Crustáceos: Estado da Arte**. Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos. Cap. 14. p. 315-354. 2012.

PEREIRA, A.M.L; LEGAT, A.P.; LEGAT, J.F.A. As enfermidades ainda ameaçam: o sucesso da carcinicultura pressupõe boas práticas de manejo. **Panorama da Aquicultura**, v. 95, p. 46-47. Maio/junho 2006

POULOS, B.T.; LIGHTNER, D.V.; TRUMPER, B.; BONAMI, J.R. Monoclonal Antibodies to a Penaeid Shrimp Parvovirus, Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV). **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 6, p. 149-154, 1994.

POULOS, B.T.; PANTOJA, C.R.; BRADLEY-DUNLOP, D.; AGUILAR, J.; LIGHTNER, D.V. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 47, p. 13-23, 2001.

POULOS, B. T.; TANG, K. F. J.; PANTOJA, C. R.; BONAMI, J. R.; LIGHTNER, D. V. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 987-996, 2006.

PRIOR, S.; BROWD, C.L.; SHEPARD, E.F.; LAMORE, R.; PARNELL, P.G. Controlled bioassay systems for determination of lethal infective doses of tissue homogenates containing Taura syndrome or white spot syndrome virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 54, p. 89-96. 2003.

RAJEDRAN, K.V. et al. Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crayfish and lobsters from India. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, p. 183–191, 1999.

RAJENDRAN, K. V.; VIJAYAN, K. K.; SANTIAGO, T.C.; RAJAN, J. J. S. White spot syndrome virus (WSSV) infection in tiger shrimp *Penaeus monodon*: A non-lethal histopathological rapid diagnostic method using paraffin and frozen sections. **Aquaculture International**, v.13, n.4, p.341-349, 2005.

REDDY, K.V.; YEDERY, R.D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 536-547, 2004.

ROCHA, I. P. Desempenho da carcinicultura brasileira em 2007: desafios e oportunidades para 2008. **Revista da ABCC**, Recife, ano 10, mar. 2008.

RODRÍGUEZ, J.; LE MOULLAC, G. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p. 109-119, 2000.

ROSENBERRY, B. Aquaculture accounts for 28% of world shrimp production. **Aquaculture Magazine**, 18: 90-91, 1992.

ROSENBERRY, B. World shrimp farming, Anual Report. **Aquaculture Digest**, San Diego, California. 2002.

SEIBERT, C.H.; BORSA, M.; ROSA, R.D.; CARGNIN-FERREIRA, E.; PEREIRA, A.M.L.; GRISARD, E.C.; ZANETTI, C.R.; PINTO, A.R. Detection of major capsid protein of infectious myonecrosis virus in shrimps using monoclonal antibodies. **Journal of Virological Methods**. Ed. 169, p 169-175, 2010.

SEIFFERT, W.Q.; WINCLER, S.; MAGGIONI, D. A mancha branca em Santa Catarina. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 87, p. 51-53 jan/fev, 2005.

SITHIGORNGUL, P.; CHAUYCHUWONG, P.; SITHIGORNGUL, W.; LONGYANT, S.; CHAIVISUTHANGKURA, P.; MENASVETA, P. Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 42, p. 27-34, 2000.

SITHIGORNGUL, P. Monoclonal antibodies against a truncated viral envelope protein (VP28) can detect white spot syndrome virus (WSSV) infections in shrimp. **Science Asia**, v. 30, p. 359-363, 2004.

SOUZA, T.M.D. **Deteção do vírus da mancha branca (WSV) em *Litopenaeus vannamei* por métodos moleculares de diagnóstico: hibridização in situ e pcr em tempo real**. Dissertação de mestrado. 2008. 46 p. Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

SRITUNYALUCKSANA, K. et al. PmRab7 is a VP28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp. **Journal of Virology**, v.80, p. 10734-10742, 2006.

STILLS, J.F. Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. **Institute For Laboratorial Research Journal**, v. 46, p. 280-293, 2005.

TANG, K. F. J.; PANTOJA, C. R.; POULOS, B. T.; REDMAN, R. M.; LIGHTNER, D. V. In situ hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 63, p. 261-265, 2005.

TAPAY, L. M.; NADALA Jr., E. C. B.; LOH, P. C. A polymerase chain reaction protocol for the detection of various geographical isolates of white spot virus. **Journal of Virological Methods**, v.82, p.39-43, 1999.

TAVARES, E.C.B; SANTOS, M.A.S. Estudo exploratório da cadeia produtiva da carcinicultura no estado do Pará: o caso do *Litopenaeus vannamei*. **Amazônia e Desenvolvimento**. Ed. 2, v. 1,

http://www.bancoamazonia.com.br/bancoamazonia2/Revista/cienciaedesenvolvimento_02/Amazonia_Ciencia_Desenvolvimento_8596.pdf > Acesso em: 18/06/2013.

VAN HULTEN, M. C. W.; GOLDBACH, R. W.; VLAK, J. M. Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication. **Journal of General Virology**, v.81, p.2525-2529, 2000.

VIDAL, O.M., GRANJA, C.B., ARANGUREN, F., BROCK, J.A., SALAZAR, M. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with White spot syndrome virus. *J. World Aquacult. Soc.* 32, 364–372, 2001.

WANG, Y.G. et al. Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 39, p. 1–11, 1999.

WANG, Y.T. et al. White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 52, p. 249–59, 2002.

WANG, C. S.; SHIH, H.H. An assay for quantification of white spot syndrome virus using a capture ELISA. **Journal of Fish Diseases**, v.25, p.249-251, 2002

WANG, Y.; ZHANG, X.; YUAN, L.; XU, T.; RAO, Y.; LI, J.; DAI, H. Generation of recombinant monoclonal antibodies to study structure–function of envelope protein VP28 of white spot syndrome virus from shrimp. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 372, p. 902–906, 2008.

WASIELESKY, W. J. **Cultivo de juvenis do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda Penaeidae) no estuário da Lagoa dos Patos: Efeitos de parâmetros ambientais e manejo de cultivo.** 199 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2000.

WU, W.; WANG, L.; ZHANG, X. Identification of white spot syndrome virus (WSSV) envelope proteins involved in shrimp infection. **Virology**, v.332, p.578-583, 2005.

XU, H. et al. The interaction of white spot syndrome virus envelope protein VP28 with shrimp Hsc70 is specific and ATPdependent. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 26, p. 414-421, 2009.

YOGANANDHAN, K.; MUSTHAQ, S. S.; NARAYANAN, R. B.; HAMEED, A. S. S. Production of polyclonal antiserum against recombinant VP28 protein and its application for the detection of white spot syndrome virus in crustaceans. **Journal of Fish Diseases**, v.27, p. 517-522, 2004.

ZHU, F.; QUAN, H.; A New method for quantifying white spot syndrome virus: Experimental challenge dose using TaqMan real-time PCR assay. **Journal of Virological Methods**, v. 184, p. 121–124, 2012.