

Emily Bruna Justino

**“PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES DO SISTEMA IMUNE  
EM LITOPENAEUS VANNAMEI DESAFIADOS COM IMNV,  
APÓS O SILENCIAMENTO VIRAL POR RNAI”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Luciane Maria Perazzolo

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa

Florianópolis/SC  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Justino, Emily Bruna  
PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES DO SISTEMA IMUNE EM  
LITOPENAEUS VANNAMEI DESAFIADOS COM IMNV, APÓS O  
SILENCIAMENTO VIRAL POR RNAI / Emily Bruna Justino ;  
orientadora, Luciane Maria Perazzolo ; coorientador,  
Rafael Diego da Rosa. - Florianópolis, SC, 2015.  
100 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Imunologia  
de Invertebrados. 3. RNA de Interferência. 4. Camarões. 5.  
Assinatura transcricional. I. Perazzolo, Luciane Maria .  
II. Rosa, Rafael Diego da. III. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

Emily Bruna Justino

**“PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES DO SISTEMA IMUNE  
EM LITOPENAEUS VANNAMEI DESAFIADOS COM IMNV,  
APÓS O SILENCIAMENTO VIRAL POR RNAI”**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Florianópolis, 20 de março de 2015.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Yara Maria Raul Muller  
Coordenador do Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e do  
Desenvolvimento

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciane Maria Perazzolo (BEG/CCB/UFSC)  
Orientadora

---

Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa (BEG/CCB/UFSC)  
Orientador

---

Prof. Dr. Luis Fernando Marins (FURG/ICB)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Célia Regina Monte Barardi (UFSC/CCB/MIP)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Yara Costa Netto Muniz (UFSC/CCB/BEG)



Este trabalho é dedicado a Deus e aos meus amados pais.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, pela vida, pelas oportunidades, por iluminar o meu caminho e por estar presente em todo momento;

Aos meus pais, Ediles e Marcos, pelo amor incondicional e apoio absoluto durante toda minha vida, pelo incentivo a cada dia, pelo maravilhoso exemplo de vida. Obrigada por terem criado as condições para que eu pudesse sempre realizar meus sonhos. Amo vocês;

À minha melhor amiga e irmã Evelyn, por todo carinho, amor, companheirismo e apoio prestado em todas as fases da minha vida. Por me incentivar a ser alguém melhor;

Ao meu amado Charles, meu maior incentivador. Obrigada pelo amor, companheirismo, amizade e por não me deixar desistir nos momentos mais difíceis. Você é muito importante na minha vida. Te amo;

Aos meus familiares pelo carinho da vida toda;

À professora Dra. Luciane Maria Perazzolo, por acreditar em mim, pela oportunidade de fazer parte do LIAA e por me orientar não somente no presente trabalho, mas também na vida profissional;

Ao professor Rafael Diego da Rosa, pela orientação, respeito, amizade e pelos conselhos que levarei para toda a vida;

A professora Margherita Barracco pelos conselhos que sempre vieram no momento necessário;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura: Amanda, Jaqueline, Graziela, Adriane, Marcelo e Augusto, por me aturarem nesses dois anos e alegrarem os meus dias;

Ao professor Prof. Rodrigo Maggioni, Rúbens Feijó e todo o pessoal do LABOMAR/UFC que me acolheram durante o período de experimentos. Obrigada pela parceria;

Aos membros da banca: Dr. Luis Fernando Marins (FURG), Dra. Célia Barardi, Dra. Yara Costa Netto Muniz, Dr. Geison Izídio e Dr. Rafael Trevisan que se dispuseram a avaliar e contribuir com sugestões para este trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de Mestrado;

Ao Programa de Pós-graduação Biologia Celular e do Desenvolvimento e a todos os seus docentes, pelo excelente aprendizado a mim disponibilizado;

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pela concessão dos recursos destinados à aquisição de equipamentos e reagentes;

Aos meus amigos da ADFloripa, Tribo da Ilha e HC3 por todo apoio e por alegrarem meus finais de semana.

A todos que direta ou indiretamente estão presentes em minha vida e que contribuem para que ela seja repleta de realizações e alegria, a minha sincera e carinhosa gratidão. **Muito obrigada!**



*“Porque onde estiver o vosso tesouro, ali estará  
também o vosso coração”.*

*São Lucas, I d. C.*



## RESUMO

A incidência de doenças virais tem implicado em significativas perdas econômicas para a carcinicultura. Nesse contexto, a busca por estratégias que aumentem a capacidade dos camarões de sobreviver a surtos virais é de grande interesse para a aquicultura, como ativar as defesas antivirais utilizando a tecnologia de RNA de interferência (RNAi). O presente trabalho avaliou o efeito do silenciamento gênico do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) na sobrevivência de camarões *Litopenaeus vannamei* e no perfil transcricional de genes associados ao seu sistema imune. Animais previamente tratados com dsRNA específico para o genoma do IMNV (dsRNA-IMNV) foram desafiados com uma dose letal desse mesmo vírus ( $1,02 \times 10^6$  cópias virais), enquanto camarões do grupo controle foram tratados com dsRNA vírus-inespecífico (gene IGSF4D de *Danio rerio*). O tratamento com dsRNA-IMNV conferiu uma proteção específica contra o IMNV, levando a uma sobrevivência de 90 % (30 dias), enquanto todos os animais tratados com dsRNA inespecífico morreram em 17 dias. A expressão de 46 genes, de diferentes categorias funcionais, foi quantificada por PCR quantitativa em tempo real nos diferentes grupos experimentais nos tempos 0 h, 24 h e 48 h pós-infecção. Dos genes analisados, 39 (85 %) apresentaram a expressão inalterada em todas as condições analisadas. Por outro lado, seis genes (13 %) pertencentes às categorias funcionais defesa antiviral (*Lv-Ago2* e *LvDcr2*), defesa antimicrobiana (*Litvan ALF-D* e *LvCrustin*), reconhecimento (*LvGal*) e apoptose (*LvIAP*) foram diferencialmente expressos entre os animais que sobreviveram ou não sobreviveram à infecção por IMNV. Em conjunto, a expressão desses genes constitui uma assinatura transcricional associada a uma resposta imune eficaz contra o IMNV. De maneira interessante, o gene de coagulação (*LvClot*) apresentou expressão diferenciada apenas em função do tratamento com o dsRNA inespecífico (24h e 48 h pós-desafio), apresentando maiores níveis de transcritos nos animais que sucumbiram à infecção. A expressão de *LvClot* pode representar assim um indicativo precoce de estado mionecrótico em camarões. Com base nos resultados obtidos no presente estudo, foi possível identificar uma assinatura transcricional em hemócitos de *L. vannamei* associada à indução de proteção antiviral específica nos camarões, utilizando a técnica de RNAi. Assim, este é o primeiro relato da identificação de efetores do sistema imune potencialmente envolvidos na proteção e sobrevivência de camarões frente à infecção pelo IMNV.

Palavras-chave: RNA de interferência (RNAi), Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV), assinatura transcricional, camarão peneídeo.



## ABSTRACT

The incidence of viral diseases has been implied in significant economic losses to the shrimp farming industry. In this context, strategies to improve the ability of shrimp to survive viral outbreaks are a major goal for aquaculture, such as the activation of shrimp antiviral defenses by using the RNA interference (RNAi) technology. The present study evaluated the effect of the RNAi-mediated gene silencing of the Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) on the survival of *Litopenaeus vannamei* shrimp and on the expression profile of genes associated to its immune system. Animals previously treated with dsRNA specific to the IMNV genome (dsRNA-IMNV) were challenged with a lethal dose of the virus ( $1.02 \times 10^6$  viral copies), while shrimp from the control group were treated with a nonspecific dsRNA (dsRNA-IGSF4D from *Danio rerio*). The dsRNA-IMNV treatment provided a specific protection against the IMNV, reaching a survival rate of 90 % (up to 30 days), whereas all animals treated with the nonspecific dsRNA died within 17 days. The expression of 46 genes, from different functional categories, was assessed in all experimental groups at 0 h, 24 h and 48 h post-infection. From those, 36 genes (85 %) did not change their expression pattern in all analyzed conditions. On the other hand, six genes (13 %) from the functional categories antiviral defense (*Lv-Ago2* and *LvDcr2*), antimicrobial defense (*Litvan ALF-D* and *LvCrustin*), microbial recognition (*LvGal*) and apoptosis (*LvIAP*) were differentially expressed between shrimp that survived and not survived to IMNV infection. Taken together, the expression of these genes can be considered as a transcriptional signature associated with an efficient immune response against IMNV. Interestingly, the coagulation gene (*LvClot*) was differently expressed only in the treatment with nonspecific dsRNA (24 h and 48 h post-infection), showing higher levels of transcripts in animals that succumbed to the infection. The expression of *LvClot* could be an indicative of an initial state of myonecrosis in shrimps. Based on these results, it was identified a hemocyte transcriptional signature in *L. vannamei* associated with the induction of a specific antiviral protection in shrimp, using the RNAi approach. Therefore, this is the first report on the identification of immune effectors potentially involved in shrimp protection and survival to IMNV infection.

Key words: RNA interference (RNAi), Infectious Myonecrosis Virus (IMNV), transcriptional signature, penaeid shrimp.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exemplar adulto do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Arquivo do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura – LIAA/UFSC).....**28**
- Figura 2.** Sinais clínicos da enfermidade causada por IMNV em camarões *Litopenaeus vannamei*. **(A)** Necrose muscular evidenciada pela opacidade do último segmento abdominal (indicada pela flecha) e animal sadio, sem necrose muscular (indicado em “a”). Fonte: POULOS et al., 2006. **(B)** Estágio avançado da mionecrose com a presença de coloração avermelhada nos últimos segmentos abdominais. Fonte: PEREIRA et al., 2008. ....**30**
- Figura 3.** Morfologia e estrutura genômica do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV). **(A)** Micrografia eletrônica dos vírions de IMNV (POULOS et al., 2006). **(B)** Estrutura do genoma de RNA dupla fita do IMNV que apresenta duas janelas abertas de leitura (ORF1 e ORF2). Fonte: NIBERT, 2007.....**31**
- Figura 4.** Respostas imunológicas induzidas nos hemócitos após reconhecimento de patógenos, via PRPs plasmáticas ou celulares, e subsequente ativação: degranulação, com liberação de diferentes imunofatores e imunoreguladores; indução e/ou repressão de genes imunológicos; ativação de respostas celulares como fagocitose, formação de nódulos e cápsulas, infiltração e formação de armadilhas extracelulares de ácidos nucleicos. Fonte: BARRACO et al., 2014.....**34**
- Figura 5.** Figura esquemática dos processos celulares dependentes do mecanismo de RNA de Interferência. Os complexos de Dicer e RISC desempenham um papel central na destruição do RNA viral invasor (1), na eliminação de transcritos de elementos móveis (transposons) (2), na regulação da síntese de proteínas (3), e na supressão da transcrição mediada por RNAi (4). O mecanismo também é utilizado quando siRNA são introduzidos na célula experimentalmente para inibir a atividade de genes específicos (5). Fonte: Daneholt, B. The Nobel Prize in Physiology or Medicin 2006 (<http://nobelprize.org>).....**37**
- Figura 6.** Localização no genoma do IMNV das regiões selecionadas (ORF1a: nucleotídeos 197-789 e ORF1b: nucleotídeos 4.239-4.839)

para a síntese das moléculas de dsRNA. nt= nucleotídeos. Adaptado de NIBERT, 2007.....45

**Figura 7.** Esquema explicativo do desenho experimental. No período de pré-infecção, os animais foram injetados com dsRNA (dsRNA-ORF1a, dsRNA-ORF1b ou dsRNA-IGSF4D) ou solução salina. Após 48 h, os animais foram infectados com  $1,02 \times 10^6$  partículas do IMNV. As coletas de hemolinfa ocorreram nos tempos 0, 24 e 48 h após a infecção com IMNV. ....47

**Figura 8.** Percentual de sobrevivência de camarões *Litopenaeus vannamei* desafiados com IMNV e previamente tratados com moléculas de dsRNA IMNV-ORF1a (linha verde), dsRNA IMNV-ORF1b (linha laranja), dsRNA Danio-IGSF4D (linha azul) ou injetados com solução salina (linha rosa).....58

**Figura 9.** Estabilidade dos genes de referência. Média geométrica dos valores de Cq dos genes (A) *LvEF-1 $\alpha$* , *Lv40S6*, *LvS3* e *LvRL40*; (B) *LvEF-1 $\alpha$* , *Lv40S6* e *LvS3*; (C) *LvEF-1 $\alpha$*  e *LvS3*; (D) *vEF-1 $\alpha$* , *LvS3* e *LvRL40*; (E) *LvEF-1 $\alpha$*  e *Lv40S6*; (F) *Lv40S6*, *LvS3* e *LvRL40*; (G) *LvEF-1 $\alpha$* , *Lv40S6* e *LvRL40*; (H) *LvEF-1 $\alpha$*  e *LvRL40*; e valor de Cq dos genes (I) *LvS3*; (J) *LvRL40*; (K) *Lv40S6* e (L) *LvEF-1 $\alpha$* .....60

**Figura 10.** Análise global da expressão de 46 genes associados ao sistema imune de *Litopenaeus vannamei* pré-tratados com dsRNA-IMNV (específico) ou dsRNA-IGSF4D (inespecífico) e infectados 48 h após com uma dose letal do IMNV. Os animais foram analisados logo antes da infecção (tempo 0 h) e 24 h e 48 h após o desafio viral. Os níveis de expressão foram calculados de acordo com o método  $2^{-\Delta Cq}$  normalizado com a média geométrica dos genes *LvEF-1 $\alpha$* , *Lv40S6*, *LvS3* e *LvRL40*. Cada retângulo da matriz corresponde ao valor médio de expressão em uma condição. A intensidade da cor, de verde a vermelho, indica a magnitude de expressão gênica, segundo a escala de cor presente na parte superior da figura. Os diferentes genes (e as categorias funcionais as quais pertencem) estão representados à direita.....62

**Figura 11.** Agrupamento hierárquico dos níveis de expressão de genes diferencialmente expressos em *Litopenaeus vannamei* tratados com dsRNA-IMNV (*LvCrustin*, *Litvan ALF-D*, *LvDcr2*, *LvAgo2*, *LvGal* e *LvIAP*) ou com dsRNA-IGSF4D (*LvClot*), 48 h após desafio com



IMNV. Os níveis de expressão ( $1,5\text{-fold change}$  e  $p < 0,05$ ) foram calculados de acordo com o método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  normalizado com a média geométrica dos genes *LvEF-1 $\alpha$* , *Lv40S6*, *LvS3* e *LvRL40*. A segunda normalização foi realizada utilizando-se como grupo calibrador a média do valor de  $\Delta Cq$  das amostras do tempo 0 h (camarões não infectados). Cada retângulo da matriz corresponde ao valor médio de expressão em um *pool* de animais de uma determinada condição experimental. A intensidade da cor, de verde ao vermelho, indica a magnitude de expressão gênica, segundo a escala de cor presente na parte superior da figura. As condições experimentais estão representadas na parte superior da figura e os diferentes genes representados à direita.....64

**Figura 12.** Perfil de expressão dos genes diferencialmente expressos potencialmente envolvidos na contra o IMNV em *Litopenaeus vannamei* pré-tratados com dsRNA-IMNV, 0 h, 24 h e 48 h após desafio com o IMNV. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão das expressões relativas. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as condições experimentais ( $p < 0,05$ ), obtido através dos testes ANOVA e Tukey. A linha pontilhada (na cor vermelha) indica os níveis de expressão nos animais pré-tratados com dsRNA-IGSF4D.....65

**Figura 13.** Perfil de expressão do gene *LvClot* em *Litopenaeus vannamei* pré-tratados com dsRNA-IMNV (barra preta) e dsRNA-IGSF4D (barra cinza) e analisados 24 h e 48 h após desafio com o IMNV. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão das expressões relativas e as diferenças estatisticamente significativas entre as condições são indicadas por asteriscos ( $p < 0,05$ ), obtidas através dos testes ANOVA e Tukey.....66



## LISTA DE QUADROS

- Tabela 1.** Sequência nucleotídica dos iniciadores e da sonda de hidrólise utilizados para a quantificação do IMNV por RT-qPCR (ANDRADE et al., 2007). .....44
- Tabela 2.** Sequência nucleotídica dos iniciadores utilizados para a amplificação dos produtos de PCR utilizados para a síntese dos dsRNAs (FEIJÓ, 2014). .....50
- Tabela 3.** Sequência nucleotídica dos iniciadores utilizados para RT-qPCR. ....50
- Tabela 4.** Valores de temperatura de dissociação.....59



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ABCC** – Associação Brasileira de Criadores de Camarão

**ANOVA** - análise de variância

**cDNA** – DNA complementar

**CEDECAM** - Centro de Estudos e Diagnóstico de Enfermidade de Organismos Aquáticos

**Cq** - *Cycle quantification* (Ciclo de quantificação)

**DGE** - Digital Gene Expression (expressão digital de genes)

**DNA** - *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

**DNase** – Deoxyribonuclease

**dNTPs** – deoxinucleotídeos trifosfatados

**Dscam** - *Down syndrome cell adhesion molecule* (Molécula de adesão celular da Síndrome de Down)

**dsDNAs** - *double-stranded DNA* (DNA de dupla fita)

**dsRNA** – *double-stranded RNA* (RNA de dupla fita)

**EDTA** – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilendiamino tetra-acético)

**ERN** - espécies reativas de nitrogênio

**ERO** - espécies reativas de oxigênio

**EST** - *Expressed sequence tag* (etiqueta de sequencia expressa)

**FAO** – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

**FREP** - *Fibrinogen-related protein* (proteínas relacionadas a fibrinogênio)

**GFP** - proteína verde fluorescente

**HCL** - *Hierarchical Clustering* (Agrupamento hierárquico)

**IFNs** - interferons

**IDEMA** – Instituto de Desenvolvimento Econômico e Meio Ambiente

**Ig** - imunoglobulina

**IHHNV** – *Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus* (vírus da necrose hipodérmica e hematopoiética)

**IHHNV** – vírus da infecção hipodermal e necrose hematopoiética

**IMNV** – *Infectious Mionecrosis Virus* (vírus da mionecrose infecciosa)

**kDa** – kilodalton

**LIAA** – Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura

**LPS** – Lipopolissacarídeos

**LTA** – Ácido lipoteicóico

**MAS** – Solução de Alsever Modificada

**MCP** - *major capsid protein* (proteína principal do capsídeo)

**MPA** - Ministério da Pesca e Aquicultura

**NIM** - *Infectious Myonecrosis* (Mionecrose infecciosa)

**ORF** – *Open reading frame* (janela de leitura aberta)

**PAMs** - peptídeos antimicrobianos

**Pb** – pares de base

**PCR** - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da Polimerase)

**PPM** – partes por mil

**proPO** - pró-fenoxidase

**PRPs** – *pattern recognition proteins* (proteínas de reconhecimento de padrão)

**PRRs**, *pattern recognition receptors* (receptores de reconhecimento de padrão)

**PstDNV** - *Penaeus stylirostris densovirus*

**qPCR** - *Quantitative Real Time PCR* (PCR quantitativa em tempo real)

**RISC** - *RNA-induced silencing complex* (complexo de silenciamento induzido por RNA)

**RNA** – *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

**RNAi** – RNA de interferência

**RNA<sub>m</sub>** - RNA mensageiro

**RNase** – Ribonuclease

**RNA-Seq** – Sequenciamento de RNA

**RpRd** - RNA polimerase dependente de RNA

**RT-PCR** – *Reverse transcriptase-PCR* (PCR com transcrição reversa)

**RT-qPCR** – *Reverse transcriptase-qPCR* (qPCR com transcrição reversa)

**siRNAs** - *small interference RNAs* (pequenos RNAs de interferência)

**SNP** - *single nucleotide polymorphism* (polimorfismos de nucleotídeo único)

**ssDNA** – *simple-stranded DNA* (DNA de simples fita)

**SSH** - *Suppression Subtractive Hybridization* (Hibridização subtrativa por supressão)

**ssRNA** - *simple-stranded RNA* (RNA de simples fita)

**TM** - *Melting temperature* (temperatura de *Melting*)

**TSV** – *Taura syndrome virus* (vírus da síndrome de Taura)

**VNTR** - *variable number of tandem repeat* (número variável de repetição)

**VSRs** - supressores virais do silenciamento do RNA

**WSSV** – *White Spot Syndrome Virus* (vírus da síndrome da mancha branca)

**YHV** – *Yellow Head Virus* (vírus da cabeça amarela)

$\Delta Cq$  - Cq do gene alvo subtraído do Cq da referência

$\Delta\Delta Cq$  -  $\Delta Cq$  subtraído da condição calibradora

**Obs:** As siglas dos genes utilizados nesse estudo não estão aqui indicadas, uma vez que são apresentadas na Tabela 3.





# SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>27</b>
1.1. A Mionecrose Infecçiosa de camarões.....	28
1.2. O sistema imunológico dos camarões.....	32
1.3. Bases moleculares da resposta imune de camarões.....	38
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>41</b>
2.1 Objetivo geral.....	41
2.2 Objetivos específicos.....	41
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>43</b>
3.1. Camarões.....	43
3.2. Diagnóstico viral.....	43
3.3. Preparo do inóculo viral.....	43
3.4. Quantificação absoluta do IMNV.....	44
3.5. Síntese de moléculas de dsRNA.....	45
3.6. Infecção experimental.....	46
3.7. Coleta de hemolinfa.....	48
3.8. Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	48
3.9. Desenho dos iniciadores.....	49
3.10. PCR quantitativa em tempo real após de Transcrição Reversa (RT-qPCR).....	55
3.11. Análise dos dados de RT-qPCR.....	55
<i>3.11.1. Seleção dos genes de referência.....</i>	<i>55</i>
<i>3.11.2. Cálculo de expressão relativa.....</i>	<i>56</i>
<i>3.11.3 Agrupamentos hierárquicos de expressão gênica.....</i>	<i>56</i>
3.12 Análises estatísticas.....	56
<b>4. Resultados.....</b>	<b>57</b>
4.1 Efeito do silenciamento viral na sobrevivência de camarões ao vírus IMNV.....	57
4.2 Padronização da técnica de RT-qPCR.....	58
4.3 Análise global de expressão gênica.....	61
4.4 Perfil de expressão gênica em função da ativação do sistema de RNA de interferência.....	63
<b>5. Discussão.....</b>	<b>67</b>
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>79</b>
<b>7. Perspectivas .....</b>	<b>81</b>
<b>8. Referências.....</b>	<b>83</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é um dos setores de produção de alimentos que mais cresce em todo mundo, exercendo um importante papel no suprimento da demanda por proteína de origem animal para alimentação humana (FAO, 2014). Essa atividade também contribui para a conservação das populações naturais de peixes, crustáceos e moluscos, ameaçadas pela pesca industrial. O cultivo de organismos aquáticos tem apresentado uma grande expansão mundial nas últimas décadas. De 1980 até 2010, foi registrado um crescimento de 12 vezes na produção, atingindo o recorde de 60 milhões de toneladas e o valor aproximado de US\$ 119 bilhões (FAO, 2014).

A carcinicultura é um dos segmentos da aquicultura que mais tem crescido e em 2010 contribuiu com 55 % da produção mundial de camarões, aproximadamente 4,7 milhões de toneladas, superando a pesca extrativista. Essa atividade também é responsável por milhões de empregos diretos e indiretos em países tropicais, sendo um item fundamental na pauta das exportações de vários países emergentes. Atualmente, os maiores exportadores mundiais de camarões são China e Tailândia na Ásia, e Equador, México e Brasil nas Américas (VALDERRAMA & ANDERSON, 2011; FAO, 2014).

As espécies de camarões peneídeos mais cultivadas no mundo são o camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) e o camarão-tigre-gigante *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) (FAO, 2014). Devido às suas excelentes características zootécnicas, a espécie *L. vannamei* (**Figura 1**) tornou-se o camarão mundialmente mais cultivado. Em 2010, o cultivo desse peneídeo representou 71,8 % da produção mundial, perfazendo aproximadamente 50 % (2,9 milhões de toneladas) do total de crustáceos cultivados no mundo (FAO, 2014).

No Brasil, o camarão *L. vannamei* foi introduzido nos cultivos da região Nordeste na década de 80, sendo posteriormente introduzido na região Sul, em Santa Catarina, no ano de 1998 (COSTA et al., 2000). O Nordeste brasileiro apresenta condições climáticas muito favoráveis para o seu cultivo, onde podem ser obtidas até 2,5 safras por ano (IDEMA, 2006). Em 2012, o Brasil produziu aproximadamente 70 mil toneladas de camarão, sendo que os Estados do Ceará e do Rio Grande do Norte foram responsáveis por cerca de 70 % da produção total (ABCC, 2013).

**Figura 1.** Exemplar adulto do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Arquivo do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura – LIAA/UFSC).



Para uma produção em escala comercial de camarões marinhos é necessária a intensificação dos sistemas de cultivo, sendo preciso maiores investimentos e cuidados no manejo. As restrições mais frequentemente observadas em relação a essa prática são de ordem ambiental (degradação do ambiente e água imprópria), nutricional e sanitária (KAUTSKY et al., 2000). Assim como em qualquer atividade zootécnica, o surgimento de enfermidades na carcinicultura está diretamente associado ao desequilíbrio entre as condições ambientais, o estado de saúde do animal e a presença de agentes potencialmente patogênicos nos sistemas de cultivo (MARTINS, 2006).

As doenças que frequentemente acometem os cultivos podem ser classificadas em infecciosas e não-infecciosas (NUNES & MARTINS, 2002). As infecciosas representam o principal fator limitante para o sucesso da carcinicultura (LIGHTNER, 2011a), sendo aquelas causadas por vírus, bactérias, protozoários e fungos, enquanto que as não-infecciosas são resultantes de agentes abióticos relacionados a fatores nutricionais, genéticos, ambientais e físicos (NUNES & MARTINS, 2002). Entre as doenças infecciosas que afetam camarões nos cultivos, as causadas pelos vírus sobressaem-se como as mais severas, pois não possuem tratamento e causam perdas de aproximadamente 60 % (LIGHTNER et al., 2012). Comparativamente, as perdas advindas por infecções bacterianas representam 20 % das perdas nos cultivos intensivos de camarões (FLEGEL, 2012).

### 1.1. A Mionecrose Infecciosa de Camarões

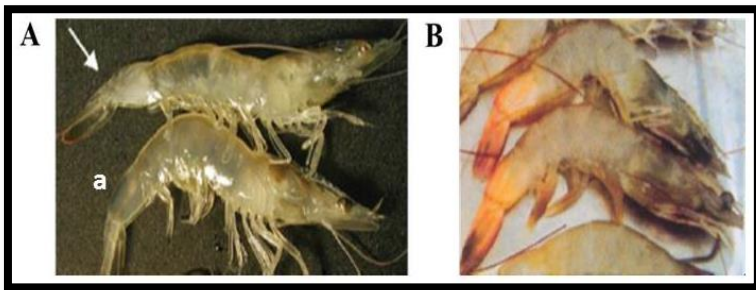
Os principais vírus que acometem os cultivos de camarões peneídeos são: o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV, *White Spot Syndrome Virus*), o vírus da síndrome de Taura (TSV, *Taura*

*Syndrome Virus*), o vírus da cabeça amarela (YHV, *Yellow Head Virus*) e o vírus da necrose hematopoiética e infecção hipodermal (IHHNV, *Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus*) (HASSON et al., 2005; LIGHTNER, 2011b; FLEGEL, 2012). No Brasil, foi detectada uma nova virose denominada Mionecrose Infecciosa, causada pelo vírus da mionecrose infecciosa (IMNV, *Infectious Myonecrosis Virus*). Na carcinicultura brasileira, o WSSV e o IMNV se destacam pelos constantes prejuízos causados à indústria do camarão.

A primeira ocorrência mundial da presença do IMNV foi registrada em cultivos de *L. vannamei* no Estado do Piauí no ano de 2002. Posteriormente, a enfermidade conhecida por NIM (*Infectious Myonecrosis*) foi também encontrada em outros Estados do Nordeste, incluindo Rio Grande do Norte, Pernambuco, Paraíba, Maranhão e Ceará (ANDRADE et al., 2007). A enfermidade foi posteriormente diagnosticada também na Indonésia (SENAPIN et al., 2007). De acordo com os dados da Associação Brasileira de Criadores de Camarões (ABCC), estima-se que as perdas econômicas devido a infecções por IMNV somaram US\$ 100-200 milhões entre 2004 e 2006 (LIGHTNER, 2011b). As espécies de camarões identificadas como susceptíveis ao IMNV são: *L. vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, *P. monodon* e *Farfantepenaeus subtilis* (GOUVEIA & FREITAS, 2007; LIGHTNER et al., 2004; TANG et al., 2005).

O desenvolvimento da NIM ocorre predominantemente em animais de 6 a 10 g, onde a mortalidade inicial pode chegar a 10 %, seguido de uma fase aguda que se caracteriza por perdas de 40 a 80 % dos animais cultivados. Posteriormente, uma fase crônica é identificada, sendo a mortalidade moderada e persistente (COVARRUBIAS, 2010). A enfermidade causada pelo IMNV é caracterizada pela necrose dos músculos estriados do abdômen, apêndices e cefalotórax. No animal, essas lesões se manifestam através de uma opacidade muscular, principalmente no abdômen distal e na cauda, com áreas de aspecto leitoso durante a fase inicial da doença e, em estágios mais avançados, a putrefação das áreas afetadas (**Figura 2**). Em um estágio crônico, as lesões são acompanhadas de uma liquefação dos músculos fibróticos necrosados, apresentando uma coloração avermelhada, dando uma aparência de “camarão cozido” (NUNES et al. 2004). Em estágios mais avançados, o IMNV pode infectar, além do tecido muscular esquelético, outros tecidos e órgãos, tais como órgão linfóide (LIGHTNER et al., 2004), brânquias, intestino, hepatopâncreas, coração, células do tecido conjuntivo e também as células do sistema imune (TANG et al., 2005; POULOS, 2006; KUNANOPPARAT et al., 2011).

**Figura 2.** Sinais clínicos da enfermidade causada por IMNV em camarões *Litopenaeus vannamei*. (A) Necrose muscular evidenciada pela opacidade do último segmento abdominal (indicada pela flecha) e animal sadio, sem necrose muscular (indicado em “a”). Fonte: POULOS et al., 2006. (B) Estágio avançado da mionecrose com a presença de coloração avermelhada nos últimos segmentos abdominais.



Fonte: PEREIRA et al., 2008.

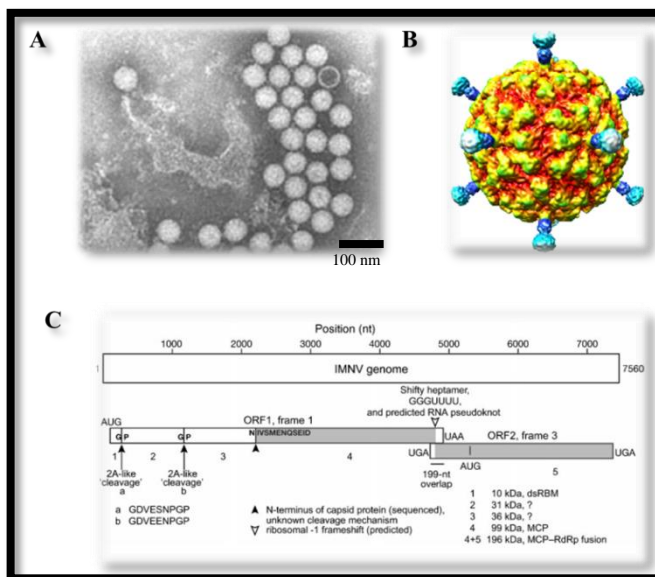
O IMNV é um vírus não envelopado, pertencente à família Totiviridae, possuindo um capsídeo composto por 120 subunidades formadas por uma proteína estrutural de 99 kDa (**Figura 3A**) e pela presença de protrusões (**Figura 3B**). Essas protrusões são de natureza proteica e podem estar envolvidas no processo de adsorção e penetração nas células-alvo (TANG et al., 2008).

O genoma do IMNV é composto por uma única molécula de RNA de dupla fita (dsRNA) de 7.560 pb, apresentando duas janelas abertas de leitura (ORF, *open reading frame*) (**Figura 3C**). A ORF da extremidade 5' (ORF1) é flanqueada pelos nucleotídeos 136-4.953, sendo provavelmente traduzida na forma de uma poliproteína que é subsequentemente clivada em três fragmentos de 93, 284 e 1.228 aminoácidos, respectivamente (NIBERT, 2007). O fragmento de 93 aminoácidos (10 kDa) se localiza na porção N-terminal e apresenta duas regiões denominadas “2A-like” (sequências nonapetídicas). Baseado em estudos com outros vírus de genoma RNA, as regiões “2A-like” se autoclivam aleatoriamente liberando um peptídeo com sequência homóloga às *RNA-binding proteins*, que se ligam a dsRNAs produzidos durante a replicação viral (DONNELLY et al., 2001). A ligação desse fragmento aos dsRNAs virais impediria a ligação de outras proteínas ligantes a RNAs (NIBERT, 2007), como a proteína Dicer (proteína

reconhecida de dsRNA), que inicia a defesa antiviral do hospedeiro através do mecanismo de RNA de interferência.

Sequências “2A-like” também foram encontradas em outros vírus com genoma de dsRNA, como no caso do rotavírus grupo C (família Reoviridae, do gênero *Rotavirus*). Essas sequências estão presentes na proteína viral NS34 e, ao se autoclivarem, liberam um fragmento de 69 aminoácidos, com sequência semelhante às proteínas de ligação a dsRNA (DONNELLY et al., 2001). Assim, pelo menos dois vírus com genoma de dsRNA distintos parecem usar sequências “2A-like” para liberar pequenos fragmentos ligantes a dsRNAs, potencialmente envolvidos na replicação viral e/ou na modulação da resposta imune do hospedeiro (NIBERT, 2007).

**Figura 3.** Morfologia e estrutura genômica do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV). (A) Micrografia eletrônica dos vírions de IMNV (POULOS et al., 2006). (B) Reconstrução tridimensional do IMNV revelando sua estrutura icosaédrica com protrusões, raio de 225 Å (TANG et al., 2008). (C) Estrutura do genoma de RNA dupla fita do IMNV que apresenta duas janelas abertas de leitura (ORF1 e ORF2) (NIBERT, 2007).



Em relação ao fragmento de 1.228 aminoácidos, codificado pela ORF1 do genoma do IMNV, sabe-se que ao sofrer uma clivagem gera outros dois fragmentos com 901 e 327 aminoácidos, respectivamente. O

fragmento de 901 aminoácidos (99 kDa) corresponde à proteína do capsídeo (MCP, *major capsid protein*), enquanto que o fragmento de 327 aminoácidos (38 kDa) tem função desconhecida. Igualmente, não se conhece a função do fragmento de 284 aminoácidos (32 kDa) da ORF1 (NIBERT, 2007).

A ORF2, localizada na extremidade 3' do genoma, é flanqueada pelos nucleotídeos 5.241-7.451 e codifica uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp; 736 aminoácidos, 85 kDa) (POULOS, 2006; NIBERT, 2007; TANG et al., 2008). Essa enzima está presente em todos os vírus com genoma de RNA e catalisa a síntese de RNAs complementares a uma determinada fita de RNA molde, durante a replicação viral (KOONIN et al., 1989; ZANOTTO et al., 1996).

Como mencionado, as enfermidades causadas pelo IMNV geram grandes perdas econômicas na carcinicultura (LIGHTNER, 2011a). Atualmente, a profilaxia e o controle de enfermidades infecciosas nos cultivos, como a NIM, se restringem a boas práticas no manejo, na tentativa de reduzir as condições de estresse dos animais e limitar, assim, a incidência de enfermidades. Dessa forma, torna-se evidente que a prevenção de doenças, especialmente as viroses seja a atual prioridade da carcinicultura, sendo para isso, fundamental o conhecimento prévio dos mecanismos de defesas antivirais de camarões (PERAZZOLO et al., 2012). É importante conhecer também quais são as moléculas envolvidas nas interações vírus-camarão e qual a relação existente entre a suscetibilidade/resistência desses animais frente aos vírus, para o desenvolvimento de ferramentas que contribuam para a sustentabilidade da carcinicultura.

## 1.2. O sistema imunológico dos camarões

Os crustáceos, grupo onde estão incluídos os camarões, contam apenas com um sistema imune do tipo inato. Eles não possuem receptores e anticorpos específicos, assim como linhagens clonais linfocíticas que lhes confirmam uma proteção baseada em memória a longo prazo, como ocorre nos vertebrados mandibulados (BARRACCO et al., 2014). Dessa forma, torna-se inviável o desenvolvimento de vacinas (na concepção clássica desse termo) que os protejam contra infecções reincidentes. No entanto, a recente descoberta de moléculas altamente variáveis contendo domínios de imunoglobulina (Ig) tem mudando o paradigma de que esses animais não sejam capazes de um reconhecimento altamente específico dos patógenos (NG et al, 2014). Em camarões, foram identificadas até o momento duas famílias de



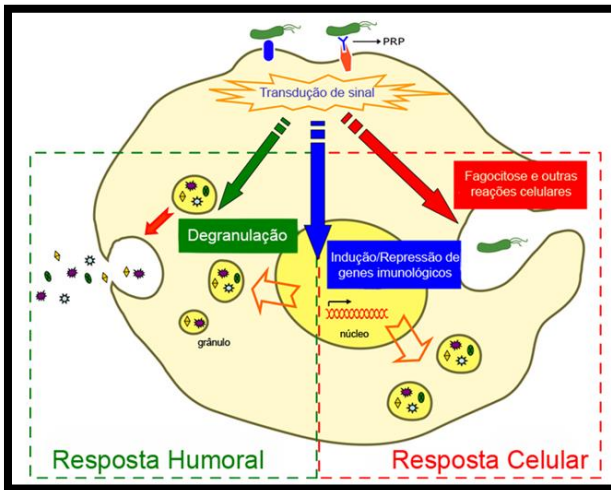
proteínas com domínio Ig altamente diversas, a Dscam (*Down syndrome cell adhesion molecule*) e a FREP (*Fibrinogen-related protein*). A partir de um único gene, podem ser geradas milhares de isoformas diferentes (através de *splicing* alternativo), as quais podem reconhecer uma alta gama de microrganismos (ARMITAGE et al., 2014). De maneira interessante, sabe-se que o contato com um determinado microrganismo gera uma determinada combinação de isoformas, as quais são distintas daquelas geradas por outro estímulo (ARMITAGE et al., 2014). Além disso, estudos mais recentes com invertebrados têm demonstrado que o contato prévio e não letal com um determinado patógeno (*priming*) pode conferir resistência a esse mesmo patógeno numa segunda infecção (*specific primed response*) (PHAM et al 2007; IMLER, 2014). Devido a essas e outras recentes descobertas, alguns autores atribuem a existência de uma *imunidade adaptativa alternativa* nos invertebrados (KURTZ & ARMITAGE, 2006).

De maneira geral, as respostas de defesa dos camarões estão intimamente ligadas ao seu sangue ou hemolinfa, que consiste de uma fração celular, composta pelas células imunocompetentes ou hemócitos, e de uma fração líquida (plasma), onde estão dissolvidos os fatores humorais. Tais respostas são desencadeadas a partir do reconhecimento do agente invasor (ou de seus componentes estruturais) por receptores/proteínas de reconhecimento padrão (PRPs/PRRs, *pattern recognition proteins/receptors*). Essas moléculas, presentes no hospedeiro, reconhecem especificamente padrões moleculares exclusivos de microrganismos (lipopolissacarídeos, peptidoglicanas,  $\beta$ -1,3-glicanas, RNA de dupla fita, entre outros) (ABBAS et al., 2015) e ativam diferentes respostas celulares e humorais de defesa, que atuam em sinergismo na proteção contra os patógenos (**Figura 4**).

As reações celulares de defesa compreendem essencialmente a fagocitose de microrganismos, a formação de cápsulas e nódulos, a infiltração hemocitária e a formação de armadilhas extracelulares de ácidos nucleicos (BARRACCO et al., 2014). A ativação dessas respostas podem acionar diferentes vias imunológicas de sinalização celular (Toll, IMD e JAK/STAT) que levam à produção e liberação de moléculas citotóxicas, como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN), peptídeos antimicrobianos (peneidinas, fatores anti-lipopolissacarídeos, crustinas e stylicinas) e enzimas hidrolíticas (lisozimas, proteases, lipases, entre outras) (BARRACCO et al., 2014). Além dessas, respostas humorais de defesas podem ser ainda ativadas, como a melanização desencadeada pelo sistema de ativação da pró-

fenoloxidase (proPO), a coagulação da hemolinfa e a aglutinação celular mediada por lectinas (**Figura 4**)

**Figura 4.** Respostas imunológicas induzidas nos hemócitos após reconhecimento de patógenos, via PRPs plasmáticas ou celulares, e subsequente ativação: degranulação, com liberação de diferentes imunofetores e imunoreguladores; indução e/ou repressão de genes imunológicos; ativação de respostas celulares como fagocitose, formação de nódulos e cápsulas, infiltração e formação de armadilhas extracelulares de ácidos nucleicos.



Fonte: BARRACO et al., 2014.

Além das respostas antimicrobianas, os camarões contam ainda com mecanismos antivirais de defesa, ainda pouco conhecidos quando comparados aos mecanismos antimicrobianos. O primeiro relato de uma defesa antiviral em camarões foi descrito por Robalino e colaboradores (2004; 2005) e trabalhos posteriores apontam que esses animais contam com uma defesa antiviral mediada basicamente por três mecanismos: apoptose celular e autofagia, produção de citocinas do tipo interferon (*interferon-like*) e o sistema de RNA de interferência (RNAi) (PERAZZOLO et al., 2012).

A apoptose e a autofagia são processos fisiológicos de reciclagem e morte celular e que nos últimos anos têm sido associados a mecanismos de proteção celular contra vírus (PERAZZOLO et al., 2012). A indução desses mecanismos em camarões tem sido demonstrada

em resposta a uma variedade de estímulos, incluindo infecções pelos vírus WSSV e YHV (SAHTOUT et al., 2001; WONGPRASERT et al., 2003; KHANOBDEE et al., 2002). No camarão *Marsupenaeus japonicus*, foi verificado que o silenciamento pós-transcricional de genes pró-apoptóticos da família das caspases resultou numa inibição significativa da apoptose induzida por WSSV e no aumento das cópias virais no animal. Cabe salientar que a indução da apoptose só é efetiva como resposta antiviral se for acionada num estágio precoce da infecção, podendo limitar a produção de partículas virais e reduzir ou eliminar a propagação da progênie viral para outros tecidos (XU et al., 2014).

Outro mecanismo envolvido na defesa antiviral de camarões consiste na produção de citocinas análogas aos interferons (IFNs) de mamíferos (*interferon-like*). Os IFNs são citocinas que interferem na replicação viral e induzem um estado antiviral inespecífico no hospedeiro (HARPENI et al., 2011). Robalino e colaboradores (2004) mostraram pela primeira vez existir uma defesa antiviral nos crustáceos, através da injeção de dsRNA de sequência viral-inespecífica em camarões. A injeção dessas moléculas causou um aumento significativo na sobrevivência de camarões a infecções pelos vírus WSSV e TSV. Esses resultados mostraram que a indução de um estado antiviral inespecífico em crustáceos é independente da sequência de dsRNA injetada, muito semelhante ao estado antiviral produzido pelos IFNs de mamíferos. Contudo, nos invertebrados, mais especificamente nos camarões, nenhum ortólogo dos IFNs de mamíferos foi até o momento identificado (BARRACCO et al., 2014).

O último mecanismo de defesa antiviral de camarões, ativado por dsRNA viral, é baseado no silenciamento pós-transcricional de genes, conhecido por RNA de interferência ou RNAi (HANNON, 2002; ROBALINO et al., 2007). Nesse processo, o dsRNA desencadeia a destruição do RNA mensageiro (RNAm) homólogo à sua própria sequência. O RNAi representa um mecanismo de defesa natural contra vírus e transposons, presente em plantas, fungos, animais vertebrados e invertebrados e em alguns protozoários (HANNON, 2002). Diferentemente do sistema IFN, que é induzido por qualquer sequência de dsRNA, a proteção antiviral baseada no sistema RNAi é sequência-específica.

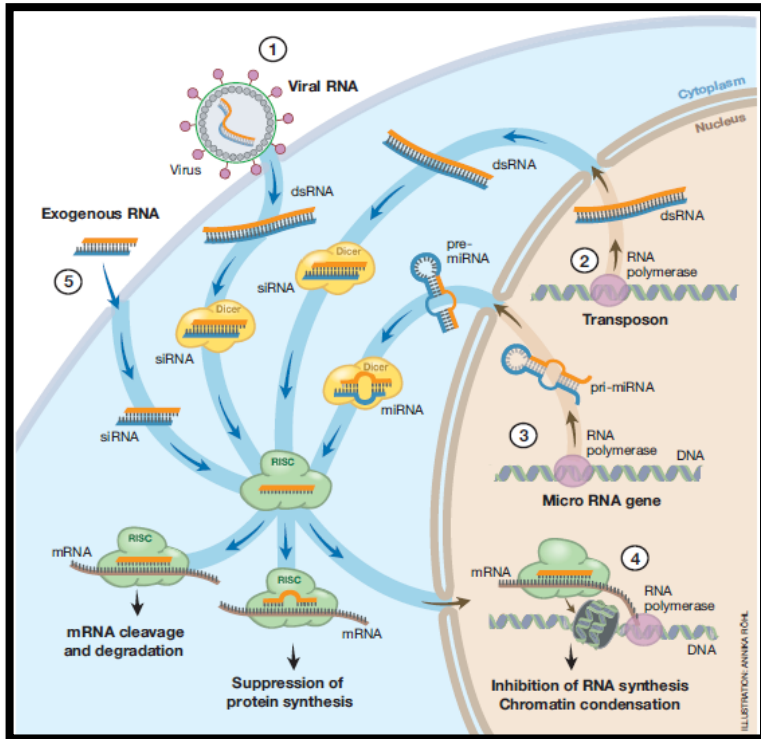
A existência de uma defesa antiviral específica em camarões foi demonstrada pela primeira vez por Robalino e colaboradores (2005) em *L. vannamei*, onde injeções com dsRNA de sequências específicas que codificam para proteínas virais (WSSV ou TSV) resultaram em uma

proteção profilática, praticamente completa contra infecções por esses vírus. Desde esse primeiro estudo, outros se seguiram, demonstrando a atividade antiviral específica do RNAi contra o WSSV (MEJÍA-RUÍZ et al., 2011; GUERTLER et al., 2013). A ativação desse sistema inicia-se pelo processamento de precursores de dsRNA longos em dsRNAs pequenos (21-25 pb), chamados de *small interference RNAs* (siRNAs), pela ação de um complexo proteico contendo a enzima Dicer, que são endoribonucleases do tipo III que clivam especificamente dsRNA ou regiões de grampo de RNAs de fita simples (ALIYARI & DING, 2009). Os siRNAs resultantes são então incorporados a um complexo multiproteico de silenciamento induzido por RNA ou RISC (*RNA-induced silencing complex*), que conduz à degradação específica ou à repressão da tradução de RNAm com regiões complementares à sequência do dsRNA desencadeante (**Figura 5**).

Em camarões, alguns genes das principais proteínas envolvidas na via de RNAi, como a Dicer (considerada uma PRP que reconhece vírus) e a Argonauta (proteína *slicer* do RISC) foram clonados em *P. monodon* (UNAJAK et al.; 2006; DECHKLAR et al.; 2008) e *L. vannamei* (LABREUCHE et al., 2010; YAO et al., 2010; CHEN et al., 2011). Uma das proteínas que interage com a Dicer, para formar o primeiro complexo do sistema RNAi, é a proteína de ligação a RNA em resposta à indução da expressão gênica (TRBP), que possui três domínios de ligação com o dsRNA. A TRBP funciona como uma ponte entre o dsRNA e a Dicer para permitir o recrutamento da Argonauta-2. Nos camarões *M. japonicus* e *Fenneropenaeus chinensis*, um ortólogo da TRBP foi identificado e parece estar associado à resposta antiviral frente ao WSSV (WANG et al., 2012).

Entre as proteínas-chave do sistema de RNAi, destacam-se as da família das Argonautas, que são componentes fundamentais do complexo RISC (HAMMOND et al., 2001). A estrutura dessas proteínas é constituída por um domínio N-terminal PAZ, que reconhece e interage com 2 pb dos siRNA, e um domínio C-terminal PIWI, com atividade de RNase e que a caracteriza como uma proteína *slicer* do RISC (PARKER & BARFORD, 2006; RONEMUS et al., 2006). Em *L. vannamei*, foram identificadas duas Argonautas, *Lv-ago1* e *Lv-ago2* (LABREUCHE et al., 2010).

**Figura 5.** Figura esquemática dos processos celulares dependentes do mecanismo de RNA de Interferência. Os complexos de Dicer e RISC desempenham um papel central na destruição do RNA viral invasor (1), na eliminação de transcritos de elementos móveis (transposons) (2), na regulação da síntese de proteínas (3), e na supressão da transcrição mediada por RNAi (4). O mecanismo também é utilizado quando siRNA são introduzidos na célula experimentalmente para inibir a atividade de genes específicos (5).



Fonte: Daneholt, B. The Nobel Prize in Physiology or Medicin 2006 (<http://nobelprize.org>).

O mecanismo de incorporação do dsRNA pela célula e o fenômeno de propagação sistêmica do silenciamento já foram descritos no nematoide *Caenorhabditis elegans* e na mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, e parecem estar ligados a dois mecanismos distintos: (a) transferência do dsRNA ao citosol por um canal proteico transmembrana denominado Sid-1 (*systemic interference defective*); e/ou (b) endocitose, utilizando receptores *scavenger* de reconhecimento padrão (HUVENNE & SMAGGHE, 2010). Em *L. vannamei*, um gene

homólogo da Sid-1 (*Lv-Sid1*) foi identificado, cujos níveis de transcritos aumentaram após injeções com dsRNA de sequência não-específica (LABREUCHE et al., 2010). Esses resultados indicam que o dsRNA ativa a transcrição do gene *Lv-Sid1* e sugerem um potencial papel da Sid-1 na captação dos dsRNAs pelas células dos camarões.

A indução de defesa antiviral específica por meio da injeção de moléculas de dsRNA com sequência viral-específica, tem sido bastante efetiva para silenciar vários vírus de camarões (LA FAUCE & OWENS, 2012), mesmo quando utilizadas em camarões desafiados com altas concentrações virais. Conseqüentemente, o RNAi tem papel fundamental na imunologia antiviral em invertebrados e sua ativação por moléculas de dsRNA sintéticas tem aberto a possibilidade do desenvolvimento de métodos profiláticos ou terapêuticos para controle de viroses em camarões cultivados. A inibição e limitação da replicação viral no hospedeiro utilizando essa tecnologia tem se tornado bastante atrativa na carcinicultura, principalmente quando se considera a impossibilidade do desenvolvimento de vacinas para animais invertebrados (ROBALINO et al. 2007).

Além da injeção de um dsRNA de sequência específica atuar na prevenção contra a infecção por vírus, um efeito terapêutico do mesmo foi demonstrado quando desafiados com o YHV (ASSAVALAPSAKUL et al., 2009; TIRASOPHON et al., 2007) ou IMNV (LOY, 2013; FEIJÓ, no prelo) e posteriormente injetados com um dsRNA de sequência viral-específica. Os resultados mostraram uma forte inibição da replicação viral, e conseqüentemente, elevadas taxas de sobrevivência. Esses trabalhos indicam que a técnica do RNAi pode ser utilizada tanto para fins profiláticos, prevenindo uma infecção viral, quanto para fins terapêuticos, reduzindo/eliminando a infecção em animais já infectados. Dessa forma, a utilização dessa técnica vem despontando no cenário científico internacional como uma ferramenta promissora e efetiva para o controle de viroses em camarões cultivados (LIU et al., 2009). No entanto, uma possível utilização na carcinicultura carece ainda de viabilidade, sendo necessários ainda mais estudos para permitir a sua utilização prática como terapia antiviral em camarões.

### *1.3. Bases moleculares da resposta imune de camarões*

A aplicação de técnicas genômicas e transcriptômicas na área de imunologia de camarões tem contribuído substancialmente para um melhor entendimento do sistema imune desses animais e a relação desses com patógenos de grande interesse para a carcinicultura

(ROBALINO et al., 2009). Os primeiros estudos transcriptômicos em camarões datam do início dos anos 2000, com a construção de bibliotecas de EST (*Expressed Sequence Tags*) de hemócitos e hepatopâncreas das espécies *Litopenaeus setiferus* e *L. vannamei* e de hemócitos de *P. monodon* (GROSS et al., 2001; SUPUNGUL et al., 2002). A partir desses estudos iniciais, diferentes efetores da resposta imune de camarões, homólogos aos já descritos em outras espécies, puderam ser identificados e caracterizados (BARTLETT et al., 2002; SUPUNGUL et al., 2004; ROBALINO et al., 2009).

Com o advento das tecnologias de sequenciamento de nova geração e de análise de expressão gênica em larga escala, novos estudos foram conduzidos com o objetivo de se identificar os mecanismos moleculares envolvidos nas respostas de defesa dos camarões frente aos vírus TSV (VELOSO et al., 2011; ZENG et al., 2013; SOOKRUKSAWONG et al., 2013), WSSV (ROBALINO et al., 2007; CHEN et al., 2013; LI et al., 2013) e YHV (PONGSOMBOON et al., 2008; PRAPAVORARAT et al., 2010). Apesar do número expressivo de estudos transcriptômicos realizados, o genoma de nenhuma espécie de camarão, incluindo as de grande interesse comercial, foi ainda inteiramente sequenciado. Do subfilo Crustacea, o único genoma completo publicamente disponível é o do microcrustáceo *Daphnia pulex* (COLBOURNE et al., 2011). Mesmo que os estudos de genômica funcional estejam apenas iniciando em camarões, em comparação a outros modelos biológicos, a análise de bibliotecas de EST (CLAVERO-SALAS et al., 2007; LEU et al., 2007; PREECHAPHOL et al., 2007), SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*) (ROBALINO et al., 2007; REYES et al., 2007; ZHAO et al., 2007), RNA-Seq (XUE et al., 2013; SANTOS et al., 2014; WEI et al., 2014) e DGE (Digital Gene Expression) (ROBALINO et al., 2009; ZHAO et al., 2014) e do perfil de expressão por microarranjos de DNA (DHAR et al., 2003; WANG et al., 2006) têm proporcionado uma riqueza de dados e apontam novos caminhos para as pesquisas.

Mais recentemente, esses estudos têm sido mais direcionados para a identificação de marcadores moleculares associados à resistência e/ou à capacidade de sobrevivência de animais aquáticos a doenças infecciosas. A grande maioria desses estudos está focado na identificação de polimorfismos genéticos (VNTR: *variable number of tandem repeat*, SNP: *single nucleotide polymorphism*) em determinadas regiões do genoma (HOA et al., 2011; VALENZUELA-MIRANDA et al., 2014; YU et al., 2014; LIU et al., 2014). Além desses, estudos mais recentes têm avaliado os padrões de expressão e regulação

de genes associados a fenótipos de resistência ou suscetibilidade a doenças. Essas "assinaturas de expressão gênica" referem-se a uma combinação de genes, cujos padrões de expressão são marcadores de um estado fisiológico específico, como resistência a infecções e suscetibilidade a doenças genéticas (Van 'T VEER et al., 2002; Van DE VIJVER et al., 2002).

Assinaturas de expressão gênica têm sido identificadas como marcadores moleculares de resistência/suscetibilidade em humanos, onde melhoram consideravelmente o diagnóstico e a compreensão de doenças genéticas complexas e como se dá a patogênese da doença (RAMILO et al., 2007; ARDURA et al., 2009; BERRY et al., 2010; PASCUAL et al., 2010). Essa ferramenta molecular vem sendo também utilizada para a identificação de marcadores de resistência a infecções em animais de interesse comercial, na área agrícola e de pesca (BERTHIER et al., 2003; ORDAS et al., 2010). Em espécies aquáticas, os estudos transcriptômicos realizados têm sido direcionados para a identificação de genes associados à resistência a doenças bacterianas (de LORGERIL et al., 2005; HEGEDUS et al., 2009; ROSA et al., 2012).

Estudos transcriptômicos comparativos permitiram a identificação de genes envolvidos na capacidade de camarões *L. stylirostris* de sobreviver a infecções por bactérias do gênero *Vibrio* (de LORGERIL et al., 2005). Em um segundo estudo, de Lorgeril e colaboradores (2008) mostraram que os níveis de expressão basal de genes relacionados às respostas antimicrobianas podem discriminar camarões capazes ou não de sobreviver a infecções pelo patógeno *Vibrio penaeicida*.

Até o momento, nenhum marcador molecular associado à capacidade de camarões de sobreviver ao IMNV foi ainda identificado. Menor atenção ainda tem sido destinada aos mecanismos moleculares implicados na proteção antiviral conferida pelo sistema de RNAi (sequência-específica) em camarões. Frente ao exposto, o presente estudo propõe um estudo pioneiro e original para a identificação dos genes potencialmente envolvidos na sobrevivência e conferir uma resposta eficaz (mediada por RNAi) em camarões da espécie *L. vannamei* frente a infecções letais pelo IMNV. A identificação de genes associados à proteção ao IMNV poderá fornecer genes candidatos para a seleção de reprodutores ou mesmo para o monitoramento de camarões menos susceptíveis a este vírus nos cultivos.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivo Geral*

Avaliar o efeito do silenciamento gênico do vírus IMNV via RNA de interferência, na sobrevivência de camarões *Litopenaeus vannamei* e no perfil transcricional de genes associados ao seu sistema imune.

### 2.2 *Objetivos Específicos*

2.2.1 Avaliar a proteção antiviral conferida pelos tratamentos com dsRNA sequência IMNV-específica e IMNV-não específica;

2.2.2 Investigar o perfil de expressão de genes hemocitários em camarões tratados com dsRNA específico para o IMNV e posteriormente desafiados com o vírus;

2.2.3 Identificar uma assinatura molecular associada à sobrevivência de camarões infectados pelo IMNV, cuja defesa antiviral tenha sido previamente induzida por RNAi



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Camarões

Foram utilizados 300 camarões juvenis da espécie *Litopenaeus vannamei* ( $8 \pm 1$  g), de ambos os sexos, provenientes de um cultivo localizado no município de Eusébio /CE. Os animais foram transportados e mantidos no Centro de Estudos e Diagnóstico de Enfermidade de Organismos Aquáticos (CEDECAM, Fortaleza), onde foram aclimatados por 30 dias em seis tanques de 500 L (50 animais/tanque), cuja água foi renovada diariamente (100 %) e os parâmetros físico-químicos da água foram mantidos com salinidade de 30 ppm, 28 °C e 5,5 mg/L de oxigênio. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com a ração comercial Poli-Nutri (POLI-CAMARÃO-350) a uma biomassa de 3,5 % do peso corporal.

#### 3.2. Diagnóstico viral dos camarões

Antes do início dos experimentos, os camarões foram previamente avaliados quanto à presença de três vírus: WSSV, IHNV (vírus de DNA) e IMNV (vírus de RNA). A detecção do WSSV e IHNV foi realizada por PCR convencional utilizando-se os iniciadores e condições de amplificação descritos por NUNAN & LIGHTNER (2011) e TANG & LIGHTNER (2001), respectivamente, a partir de amostras de DNA genômico extraídas de hemócitos. A detecção do IMNV foi realizada por RT-PCR convencional utilizando-se os iniciadores e condições de amplificação descritos por SENAPIN e colaboradores, 2007, a partir de amostras de RNA total extraídas de hemócitos.

#### 3.3. Preparo do inóculo viral (IMNV)

O preparo do inóculo foi realizado segundo protocolo adaptado de Prior e colaboradores (2003), a partir de tecido muscular de camarões apresentando lesões características de infecção por IMNV e diagnosticados como positivos somente para esse vírus. O tecido foi homogeneizado em tampão Tris-NaCl gelado (330 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,4; 1:10; p:v) e imediatamente centrifugado a  $4.000 \times g$  por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado, filtrado ( $0,45 \mu m$ ) e centrifugado a  $8.000 \times g$  por 30 min a 4 °C. O extrato viral obtido foi

novamente filtrado (0,22  $\mu\text{m}$ ), aliquotado e armazenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para uso posterior.

### 3.4. Quantificação absoluta do IMNV

A quantificação absoluta do número de cópias do IMNV no inóculo viral foi realizada por PCR quantitativa em tempo real após transcrição reversa (RT-qPCR) utilizando-se a plataforma 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems<sup>®</sup>), segundo protocolo descrito por Andrade e colaboradores (2007). As reações de RT-qPCR foram realizadas em um volume final de 10  $\mu\text{L}$  contendo 5  $\mu\text{L}$  de *Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG 2 $\times$*  (Invitrogen<sup>®</sup>), 0,3  $\mu\text{M}$  de cada iniciador, 0,15  $\mu\text{M}$  da sonda de hidrólise IMNVp1 (**Tabela 1**), 0,2  $\mu\text{L}$  do corante de referência passiva *Rox*, 1  $\mu\text{L}$  de cDNA e 3,05  $\mu\text{L}$  de água ultrapura (Invitrogen<sup>®</sup>). As condições de amplificação foram: 50  $^{\circ}\text{C}$  por 2 min, seguido por desnaturação inicial a 95  $^{\circ}\text{C}$  por 2 min e 40 ciclos de a 95  $^{\circ}\text{C}$  por 15 s (desnaturação) e 60  $^{\circ}\text{C}$  por 30 s (hibridização/extensão). Os dados foram coletados durante a etapa de extensão.

O número de cópias virais foi determinado através de uma curva padrão com concentrações conhecidas do IMNV, utilizando como material inicial um produto de 593 pb do IMNV clonado no vetor *pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO vector* (Invitrogen<sup>®</sup>), denominado pTOPO-IMNV.1. Uma série de sete diluic es seriadas do pTOPO-IMNV.1 ( $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  e  $10^2$  cópias do IMNV) foram adicionados à qPCR e o número de cópias virais de cada amostra foi determinado de acordo com o *software* SDS 1.3.1 (Applied Biosystems<sup>®</sup>).

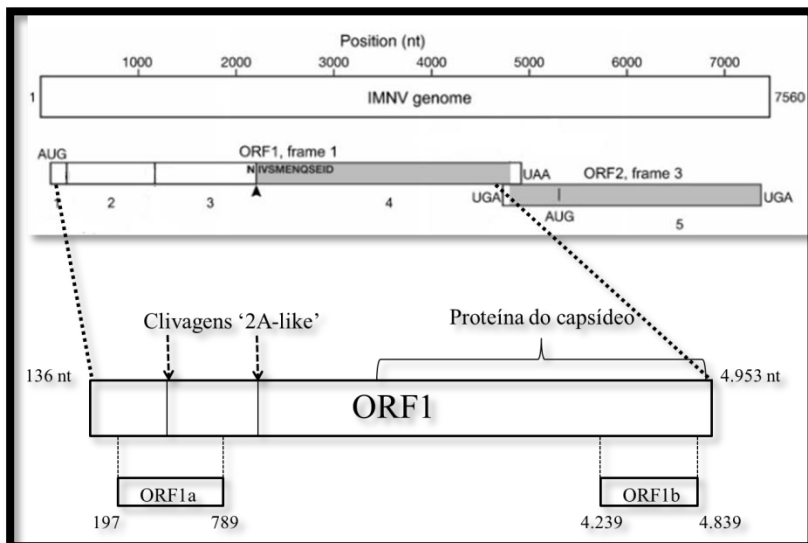
**Tabela 1.** Sequência nucleotídica dos iniciadores e da sonda de hidrólise utilizados para a quantificação do IMNV por RT-qPCR (ANDRADE et al., 2007).

Nome	Sequência (5' - 3')	Amplificado (pb)
IMNV412F	GGACCTATCATACATAGCGTTTGCA	134
IMNV545R	AACCCATATCTATTGTCGCTGGAT	
IMNVp1	6FAM-CCACCTTTACTTTCAATACTACATCATCCCCGG-TAMRA	

### 3.5. Síntese de moléculas de dsRNA

As moléculas longas de RNA de dupla fita (dsRNA) foram sintetizadas no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande (ICB/FURG). Esses dsRNAs sintetizadas são correspondentes a duas regiões da ORF1 do genoma do IMNV, foram sintetizadas a partir de fragmentos de PCR amplificados por iniciadores contendo a sequência do promotor do bacteriófago T7 na extremidade 5' (**Tabela 2**). A primeira região da ORF1 corresponde à porção flanqueada pelos nucleotídeos 197 e 789 (dsRNA-ORF1a) e codifica proteínas de ligação a dsRNA, enquanto a segunda região, flanqueada pelos nucleotídeos 4.239 e 4.839 (dsRNA-ORF1b), codifica a proteína do capsídeo viral (**Figura 6**).

**Figura 6.** Localização no genoma do IMNV das regiões selecionadas (ORF1a: nucleotídeos 197-789 e ORF1b: nucleotídeos 4.239-4.839) para a síntese das moléculas de dsRNA. nt= nucleotídeos.



Fonte: Adaptado de NIBERT, 2007.

Inicialmente, realizou-se a amplificação dos fragmentos ORF1a e ORF1b por PCR convencional a partir de cDNA reversamente transcrito de 100 ng de RNAm extraídos de pleópodos de camarões diagnosticados positivos para o IMNV. A esse material foi acrescido 200  $\mu$ M de dNTP,

0,4  $\mu\text{M}$  de cada iniciador, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  e 1 U da enzima *Taq Platinum* (Invitrogen<sup>®</sup>), em um volume final de reação de 12,5  $\mu\text{L}$ . As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, hibridização dos iniciadores a 62 °C por 40 s, extensão a 72 °C por 30 s e extensão final a 72 °C por 7 min.

Os produtos de PCR foram então precipitados com etanol absoluto (Merck<sup>®</sup>), na presença de 0,3 M de acetato de sódio, e purificados com o sistema de membranas *Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega<sup>®</sup>), conforme recomendações do fabricante. A transcrição *in vitro* das moléculas de dsRNA foi realizada com o kit *T7 RiboMAX<sup>™</sup> Express Large Scale RNA Production System* (Promega<sup>®</sup>), de acordo com as seguintes etapas de incubação: 42 °C por 4 h e 70 °C por 10 min; seguida de uma redução gradual da temperatura (0,5 °C por 20 s) até atingir 20 °C. Para assegurar a presença de somente moléculas de dsRNA corretamente hibridizadas, a solução foi então incubada com DNase I e com RNase A (visando a degradação respectiva de dsDNAs/ssDNA e ssRNA), na presença de 0,5 M de NaCl, a 37 °C por 30 min. Proteínas, nucleotídeos livres e resíduos de ácidos nucleicos possivelmente presentes na reação de transcrição foram removidos em colunas *Wizard<sup>®</sup> SV Minicolumns* (Promega<sup>®</sup>) em presença de 4 M de tiocianato de guanidina diluído em 0,01 M Tris-HCl (pH 7,5). As moléculas de dsRNA foram então eluídas com 100  $\mu\text{L}$  de TE-salina (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl, pH 7), aliqüotadas, quantificadas por espectrofotometria (*NanoVue plus<sup>™</sup>*) e acondicionadas a -80 °C, para uso posterior.

Como dsRNA controle (sequência não relacionada a genes virais ou do camarão), selecionou-se uma região codificadora para uma imunoglobulina do peixe *Danio rerio* (*vertebrate immunoglobulin superfamily, member 4D* ou IGSF4D: nucleotídeos 4.568-5.246). Esse dsRNA foi aqui denominado dsRNA-IGSF4D, sendo sintetizado a partir de amostras de DNA genômico extraídas do cérebro de *D. rerio*, utilizando-se o mesmo protocolo acima descrito.

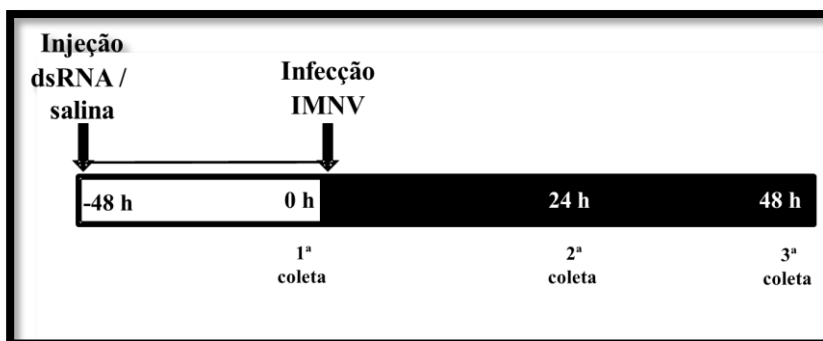
### 3.6. Infecção experimental

Para a infecção experimental, 240 animais foram individualmente alocados em aquários plásticos (5,5 L) contendo aeração constante e renovação diária da água de 50 %. A infecção experimental realizou-se no CEDECAM em Fortaleza-CE. Um grupo de 60 animais foi injetado com dsRNA-ORF1a e outro grupo de 60 animais com o dsRNA-ORF1b.

Como controle, 60 animais foram injetados com dsRNA inespecífico (dsRNA-IGSF4D) e 60 animais injetados com solução salina (330 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,4). As injeções de dsRNA (2 µg/g de peso corporal) e solução salina foram realizadas num volume de 100 µL entre o primeiro segmento abdominal e o cefalotórax, na região dorsal. Após 48 h dessa injeção, todos os animais foram infectados com 100 µL de uma solução contendo  $1,02 \times 10^6$  cópias genômicas do IMNV (dose letal segundo Feijó, 2014), na mesma região onde foram injetados os dsRNAs (**Figura 7**).

Para a verificação da mortalidade, os camarões foram mantidos no sistema por 30 dias. Dezoito camarões injetados com dsRNA específico (dsRNA IMNV-ORF1a e dsRNA-IMNV-ORF1b) e nove animais injetados com dsRNA inespecífico (dsRNA Danio-IGSF4D), foram amostrados no tempo 0 h (momento antes da injeção do inóculo viral - 1ª coleta) e 24 h e 48 h após a injeção do inóculo viral (2ª e 3ª coleta, respectivamente). Os animais injetados com a solução salina foram utilizados para verificação da mortalidade. Todos os dados gerados desde a aclimação dos animais até a infecção experimental foram realizados em parceria com Feijó e colaboradores (no prelo).

**Figura 7.** Esquema explicativo do desenho experimental. No período de pré-infecção, os animais foram injetados com dsRNA (dsRNA-ORF1a, dsRNA-ORF1b ou dsRNA-IGSF4D) ou solução salina. Após 48 h, os animais foram infectados com  $1,02 \times 10^6$  partículas do IMNV. As coletas de hemolinfa ocorreram nos tempos 0, 24 e 48 h após a infecção com IMNV.



### 3.7. Coleta de hemolinfa

A hemolinfa dos camarões (3 grupos de 3 animais/grupo experimental) foi extraída da região ventral do abdômen, entre o último esternito cefalotorácico e o primeiro abdominal, por inserção de uma agulha (13 × 0,4 mm) acoplada a uma seringa estéril de 1 mL. A hemolinfa foi coletada na presença da solução anticoagulante MAS (Solução de Alsever Modificada: 336 mM NaCl, 115 mM glicose, 27 mM citrato de sódio, 9 mM EDTA, pH 7,2) (diluição 1 hemolinfa:2 MAS). A mistura foi centrifugada (1.000 ×g por 10 min a 4 °C), e após o sobrenadante ser descartado, o precipitado celular foi suspenso em 1 mL de Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>) e armazenado a -20 °C para posterior extração de RNA total.

### 3.8. Extração de RNA total e síntese de cDNA

Para extração do RNA total, os hemócitos conservados em Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>) foram homogeneizados e submetidos à extração com clorofórmio (5 Trizol:1 clorofórmio) e após centrifugação (12.000 ×g por 15 min a 4° C), o RNA obtido foi precipitado com isopropanol (2:1 Trizol:isopropanol) e hidratado com etanol 75 %. O precipitado de RNA foi suspenso em água livre de DNA/RNA/DNases/RNases. Em seguida, as amostras foram tratadas com 1 U de DNase I (Thermo Scientific<sup>®</sup>) e a mistura incubada por 15 min a 20 °C. Após a inativação da DNase I (65 °C, 15 min), as amostras foram precipitadas com 0,3 M acetato de sódio (pH 5,2) e isopropanol (v:v). Finalmente, o RNA foi hidratado com etanol 75 % e suspenso em água livre de DNA/RNA/DNases/RNases. A concentração e a pureza das amostras foram avaliadas em espectrofotômetro (NanoVue *plus*<sup>TM</sup>), considerando a relação A<sub>260</sub>:A<sub>280</sub>. Os cDNAs foram sintetizados a partir de 150 ng de RNA reversamente transcrito em presença de 200 U da enzima RevertAid<sup>®</sup> Reverse Transcriptase (Thermo Scientific<sup>®</sup>), 0,5 mM de dNTP, 0,5 µg de iniciador oligo(dT)<sub>12-18</sub> e 20 U de RiboLock<sup>TM</sup> RNase Inhibitor (Fermentas<sup>®</sup>). As amostras foram incubadas a 42 °C por 60 min e a enzima inativada por calor a 65 °C por 15 min. A partir da extração de RNA e síntese de cDNA, todas as etapas posteriores foram realizadas no Laboratório de Imunologia aplicada à Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina (LIAA/UFSC).



### 3.9. Desenho dos iniciadores

Para as análises de expressão gênica, foram utilizados ao total 50 pares de iniciadores, dos quais 44 pares foram sintetizados seguindo-se dados da literatura e os seis restantes (*Lv14.3.3*, *LvARP8*, *LvCalpB*, *LvFREP*, *LvGal* e *Lvintegrin*) foram desenhados manualmente a partir de sequências depositadas no GenBank. O potencial de auto complementariedade e formação de dímeros foi verificado utilizando o *Software FastPCR* (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>). Os parâmetros preconizados para a escolha dos iniciadores foram: (1) temperatura de hibridização entre 58-62 °C, (2) tamanho dos iniciadores de 20-21 pb, (3) conteúdo de C/G entre 45-55 % e (4) tamanho do produto de amplificação entre 100-200 pb. Detalhes dos iniciadores estão listados na **Tabela 3**.

**Tabela 2.** Sequência nucleotídica dos iniciadores utilizados para a síntese dos dsRNAs (FEIJÓ, 2014).

Gene	Iniciador senso (5' - 3')	Iniciador antiseno (5' - 3')	Amplificado (pb)	GenBank
<b>ORF1a (IMNV)</b>	<u>TAATACGACTCACTATAGGGCCGAGCTGA</u> CCACATTCCAAGC	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGGGCCTGCT</u> GTTGTGGTACCA	593 pb	AY570982
<b>ORF1b (IMNV)</b>	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGCCATGGCCA</u> ATGCCAGAAGGAA	<u>TAATACGACTCACTACTATAGGTGCCACAT</u> ATTGCTGGGAACGGG	600 pb	
<b>IGSF4D (Danio rerio)</b>	<u>TAATACGACTGACTATAGGGGTTTGTCTGT</u> CCCTCGTGGT	<u>TAATACCGATCACTATAGGGAGGTGCAGGT</u> TTTCCTTTT	678 pb	AL954312

Sequência do Promotor T7 encontra-se sublinhado e em itálico.

**Tabela 3.** Sequência nucleotídica dos iniciadores utilizados para RT-qPCR.

Sigla	Gene	Sequência (5' - 3')	Amplificado (pb)	GenBank	Referência
<b>Genes de referência</b>					
<i>LvEF1a</i>	Fator de elongação 1- $\alpha$	<i>Fw</i> TGGCTGTGAACAAGATGGACA	103	GU136229	Yao et al., 2010
		<i>Rv</i> TTGTAGCCACCTTCTTGACG			
<i>LvRL40</i>	proteína ribossomal L40	<i>Fw</i> GAGAATGTGAAGGCCAAGATC	104	FE077602	Goncalves et al., 2014
		<i>Rv</i> TCAGAGAGAGTGCGACCATC			
<i>Lv40S6</i>	proteína S6 da subunidade ribossomal 40S	<i>Fw</i> AGCAGATACCCTTGGTGAAG	193	FE080516	Goncalves et al., 2014
		<i>Rv</i> GATGCAACCACGGACTGAC			
<i>LvS3</i>	proteína ribossomal S3A	<i>Fw</i> GGCTTGCTATGGTGTGCTCC	101	BF023924	Labreuche et al., 2009
		<i>Rv</i> TCATGCTCTTGGCTCGCTG			
<b>Defesas antivirais</b>					
<i>Lv-Ago 1</i>	Argonauta 1	<i>Fw</i> TGCGTCATTGGCATCCAT	65	HM234689	Labreuche et al., 2010
		<i>Rv</i> GCCATCTGGAGCGGAGAAG			
<i>Lv-Ago 2</i>	Argonauta 2	<i>Fw</i> GATGGCATGAAGTCTGCAGTTG	62	HM234690	Labreuche et al., 2010
		<i>Rv</i> TGCGCACGACCATCACTAAG			
<i>LvDcr1</i>	DICER-1	<i>Fw</i> CCGGAGATAGAACGGTTCAGTG	176	EU676241	Yao et al., 2010c
		<i>Rv</i> CGATAATTCTCCCAACACCTG			

**Tabela 3.** Sequência nucleotídica dos iniciadores utilizados para RT-qPCR (continuação)

Sigla	Gene	Sequência (5' - 3')	Amplificado (pb)	GenBank	Referência
<i>LvDcr2</i>	DICER-2	Fw AGGAAATGCAATGTCGTGGTT	78	HQ541163	Chen et al., 2011
		Rv ACGAGCCCTCCCCCTAGATT			
<i>Lv-Sid 1</i>	Proteína transmembrana transportadora de dsRNA	Fw AAGCGATTGGCAGTCTATGAAC	63	HM234688	Labreuche et al., 2010
		Rv TGGAAGCCTATCTCTGCAACTTG			
<i>Lv-ARS2</i>	Proteína 2 resistente a arsenito-like (Ars2)	Fw GCCATTTATTTGGGAGAGGAC	115	HQ692888	Chen et al., 2012
		Rv CTGTAACCTCCATCTGTTCTCTGAC			
<i>LvTRBP1</i>	Proteína ligante de RNA TAR 1 (TRBP1)	Fw CAAGAGTTGTATGCGCAG	195	HQ541157	Chen et al., 2011
		Rv AGCACCACCCTGGATGATG			
<b>Defesas antimicrobianas</b>					
<i>Litvan PEN2</i>	Peneidina 2	Fw GTCTGCCTGGTCTTCTTGG	123	Y14925	Goncalves et al, 2014
		Rv GCAGCAATTGGCAGCATCTG			
<i>Litvan PEN3</i>	Peneidina 3	Fw GTCTGCCTGGTCTTCTTGG	141	AF390144	Goncalves et al, 2014
		Rv GCGCTTGTGAGAAGGAAATTC			
<i>Litvan PEN4</i>	Peneidina 4	Fw GTCTGCCTGGTCTTCTTGG	321	DQ211701	Goncalves et al, 2014
		Rv TTGCGGAGGGAATTCCTAG			
<i>Litvan ALF-A</i>	Fator anti-lipopolissacarídeo Grupo A	Fw CTGATTGCTCTTGCCACG	113	EW713395	Rosa et al., 2013
		Rv TGACCCATGAACTCCACCTC			
<i>Litvan ALF-B</i>	Fator anti-lipopolissacarídeo Grupo B	Fw GTGTCTCCGTGTTGACAAGC	123	GQ227486	Rosa et al., 2013
		Rv ACAGCCCAACGATCTTGCTG			
<i>Litvan ALF-C</i>	Fator anti-lipopolissacarídeo Grupo C	Fw ATGCGAGTGTCTGCTCAG	115	FE058235	Rosa et al., 2013
		Rv TGAGTTTGTTCGCGATGGCC			
<i>Litvan ALF-D</i>	Fator anti-lipopolissacarídeo Grupo D	Fw TGTGTTGGTTGTGGCACTGG	131	FE151634	Rosa et al., 2013
		Rv CAACGAGGTCAATGTCACCG			
<i>LvCrustin</i>	Crustina (Tipo II)	Fw CGAACCAAGACACCTGTTG	113	AY488496	Goncalves et al, 2014
		Rv CAGCACACTTGTAGTCGTTG			
<i>LyproPO-1</i>	pró-fenoloxidase 1	Fw CGGTGACAAAGTTCTCTTC	122	EU284136	Wang et al., 2007
		Rv GCAGGTCGCCGTAGTAAG			
<i>LyproPO-2</i>	pró-fenoloxidase 2	Fw GCGGAATGACTTGGTCTCG	137	EU373096	Goncalves et al., 2014
		Rv AAGTGACGTCATCGGAGAGG			

**Tabela 3.** Sequência nucleotídica dos iniciadores utilizados para RT-qPCR (continuação).

Sigla	Gene	Sequência (5' - 3')	Amplificado (pb)	GenBank	Referência
<b>Proteínas de reconhecimento de padrão (PRPs)</b>					
<i>LvDscam</i>	Molécula de adesão celular da Síndrome de Down	<i>Fw</i> AGGTGGACAATCCGTGGTG	160	GQ154653	Goncalves et al., 2014
		<i>Rv</i> GGAGTGATGTGTGACTGTG			
<i>LvFREP</i>	Proteínas relacionadas a fibrinogênio	<i>Fw</i> TAGGTGATTACTCGCGAAC	127	FE071367	estudo atual
		<i>Rv</i> TAATACTCCACGAGTCGAG			
<i>LvGal</i>	Galectina	<i>Fw</i> AATGCTTTCACACGAGCAGC	237	KF179103	estudo atual
		<i>Rv</i> GTCTTCAATCCAGACACAGG			
<i>LvQM protein</i>	Proteína QM	<i>Fw</i> TCGTGTGCTGGTGCTGATAGAT	143	JX880087	Liu et al., 2014
		<i>Rv</i> GCCTCAATGACCTGCTCCTTGT			
<b>Sinalização celular</b>					
<i>LvDorsal</i>	Fator de transcrição Rel/NF-κB (Dorsal/Rel1)	<i>Fw</i> TCACTGTTGACCCACCTTAC	164	FJ998202	Goncalves et al., 2014
		<i>Rv</i> GAGGGCATCTTCAACATCAC			
<i>LvRelish</i>	Fator de transcrição Rel/NF-κB (Relish/Rel2)	<i>Fw</i> GAGGAGGCTTGTGCTATGC	131	EF432734	Goncalves et al., 2014
		<i>Rv</i> CAGGTACAGGTCGTGTTAGG			
<i>LvIMD</i>	Homóloga a Imuno deficiência (imd)	<i>Fw</i> AAGGTCGAGGTCAGCGAAC	192	FJ592176	Goncalves et al., 2014
		<i>Rv</i> GATCATCTGGGTGAGTCTGG			
<i>LvGILTR</i>	Redutase dependente de tiol induzível por interferon Gamma	<i>Fw</i> TCCACCTGTACTACGAGTCC	114	HQ317497	Goncalves et al., 2014
		<i>Rv</i> CGAATGGGAACATCTCCACC			
<i>LvSTAT</i>	STAT	<i>Fw</i> CATGGCTCTGGCAGATAAGC	107	HQ228176	Goncalves et al., 2014
		<i>Rv</i> GCATCTGCTGGTCTCTTTC			
<i>LvHMGBa</i>	Grupo de alta mobilidade (HMGBa)	<i>Fw</i> GGATGAGAAGGTCAAGTACG	186	HQ228174	Goncalves et al., 2014
		<i>Rv</i> TCCTCGTCGTCTTCCTCTC			
<i>LvAstakine</i>	Astacina	<i>Fw</i> GACTGGGCGACTGTTCTTC	156	HM473285	Goncalves et al., 2014
		<i>Rv</i> GGTACGCAAGATTACAGTCC			
<i>LvToll2</i>	Toll2	<i>Fw</i> CATGCCTGCAGGACTGTTTA	158	JN180637	Wang et al., 2012
		<i>Rv</i> GGCCTGAGGGTAAGGTCTTC			
<b>Apoptose e autofagia</b>					
<i>LvIAP</i>	Inibidor de apoptose	<i>Fw</i> TGGAACGTCAAGGCACATGG	181	GQ293142	Goncalves et al., 2014
		<i>Rv</i> CTTCTGAGTGACACGTTCTG			

**Tabela 3.** Sequência nucleotídica dos iniciadores utilizados para RT-qPCR (continuação).

Sigla	Gene	Sequência (5' - 3')	Amplificado (pb)	GenBank	Referência
<i>LvCasp3</i>	Caspase 3	<i>Fw</i> GACAAAGGCGTGAGTATGAC	157	EU074795	Goncalves et al., 2014
		<i>Rv</i> GGATCCCTTTACGTTCACTC			
<i>Lv14.3.3</i>	14.3.3	<i>Fw</i> GTACGATGATATGGCAGCAG	71	EF408929	estudo atual
		<i>Rv</i> TACGTTCCCTCGTTTGACAGC			
<i>LvSurvivin</i>	Survivin	<i>Fw</i> CTGACCTTGTCGGTTGCTTTG	62	GU903910	Leu et al., 2012
		<i>Rv</i> GTCATCTTCGACTTCCCATCCA			
<i>LvARP8</i>	Proteína 8 relacionada à Autofagia	<i>Fw</i> AAGTGACCTCACTGTTGGAC	69	JQ410230	estudo atual
		<i>Rv</i> GCATCTTCTGGTCGTAGATG			
<b>Coagulação e homeostasia</b>					
<i>LvClot</i>	Proteína de coagulação	<i>Fw</i> ACCAAGGTCGTCTCATTAC	172	DQ984182	Goncalves et al., 2014
		<i>Rv</i> TGTCCACTTCCAGGGTGC			
<i>LvTG</i>	Transglutaminase	<i>Fw</i> GAGCTTCAAGATCGAGGATCGA	79	EF081004	Yeh et al., 2009
		<i>Rv</i> GCTGGTGTTCGTAGCGGTTATC			
<i>LvHHAP</i>	Proteína associada à homeostase de hemócitos	<i>Fw</i> CAAGCAGGTCAAGCACGAG	108	FE124306	Goncalves et al., 2014
		<i>Rv</i> CTGGAACCACAATAGAAGCC			
<b>Proteases, inibidores de proteases e antioxidantes</b>					
<i>Lv-PRX</i>	Peroxiredoxina	<i>Fw</i> ACGGACAGTTCAAGGAGATC	131	GQ995702	Goncalves et al., 2014
		<i>Rv</i> GAATTCCTCAACACGGTCAG			
<i>LvCysB</i>	Cystatina B	<i>Fw</i> CGAGGAACTGGTGCACATG	145	FE188646	Goncalves et al., 2014
		<i>Rv</i> CTCAGCGAAGAGGTCAAGC			
<i>Lva2M</i>	Alpha2-macroglobulina	<i>Fw</i> TGCAGGTTCTAGTGTGGTAC	261	DQ988330	Goncalves et al., 2014
		<i>Rv</i> CACCCAGGTAGTCGATGAC			
<i>LvCalpB</i>	Calpaina B	<i>Fw</i> TCACCATGCTTGAGATGACC	85	GQ179742	estudo atual
		<i>Rv</i> ATCTCCCACTGTGCTTAC			
<b>Proteínas de choque térmico e relacionadas à endocitose</b>					
<i>LvHSP70</i>	Proteínas de choque térmico 70	<i>Fw</i> CTTGTCCCTGGGTATCGAG	134	AY645906	Goncalves et al., 2014
		<i>Rv</i> ACACCTGGATGAGCACACC			
<i>LvHSP90</i>	Proteínas de choque térmico 90	<i>Fw</i> TCTACATGACCGAACCCATC	143	HQ008268	Goncalves et al., 2014
		<i>Rv</i> GGTCTTCTGTTCCTCGTACTTC			

**Tabela 3.** Sequência nucleotídica dos iniciadores utilizados para RT-qPCR (continuação).

<b>Sigla</b>	<b>Gene</b>	<b>Sequência (5' - 3')</b>	<b>Amplificado (pb)</b>	<b>GenBank</b>	<b>Referência</b>
<i>LvRab7</i>	Proteína relacionada a RAS Rab-7	<i>Fw</i> CGAAGCGAGCACACAATGG	144	FJ811529	Goncalves et al., 2014
		<i>Rv</i> TGTACAGCTCCACCTCTGAC			
<i>LvRab11</i>	Prot. relacionada a RAS Rab-11	<i>Fw</i> GCAGCAGTTGTTGGAGGAG	182	FE130921	Goncalves et al., 2014
		<i>Rv</i> AGACCTCGGCTCTTGACTC			
<i>Lvintegrin</i>	Integrina	<i>Fw</i> GCAGTGGTATGAGCATTAGTG	135	GU131148	estudo atual
		<i>Rv</i> GGTAATCCTCTGCTTGACTG			

### 3.10. PCR quantitativa em tempo real após de Transcrição Reversa (RT-qPCR)

Para as análises de expressão gênica, foram avaliados 46 genes associados ao sistema imunológico de camarões, os quais contemplam oito diferentes categorias gênicas, como segue: (1) defesas antivirais, (2) defesas antimicrobianas, (3) proteínas de reconhecimento de padrão, (4) moléculas de sinalização celular, (5) proteínas relacionadas à apoptose e à autofagia, (6) coagulação e homeostasia, (7) proteases, inibidores de proteases e moléculas antioxidantes e (8) proteínas de choque térmico e relacionadas à endocitose (**Tabela 3**). Além desses, quatro genes de referência foram utilizados: o fator de alongação 1- $\alpha$  (*LvEF1 $\alpha$* ) e as proteínas ribossomais 40S (*Lv40S6*), S3 (*LvS3*) e L40 (*LvRL40*).

As análises de RT-qPCR foram realizadas em microplacas de 96 poços, utilizando-se o sistema *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems®). As reações de RT-qPCR foram realizadas em um volume final de 15  $\mu$ L contendo 7,5  $\mu$ L de Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2  $\times$  (Thermo Scientific®), 0,3  $\mu$ M de cada iniciador, 1  $\mu$ L de cada cDNA (diluído 1:10) e 5,9  $\mu$ L água livre de DNA/RNA/DNases/RNases. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s, hibridização dos iniciadores e extensão a 60 °C por 1 min. A especificidade das reações foi confirmada através da análise de curvas de dissociação (60-95 °C; 0,3 °C/s), realizada após as etapas de amplificação. O limite de detecção de expressão gênica foi determinado através de uma curva de linearidade dos iniciadores dos genes de referência, utilizando diluições seriadas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) de uma solução contendo todas as amostras de cDNA.

### 3.11. Análise dos dados de RT-qPCR

#### 3.11.1. Seleção dos genes de referência

O programa **RefFinder** (<http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference#>) foi utilizado para a escolha do melhor gene de referência entre os quatro genes candidatos selecionados: *LvEF1 $\alpha$* , *Lv40S6*, *LvS3* e *LvRL40*. Para cada gene foi calculado um índice de estabilidade, que levou em consideração a variação dos valores de Cq (*Cycle quantification*) entre as diferentes condições. Cq é definido como o ponto em que a fluorescência aumenta significativamente acima do ruído de fluorescência (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Assim, quanto

menor o valor do índice de estabilidade, menor a variação de expressão do gene de referência entre as condições experimentais. Para uma normalização mais apurada foi considerada ainda a média geométrica dos valores de Cq das diferentes combinações dos genes selecionados (média geométrica de dois ou três genes) e ainda a média geométrica de todos os genes de referência (VANDESOMPELE et al., 2002).

### **3.11.2. Cálculo de expressão relativa**

Para o cálculo de expressão relativa, foi utilizado o método descrito por Livak e Schmittgen (2001). Os valores de expressão foram calculados com base nos valores de Cq dos genes de interesse em relação aos valores de Cq dos genes de referência ( $\Delta Cq = Cq$  do gene alvo subtraído do Cq da referência). Então, níveis de expressão foram calculados utilizando-se a fórmula  $2^{-\Delta Cq}$ , onde 2 é o valor atribuído a 100 % de eficiência dos iniciadores. Para as representações gráficas, foi utilizada a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , utilizando-se como condição calibradora o grupo 0 h, 24 h e 48 h dos animais tratados com o dsRNA-IGSF4D (inespecífico).

### **3.11.3 Agrupamentos hierárquicos de expressão gênica**

Agrupamentos hierárquicos (*Hierarchical clustering*) dos níveis de expressão gênica foram realizados a partir dos valores de  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  com o *software Multiple Array Viewer 4.81*. Os agrupamentos hierárquicos foram utilizados para relacionar as condições experimentais em função de seus níveis de expressão gênica e os tempos 24 h e 48 h pós-infecção. O critério utilizado no agrupamento foi a correlação de Pearson.

### **3.12 Análises estatísticas**

Um teste de Log-Rank baseado na estimativa da curva de sobrevivência Kaplan-Meier foi utilizado para verificar diferenças na sobrevivência entre os grupos experimentais, utilizando o programa *GraphPad Prism 3*. Os dados de RT-qPCR foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo Teste de comparação de médias de Tukey. Os testes estatísticos foram realizados com o programa *Statística 7.0*. Para a construção dos gráficos de expressão, foi utilizado o programa *GraphPad Prism 3*. As diferenças entre os grupos experimentais foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .



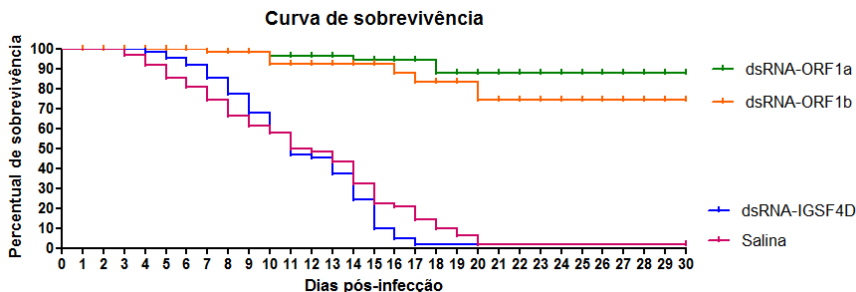
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efeito do silenciamento viral na sobrevivência de camarões ao vírus IMNV

Com o objetivo de verificar o efeito protetor do silenciamento do vírus da mionecrose infecciosa, camarões *L. vannamei* foram previamente tratados com dsRNA sequências IMNV-específicas, seguido por desafio com IMNV (48 h após). O potencial efeito protetor de sequências inespecíficas de dsRNA também foi avaliado em camarões tratados com moléculas de dsRNA não relacionadas ao IMNV ou ao genoma de *L. vannamei*. Para isso, foram sintetizadas moléculas de dsRNA correspondentes a duas diferentes regiões da ORF1 do genoma viral (**Figura 8**), as quais foram designadas de dsRNA-ORF1a e dsRNA-ORF1b. As moléculas de dsRNA inespecíficas corresponderam à sequência de uma imunoglobulina do peixe *D. rerio* (dsRNA-IGSF4D). Como controle, foram utilizados animais tratados apenas com solução salina e posteriormente infectados com o IMNV. Previamente aos ensaios, todos os camarões foram avaliados por RT-PCR convencional para verificar a presença do IMNV, sendo diagnosticados como portadores assintomáticos (FEIJÓ, 2014). No entanto, nenhuma reação positiva para o WSSV ou IHHNV foi detectada nesses mesmos animais. No caso do desafio experimental, os camarões foram injetados com  $1,02 \times 10^6$  cópias do IMNV, dose capaz de causar 100 % de mortalidade entre 17 e 20 dias (FEIJÓ et al., no prelo).

As moléculas de dsRNA específicas para o IMNV se mostraram efetivas na proteção dos camarões contra o vírus. O pré-tratamento com dsRNA-ORF1a e dsRNA-ORF1b conferiu, respectivamente, 90 % e 83 % de sobrevivência ao longo dos 30 dias de monitoramento. Por outro lado, moléculas de dsRNA inespecíficas (dsRNA-IGSF4D) não conferiram proteção contra o vírus, levando à morte de 100 % dos animais em 17 dias após a infecção (**Figura 8**). Da mesma forma, todos os animais injetados com solução salina e posteriormente infectados com IMNV morreram 20 dias após a infecção experimental, sendo que até o 15º dia a mortalidade de ambos os grupos foi equivalente (**Figura 8**).

**Figura 8.** Percentual de sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* desafiados com IMNV e previamente tratados com moléculas de dsRNA IMNV-ORF1a (linha verde), dsRNA IMNV-ORF1b (linha laranja), dsRNA Danio-IGSF4D (linha azul) ou injetados com solução salina (linha rosa) (FEIJÓ et al., no prelo).



#### 4.2 Padronização da técnica de RT-qPCR

A padronização da técnica de RT-qPCR consistiu na: (I) verificação da especificidade dos iniciadores, (II) escolha dos genes de referência e (III) determinação da concentração ótima de cDNA para as reações de RT-qPCR. A avaliação da especificidade dos iniciadores foi realizada por análises das curvas de dissociação (*Melting curves*) geradas a partir das amplificações de PCR utilizando-se intercalantes de DNA (*SYBR Green*). As análises das curvas de dissociação, segundo os valores de  $T_m$  (*Melting temperature*) obtidos para cada produto amplificado, mostraram que todos os iniciadores foram específicos e apresentaram apenas um único valor de  $T_m$  em todas as reações (**Tabela 4**).

Outra etapa importante foi a escolha dos genes de referência. Para garantir a confiabilidade dos resultados, foram selecionados quatro genes com base em dados da literatura: o fator de alongação 1- $\alpha$  (*LvEF1 $\alpha$* ) e as proteínas ribossomais 40S (*Lv40S6*), S3 (*LvS3*) e L40 (*LvRL40*). As reações foram realizadas em triplicatas, assumindo a média entre os valores de Cq encontrados.

As análises para a escolha do melhor gene de referência levou em consideração a estabilidade dos valores de Cq e foi avaliada utilizando-se o programa *RefFinder*. O *RefFinder* é um programa desenvolvido para avaliação e triagem de genes de referência a partir de extensos conjuntos de dados experimentais, como os utilizados neste estudo. Ele integra os programas *geNorm* (VANDESOMPELE et al., 2002), *Normfinder* (ANDERSEN et al., 2004), *BestKeeper* (PFAFFL et al.,

2004) e o método comparativo Cq (SILVER et al., 2006) para comparar e classificar os genes candidatos a referências.

**Tabela 4.** Valores de temperatura de dissociação.

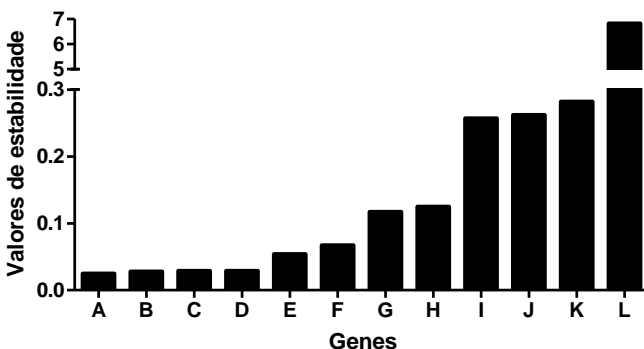
<b>Categorias funcionais</b>	<b>Genes</b>	<b>Tm</b>
Genes de referência	<i>LvEF1a</i>	80.04
	<i>LvRL40</i>	81.26
	<i>Lv40S6</i>	82.72
	<i>LvS3</i>	80.39
Defesas antivirais	<i>Lv-Ago 1</i>	78.95
	<i>Lv-Ago 2</i>	77.06
	<i>LvDcr1</i>	78.50
	<i>LvDcr2</i>	78.02
	<i>Lv-Sid 1</i>	76.41
	<i>Lv-ARS2</i>	76.43
Defesas antimicrobianas	<i>LvTRBP1</i>	80.95
	<i>Litvan PEN2</i>	84.10
	<i>Litvan PEN3</i>	84.28
	<i>Litvan PEN4</i>	82.99
	<i>Litvan ALF-A</i>	82.17
	<i>Litvan ALF-B</i>	86.16
	<i>Litvan ALF-C</i>	87.42
	<i>Litvan ALF-D</i>	79.64
	<i>LvCrustin</i>	82.35
	<i>LvproPO-1</i>	84.01
Proteínas de Reconhecimento de padrão (PRPs)	<i>LvproPO-2</i>	82.76
	<i>LvDscam</i>	75.89
	<i>LvFREP</i>	82.05
	<i>LvGal</i>	80.44
Sinalização celular	<i>LvQM protein</i>	83.18
	<i>LvRelish</i>	80.09
	<i>LvDorsal</i>	79.45
	<i>LvIMD</i>	85.26
	<i>LvGILTR</i>	78.31
	<i>LvSTAT</i>	76.76
	<i>LvHMGBa</i>	86.43
	<i>LvAstakine</i>	85.08
Apoptose e autofagia	<i>LvToll2</i>	76.56
	<i>LvIAP</i>	82.23
	<i>LvCasp3</i>	82.02
	<i>Lv14.3.3</i>	78.31
Coagulação e homeostasia	<i>LvSurv</i>	74.68
	<i>LvARP8</i>	74.97
	<i>LvClot</i>	84.30
	<i>LvTG</i>	77.75
Proteases, inibidores de proteases e antioxidantes	<i>LvHHAP</i>	80.23
	<i>LvCysB</i>	83.51
	<i>Lva2M</i>	86.29
	<i>LvCalpB</i>	79.88
Proteínas de choque térmico e relacionadas à endocitose	<i>Lv-PRX</i>	77.30
	<i>LvHSP70</i>	82.22
	<i>LvHSP90</i>	80.95
	<i>LvRab7</i>	78.44
	<i>LvRab11</i>	83.19
	<i>Lvintegrin</i>	78.63

**Tm:** Temperatura de dissociação (do inglês, *melting temperature*). O significado das siglas dos genes está apresentado na Tabela 3.

Em cada um dos programas é atribuído um valor para cada gene individual e para as médias geométricas, levando a uma classificação geral final. Segundo esse critério, quanto menor o valor do índice de estabilidade, menor a variação de expressão do gene de referência entre as condições experimentais.

As condições testadas foram os valores de Cq de cada um dos genes de referência em separado e as médias geométricas das combinações entre eles (**Figura 9**). Para os cálculos de expressão, foi utilizada a média geométrica dos quatro genes de referência que obtiveram o menor valor de estabilidade (0,025). Os menores valores de estabilidade entre as médias de combinações dos genes foram: *LvEF1α*+*LvS3*+*LvRL40* (**0,029**); *LvEF1α* + *LvS3* (**0,029**); *LvEF1α* + *Lv40S6*+*LvS3* (0,028) e *LvEF1α* + *Lv40S6*+ *LvS3*+ *LvRL40* (**0,025**). No entanto, o gene *LvEF1α* apresentou a menor estabilidade cujo valor foi de 6,823.

**Figura 9.** Estabilidade dos genes de referência. Média geométrica dos valores de Cq dos genes (A) *LvEF-1α*, *Lv40S6*, *LvS3* e *LvRL40*; (B) *LvEF-1α*, *Lv40S6* e *LvS3*; (C) *LvEF-1α* e *LvS3*; (D) *LvEF-1α*, *LvS3* e *LvRL40*; (E) *LvEF-1α* e *Lv40S6*; (F) *Lv40S6*, *LvS3* e *LvRL40*; (G) *LvEF-1α*, *Lv40S6* e *LvRL40*; (H) *LvEF-1α* e *LvRL40*; e valor de Cq dos genes (I) *LvS3*; (J) *LvRL40*; (K) *Lv40S6* e (L) *LvEF-1α*.



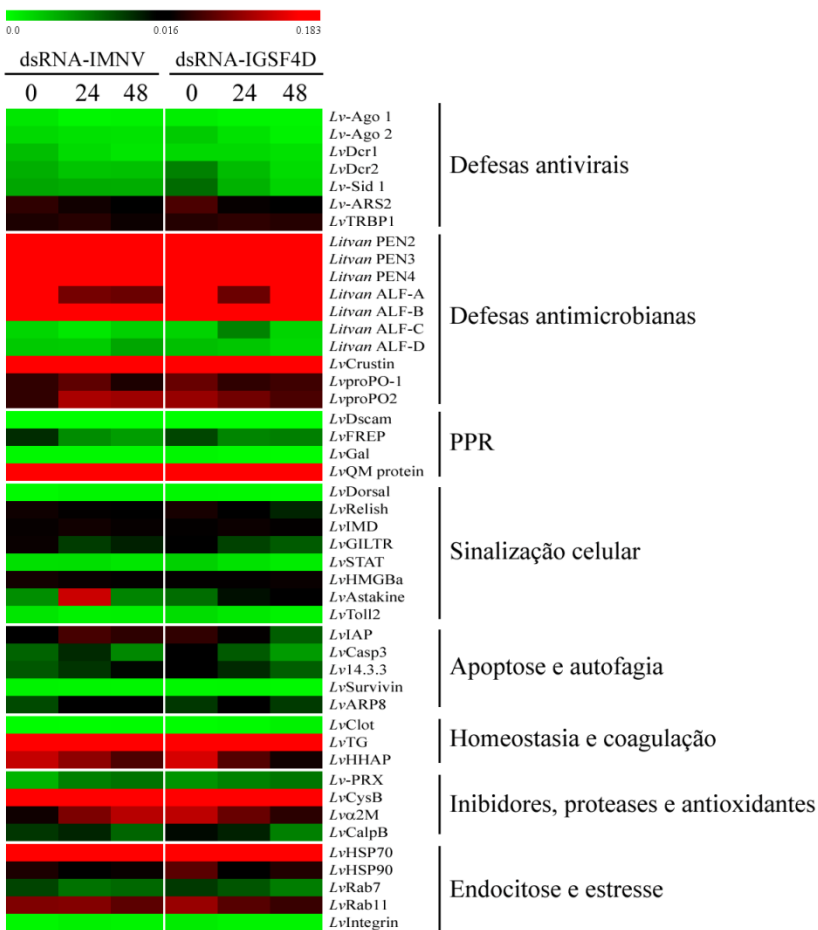
Finalmente, foi determinada a concentração ótima de cDNA a ser utilizada nas reações de RT-qPCR. Para isso, foi realizada uma diluição seriada (1:2 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) de uma mistura de todos os cDNAs amplificados com os iniciadores dos quatro genes de referência. O limite de detecção para os genes analisados foi avistado entre as diluições 1:8 e 1:16. Assim, a concentração de cDNA escolhida para as reações de RT-qPCR foi a diluição de 1:10, que corresponde a 1 ng de RNA total por reação.

### 4.3 *Análise global de expressão gênica*

Uma vez que a injeção de moléculas de dsRNA específicas para o IMNV conferiu sobrevivência aos animais desafiados com o vírus, foi avaliado o perfil de expressão transcricional de genes associados ao sistema imune nas células imunocompetentes desses animais, com o intuito de identificar os mecanismos moleculares envolvidos na sobrevivência. Pelo fato de os animais tratados com dsRNA-ORF1a e dsRNA-ORF1b apresentarem percentuais de sobrevivência similares, tais condições foram reunidas em um único grupo, denominado dsRNA-IMNV, para posteriormente, serem contrastados com o grupo tratado com o dsRNA inespecífico.

A expressão de 46 genes relacionados ao sistema imunológico de *L. vannamei* foi comparada nos animais tratados com dsRNA-IMNV em relação aos animais tratados com dsRNA-IGSF4D (inespecífico). Foram escolhidos genes de oito diferentes categorias funcionais, como detalhado na **Tabela 3**. As análises de RT-qPCR geraram 1.872 valores de Cq. Os perfis de expressão dos 46 genes foram avaliados de maneira global nas diferentes condições experimentais pela construção de um *heatmap*. Para os cálculos de expressão, foi utilizado o método  $2^{-\Delta Cq}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando-se como referência a média geométrica dos quatro genes de referência. Dessa forma, não foi escolhido um grupo calibrador, a fim de se comparar os níveis de expressão em todas as condições experimentais. Nessa análise, foi considerada a média dos valores de expressão das triplicatas biológicas, de cada condição experimental, nos diferentes tempos pós-infecção. A análise global do nível de expressão (24 h e 48 h) dos 46 genes em camarões tratados com o dsRNA-IMNV ou com o dsRNA-IGSF4D estão apresentados na **Figura 10**.

**Figura 10.** Análise global da expressão de 46 genes associados ao sistema imune de *Litopenaeus vannamei* pré-tratados com dsRNA-IMNV (específico) ou dsRNA-IGSF4D (inespecífico) e infectados 48 h após com uma dose letal do IMNV. Os animais foram analisados logo antes da infecção (tempo 0 h) e 24 h e 48 h após o desafio viral. Os níveis de expressão foram calculados de acordo com o método  $2^{-\Delta Cq}$  normalizado com a média geométrica dos genes *LvEF-1a*, *Lv40S6*, *LvS3* e *LvRL40*. Cada retângulo da matriz corresponde ao valor médio de expressão em uma condição. A intensidade da cor, de verde a vermelho, indica a magnitude de expressão gênica, segundo a escala de cor presente na parte superior da figura. Os diferentes genes (e as categorias funcionais as quais pertencem) estão representados à direita.



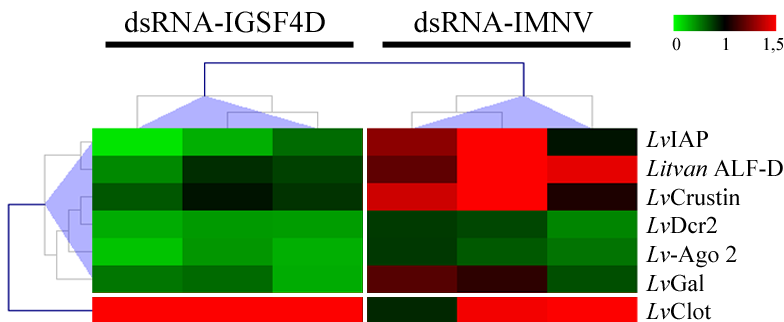
#### 4.4 Perfil de expressão gênica em função da ativação do sistema de RNA de interferência

Com o intuito de agrupar os genes relacionados ao sistema imune, candidatos a formarem uma *assinatura transcricional* associada à proteção antiviral específica contra o IMNV, foram avaliados os perfis de expressão gênica em diferentes tempos pós-infecção viral (24 h e 48 h). O perfil de expressão dos genes potencialmente envolvidos na proteção contra o IMNV foi obtido através do método de  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e a normalização foi realizada utilizando a média geométrica dos valores de Cq dos genes de referência (*LvEF1 $\alpha$* , *Lv40S6*, *LvS3* e *LvRL40*). A segunda normalização foi realizada utilizando-se como condição calibradora a média do valor de  $\Delta Cq$  das amostras do tempo 0 h, 24 h e 48 h dos animais tratados com o dsRNA-IGSF4D (inespecífico).

As análises estatísticas dos dados gerados por RT-qPCR revelaram que nenhum dos genes analisados modulou 24 h pós-desafio viral em função do tratamento com o dsRNA-IMNV ( $P > 0,05$ ) (**Figura 10**). No entanto, 48 h pós-infecção viral, seis dos 46 genes analisados (13 %) foram diferencialmente expressos em função do tratamento com o dsRNA IMNV-específico, apresentando um *fold change* de expressão superior a 1,5 (**Figura 11**). Esses genes pertencem às categorias funcionais de defesa antiviral (*Lv-Ago2*, *LvDcr2*), defesa antimicrobiana (*Litvan ALF-D*, *LvCrustin*), PRP (*LvGal*) e inibição de apoptose (*LvIAP*). Os perfis de expressão desses genes foram analisados globalmente, através da construção de agrupamentos hierárquicos ou HCL (*Hierarchical Clustering*), com o programa *Multiple Array Viewer* 4.8. As análises do HCL agruparam os perfis de expressão mais semelhantes em função das condições experimentais (**Figura 11**).

De maneira interessante, o gene de coagulação *LvClot* foi diferencialmente expresso apenas em função do tratamento com o dsRNA inespecífico, nas 24 h e 48 h pós-desafio (**Figura 11**), sendo que a expressão dos demais 39 genes não modulou nos camarões tratados com dsRNA-IMNV ou com dsRNA-IGSF4D, em nenhum dos tempos analisados.

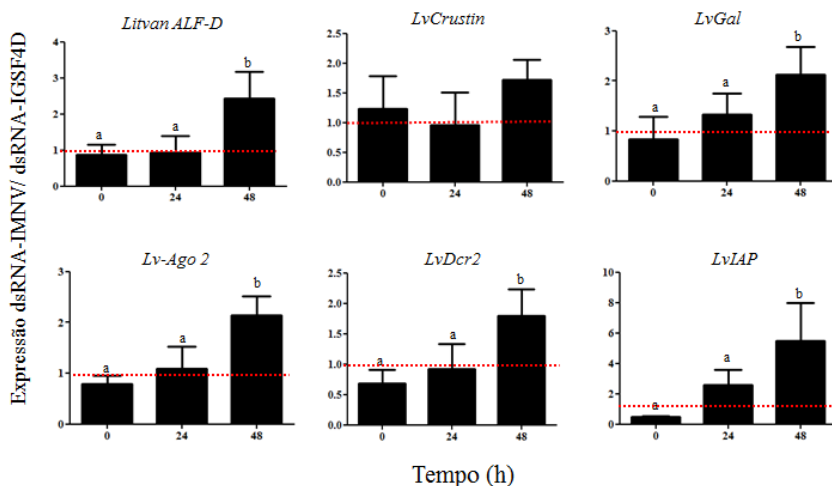
**Figura 11.** Agrupamento hierárquico dos níveis de expressão de genes diferencialmente expressos em *Litopenaeus vannamei* tratados com dsRNA-IMNV (*LvCrustin*, *Litvan ALF-D*, *LvDcr2*, *Lv-Ago2*, *LvGal* e *LvIAP*) ou com dsRNA-IGSF4D (*LvClot*), 48 h após desafio com IMNV. Os níveis de expressão ( $1,5\text{-fold change}$  e  $p < 0,05$ ) foram calculados de acordo com o método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  normalizado com a média geométrica dos genes *LvEF-1 $\alpha$* , *Lv40S6*, *LvS3* e *LvRL40*. A segunda normalização foi realizada utilizando-se como grupo calibrador a média do valor de  $\Delta Cq$  das amostras do tempo 0 h (camarões não infectados). Cada retângulo da matriz corresponde ao valor médio de expressão em um *pool* de animais de uma determinada condição experimental. A intensidade da cor, de verde ao vermelho, indica a magnitude de expressão gênica, segundo a escala de cor presente na parte superior da figura. As condições experimentais estão representadas na parte superior da figura e os diferentes genes representados à direita.



Dois grupos principais de expressão foram distinguidos pelo programa em 48 h pós-desafio viral. O primeiro agrupamento contém os seis genes que apresentaram maiores níveis de transcritos no grupo tratado com dsRNA-IMNV em relação ao grupo tratado com dsRNA-IGSF4D (**Figura 11**). Esse grupo é formado pelos **peptídeos** antimicrobianos *LvCrustin* ( $1,7\text{-fold change}$ ;  $P = 0,031$ ) e *Litvan ALF-D* ( $2,4\text{-fold change}$ ,  $P = 0,038$ ), as proteínas relacionadas com o sistema RNAi *LvDcr2* ( $1,8\text{-fold change}$ ;  $P = 0,037$ ) e *Lv-Ago2* ( $2,1\text{-fold change}$ ;  $P = 0,016$ ), a lectina *LvGal* ( $2,1\text{-fold change}$ ;  $P = 0,04$ ) e o inibidor de apoptose *LvIAP* ( $4,4\text{-fold change}$ ;  $P = 0,047$ ) (**Figura 12**).

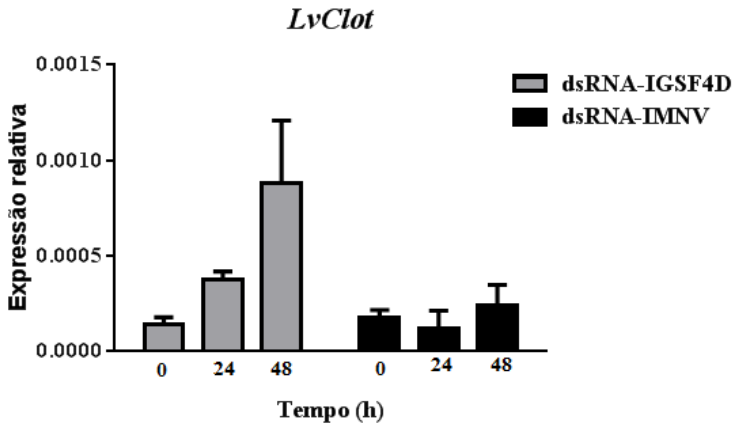


**Figura 12.** Perfil de expressão dos genes diferencialmente expressos potencialmente envolvidos na contra o IMNV em *Litopenaeus vannamei* pré-tratados com dsRNA-IMNV, 0 h, 24 h e 48 h após desafio com o IMNV. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão das expressões relativas. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as condições experimentais ( $p < 0,05$ ), obtido através dos testes ANOVA e Tukey. A linha pontilhada (na cor vermelha) indica os níveis de expressão nos animais pré-tratados com dsRNA-IGSF4D.



O segundo agrupamento é formado somente pelo gene *LvClot*, cuja expressão modulou apenas nos camarões tratados com o dsRNA inespecífico (dsRNA-IGSF4D) em 24 h e 48 h após a infecção (**Figura 13**). Seus níveis de expressão aumentaram 3,2 vezes ( $P = 0,012$ ) e 3,7 vezes ( $P = 0,032$ ) em 24 h e 48 h, respectivamente, no grupo tratado com dsRNA-IGSF4D (**Figura 13**). Nos animais tratados com dsRNA-IMNV, a expressão desse gene foi semelhante ao do grupo controle (animais não infectados).

**Figura 13.** Perfil de expressão do gene *LvClot* em *Litopenaeus vannamei* pré-tratados com dsRNA-IMNV (barra preta) e dsRNA-IGSF4D (barra cinza) e analisados 24 h e 48 h após desafio com o IMNV. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão das expressões relativas e as diferenças estatisticamente significativas entre as condições são indicadas por asteriscos ( $p < 0,05$ ), obtidas através dos testes ANOVA e Tukey.



Com base nos resultados obtidos, foi possível identificar uma assinatura transcricional em hemócitos de *L. vannamei* associada à indução de proteção antiviral específica nos camarões, utilizando interferência por RNA (RNAi). Essa assinatura transcricional foi identificada 48 h após o desafio dos camarões com IMNV, sendo constituída por seis genes associados ao sistema imune: *Litvan ALF-D*, *LvCrustin*, *LvDcr2*, *Lv-Ago2*, *LvGal* e *LvIAP*. Além desses, o gene *LvClot* foi identificado como um marcador de animais incapazes de sobreviver a uma infecção pelo IMNV. Assim, este é o primeiro relato da identificação de efetores do sistema imune potencialmente envolvidos na proteção e sobrevivência de camarões frente à infecção pelo IMNV. Além disso, este trabalho possibilita, pela primeira vez, a compreensão de mecanismos moleculares envolvidos na defesa de camarões peneídeos contra um vírus de genoma dsRNA, induzida pelo sistema de RNA de interferência.

## 5. DISCUSSÃO

A Mionecrose Infecciosa (NIM) é uma das enfermidades responsáveis pelos constantes prejuízos causados à indústria do camarão no Nordeste do Brasil e na Indonésia. Desde o seu surgimento, em 2002, até o presente momento, três estudos foram conduzidos, com o intuito de verificar o efeito da técnica de RNA de interferência em infecções por esse vírus (LOY et al., 2012; 2013; FEIJÓ et al., no prelo). A compreensão dos mecanismos de defesa antiviral desencadeados pelos camarões peneídeos é imprescindível para a obtenção de um amplo entendimento da interação patógeno-hospedeiro, como também para possibilitar o desenvolvimento de métodos efetivos de prevenção e controle da NIM (LOY et al, 2013).

É conhecido o fato que os vírus, independente do seu genoma ser de DNA ou RNA, podem produzir longas moléculas de dsRNAs geradas durante a sua replicação ou provenientes de interações intramoleculares entre os transcritos virais (XU et al, 2014). Esses dsRNAs são considerados padrões moleculares de vírus e desencadeiam uma defesa antiviral específica, mediada pelo mecanismo de RNA de interferência (LABREUCHE et al., 2010; LA FAUCE & OWERS, 2012) e uma defesa antiviral não-específica, mediada possivelmente por citocinas do tipo interferon (*interferon-like*), análogas às encontradas em vertebrados (ROBALINO, 2004; HARPENI, 2012). De posse dessas informações, o uso da tecnologia de RNAi é capaz de ativar respostas antivirais específicas especialmente quando utilizado via sistêmica (por injeções intramusculares), sendo considerada uma das mais promissoras terapias antivirais para crustáceos de interesse econômico (XU et al., 2014; BARTHOLOMAY et al., 2012; LA FAUCE & OWERS, 2012; KRISHNAN et al., 2009; SHEKHAR & LU, 2009).

Essa tecnologia tem sido utilizada como um método profilático para prevenir viroses de camarões causadas pelo WSSV (ROBALINO et al., 2005; XU et al., 2007; GUERTLER et al., 2013), YHV (TIRASOPHON et al., 2005; 2007; YODMUANG et al., 2006), TSV (ROBALINO et al., 2004), PstDNV (HO et al., 2011) e IMNV (LOY et al., 2012; FEIJÓ et al, no prelo). Esses estudos utilizaram constructos de dsRNA (sequências específicas do genoma ou de genes codificando proteínas virais) que foram injetados em camarões e posteriormente desafiados com o vírus correspondente. Por consequência da ativação prévia da maquinaria de RNAi, uma resposta antiviral específica foi desencadeada levando a uma redução nos índices de mortalidade e a uma importante limitação na replicação viral. Além disso, foi verificado

também um efeito terapêutico da técnica de RNAi quando os animais foram desafiados com o YHV (ASSAVALAPSAKUL et al., 2009; TIRASOPHON et al., 2007) ou IMNV (LOY, 2013; FEIJÓ et al., no prelo) e posteriormente injetados com um dsRNA de sequência viral-específica. Em ambos os estudos, as infecções foram limitadas, levando à sobrevivência de grande parte dos animais desafiados.

O primeiro relato de silenciamento do IMNV foi realizado por LOY e colaboradores (2012) utilizando injeções de dsRNA homólogo à região viral ORF1. Essa região se mostrou mais eficaz na inibição da replicação e conseqüente na sobrevivência dos animais, quando comparado ao tratamento com dsRNA de sequência homóloga a outras regiões do genoma viral. Em um estudo posterior, esses autores demonstraram também existir uma proteção terapêutica induzida pelos mesmos constructos de dsRNA (LOY et al., 2013). Mais recentemente, um estudo de silenciamento do IMNV em camarões cultivados no Nordeste do Brasil (Ceará) foi conduzido, onde os dados obtidos por Feijó e colaboradores (no prelo), foram muito semelhantes aos de Loy e colaboradores (2012) no que diz respeito à efetividade do tratamento com dsRNA de sequência correspondente à região ORF1 do genoma viral. O dsRNA homólogo à região ORF1a levou a uma maior sobrevivência dos camarões em comparação à injeção com dsRNA-ORF1b.

Os dados de sobrevivência apresentados no presente estudo foram gerados em parceria com Feijó e colaboradores (no prelo) e demonstram que o tratamento dos camarões com dsRNA específico para o IMNV (dsRNA-ORF1a e dsRNA-ORF1b) foi capaz de limitar de maneira importante a infecção, levando a altas taxas de sobrevivência nos animais (90% e 83%, respectivamente) durante os 30 dias de experimento. Esses animais foram desafiados com  $1,02 \times 10^6$  partículas do IMNV, concentração essa considerada letal para os animais (FEIJÓ et al., no prelo).

Feijó e colaboradores (no prelo) demonstraram ainda que a expressão dos principais genes do mecanismo de RNAi (Sid-1, Dicer-2 e Argonauta-2), aumenta em camarões tratados com dsRNA de sequência viral-específica. No presente estudo, a modulação de 46 genes de diferentes categorias funcionais foi investigada nesses mesmos animais, ampliando assim as informações sobre a modulação gênica em camarões infectados por IMNV, cuja defesa antiviral por RNAi tenha sido previamente ativada.

Um fato curioso observado no presente estudo é que não foi encontrada ativação de defesa antiviral inespecífica, atribuída ao

mecanismo *interferon-like*, nos camarões tratados com dsRNA inespecífico (sequência para imunoglobulina de peixe). Todos os animais morreram em 17 dias, de maneira similar ao grupo controle (injetado apenas com solução salina). Diferentemente dos resultados aqui obtidos, Robalino e colaboradores (2004) demonstraram existir um estado antiviral inespecífico em *L. vannamei*, induzido por injeções com dsRNA de sequência viral-inespecífica, contra infecções por TSV (genoma de ssRNA) e por WSSV (genoma dsDNA). No entanto, o mesmo efeito não foi encontrado quando a infecção deste mesmo peneídeo é causada pelo IMNV, mesmo utilizando-se diferentes sequências de dsRNA-inespecíficos, como para a proteína verde fluorescente (GFP) (LOY et al., 2012) ou para a imunoglobulina de peixe (IGSF4D) (FEIJÓ et al 2015).

Algumas hipóteses podem ser formuladas para tais resultados. A primeira delas poderia estar relacionada ao fato de o *genoma do IMNV ser de RNA dupla fita*, uma vez que os relatos existentes de indução de estado antiviral inespecífico em camarões se relacionam a vírus com genomas de RNA de simples fita (TSV) ou de DNA dupla fita (WSSV) (ROBALINO et al., 2004). Nesses estudos, a taxa de sobrevivência dos animais foi de 50 % e 75 %, respectivamente, em 10 dias de experimento, onde se observou uma estabilização na mortalidade. No presente estudo, 10 dias pós-desafio, a mortalidade dos camarões atingiu 40 %, continuando a aumentar e atingindo 100 % ao final dos 17 dias.

Uma segunda hipótese seria o “sequestro” dos *dsRNA-IGSF4D injetados por meio de sua ligação com os fragmentos 2A-like*. Sabe-se que a região ORF1a do IMNV possui sequências de ligação a dsRNAs que podem se autoclicar (*2A-like*) e que, em seguida, podem se ligar a quaisquer moléculas de dsRNAs presentes no animal (NIBERT, 2007). Nos animais desafiados com IMNV e não tratados com dsRNA-ORF1, os fragmentos *2A-like* do genoma viral não teriam sido degradados e, portanto, estariam presentes em grandes quantidades no organismo dos animais. Esses fragmentos poderiam então ligar-se ao dsRNA-IGSF4D injetado, indisponibilizando-os para ativar o mecanismo antiviral *inespecífico* nos animais, via *interferon-like*.

Finalmente, uma terceira hipótese a ser aventada, seria a *atuação de supressores/proteínas virais que impediriam o silenciamento viral*. Muitos vírus produzem supressores virais de silenciamento de RNA (VSRs), incluindo as proteínas supressoras do silenciamento do RNA (SSPs) (LI & DING 2006; BORTOLAMIOL et al., 2008; LAUBRECHE & WARR, 2013). Esses VSRs são capazes de interferir em vários passos do processo de silenciamento, otimizando assim, a

replicação viral e propiciando a propagação viral no organismo do hospedeiro. Alguns VSRs se relacionam com a supressão da produção de siRNA, enquanto outros sequestram quaisquer siRNAs, impedindo a sua incorporação ao RISC e a propagação do efeito do silenciamento por RNAi (LAUBRECHE & WARR, 2013). A atuação de potenciais VSRs produzidos pelo IMNV, poderia assim, no presente estudo, ter inibido a ativação do *interferon-like* (que reconhecidamente é ativado por dsRNAs) e da resultante resposta antiviral inespecífica, explicando assim a mortalidade de todos os animais tratados com dsRNA inespecífico.

A hipótese da existência desses VSRs em camarões foi verificada em *L. vannamei* quando Robalino e colaboradores (2007) relataram pela primeira vez, a inibição de silenciamento mediado por dsRNA em camarões infectados com WSSV. Esses mesmos autores observaram ainda uma supressão semelhante no silenciamento de genes em camarões infectados com TSV. Até o presente momento, os mecanismos de ação que apontam para atividades VSR nestes dois vírus não foram ainda determinados. Além disso, experimentos adicionais se fazem necessários para investigar se outros vírus de camarão podem apresentar a mesma capacidade, como o IMNV.

Loy e colaboradores (2012) afirmam que o tratamento profilático por meio da injeção de dsRNA sequência viral-específica protege camarões sadios contra infecções por IMNV, assim como tratam animais de forma terapêutica, ou seja, apresentando infecções brandas pré-existentes (LOY et al., 2013). Ampliando essas informações, Feijó e colaboradores (no prelo) confirmou que a técnica de RNAi é capaz de proteger de maneira muito significativa (83-90 % sobrevivência) camarões previamente infectados com IMNV e posteriormente desafiados com uma dose letal do mesmo vírus. Deve-se considerar que a presença de animais infectados por IMNV é a condição comumente encontrada nos cultivos do Nordeste brasileiro, o que representaria, então, um passo significativo para o desenvolvimento de uma terapia antiviral para animais previamente infectados com baixa carga viral. A injeção de dsRNA específico para o IMNV ativou as defesas antivirais dos camarões, ajudando a limitar o processo infeccioso. Esses estudos serviriam então de base para a busca de meios alternativos de administração do constructo aos animais, como por exemplo por via oral, visando assim uma aplicação prática e em larga escala para os cultivos de camarão.

Sabe-se que as moléculas relacionadas à defesa imunológica dos crustáceos são especialmente expressas nos hemócitos, hepatopâncreas

(GROSS et al., 2001) e intestino (SOONTHORNCHAI et al., 2010), sendo os hemócitos o sítio majoritário da diversidade de genes imunológicos expressos (GROSS et al., 2001). Em vista disso, as alterações na modulação dos genes codificantes para as moléculas imunes, durante as infecções virais, por exemplo, podem ser conhecidas por meio de análises transcriptômicas dos hemócitos (SOOKRUKSAWONG et al., 2013).

Como já é bem estabelecido, existe uma variabilidade genética individual encontrada nos organismos (SOOKRUKSAWONG et al., 2013). Na tentativa de diminuir essa variabilidade, o perfil transcriptômico dos animais foi avaliado no presente estudo utilizando-se a combinação de quantidades iguais de RNA de um conjunto de três animais. Polimorfismos interindividuais de expressão gênica em hemócitos foi anteriormente descrito em ostras *Crassostrea gigas*, particularmente para genes relacionados ao sistema imunológico, devido ao seu alto nível de diversidade nucleotídica (ROSA et al., 2012). Essa grande variabilidade interindividual também deve ser considerada em outros invertebrados. No caso de camarões, análises de RT-qPCR em nível individual poderiam fornecer informações mais confiáveis sobre a expressão de genes relacionados com o sistema imunológico em hemócitos

Em relação à análise de expressão gênica de proteínas imunológicas nos diferentes grupos de *L. vannamei* avaliados neste estudo, observou-se um comportamento diferenciado para cada gene no que se refere ao grau de expressão entre os animais tratados com dsRNA-IMNV ou com dsRNA-IGSF4D e, posteriormente desafiados com IMNV. Além do trabalho de Feijó e colaboradores (no prelo) que analisou a expressão de três genes relacionados ao RNAi em camarões pré-tratados com dsRNA e desafiados com IMNV, até o momento não existe na literatura outros estudos que relatem a modulação na expressão de genes (de qualquer categoria funcional) em camarões simultaneamente tratados com RNAi e infectados com esse vírus. Esse fato dificulta se estabelecer inferências e discorrer de forma mais ampla os resultados aqui encontrados. A única exceção, são os estudos de Guertler (2010) que analisou a expressão semiquantitativa de sete transcritos codificantes para proteínas imunológicas (argonata, caspase-3, ALF, LGBP,  $\alpha$ 2M, proPO e TGase) de *L. vannamei* cujo sistema RNAi tenha sido previamente induzido e, 48 h após, desafiados com uma doses letal de WSSV (100 % mortalidade em 96 h).

No presente estudo, dois tempos pós-infecção (24 h e 48 h) foram avaliados, sendo que nenhuma diferença foi encontrada nas primeiras 24

h pós-desafio viral, nos perfis transcricionais avaliados. A única exceção foi o gene codificante para a proteína de coagulação (*LvClot*) que modulou positivamente ainda nas 24 h pós-desafio, seguindo o aumento nas 48 h posteriores (*2-fold* e *5-fold change*, respectivamente). Porém esse aumento no nível transcricional de *LvClot* foi registrado somente nos animais tratados com o dsRNA-controle (sequência viral-inespecífica), ou seja, nos camarões que sucumbiram ao vírus.

Sabe-se que a proteína de coagulação é fundamental para manter a homeostasia do animal, pois a rápida formação de coágulos no local da injúria impede a perda de hemolinfa (LORAND & CONRAND, 1984). Um aumento significativo dos seus transcritos, justamente nos camarões com necrose muscular em evolução, poderia indicar um aumento consequente na síntese proteica, visando promover uma rápida coagulação para evitar o extravasamento da hemolinfa decorrente das lesões mionecróticas.

Em outro estudo conduzido por nosso grupo, o gene *LvClot* foi identificado como sendo um marcador de morte iminente em *L. vannamei*, por dois patógenos: WSSV e pelo fungo *Fusarium solani*. Contudo, a expressão de *LvClot* diminuiu fortemente nos animais que apresentavam infecções letais por um desses patógenos (GONCALVES et al., 2014). A exemplo disso, poder-se-ia sugerir que o *LvClot* poderia também servir de *indicador precoce de estado mionecrótico em camarões*, uma vez que esse foi o único gene, dentre os 46 analisados, a ter a expressão aumentada em período bastante precoce (24 h), ou seja, muito anterior à visualização dos primeiros sinais clínicos da enfermidade que aparecem após várias semanas da infecção (NUNES et al., 2004). No entanto, seria importante também que novos estudos fossem realizados com animais infectados por outros patógenos mionecrosantes, a fim de estabelecer a especificidade ou não dos níveis aumentados de *LvClot* para mionecrose por IMNV.

No presente estudo, foi analisada a expressão diferenciada (*fold-change* >1,5) de seis genes de diferentes categorias funcionais após 48 h do desafio nos animais que apresentaram de 83-90 % de sobrevivência, decorrentes da defesa antiviral ativada pelo tratamento com RNAi. Os genes analisados foram *LvCrustin*, *Litvan ALF-D*, *LvDcr2*, *Lv-Ago2*, *LvGal* e *LvIAP*.

O tratamento dos animais com dsRNA-IMNV, 48 h antes do desafio letal, levou ao silenciamento viral, limitação da replicação e contenção do processo infeccioso. Esse fato permitiu aos animais que repostas imunológicas-chave fossem precocemente *ativadas em seu organismo* para garantir um estado imunológico satisfatório e a



sobrevivência dos animais. Cabe ressaltar que o período entre 48 h e 72 h coincide com a maior taxa de replicação do IMNV em camarões (LOY et al. 2012). Os seis genes imunológicos acima tiveram sua expressão aumentada justamente nesse período, sugerindo a participação deles e de seus produtos, direta ou indiretamente, na contenção do processo infeccioso pelo IMNV. Outros estudos também relatam um aumento na expressão de vários transcritos nas 48 h pós-desafio, correspondentes a genes de diversas categorias funcionais (ex, defesa antiviral, antimicrobiana, PRPs), em *L. vannamei* desafiados com WSSV (XU et al., 2013; GONÇALVES et al., 2014) ou com *F. solani* (GONÇALVES et al., 2014).

Em relação aos genes da categoria RNAi analisados neste estudo, os que foram diferencialmente expressos 48 h pós-desafio, foram o *LvDcr2* e o *Lv-Ago2*. A Dicer 2 é uma PRP viral, pois reconhece e cliva longas moléculas de dsRNA (ALIYARI e DING, 2009). A cinética de expressão dos transcritos de *LvDcr2* revelou um aumento nos animais tratados com dsRNA específico em 48 h após o desafio. No entanto, no grupo tratado com dsRNA inespecífico, os níveis de Dicer diminuíram progressivamente nos tempos analisados, sugerindo que esses animais não conseguiram limitar o processo infeccioso. Esses resultados indicam a possível ausência de enzima Dicer para clivar os dsRNA nos animais tratados com dsRNA-IGSF4D.

Altos níveis de *LvDcr2* são relatados quando *L. vannamei* foram injetados com moléculas sintéticas que mimetizam dsRNAs virais, como os poly (C-G). Chen e colaboradores (2011) relatam um pico de expressão nas 9 horas pós-injeção com poly (C-G), enquanto que animais desafiados com WSSV, o pico foi encontrado em 48 h após. Outros estudos também relatam o aumento nos níveis de transcritos de Dicer quando os animais são desafiados com WSSV (GUERTLER et al., 2013), TSV (YAO et al., 2010) e IMNV (FEIJÓ et al., no prelo). Recentemente, foi relatada a função da Dicer-2 como mediadora da biogênese de siRNAs antivirais em *M. japonicus*. O silenciamento pós-transcricional de Dicer-2 bloqueou a produção de siRNA-vp28 em camarões infectados com WSSV, aumentando as cópias virais em 24 e 48 h após a infecção viral (HUANG & ZHANG, 2012). Esses dados mostram a importância da presença de transcritos da Dicer para a limitação da infecção viral, como descrito neste trabalho.

Outra família de proteínas do sistema RNAi, as argonautas, representam as proteínas-chave (proteína *slicer*) do complexo multiproteico de silenciamento induzido (RISC) do RNAi (HAMMOND et al., 2001; CARMELL et al., 2002; MARTINEZ et al., 2002;

CARMELL & HANNON, 2004). Essas proteínas compõem um núcleo catalítico, juntamente com outras proteínas, guiando a degradação específica do mRNA alvo (LABREUCHE et al., 2010). No presente estudo, a cinética da expressão gênica de *Lv-Ago2* nos animais de ambos os tratamentos com RNAi, foi semelhante àquela observada para *LvDcr2*, ou seja, um aumento nos transcritos nos animais que sobreviveram em 48 h após o desafio, em comparação aos animais tratados com dsRNA-IGSF4D. Sabe-se que infecções virais severas, como a utilizada no presente estudo, levam a uma rápida replicação e evolução do processo infeccioso, o que gera nos animais uma condição de debilidade imunológica generalizada. À medida que a infecção viral progrediu, uma depleção do sistema RNAi parece ter ocorrido nos animais, uma vez que a partir de 24 h a expressão de *Lv-Ago2* diminuiu consideravelmente nos animais que sucumbiram à infecção.

É possível que o arsenal imunológico do complexo RNAi tenha se montado após as 24 h. Possivelmente se análises nos tempos 72 h e 96 h pós-desafio houvessem sido realizadas, aumento nos níveis de *Lv-Ago2* teriam sido registrados, como relatado em outros estudos com WSSV (GUERTLER et al, 2013) e com IMNV (FEIJÓ et al., no prelo). O fato de os animais que sucumbiram à infecção apresentarem uma diminuição constante na expressão do *Lv-Ago2*, aliado aos altos índices de mortalidade, indicam novamente uma possível ausência de enzima Argonauta para guiar a degradação específica dos dsRNA nos animais tratados com dsRNA-IGSF4D.

Em outro estudo com *P. monodon* não tratados com dsRNA vírus-específico, porém infectados com YHV ou WSSV, a expressão do gene argonauta aumentou apenas nas primeiras 24 h pós-desafio, seguido (30 h pós-desafio) por um rápido declínio na expressão e sendo praticamente indetectável nos animais moribundos (UNAJAK et al., 2006). A expressão dos transcritos argonauta não foi aqui verificada em animais moribundos, no entanto, a mortalidade total dos animais em 17 dias reforça a hipótese de Unajak e colaboradores (2006), de que a diminuição da expressão gênica dessa proteína *slicer*, em estágios mais avançados da infecção, reflete a ausência da atuação do sistema RNAi para inibir a replicação viral no hospedeiro e o aumento da sobrevivência do animal.

Vários relatos apontam para aumento nos níveis de transcritos de genes associados à ativação do mecanismo de RNAi, Dicer e Argonauta, e aumento de sobrevivência em peneídeos infectados com diferentes vírus, como WSSV (KITAGISHI et al., 2011; LI et al., 2013; GONCALVES et al., 2014), TSV (KITAGISHI et al., 2011), YHV

(KITAGISHI et al., 2011) e IMNV (FEIJÓ et al., no prelo). Esses resultados corroboram com os do presente estudo, onde pode-se constatar a presença de transcritos de ambos os genes envolvidos na sobrevivência de *L. vannamei* infectados por IMNV.

Outro gene que apresentou expressão diferenciada entre os diferentes tratamentos foi o codificante para o peptídeo antimicrobiano da família ALF, o *Litvan ALF-D*. Os quatro integrantes da família dos ALFs (ALFA-D) possuem atividade contra um amplo espectro de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (ROSA & BARRACCO, 2010; ROSA et al., 2013), estando também envolvidos na limitação de infecções virais pelo WSSV (LIU et al., 2006; THARNTADA et al., 2009).

No presente estudo, foi verificado um aumento da expressão do *Litvan ALF-D* nos camarões tratados com dsRNA-IMNV, 48 h após o desafio com IMNV. Por outro lado, uma diminuição na expressão desse gene foi observada no mesmo período nos animais tratados com dsRNA-IGSF4D. Embora o papel antiviral dos ALFs não tenha sido ainda bem estabelecido, alguns estudos transcriptômicos indicam a presença aumentada dos transcritos desse PAM relacionada com um efeito inibitório da infecção de camarões pelo WSSV (LIU et al., 2006; THARNTADA et al., 2009). Liu e colaboradores (2006) demonstraram que o silenciamento do ALF de *Pacifastacus leniusculus* leva a um aumento na taxa de replicação do WSSV, sugerindo que esse PAM possua um papel antiviral em crustáceos.

Tharntada e colaboradores (2009) demonstraram que uma forma recombinante de ALF é capaz de inibir *in vitro* a replicação do WSSV infectando células hematopoiéticas em cultura de *P. leniusculus*, o que levou a um aumento da sobrevivência dos animais. Em estudos conduzidos em nosso laboratório, observou-se que o tratamento com dsRNA de sequência viral-específica levou ao restabelecimento das condições gerais de saúde dos camarões, limitando a replicação viral através da atuação do sistema RNAi e permitindo que PAMs importantes, como o ALF, continuassem sendo expressos (GUERTLER, 2010). Em contrapartida, animais desafiados com altas doses de WSSV cujo sistema de RNAi não tenha sido ativado e que morreram em 5 dias, apresentaram expressão do ALF diminuída.

O ALF-D (*Litvan ALF-D*) é o único ALF aniônico e que apresenta atividade antimicrobiana muito baixa, diferente dos ALFs catiônicos que são potentes microbicidas (ROSA et al., 2013). Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que esse PAM deve estar envolvido no processo infeccioso viral, direta ou indiretamente. Embora

não exista ainda relatos na literatura, uma hipótese levantada é que o envolvimento do ALF-D na defesa do organismo não seja nas defesas antimicrobianas, mas sim nas defesas antivirais.

Além do ALF, o peptídeo antimicrobiano crustina (*LvCrustin*) também apresentou uma expressão gênica diferenciada entre os diferentes tratamentos aplicados no presente estudo. A crustina possui ação antimicrobiana restrita a bactérias Gram-positivas (ROSA & BARRACCO, 2010), porém não há ainda relatos de uma potencial função antiviral. De maneira interessante, o perfil transcricional de *LvCrustin* foi bastante similar àquele encontrado para *Litvan ALF-D*, onde um aumento de 2,4-fold change, 48 h pós-desafio, na expressão do *LvCrustin* foi encontrado nos camarões com sistema RNAi ativado, em relação aos animais que morreram.

Vários estudos realizaram o silenciamento pós-transcricional de crustina através da técnica de RNAi e avaliaram a sobrevivência de animais infectados por diferentes patógenos, tais como *Vibrio penaeicida* (SHOCKEY et al., 2009; HIPOLITO et al., 2014), *Vibrio anguillarum* (JIANG et al., 2015; LIU et al., 2015) e *Staphylococcus aureus* (LIU et al., 2015). Em todos os estudos citados anteriormente, a taxa de mortalidade dos animais foi elevada, em decorrência da ausência dos transcritos da crustina. Em relação às infecções virais, Jiang e colaboradores (2015) verificaram um aumento nos transcritos de crustina em *M. japonicus* desafiados com WSSV. Por outro lado, Hipolito e colaboradores (2014) silenciaram a crustina de *M. japonicus* (MjCRS), e não encontraram diferença significativa na mortalidade dos animais desafiados com WSSV em relação ao grupo desafiado com PBS. Os resultados sugerem que MjCRS está envolvido na defesa antibacteriana e pode não ter função contra a infecção viral. Porém, os resultados obtidos no presente estudo sugerem, pela primeira vez, a potencial atuação de *LvCrustin* na limitação da infecção por IMNV.

Neste trabalho, avaliou-se ainda a expressão do gene Galectina (*LvGal*), pertencentes à família das lectinas que se ligam a galactosídeos (BARONDES et al., 1994) e que, em vertebrados, estão envolvidas com uma variedade de processos celulares, tais como adesão, migração, proliferação e apoptose celular, além de participarem em reações inflamatórias (COOPER et al., 1999; ROMER & ELLING, 2011). No presente estudo, no grupo tratado com dsRNA-IMNV, os níveis de transcritos de *LvGal* aumentaram durante o tratamento em relação ao grupo tratado com dsRNA-controle. A manutenção dos níveis de transcritos desse gene nos animais que irão sobreviver, em contrapartida, ao declínio acentuado e crescente nos animais que irão

morrer, sugere que a presença dessa lectina parece ser importante para a sobrevivência dos animais frente à infecção.

Tasumi & Vasta (2007) verificaram que as galectinas da ostra *Crassostrea virginica* (*CvGal*) facilitam o reconhecimento e promovem a fagocitose de bactérias e algas. Eles verificaram ainda que o parasita *Perkinsus marinus* utiliza o mecanismo de reconhecimento imune mediado pelas galectinas para entrar nos hemócitos, favorecendo a infecção. Parrinello e colaboradores (2015) estudaram a expressão de galectina do tunicado *Ciona intestinalis* (*CiLgals* -a/ -b) e verificaram que a expressão desses genes é positivamente regulada quando os animais são injetados com LPS, sugerindo que essa lectina atue na defesa dos animais.

No peneídeo *M. japonicus* foi encontrada uma galectina constitutivamente expressa nos hemócitos, hepatopâncreas e intestino, que se liga a LPS e LTA, facilitando ainda *clearance* bacteriano (WANG & WANG, 2013). Por sua capacidade de se ligar a  $\beta$ -galactosídeos, essa PRP desempenha papéis cruciais nas respostas imunes de invertebrados. O presente estudo é o primeiro relato de uma potencial atividade antiviral da galectina de peneídeos, e maiores estudos são necessários para entender quais mecanismos de ação estão envolvidos, tais como, se ela atua como uma PRP de reconhecimento viral, como sinalizador intracelular para solicitar outras moléculas antivirais ou como uma proteína antiviral.

Finalmente, outro gene avaliado neste estudo foi o *LvIAP*, codificante para a proteína inibidora de apoptose presente no hospedeiro e cuja função é regular e manter a apoptose em níveis não letais no camarão (DEVERAUX & REED, 1999). No presente estudo, houve um aumento de transcritos de *LvIAP* no grupo tratado com dsRNA-IMNV, enquanto no grupo tratado com dsRNA-controle houve diminuição progressiva desse transcrito, semelhantemente ao resultado encontrado para *LvGal*.

Sabe-se que o IMNV se replica preferencialmente no citoplasma de células musculares e que os dsRNAs virais produzidos desencadeiam a apoptose nas células infectadas (LIGHTNER et al., 2004). Porém, uma morte celular excessiva seria extremamente prejudicial ao animal, como ocorre no caso das infecções por WSSV (FLEGEL, 2007). A IAP é uma proteína que inibe a ação das caspases, regulando e evitando uma apoptose excessiva, mantendo um equilíbrio entre o mecanismo de apoptose das células infectadas, sem haver morte celular excessiva. Esse fenômeno parece ter sido mantido nos animais cuja defesa antiviral tenha sido previamente ativada via RNAi. Em contrapartida, nos

animais em que houve uma mionecrose importante, o nível de apoptose deve ter superado o normal, uma vez que os níveis de transcritos de IAPs estavam muito diminuídos 48 h pós-infecção.

A ocorrência de enfermidades virais nos cultivos é um grande obstáculo para o sucesso da carcinicultura. Assim, o estudo das bases moleculares envolvidas na resistência a doenças infecciosas desponta de maneira promissora para a busca de marcadores para o diagnóstico e avaliação do estado de saúde desses animais.

Em conclusão, o presente estudo representa a primeira evidência da expressão diferenciada de genes candidatos de *L. vannamei* a compor uma assinatura transcricional associada à proteção antiviral em camarões contra o IMNV, induzida via RNAi. A ativação dessa assinatura foi identificada 48 horas após a infecção sendo composta por seis genes (*Litvan ALF-D*, *LvCrustin*, *Lv-Ago2*, *LvDcr2*, *LvGal*, *LvIAP*), estando intimamente associada às condições adequadas de saúde dos camarões sobreviventes, decorrente da ativação prévia da defesa antiviral nos animais que garantiu a limitação da infecção viral e a sobrevivência de cerca de 90 % dos animais em 30 dias.

Não se verificou, no presente estudo, se a ativação do sistema de RNAi levou a uma diminuição na carga viral ou mesmo a um *clearance* viral nos animais sobreviventes, como encontrado no caso de animais infecados por WSSV (GUERTLER et al., 2013). Contudo, pode-se concluir que o tratamento com dsRNA-IMNV permitiu que as moléculas associadas ao sistema imunológico e antiviral montassem uma defesa efetiva nos animais, antes que a infecção pelo IMNV se tornasse ameaçadora. A identificação de genes associados à sobrevivência à mionecrose infecciosa (NIM) poderá, em futuro próximo, fornecer subsídios para o desenvolvimento de marcadores moleculares que auxiliem na seleção de reprodutores menos susceptíveis à infecção pelo IMNV.

## 6. CONCLUSÕES

- O tratamento de camarões com moléculas de dsRNA específicas para o genoma do IMNV foi capaz de limitar a infecção viral e conferir proteção aos animais contra esse vírus;
- O tratamento de camarões com moléculas de dsRNA de sequência viral-inespecífica não foi capaz de conferir sobrevivência aos animais;
- Uma assinatura transcricional (composta por seis genes hemocitários) foi identificada em camarões com RNAi induzido, estando associada a uma resposta imune eficaz contra o IMNV;
- Um gene (*LvClot*) foi identificado em animais infectados por IMNV, cuja expressão é indicador de um estado mionecrótico precoce em camarões.





## 7. PERSPECTIVAS

- O tratamento de camarões com moléculas de dsRNA específicas para o genoma do IMNV foi capaz de limitar a infecção viral e conferir proteção aos animais contra esse vírus;
- O tratamento de camarões com moléculas de dsRNA de sequência viral-inespecífica não foi capaz de conferir sobrevivência aos animais;
- Uma assinatura transcricional (composta por seis genes hemocitários) foi identificada em camarões com RNAi induzido, estando associada a uma resposta imune eficaz contra o IMNV;
- Um gene (*LvClot*) foi identificado em animais infectados por IMNV, cuja expressão é indicador de um estado mionecrótico precoce em camarões.



## 8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LITCHMAN, A. H.; PILLAI, S. Cellular and Molecular Immunology. 8° ed., **Saunders**, p. 535, Canada. 2015.

ABCC – Associação Brasileira de Criadores de Camarão. BORBA, M.; NOGUEIRA, J. Carcinicultura Brasileira: o perfil do setor em cada unidade federativa produtora em 2011. **Revista da ABCC**, ano XV, n. 2, p. 26-29, jun. 2013.

ALIYARI, R.; DING, S.-W. RNA-based viral immunity initiated by the Dicer family of host immune receptors. **Immunological Reviews**, v. 227, n. 1, p. 176–188, jan. 2009.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer research** 64:5245-5250. 2004.

ANDRADE, T. P. D. et al. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of Infectious myonecrosis virus (IMNV). **Aquaculture**, v. 264, n. 1-4, p. 9–15, abr. 2007.

ARDURA, M. I. et al. Enhanced Monocyte Response and Decreased Central Memory T Cells in Children with Invasive *Staphylococcus aureus* Infections. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, p. e5446, 8 maio 2009.

ARMITAGE, S. A. O.; PEUB, R.; KURTZ, J. Dscam and pancrustacean immune memory - A review of the evidence. **Developmental and Comparative Immunology**, 19 mar. 2014.

ASSAVALAPSAKUL, W.; CHINNIRUNVONG, W.; PANYIM, S. Application of YHV-protease dsRNA for protection and therapeutic treatment against yellow head virus infection in *Litopenaeus vannamei*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 84, n. 2, p. 167–171, 6 abr. 2009.

BARONDES, S. H. et al. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 33, p. 20807–20810, 19 ago. 1994.

BARRACCO, M.A, PERAZZOLO, L.M, ROSA, R.D. Avances en la Inmunología del Camarón. In: Morales V, Cuéllar-Anjel J (Org.) Guía Práctica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. 2ed. Panamá: OIRSA, p. 237-304. 2014.

BARTHOLOMAY, L. C. et al. Nucleic-acid based antivirals: augmenting RNA interference to “vaccinate” *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 261–266, jun. 2012.

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

BERRY, M. P. R. et al. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. **Nature**, v. 466, n. 7309, p. 973–977, 19 ago. 2010.

BERTHIER, D. et al. Serial analysis of gene expression (SAGE) in bovine trypanotolerance: preliminary results. **Genetics, selection, evolution: GSE**, v. 35 Suppl 1, p. S35–47, 2003.

BORTOLAMIOL, D.; PAZHOUHANDEH, M.; ZIEGLER-GRAFF, V. Viral suppression of RNA silencing by destabilisation of ARGONAUTE 1. **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, n. 9, p. 657–659, set. 2008.

CARMELL, M. A. et al. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. **Genes & Development**, v. 16, n. 21, p. 2733–2742, 1 nov. 2002.

CARMELL, M. A.; HANNON, G. J. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 11, n. 3, p. 214–218, mar. 2004.

CARRIEL-GOMES, M. C. et al. In vitro antiviral activity of antimicrobial peptides against herpes simplex virus 1, adenovirus, and rotavirus. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 4, p. 469–472, jun. 2007.

CHEN, X. et al. Transcriptome Analysis of *Litopenaeus vannamei* in Response to White Spot Syndrome Virus Infection. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e73218, 26 ago. 2013.

CHEN, Y.-H. et al. Identification and functional characterization of Dicer2 and five single VWC domain proteins of *Litopenaeus vannamei*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 6, p. 661–671, jun. 2011.

CLAVERO-SALAS, A. et al. Transcriptome analysis of gills from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* infected with White Spot Syndrome Virus. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, n. 2, p. 459–472, ago. 2007.

COLBOURNE, J. K. et al. The Ecoresponsive Genome of *Daphnia pulex*. **Science**, v. 331, n. 6017, p. 555–561, 4 fev. 2011.

COOPER, D. N. W.; BARONDES, S. H. God must love galectins; He made so many of them. **Glycobiology**, v. 9, n. 10, p. 979–984, 10 jan. 1999.

COSTA, S.W. et al. Caracterização do cultivo de camarões no Sul do Brasil. Em: Simposio Brasileiro de Aquicultura, 11, Florianópolis. Anais. Florianópolis: ABRAq (CD Room). Florianópolis, 2000.

COVARRUBIAS, M. S. M. Enfermedades del Camarón. Detección Mediante Análisis em Fresco e Histopatología. México: Trillas, 2010, pp. 180.

DANEHOLT, B. The Nobel Prize in Physiology or Medicin 2006 (<http://nobelprize.org>).

DECHKLAR, M.; UDOMKIT, A.; PANYIM, S. Characterization of Argonaute cDNA from *Penaeus monodon* and implication of its role in RNA interference. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 367, n. 4, p. 768–774, 21 mar. 2008.

DE LORGERIL, J. et al. Identification of genes that are differentially expressed in hemocytes of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) surviving an infection with *Vibrio penaeicida*. **Physiological Genomics**, v. 21, n. 2, p. 174–183, 14 abr. 2005.

DE LORGERIL, J. et al. A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 12, p. 3438–3445, jul. 2008.

DEVERAUX, Q. L.; REED, J. C. IAP family proteins—suppressors of apoptosis. **Genes & Development**, v. 13, n. 3, p. 239–252, 2 jan. 1999.

DHAR, A. K. et al. Identification of differentially expressed genes in shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with White spot syndrome virus by cDNA microarrays. **Archives of Virology**, v. 148, n. 12, p. 2381–2396, dez. 2003.

DONNELLY, M. L. et al. The “cleavage” activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring “2A-like” sequences. **The Journal of General Virology**, v. 82, n. Pt 5, p. 1027–1041, maio 2001.

E., C.; ELLING, L. Galectins: Structures, Binding Properties and Function in Cell Adhesion. In: PIGNATELLO, R. (Ed.) **Biomaterials - Physics and Chemistry**. [s.l.] InTech, 2011.

FEIJÓ R. G. **Mecanismo de RNA de Interferência (RNAi) como uma ferramenta biotecnológica para a sanidade e reprodução do camarão branco *Litopenaeus vannamei***. 2014. 120 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. 2014.

FEIJÓ, R. G.; MAGGIONI, R.; MARTINS, P. C. C.; ABREU, K. L.; OLIVEIRA-NETO, J. M.; GUERTLER, C.; JUSTINO, E. B.; PERAZZOLO, M. P.; MARINS, L. F. RNAi-based inhibition of *Infectious myonecrosis virus* replication in the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by dsRNAs targeted to different genome regions. **Diseases of Aquatic Organisms**. No. 201406018. No prelo.

FLEGEL, T. W. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 31, n. 3, p. 217–231, 2007.

FLEGEL, T. W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 166–173, jun. 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO); FISHERIES AND AQUACULTURE DEPARTMENT. **The state of world fisheries and aquaculture 2014**. Rome; London: Food and Agriculture Organization of the United Nations ; Eurospan [distributor], 2014.

GONCALVES, P. et al. Molecular signatures at imminent death: Hemocyte gene expression profiling of shrimp succumbing to viral and fungal infections. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 42, n. 2, p. 294–301, fev. 2014.

GOUVEIA, R. P. & FREITAS, M. L. Southern brown shrimp found susceptible to IMNV. **Global Aquaculture Advocate**. p. 86. jul/ago. 2007.

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, set. 2001.

GUERTLER, C. **Defesa antiviral em *Litopenaeus vannamei* contra o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), induzida via RNA de interferência, e sua influência na expressão de alguns genes imunológicos**. 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2010.

GUERTLER, C. et al. Hemograma e sobrevivência de camarões marinhos após silenciamento do WSSV por RNA de interferência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 983–990, ago. 2013.

HAMMOND, S. M. et al. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5532, p. 1146–1150, 10 ago. 2001.

HANNON, G. J. RNA interference. **Nature**, v. 418, n. 6894, p. 244–251, 11 jul. 2002.

HARPENI, E. The potential roles of Interferon in managing viral diseases in crustacean. **Journal of coastal development**, v. 14, n. 2, p. 91–103, 2011.

HASSON, K. W.; FAN, Y.; VARNER, P. W. Current infections marine shrimp diseases of concern in the United States. In: Korea-us seminar and workshop on the sustainable marine shrimp culture: challenges and opportunities for the future of marine shrimp farming. **West Sea Fisheries Research Institute/NOAA**: Incheon, p. 24-26. 2005.

HEGEDUS, Z. et al. Deep sequencing of the zebrafish transcriptome response to mycobacterium infection. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 15, p. 2918–2930, set. 2009.

HIPOLITO, S. G. et al. Role of *Marsupenaeus japonicus* crustin-like peptide against *Vibrio penaeicida* and white spot syndrome virus infection. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 46, n. 2, p. 461–469, out. 2014.

HOA, T. T. T. et al. Mixed-genotype white spot syndrome virus infections of shrimp are inversely correlated with disease outbreaks in ponds. **The Journal of General Virology**, v. 92, n. Pt 3, p. 675–680, mar. 2011.

HO, T. et al. Double-stranded RNA confers both preventive and therapeutic effects against *Penaeus stylirostris* densovirus (PstDNV) in *Litopenaeus vannamei*. **Virus Research**, v. 155, n. 1, p. 131–136, jan. 2011.

HUANG, T.; ZHANG, X. Host defense against DNA virus infection in shrimp is mediated by the siRNA pathway. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 1, p. 137–146, 2013.

HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 3, p. 227–235, mar. 2010.

IDEMA-Instituto de Desenvolvimento Econômico e Meio Ambiente do Rio Grande do Norte. Desenvolvimento Sustentável – RN Melhor para Carcinicultura. Ano I (1), 1-6, fev. 2006.



- IMLER, J.-L. Overview of *Drosophila* immunity: A historical perspective. **Developmental & Comparative Immunology**, *Drosophila Immunity*, v. 42, n. 1, p. 3–15, jan. 2014.
- JIANG, H.-S. et al. Four crustins involved in antibacterial responses in *Marsupenaeus japonicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 43, n. 2, p. 387–395, 9 jan. 2015.
- KAUTSKY, N. et al. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, v. 191, n. 1, p. 145–161, 2000.
- KHANOBDDEE, K. et al. Evidence for apoptosis correlated with mortality in the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with yellow head virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 48, n. 2, p. 79–90, 11 mar. 2002.
- KITAGISHI, Y. et al. Dicer Functions in Aquatic Species. **Journal of Amino Acids**, v. 2011, p. e782187, 9 jun. 2011.
- KOONIN, E. V.; GORBALENYA, A. E.; CHUMAKOV, K. M. Tentative identification of RNA-dependent RNA polymerases of dsRNA viruses and their relationship to positive strand RNA viral polymerases. **FEBS letters**, v. 252, n. 1-2, p. 42–46, 31 jul. 1989.
- KRISHNAN, P. et al. RNA interference-based therapeutics for shrimp viral diseases. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 86, n. 3, p. 263–272, 9 nov. 2009.
- KUNANOPPARAT, A. et al. Detection of infectious myonecrosis virus using monoclonal antibody specific to N and C fragments of the capsid protein expressed heterologously. **Journal of Virological Methods**, v. 171, n. 1, p. 141–148, jan. 2011.
- KURTZ, J.; ARMITAGE, S. A. O. Alternative adaptive immunity in invertebrates. **Trends in Immunology**, v. 27, n. 11, p. 493–496, nov. 2006.
- LABREUCHE, Y. et al. Lack of evidence for *Litopenaeus vannamei* Toll receptor (IToll) involvement in activation of sequence-independent antiviral immunity in shrimp. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 33, n. 7, p. 806–810, jul. 2009.

LABREUCHE, Y.; VELOSO, A.; DE LA VEJA, E.; GROSS, P.S.; CHAPMAN, R.W.; BROWDY, C.L.; WARR, G.W. Non-specific activation of antiviral immunity and induction of RNA interference may engage the same pathway in the Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, n. 11, p. 1209-1218, 2010.

LABREUCHE, Y.; WARR, G. W. Insights into the antiviral functions of the RNAi machinery in penaeid shrimp. **Fish & Shellfish Immunology**, Innate Immune System of Shrimp. v. 34, n. 4, p. 1002–1010, abr. 2013.

LA FAUCE, K.; OWENS, L. RNA interference with special reference to combating viruses of crustacea. **Indian Journal of Virology: An Official Organ of Indian Virological Society**, v. 23, n. 2, p. 226–243, set. 2012.

LEU, J.-H. et al. Comparative analysis of differentially expressed genes in normal and white spot syndrome virus infected *Penaeus monodon*. **BMC Genomics**, v. 8, p. 120, 16 maio 2007.

LEU, J.-H. et al. *Litopenaeus vannamei* inhibitor of apoptosis protein 1 (LvIAP1) is essential for shrimp survival. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 38, n. 1, p. 78–87, set. 2012.

LI, F.; DING, S.-W. Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 503–531, 2006.

LIGHTNER, D. V.; PANTOJA, C. R.; POULOS, B. T.; TANG, K. F. J.; REDMAN, R. M.; PASOS DE ANDRADE, T. & BONAMI, J. R. Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white shrimp. **Glob Aquac Advocate** 7, 85. 2004.

LIGHTNER, D. V. Status of shrimp diseases and advances in shrimp health management. **Diseases in Asian Aquaculture VII. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia**, p. 121–134, 2011a.

LIGHTNER, D. V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 106, n. 1, p. 110–130, jan. 2011b.

LIGHTNER, D. V. et al. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 174–183, jun. 2012.

LI, S. et al. Transcriptome Analysis on Chinese Shrimp *Fenneropenaeus chinensis* during WSSV Acute Infection. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e58627, 19 mar. 2013.

LIU, H. et al. Antilipopolsaccharide Factor Interferes with White Spot Syndrome Virus Replication In Vitro and In Vivo in the Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Journal of Virology**, v. 80, n. 21, p. 10365–10371, nov. 2006.

LIU, H.; SÖDERHÄLL, K.; JIRAVANICHPAISAL, P. Antiviral immunity in crustaceans. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 27, n. 2, p. 79–88, ago. 2009.

LIU, J. et al. A new anti-lipopolsaccharide factor (ALF) gene with its SNP polymorphisms related to WSSV-resistance of *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 39, n. 1, p. 24–33, jul. 2014.

LIU, N. et al. A novel crustin from *Marsupenaeus japonicus* promotes hemocyte phagocytosis. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 49, n. 2, p. 313–322, abr. 2015.

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

LORAND, L.; CONRAD, S. M. Transglutaminases. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 58, n. 1-2, p. 9–35, 1984.

LOY, J. et al. Sequence-optimized and targeted double-stranded RNA as a therapeutic antiviral treatment against infectious myonecrosis virus in *Litopenaeus vannamei*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 105, n. 1, p. 57–64, 9 jul. 2013.

LOY, J. D. et al. dsRNA provides sequence-dependent protection against infectious myonecrosis virus in *Litopenaeus vannamei*. **Journal of General Virology**, v. 93, n. Pt\_4, p. 880–888, 1 abr. 2012.

MARTINEZ, J. et al. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. **Cell**, v. 110, n. 5, p. 563–574, 6 set. 2002.

MARTINS, P.C.C. Cultivo de camarão marinho. In: Sanidade de organismos aquáticos no Brasil. **ABRAPOA**, Maringá: Silva-Souza, p.121-135. 2006.

MEJÍA-RUIZ, C. H. et al. Double-stranded RNA against white spot syndrome virus (WSSV) vp28 or vp26 reduced susceptibility of *Litopenaeus vannamei* to WSSV, and survivors exhibited decreased susceptibility in subsequent re-infections. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 107, n. 1, p. 65–68, maio 2011.

NG, T. H. et al. Reprint of “Review of Dscam-mediated immunity in shrimp and other arthropods”. **Developmental and Comparative Immunology**, 30 jul. 2014.

NIBERT, M. L. “2A-like” and “shifty heptamer” motifs in penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, a monosegmented double-stranded RNA virus. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 4, p. 1315–1318, 1 abr. 2007.

NUNAN, L. M.; LIGHTNER, D. V. Optimized PCR assay for detection of white spot syndrome virus (WSSV). **Journal of Virological Methods**, v. 171, n. 1, p. 318–321, jan. 2011.

NUNES, A.J.P.; MARTINS, P.C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda. **Panorama da Aqüicultura**. Rio de Janeiro. v. 12, p. 23-33. jul/ago. 2002.

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

ORDAS, A. et al. Deep sequencing of the innate immune transcriptomic response of zebrafish embryos to *Salmonella* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, n. 5, p. 716–724, nov. 2011.

PARKER J.S.; BARFORD D. Argonaute: A scaffold for the function of short regulatory RNAs. **Trends Biochem. Sci.** 31:622–630. 2006.

PARRINELLO, D. et al. *Ciona intestinalis* galectin (CiLgals-a and CiLgals-b) genes are differentially expressed in endostyle zones and challenged by LPS. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 42, n. 1, p. 171–176, jan. 2015.

PASCUAL, V.; CHAUSSABEL, D.; BANCHEREAU, J. A genomic approach to human autoimmune diseases. **Annual Review of Immunology**, v. 28, p. 535–571, 2010.

PERAZZOLO; ROSA; BARRACO. Capítulo 14. Defesas Antivirais em Crustáceos: Estado da Arte. In: Ângela Teresa Silva- Souza, Maria de los Angeles Perez Lizama, Ricardo Massato Takemoto. **Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos**. 1ra ed. Maringá-Brazil. Organizadores. p. 315-354, 2012.

PEREIRA *et al.* 2008. Mionecrosis infecciosa viral (IMNV) y sus implicaciones en los cultivos de camarones brasileños. p 96-103. In: Morales y Cuéllar-Anjel (eds.). **Guía Técnica: Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos**. 270 pp. ISBN: 978-9962-661-02-3. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. 2008.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology letters** 26:509-515. 2004.

PHAM, L. N. et al. A Specific Primed Immune Response in *Drosophila* Is Dependent on Phagocytes. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 3, mar. 2007.

PONGSOMBOON, S. et al. Differentially expressed genes in *Penaeus monodon* hemocytes following infection with yellow head virus. **BMB reports**, v. 41, n. 9, p. 670–677, 30 set. 2008.

POULOS, B. T. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 4, p. 987–996, 1 abr. 2006.

PRAPAVORARAT, A.; PONGSOMBOON, S.; TASSANAKAJON, A. Identification of genes expressed in response to yellow head virus infection in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, by suppression subtractive hybridization. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, n. 6, p. 611–617, jun. 2010.

PREECHAPHOL, R. et al. Expressed sequence tag analysis for identification and characterization of sex-related genes in the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 4, p. 501–510, 31 jul. 2007.

PRIOR, S. et al. 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, n. 2, p. 89–96, 2003.

RAMILO, O. et al. Gene expression patterns in blood leukocytes discriminate patients with acute infections. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 2066–2077, 1 mar. 2007.

REYES, A.; SALAZAR, M.; GRANJA, C. Temperature modifies gene expression in subcuticular epithelial cells of white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 31, n. 1, p. 23–29, 2007.

ROBALINO, J. et al. Induction of Antiviral Immunity by Double-Stranded RNA in a Marine Invertebrate. **Journal of Virology**, v. 78, n. 19, p. 10442–10448, out. 2004.

ROBALINO, J. et al. Double-Stranded RNA Induces Sequence-Specific Antiviral Silencing in Addition to Nonspecific Immunity in a Marine Shrimp: Convergence of RNA Interference and Innate Immunity in the Invertebrate Antiviral Response? **Journal of Virology**, v. 79, n. 21, p. 13561–13571, nov. 2005.

ROBALINO, J. et al. Double-stranded RNA and antiviral immunity in marine shrimp: inducible host mechanisms and evidence for the

evolution of viral counter-responses. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 31, n. 6, p. 539–547, 2007.

ROBALINO, J. et al. Contributions of functional genomics and proteomics to the study of immune responses in the Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 110–118, 15 mar. 2009.

RONEMUS, M.; VAUGHN, M. W.; MARTIENSSEN, R. A. MicroRNA-targeted and small interfering RNA-mediated mRNA degradation is regulated by argonaute, dicer, and RNA-dependent RNA polymerase in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 18, n. 7, p. 1559–1574, jul. 2006.

ROSA, R. D. et al. A hemocyte gene expression signature correlated with predictive capacity of oysters to survive *Vibrio* infections. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 252, 18 jun. 2012.

ROSA, R. D. et al. Functional Divergence in Shrimp Anti-Lipopolysaccharide Factors (ALFs): From Recognition of Cell Wall Components to Antimicrobial Activity. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e67937, 4 jul. 2013.

ROSA, R. D.; BARRACCO, M. A. Shrimp interferon is rather a portion of the mitochondrial F<sub>0</sub>-ATP synthase than a true alpha-interferon. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 12, p. 3490–3493, jul. 2008.

ROSA, R. D.; BARRACCO, M. A. Antimicrobial peptides in crustaceans. **Invert. Surviv. J**, v. 7, p. 262–284, 2010.

SAHTOUT, A. H.; HASSAN, M. D.; SHARIFF, M. DNA fragmentation, an indicator of apoptosis, in cultured black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white spot syndrome virus (WSSV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 44, n. 2, p. 155–159, 9 mar. 2001.

SANTOS, C. A.; BLANCK, D. V.; DE FREITAS, P. D. RNA-seq as a powerful tool for penaeid shrimp genetic progress. **Frontiers in Genetics**, v. 5, p. 298, 2014.

SENAPIN, S. et al. Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. **Aquaculture**, v. 266, n. 1, p. 32–38, 2007.

SHEKHAR, M. S.; LU, Y. Application of nucleic-acid-based therapeutics for viral infections in shrimp aquaculture. **Marine Biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 11, n. 1, p. 1–9, fev. 2009.

SHOCKEY, J. E. et al. The role of crustins in *Litopenaeus vannamei* in response to infection with shrimp pathogens: An in vivo approach. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 33, n. 5, p. 668–673, maio 2009.

SILVER, N. et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC molecular biology**, v. 7, n. 1, p. 33, 2006.

SOOKRUKSAWONG, S. et al. RNA-Seq analysis reveals genes associated with resistance to Taura syndrome virus (TSV) in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 41, n. 4, p. 523–533, dez. 2013.

SOONTHORNCHAI, W. et al. Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, n. 1, p. 19–28, jan. 2010.

SUPUNGUL, P. et al. Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Marine Biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 4, n. 5, p. 487–494, out. 2002.

SUPUNGUL, P. et al. Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 61, n. 1-2, p. 123–135, 21 out. 2004.

TANG, J. et al. Infectious myonecrosis virus has a totivirus-like, 120-subunit capsid, but with fiber complexes at the fivefold axes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 45, p. 17526–17531, 2008.



TANG, K. F. J. et al. 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, n. 2-3, p. 261–265, 28 fev. 2005.

TANG, K. F. J.; LIGHTNER, D. V. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 44, n. 2, p. 79–85, 9 mar. 2001.

TASUMI, S.; VASTA, G. R. A galectin of unique domain organization from hemocytes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus*. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 179, n. 5, p. 3086–3098, 1 set. 2007.

THARNTADA, S. et al. Role of anti-lipopolysaccharide factor from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, in protection from white spot syndrome virus infection. **The Journal of General Virology**, v. 90, n. Pt 6, p. 1491–1498, jun. 2009.

TIRASOPHON, W. et al. Therapeutic inhibition of yellow head virus multiplication in infected shrimps by YHV-protease dsRNA. **Antiviral Research**, v. 74, n. 2, p. 150–155, maio 2007.

TIRASOPHON, W.; ROSHORM, Y.; PANYIM, S. Silencing of yellow head virus replication in penaeid shrimp cells by dsRNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 334, n. 1, p. 102–107, 19 ago. 2005.

UNAJAK, S.; BOONSAENG, V.; JITRAPAKDEE, S. Isolation and characterization of cDNA encoding Argonaute, a component of RNA silencing in shrimp (*Penaeus monodon*). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 145, n. 2, p. 179–187, out. 2006.

VALDERRAMA, D., ANDERSON, J.L., 2011. PRODUCTION: Global Shrimp Review. *Global Aquaculture Advocate* (January/February) 15, 8.

VALENZUELA-MIRANDA, D. et al. Sex-dependent transcriptome analysis and single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in the brine shrimp *Artemia franciscana*. **Marine Genomics**, v. 18PB, p. 151–154, 29 out. 2014.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. research0034, 2002.

VAN DE VIJVER, M. J. et al. A Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 25, p. 1999–2009, 19 dez. 2002.

VAN 'T VEER, L. J. et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, v. 415, n. 6871, p. 530–536, 31 jan. 2002.

VELOSO, A. et al. The transcriptomic response to viral infection of two strains of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 3, p. 241–246, mar. 2011.

WANG, B. et al. Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray. **Marine Biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 8, n. 5, p. 491–500, out. 2006.

WANG, H.-C. et al. Identification of icp11, the most highly expressed gene of shrimp white spot syndrome virus (WSSV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 74, n. 3, p. 179–189, 13 mar. 2007.

WANG, S. et al. TRBP and eIF6 Homologue in *Marsupenaeus japonicus* Play Crucial Roles in Antiviral Response. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e30057, 18 jan. 2012.

WANG, X.-W.; WANG, J.-X. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 4, p. 981–989, abr. 2013.

WEI, J. et al. RNA-Seq reveals the dynamic and diverse features of digestive enzymes during early development of Pacific white shrimp

*Litopenaeus vannamei*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part D, Genomics & Proteomics**, v. 11, p. 37–44, set. 2014.

WONGPRASERT, K. et al. Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white-spot syndrome virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 55, n. 1, p. 3–10, 20 jun. 2003.

XU, D. et al. Cellular immune responses against viral pathogens in shrimp. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 47, n. 2, p. 287–297, dez. 2014.

XUE, S. et al. Sequencing and de novo analysis of the hemocytes transcriptome in *Litopenaeus vannamei* response to white spot syndrome virus infection. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e76718, 2013.

YAO, X. et al. A Dicer-1 gene from white shrimp *Litopenaeus vannamei*: expression pattern in the processes of immune response and larval development. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, n. 4, p. 565–570, out. 2010.

YEH, S.-P. et al. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 26, n. 4, p. 582–588, abr. 2009.

YODMUANG, S. et al. YHV-protease dsRNA inhibits YHV replication in *Penaeus monodon* and prevents mortality. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 341, n. 2, p. 351–356, 10 mar. 2006.

YU, Y. et al. SNP discovery in the transcriptome of white Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei* by next generation sequencing. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e87218, 2014.

ZANOTTO, P. M. et al. A reevaluation of the higher taxonomy of viruses based on RNA polymerases. **Journal of Virology**, v. 70, n. 9, p. 6083–6096, set. 1996.

ZENG, D. et al. Transcriptome Analysis of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Hepatopancreas in Response to Taura

Syndrome Virus (TSV) Experimental Infection. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e57515, 28 fev. 2013.

ZHAO, S. et al. Comparative proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under different nitrogen sources. **Journal of Proteomics**, v. 101, p. 102–112, 14 abr. 2014.

ZHAO, Z.-Y. et al. Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridisation. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, n. 5, p. 520–534, maio 2007.