

LAURA FREITAS SARAIVA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE COMPARATIVA DE MARCADORES
MOLECULARES DO GENOMA DO VÍRUS DA SÍNDROME DA
MANCHA BRANCA (WSSV) EM DIFERENTES ESPÉCIES DE
CRUSTÁCEOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina como parte das
exigências para a obtenção dos títulos
de Bacharel e Licenciada em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria
Risoleta Freire Marques
Coorientadora: Pós-Dra. Claudia
Hollatz

Florianópolis
2015

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

, Laura Freitas Saraiva de Oliveira

Análise comparativa de marcadores moleculares do genoma do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) em diferentes espécies de crustáceos. / Laura Freitas Saraiva de Oliveira ; orientador, Maria Risoleta Freire Marques ; coorientador, Claudia Hollatz. - Florianópolis, SC, 2015. 59 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Síndrome da Mancha Branca. 3. Litopenaeus vannamei. 4. Neohelice Granulatta. 5. Marcadores Genéticos. I. Freire Marques, Maria Risoleta . II. Hollatz, Claudia. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

LAURA FREITAS SARAIVA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE COMPARATIVA DE MARCADORES
MOLECULARES DO GENOMA DO VÍRUS DA SÍNDROME DA
MANCHA BRANCA (WSSV) EM DIFERENTES ESPÉCIES DE
CRUSTÁCEOS.**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para
obtenção dos Títulos de Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas.

Florianópolis, 3 de julho de 2015.

Prof.^a Maria Risoleta Freire Marques, Dr.^a
Coordenador do Curso de Ciências Biológicas

Banca Examinadora:

Prof.^a Maria Risoleta Freire Marques, Dr.^a
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Isabel Cristina Müller, Dr.^a
Instituto Federal de Santa Catarina

Guilherme de Toledo e Silva, Pós-Dr.
Universidade Estadual de Campinas

Este trabalho é dedicado aos meus pais
Cristina e Dogivaldo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus amados pais Cristina e Dogivaldo, a quem dedico esse trabalho, por lutarem arduamente durante grande parte de suas vidas para prover a mim e à minha irmã os melhores colégios, os melhores cursos e tudo o que necessitávamos para nos tornarmos grandes profissionais. Ao meu querido pai, agradeço todas as conversas francas, porém amorosas. Por todo apoio psicológico e emocional durante toda a minha graduação. Por todos os momentos de descontração, por suas brincadeiras e palhaçadas que fizeram esse processo ficar muito mais leve e prazeroso! Não posso deixar de agradecer-lo por sua exigência militar, o que fez com que eu só me contentasse com o melhor de mim. À minha amada mãe agradeço pelos abraços reconfortantes nos momentos de quase desistência. Por todo seu amor incondicional que me fez e faz enxergar além dos problemas que me afligem. Agradeço por todos os pequenos agrados que me fez, quando o cansaço me tirava o sorriso! Mãe, Pai vocês são o meu alicerce, a matéria prima a qual estou moldando com o passar dos dias e das experiências para me tornar completa. Muito obrigada por tudo o que são e o que me ensinaram, palavras são insignificantes diante do que vocês representam para mim! Amo vocês!

Agradeço à minha irmã Laís, apesar de estar longe seu apoio foi indispensável para o término desse trabalho. Obrigada por me transmitir sua experiência através de conselhos sinceros, por me compreender de forma tão genuína e me tornar mais forte com seu carinho. Muito obrigada Lala por me transformar em uma pessoa melhor do que eu seria! Te amo Chuchu!

Com muito carinho agradeço à Professora Doutora Maria Risoleta Freire Marques, que abriu as portas de seu laboratório à uma menina tímida que acabara de terminar a segunda fase do curso. Foram mais de cinco anos de trabalho duro e incontáveis aprendizados, acadêmicos e pessoais. Foi sob a orientação da senhora e pelo convívio com tantos colegas do LABCAI que pude me tornar a profissional que sou hoje.

Agradeço a todos os colegas do LABCAI, todos contribuíram com a minha formação, não só como bióloga, mas como pessoa. Gostaria de agradecer em especial à Juliana Righetto Moser (Ju) e à Ana Paula de Medeiros Fraga (Aninha) pela paciência e dedicação que tiveram ao me ensinarem tudo o que sabiam em meus primeiros dias, na verdade anos, como futura pesquisadora. Querida Claudia Hollatz (Clau), você não foi apenas minha coorientadora, mas como gostávamos

de brincar, minha “ mãe científica”. Muito obrigada por todas as orientações, por toda a confiança que teve em mim e tudo o que me ensinou! Lembrarei para sempre de você!

Gabriel Machado Matos (Gabs), Miriam Gualdezi (Mi), Talita Miguelão (Tali), Tomás Bohn Pessati (Tomatinho) e Cecília Souza (Ceci), sem vocês o que seria dessa experiência toda? Isso eu não posso responder, mas com certeza vocês são amigos que levarei para o resto da minha vida! Não tenho palavras, nem linhas suficientes para descrever a importância que vocês têm na minha vida pessoal e acadêmica! Muito obrigada por todas as risadas, cafés, programas legais pós laboratório, por todas as reações de PCR guardadas para mim, por todas as placas de sequenciamento, tampões, caixinhas, amostras, enfim, por estarem sempre presentes e prestativos! Amo vocês muito!

Agradeço aos membros da banca que se disponibilizaram a ceder parte do seu tempo para ler e avaliar meu trabalho. Muito Obrigada Professora Doutora Isabel Cristina Müller e Professor Doutor Carlos Peres Silva pela compreensão e por virem participar da minha banca! Ao Doutor Guilherme Toledo por toda a atenção, paciência e dedicação para me ensinar um pouco desse novo mundo chamado bioinformática!

Aos meus amigos de turma, não conseguirei ser justa pois foram muitas as pessoas especiais que cruzaram o meu caminho nessa jornada, a todos agradeço com muito carinho. Gustavo Felipe Dell’Antônio Flores (Gug), Tábata Burkhardt Rodrigues (Batatinha) e Ana Gabriela Itokazu Canzian (Chun), nem preciso agradecer né! Vocês são os integrantes ideais para formar o quarteto fantástico mais fantástico que eu poderia fazer parte. Muito obrigada por tudo, trabalhos, festas, nossa é tanta coisa! A amizade de vocês é impagável, nem tenho como agradecer. Querida Priscilla Barros Delben (Pri), eu já deveria ser grata só por você ter me arrastado para o LABCAI contigo, mas acabou que isso ficou insignificante perto de tudo o que você se tornou para mim. Muito obrigada por me ensinar que uma amizade verdadeira sobrevive sempre, não importa quais foram os mal-entendidos.

Ao meu querido namorado, Raynner Xavier Gonçalves, agradeço todo o seu apoio e incentivo. Por sempre me dizer o quanto achava bonito a minha dedicação e empenho, dando-me ainda mais coragem para continuar. Pelos momentos lindos que me proporcionou, ajudando-me a aliviar a tensão do final dessa jornada. Te amo!

E por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer a todos os professores do Curso de graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, por ajudarem a me tornar aquilo que tanto almejei, ser uma bióloga!

“Uma pessoa para compreender tem de se transformar.”

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

O vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) tem causado grande mortalidade nas regiões produtoras de camarão em nível mundial. As taxas de mortalidade podem atingir 100%, após três a nove dias da observação dos primeiros sinais clínicos, acarretando perdas econômicas significativas aos produtores e gerando, ainda, grande impacto social. Os VNTRs (*Variable Number Tandem Repeats*) associados a três ORFs (75, 94, 125) presentes no genoma do WSSV, foram propostos como marcadores com base em estudos epidemiológicos e de genotipagem realizados recentemente. O objetivo do presente trabalho foi genotipar e analisar comparativamente as três regiões VNTRs citadas em amostras positivas para WSSV de camarão de cultivo (*Litopenaeus vannamei*) e de caranguejo nativo (*Neohelice granulatta*) infectados naturalmente, provenientes de surtos ocorridos no Brasil (Estado de Santa Catarina) entre 2005 e 2008. As metodologias utilizadas foram Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), sequenciamento e análise comparativa das sequências obtidas. A padronização das condições da reação foi efetuada e foram obtidos produtos para as três regiões genômicas alvo para ambas as espécies. Diversas sequências de boa qualidade foram obtidas e analisadas. As sequências obtidas mostraram-se bastante conservadas, tanto entre os indivíduos quanto entre as duas espécies. Novos estudos com outras regiões VNTRs semelhantes, como ORF 14/15 e ORF 23/24, assim como em outras espécies de crustáceos poderão contribuir para o melhor entendimento da história evolutiva e epidemiológica do vírus da síndrome da mancha branca no Brasil.

Palavras-chave: WSSV; *Neohelice granulatta*; *Litopenaeus vannamei*; ORFs.

ABSTRACT

The White Spot Syndrome Virus (WSSV) has caused huge mortality in shrimp farm areas worldwide. The mortality rate can reach 100% after three to nine days after the first clinical signs, bringing along significant economic losses and social impact. The VNTRs (Variable Number Tandem Repeats) flanked to three ORFs (75, 94,125) found in the WSSV genome have been proposed as suitable molecular markers both for genotyping and epidemiological studies. The main goals of the present study was to genotype and perform a comparative analysis from WSSV positive samples of farmed shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and native crab (*Neohelice granulatta*) which were naturally infected in WSSV outbreaks in Brazil (Santa Catarina State) from 2005 to 2008. The methodology approach comprised Polymerase Chain Reaction (PCR), sequencing and comparative analyses of the obtained sequences. The standardization of cycling conditions was performed and amplicons were obtained for the three genomic regions for both species. Several high quality sequences were obtained and analyzed. The obtained sequences seemed to be conserved among individuals and between the two species. New studies with other VNTRs, such as ORF 14/15 and ORF 23/24 and other crustacean species will contribute to the understanding of the evolutionary history and epidemiology of the White spot Syndrome Virus in Brazil.

Keywords: WSSV; *Neohelice granulatta*; *Litopenaeus vannamei*; ORFs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do genoma completo do Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), isolado geográfico da Tailândia.....	25
Figura 2 - Esquema do genoma do Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) evidenciando as regiões VNTRs associadas às ORFs 75, 94 e 125.....	27
Figura 3 - Mapa do estado de Santa Catarina, evidenciando o litoral sul assim como os municípios (respectivamente de cima para baixo) de Imaruí, Laguna e Jaguaruna.	32
Figura 4 - Frascos da coleção de amostras de pleópodes de <i>Litopenaeus vannamei</i> conservadas em etanol 95%.....	32
Figura 5 - Frascos da coleção de amostras de brânquias de <i>Neohelice granulatta</i> conservadas em etanol 95%.....	33
Figura 6 - Foto de um indivíduo de <i>Neohelice granulatta</i>	33
Figura 7 - Foto de um indivíduo de <i>Litopenaeus vannamei</i>	34
Figura 8 - Sistema horizontal de eletroforese para gel de agarose utilizado para a realização das corridas.....	35
Figura 9 - Gel representativo do material obtido a partir da extração das amostras realizada pelo protocolo padrão do LABCAI, evidenciando a presença de DNA íntegro (bandas definidas e fortes) assim como degradado (arrasto). Amostras de caranguejo (poços 1 ao 10), amostras de siri (poços 11 ao 16), amostras camarão de cultivo (poços 17 ao 26) e amostras de camarão nativo (27 ao 32).	39
Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose (2%) representativa dos produtos amplificados por PCR a partir do DNA genômico de pleópodes de <i>L. vannamei</i> . 1: controle positivo da reação. 2 e 3: Amostras de campo 4: Marcador de peso molecular 1Kb.....	40
Figura 11 - Produtos de PCR da ORF 75 em sua temperatura ótima de anelamento (54°C), sendo: 1- amostra de caranguejo, 2- amostra de camarão, 3 e 4- amostras de siris, 5- marcador de 1Kb e 6- marcador de 100pb.....	41
Figura 12 - Produtos de PCR da ORF 94 em sua temperatura ótima de anelamento (60°C), sendo 1- amostra de caranguejo, 2- amostra de siri, 3- marcador de 100pb e 4- marcador de 1Kb.	41
Figura 13 - Produtos de PCR da ORF 125 em sua temperatura ótima de anelamento (60°C), sendo 1- amostra de caranguejo, 2- amostra de camarão, 3- amostra de siri, 4- marcador de 100pb, 5- marcador de 1Kb.....	42

Figura 14 - Produto de PCR da ORF 75 para <i>Litopenaeus vannamei</i> , sendo 1- amostra de camarão de cultivo, 2- marcador de 100pb e 3- marcador de 1Kb.....	43
Figura 15 - Produto de PCR da ORF 75 para <i>Neohelice granulatta</i> , sendo 1 e 2- marcador de 100pb e 3- amostra de caranguejo nativo.....	43
Figura 16 - Produto de PCR da ORF 94 para <i>Litopenaeus vannamei</i> , sendo 1- amostra de camarão de cultivo, 2- marcador de 100pb e 3- marcador de 1Kb.....	44
Figura 17 - Produto de PCR da ORF 94 para <i>Neohelice granulatta</i> , sendo 1- amostra de caranguejo nativo, 2- marcador de 100pb e 3- marcador de 1Kb.....	44
Figura 18 - Produto de PCR da ORF 125 para <i>Litopenaeus vannamei</i> sendo 1- amostra de camarão de cultivo, 2- marcador de 100pb e 3- marcador de 1Kb.....	45
Figura 19 - Produto de PCR da ORF 125 para <i>Neohelice granulatta</i> , sendo 1- amostra de caranguejo nativo, 2- marcador 100pb e 3- marcador 1Kb.....	45
Figura 20. Alinhamento representativo das sequências de ORF75 obtidas para <i>Litopenaeus vannamei</i> e <i>Neohelice granulatta</i>	47
Figura 21. Alinhamento representativo das sequências de ORF94 obtidas para <i>Litopenaeus vannamei</i> e <i>Neohelice granulatta</i>	47
Figura 22. Alinhamento representativo das sequências de ORF125 obtidas para <i>Litopenaeus vannamei</i> e <i>Neohelice granulatta</i>	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nomes e sequências dos iniciadores utilizados no procedimento de Nested PCR para a detecção do WSSV	35
Tabela 2 - Condições da PCR de detecção do WSSV, o primeiro passo após a desnaturação inicial é repetido 39 vezes (etapas 2 ^a 4) e depois segue a extensão final. No segundo passo a repetições começam no passo 4 em número de 35 e termina com a extensão final	36
Tabela 3 - Nomes, sequências e referenciais dos iniciadores utilizados para as PCr's de análise das regiões microssatélites de interesse.....	37
Tabela 4 - Condições de ciclagem das PCR's de análise das regiões microssatélites de interesse.	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 A CARCINOCULTURA	21
1.2 O VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV).....	22
1.3 OCORRÊNCIAS DO WSSV NO BRASIL.....	23
1.4 O GENOMA DO WSSV	24
1.5 ISOLADOS GEOGRÁFICOS	25
2. OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	34
3.3 QUANTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA.....	34
3.4 DETECÇÃO DO WSSV	35
3.5 PCR PARA A ANÁLISE DOS MINISSATÉLITES	36
3.6 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR	37
3.7 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS.....	37
4. RESULTADOS	39
4.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	39
4.2 DETECÇÃO DO WSSV	40
4.3 PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE PCR PARA DETECÇÃO DE MINISSATÉLITES.....	40
4.4. AMPLIFICAÇÃO DOS MINISSATÉLITES.....	42
4.4.1. ORF 75.....	43
4.4.2. ORF 94.....	44
4.4.3. ORF 125.....	45
4.5 SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR.....	45
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 A CARCINICULTURA

O cultivo de animais aquáticos iniciou-se provavelmente há quatro mil anos atrás, na China pré-feudal. Criações de peixes eram comuns na Europa no período romano, e um estudo revelou que existiam cultivos de peixes na Amazônia boliviana anteriores à era hispânica (ERICKSON, 2000; HIGGINBOTHAN, 1997). Apesar de suas origens ancestrais, a aquicultura foi uma atividade apenas de subsistência até a metade do século 20, quando se iniciaram os cultivos em maior escala de espécies como salmão e truta. Segundo Subasinghe (2005), a aquicultura é o setor produtor de alimentos que mais cresce no mundo e cerca de 90% desta produção vem de países em desenvolvimento. A produção anual da aquicultura chegou a aproximadamente 160 milhões de toneladas. (FAO, 2012). Segundo Maciel (2002), um dos ramos mais importantes e promissores da aquicultura é a carcinicultura (cultivo de camarão), a qual possui grande importância socioeconômica para muitos países. Segundo registros da FAO (2012), a produção mundial de camarões foi de 3.353.661 toneladas em 2012, número este que reflete a importância econômica da carcinicultura no mundo. A Ásia é a maior produtora mundial, destacando-se a Tailândia, Indonésia, China, Índia, Vietnã, Bangladesh e Filipinas. A carcinicultura no Brasil apresentou altos e baixos em termos do histórico de sua produção. Em 1997, o Brasil produziu apenas 4.059 toneladas de camarão, equivalente a 0,5% da produção mundial. No ano de 2003, segundo dados da ABCC, foram produzidas 90.190 toneladas de camarões no Brasil, o que representava 3% da produção mundial. Esse grande aumento da produção foi interrompido em 2004, quando, a partir desse ano, vários fatores contribuíram para uma queda na produção, entre eles o baixo valor de comercialização do camarão, os elevados custos de produção e a ocorrência de enfermidades virais – o vírus da Mio Necrose Infecciosa Viral (IMNV) no Nordeste e o vírus da Síndrome da Mancha Branca no Sul (WSSV) (OSTRENSKY; BOEGER, 2008). Essa queda na produção foi refletida por alguns anos, sendo que, em 2006, o total de camarões produzidos chegou a apenas 65.000 toneladas. No Brasil, existem duas regiões produtoras de camarão, a região Nordeste e a Região Sul, nessa última o destaque é o estado de Santa Catarina. A carcinicultura em Santa Catarina desenvolveu-se a partir de 1998, com a introdução do *Litopenaeus vannamei* e a criação do Programa Estadual de Cultivo de Camarões

Marinhos. A produção foi de 50 toneladas em 1998 para 4.267 toneladas em 2004. Nesta época, existiam cerca de 108 fazendas na principal região produtora (Laguna), ocupando uma área de mais de 1500 hectares (FREITAS; VINATEA; NETO, 2009; GELINSKI, 2005).

De acordo com o Censo da Aquicultura, o último dado oficial registrou uma produção de 69.571 toneladas em 2011, e segundo a Associação Brasileira de Criadores de Camarão, em 2012, foram aproximadamente 75.000 toneladas (ABCC, 2012).

1.2 O VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV)

O WSSV pertence ao gênero *Whispovirus*, família *Nimaviridae* (MAYO, 2002). Este vírus é baciliforme, envelopado, com um nucleocapsídeo na forma de bastão, contendo um grande genoma (~300 kpb), composto por DNA circular dupla-fita (CHEN *et al.*, 2002; VAN HULTEN *et al.* 2001; VASEEHARAN; JAYAKUMAR; RAMASAMY, 2003; YANG *et al.*; 2001). O primeiro relato do WSSV se deu no ano de 1992, em uma província chinesa chamada Fujian (CAI *et al.*, 1995; FLEGEL, 1997). O WSSV dispersou-se rapidamente para todo o continente Asiático (INOUYE *et al.*, 1994; LO *et al.*, 1999). No ano de 1995 a presença do WSSV já tinha sido detectada nos Estados Unidos (NUNAN; LIGHTNER, 1997; NUNAN; POULOS; LIGHTNER, 1998), e se espalhou rapidamente pelas américas, sendo diagnosticado nos anos seguintes em vários países das Américas Central e do Sul (Guatemala, Honduras, Nicarágua, Panamá e Equador) (INFOFISH, 1999). No caso do equador, por exemplo, o impacto econômico do WSSV foi devastador de 130.000 toneladas de camarão produzidas em 1998, passou para 37.000 toneladas em 2000 (ano quando a doença estava no auge) (PAREDES, 2005).

Com a vasta dispersão do WSSV pelo mundo e seus efeitos devastadores pelo mundo, foi promulgado no ano de 1999 o fechamento das fronteiras brasileiras para a importação de crustáceos, com o objetivo de impedir a chegada do Vírus da Síndrome da Mancha Branca em território nacional (MAPA,1999). No Brasil, sintomas da doença começaram a ser detectados em novembro de 2004 em fazendas de camarão de Santa Catarina. O WSSV foi diagnosticado, em janeiro de 2005, em 15 fazendas nos municípios de Imaruí e Laguna (SEIFFERT; WINCKLER; MAGGIONI, 2005).

A Síndrome da Mancha Branca é caracterizada pela presença de inclusões brancas na cutícula e infecta diferentes espécies de peneídeos, como: *Penaeus monodon*, *P. japonicus*, *P. indicus*, *P. chinensis*, *P.*

merguiensis e *P. setiferus* (LIGHTNER, 1996). O WSSV, ao contrário da maioria dos vírus, possui afinidade indiscriminada por um grande número de famílias de crustáceos. Muitas das espécies desenvolvem tolerância ao vírus, após uma alta incidência de mortalidade inicial (SCHUUR, 2003). Camarões infectados apresentam também redução no consumo de alimento, letargia e coloração avermelhada nos apêndices ou mesmo no corpo (DURAND *et al.*, 1997; LIGHTNER, 1996).

A virulência do WSSV é muito alta, as taxas de mortalidade podem atingir 100%, após 3 a 9 dias da observação dos sinais clínicos (LIGHTNER, 1996; VASEEHARAN; JAYAKUMAR; RAMASAMY, 2003). Por ter uma afinidade indiscriminada por diversas famílias de crustáceos este vírus já foi identificado em lagostins, lagostas, caranguejos, crustáceos não-decápodos, poliquetas, rotíferos e algumas larvas de insetos (ESCOBEDO-BONILLA *et al.*, 2008). Algumas espécies não são suscetíveis ao vírus, atuando como vetores da doença, um fato interessante para o entendimento da estratégia de sobrevivência do WSSV. A transmissão do vírus pode ocorrer pela predação de animais doentes ou por partículas virais liberadas na água (ARTS *et al.*, 2007).

1.3 OCORRÊNCIAS DO WSSV NO BRASIL

As fronteiras brasileiras foram fechadas para a entrada de crustáceos em 1999 pelo MAPA, através da Instrução Normativa n° 39, da Secretaria de Defesa Agropecuária, com o objetivo de impedir a entrada do WSSV no país. Entretanto, sintomas da doença começaram a ser detectados em novembro de 2004 em fazendas de camarão de Santa Catarina. A Síndrome da Mancha Branca foi diagnosticada em janeiro de 2005, em amostras analisadas no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI – CCB – UFSC), em 15 fazendas nos municípios de Imarú e Laguna (SC) em uma área de 200 hectares. Este resultado foi encaminhado, simultaneamente, à Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC) e à Secretaria de Estado da Agricultura e Desenvolvimento de Santa Catarina em 19 de janeiro de 2005, oito dias após a divulgação do resultado do diagnóstico considerado oficial, o qual foi realizado em amostras enviadas ao laboratório do Dr. Donald Lightner da Universidade do Arizona, EUA, laboratório referência da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para patologia de crustáceos (OIE, 2005).

As fazendas contaminadas foram interditadas e foi estabelecido vazio sanitário até setembro de 2005 (SEIFFERT; WINCKLER; MAGGIONI, 2005). Medidas sanitárias e estratégicas de proteção para evitar a disseminação da doença foram adotadas, assim como um mecanismo de monitoramento e controle da área afetada (REVISTA DA ABCC, 2005). A Síndrome da Mancha Branca causou grandes perdas econômicas em Santa Catarina. Antes do surgimento da doença, cerca de 100 fazendas produziam 4.100 tons de camarão, enquanto em 2006 e 2007 apenas três fazendas em operação produziram 59 tons (MELLO; FARIAS, 2007). Segundo a ABCC (2011), Santa Catarina possuía no ano do estudo um número de produtores igual a 17, dos quais 5 eram classificados como micro produtores, outros 5 como pequenos produtores e 7 como produtores de médio porte.

Em 2005, no Ceará, também houve um surto de WSSV, entretanto, tratou-se de um caso isolado (OIE, 2005b). Em novembro de 2008, um surto de WSSV foi confirmado na Bahia, com uma sobrevivência de 5% nas fazendas afetadas (CAVALLI *et al.*, 2008; TRINDADE *et al.*, 2008; MULLER *et al.*, 2010). Não existe informação a respeito da introdução do WSSV no Brasil, já que a importação de crustáceos foi proibida no país. Existem várias hipóteses, como a introdução do vírus através de correntes marítimas vindas do Uruguai, país que processa pescado vindo do Equador; outra possibilidade é que o vírus tenha sido introduzido anteriormente à proibição de exportações e tenha se mantido latente até 2005 (SEIFFERT, 2005).

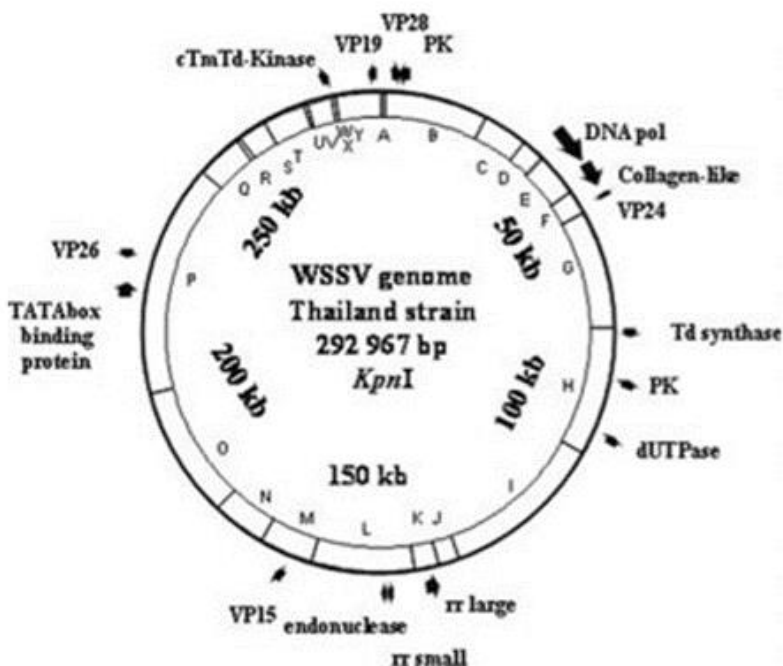
1.4 O GENOMA DO WSSV

O genoma do WSSV é composto por uma dupla fita de DNA em formato circular (Representado na Figura 1). Seu tamanho varia entre 293 a 307 Kbp, dependendo da região do planeta onde é encontrado, essas variações chamamos de isolados geográficos. Segundo Escobedo-Bonilla (2008), esse genoma viral é um dos maiores já sequenciados, perdendo apenas para um *mi.mivirus* de ameba, um canarypox, um vírus de alga *Ectocarpus siliculosus* e um vírus de *Paramecium bursaria*.

Foram encontradas entre 531 a 684 sequências de leitura aberta, chamadas de ORFs (Open Reading Frame). Dessas ORFs aproximadamente 184 parecem codificar proteínas funcionais de tamanhos entre 51 a 6077 aminoácidos (Escobedo-Bonilla 2008), os quais representam 92 % da informação genética contida no genoma do WSSV (van Hulst *et al.* 2001b; Yang *et al.* 2001). Aproximadamente 21-29% das ORFs demonstraram codificar proteínas do WSSV ou

outras proteínas já conhecidas, essas incluem enzimas envolvidas no metabolismo e replicação do DNA como a DNA polimerase (*Chen et al.*2002).

Figura 1 - Esquema do genoma completo do Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), isolado geográfico da Tailândia



Fonte: ESCOBEDO-BONILLA, 2008.

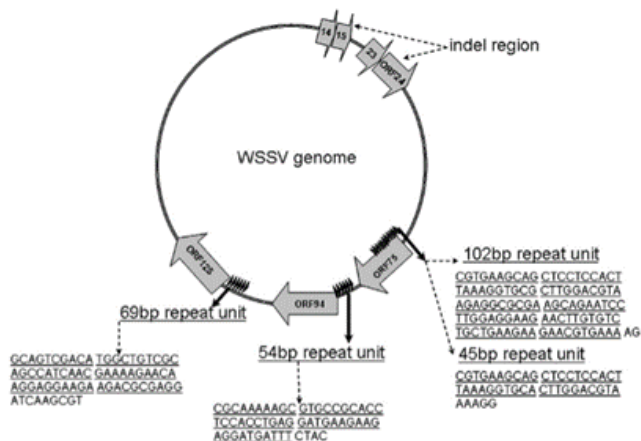
1.5 ISOLADOS GEOGRÁFICOS

Apesar do WSSV ter sido identificado em muitas espécies de crustáceos de diferentes regiões geográficas, por um certo tempo era incerto até que ponto os agentes causativos da doença eram idênticos, se existem diferentes linhagens geográficas ou até vírus distintos (*LO et al.*, 1999). Até os dias de hoje usamos como referência três isolados diferentes, provenientes de Taiwan – WSSV-TW (*WANG et al.*, 1995), China – WSSV-CN (*YANG et al.*, 2001) e Tailândia - WSSV-TH (*VAN HULTEN et al.*, 2001), a variação em vários loci sugere que o vírus se

propagou a partir de um ancestral comum da Tailândia (MARKS et al., 2004). Os vários isolados geográficos de WSSV encontrados até hoje são muito similares quanto à morfologia, proteoma e apresentam pequenas diferenças no padrão de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) (LO et al. 1999, MARKS et al. 2004, NADALA & LOH 1998, WANG et al. 2000,). Segundo Escobedo-Bonilla et al. (2008), os isolados apresentam 99,3% de similaridade na composição de nucleotídeos. As diferenças nucleotídicas entre os isolados encontram-se concentradas em regiões específicas do genoma, tais modificações significativas podem determinar a origem de um determinado isolado de WSSV e sua dispersão geográfica (DIEU et al. 2004). Essas modificações são refletidas no tamanho do genoma dos vários isolados seguem alguns exemplos: isolado da China (305.107 pb; número de acesso no GenBank: AF332093), isolado da Tailândia (292.967; número de acesso no GenBank: AF369029) e isolado de Taiwan (307.287 pb; número de acesso no GenBank: AF440570). As diferenças de tamanho são devidas principalmente a várias inserções pequenas e uma deleção grande (12 kb) (CHEN *et al.*, 2002). A grande deleção é encontrada na região da ORF23/24, o seu tamanho também varia nos diferentes isolados (cerca de 13.2 kb no WSSV-TH e de 1.2 kb no genoma do WSSV-CN quando comparados ao WSSV-TW).

Outra região onde a variação pode ser encontrada é a ORF14/15, uma região favorável à recombinação. Entre outras modificações do genoma do WSSV entre os isolados temos a sequência de uma transposase presente apenas no WSSV-TW, minissatélites, deleções de base única e polimorfismos de base única (single nucleotide polymorphisms – SNPs) (MARKS *et al.*, 2004).

Figura 2 - Esquema do genoma do Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) evidenciando as regiões VNTRs associadas às ORFs 75, 94 e 125



Fonte: HOA,2011.

As variações associadas com as ORFs 23/24 e 14/15 foram relatadas como úteis na identificação de mudanças evolutivas no WSSV (MARKS *et al.* 2004). Os VNTRs (*Variable Number Tandem Repeat*) associados com três minissatélites, ORF 94, ORF 75 e ORF 125, foram propostos como marcadores em estudos epidemiológicos (DIEU *et al.* 2004, MARKS *et al.* 2004, SHEKAR *et al.* 2005, WONGTEERASUPAYA *et al.* 2003). Para estudar os diferentes isolados geográficos e comparar os seus genomas podem ser usadas diferentes técnicas como RFLP (DIEU *et al.*, 2004; LO *et al.*, 1999), hibridização com sondas não-radioativas (LO *et al.*, 1999), comparação de genomas (MARKS *et al.*, 2004) e PCR e sequenciamento de determinadas regiões do genoma (KIATPATHOMCHAI *et al.*, 2005; WONGTEERASUPAYA *et al.*, 2003).

Com os dados da bibliografia expostas acima chegamos à hipótese do presente trabalho, o WSSV obtido de indivíduos de caranguejo nativo (*Neohelice granulata*) poderia trazer algumas diferenças em seu genoma.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi genotipar e analisar comparativamente três regiões VNTRs do genoma do vírus da mancha branca (ORF 75, ORF 94 e ORF 125) em amostras de camarão de cultivo (*Litopenaeus vannamei*) e em amostras de caranguejo nativo (*Neohelice granulatta*) para validar essas regiões como marcadores epidemiológicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a metodologia de PCR para a detecção das ORFs 75, 94 e 125 em WSSV proveniente de camarões (*L. vannamei*) e caranguejos (*N. granulatta*).
- Padronização das condições do ensaio de PCR para as diferentes ORFs a partir de DNA obtido de amostras conservadas em etanol 95%.
- Sequenciar os fragmentos amplificados para realizar a análise comparativa entre as sequências correspondentes as diferentes ORFs.
- Identificar possíveis mutações, como deleções e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nas sequências obtidas.
- Validar os marcadores propostos para genotipagem do WSSV.

3. METODOLOGIA

3.1. ORIGEM DAS AMOSTRAS

As amostras utilizadas no presente trabalho foram retiradas da coleção de amostras do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), amostras essas provenientes de um projeto de monitoramento do Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) realizado pelo laboratório e financiado pela FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos). As amostras foram coletadas no ano de 2006 e 2008, após a ocorrência de um surto da Síndrome da Mancha Branca em fazendas de carcinicultura no litoral sul do estado de Santa Catarina, incluindo os municípios de Laguna, Jaguaruna e Imaruí (apontadas na Figura 3). Todas as amostras foram conservadas em etanol 95% (representadas pelas Figura 4 e Figura 5), e certificadas como positivas ou negativas para a presença do WSSV. A coleção utilizada possuía amostras de Camarão Nativo, Caranguejo Nativo (*Neohelice granulata*), Camarão de cultivo (*Litopenaeus vannamei*) e Siri Nativo, porém para o presente trabalho foram selecionadas apenas as amostras de caranguejo nativo (Figura 6) e camarão de cultivo (Figura 7) por serem as que obtiveram melhor qualidade de DNA e reprodutibilidade nos ensaios de PCR. Todas as amostras utilizadas no atual trabalho foram certificadas previamente como positivas para a presença do WSSV. Duas amostras de *Litopenaeus vannamei* do Piauí, infectados naturalmente pelo WSSV, foram fornecidas pela Dra. Alitiene Moura Lemos Pereira da Embrapa Meio-Norte e incluídas no presente trabalho para fins comparativos.

Figura 3 - Mapa do estado de Santa Catarina, evidenciando o litoral sul assim como os municípios (respectivamente de cima para baixo) de Imaruá, Laguna e Jaguaruna.



Figura 4 - Frascos da coleção de amostras de pleópodes de *Litopenaeus vannamei* conservadas em etanol 95%.



Figura 5 - Frascos da coleção de amostras de brânquias de *Neohelice granulatta* conservadas em etanol 95%.



Figura 6 - Foto de um indivíduo de *Neohelice granulatta*.



Fonte: Google Imagens; Disponível em:
<https://www.flickr.com/photos/cdtimm/5497643247>.

Figura 7 - Foto de um indivíduo de *Litopenaeus vannamei*



Fonte: Google Imagens; Disponível em: http://www.ictioterm.es/especies/fotos_principales/L/Penaeus_vannamei_L.jpg

3.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A extração do DNA genômico foi realizada segundo o procedimento padronizado em nosso laboratório e protocolo adaptado de MACIEL (2002).

3.3 QUANTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA

O DNA extraído foi quantificado através da leitura de sua absorbância a um comprimento de onda de 260nm utilizando-se um espectrofotômetro Nanodrop Thermo Scientific[®]. Amostras com mais de 3000ng/ μ L foram diluídas e quantificadas novamente para maior precisão das quantificações.

A integridade do DNA extraído foi avaliada através de dois procedimentos, primeiramente foi determinada e avaliada pela razão 260/280, amostras que apresentavam razão 260/280 com um valor aproximado entre 1.8 e 2.0 durante a quantificação foram classificadas como satisfatórias. A segunda etapa da avaliação da integridade do DNA extraído se deu através da performance de gel de agarose 1%

Figura 8 - Sistema horizontal de eletroforese para gel de agarose utilizado para a realização das corridas.



3.4 DETECÇÃO DO WSSV

Todas as amostras desse trabalho foram certificadas como WSSV positivas através da metodologia de Nested PCR descrita por Nunan *et al.* (1998). Os iniciadores utilizados para tal procedimento foram os descritos por Lo *et al.* (1996). As sequências desses iniciadores estão descritas na Tabela 1 e as condições da PCR estão descritas na Tabela 2.

Tabela 1 - Nomes e sequências dos iniciadores utilizados no procedimento de Nested PCR para a detecção do WSSV

Denominação do Iniciador	Sequência
WS146F1	5'-ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG-3'
WS146R1	5'-TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACG-3'
WS146F2	5'-GTAAGTCCCCCTTCCATCTCCA-3'
WS146R2	5'-TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT-3'

Tabela 2 - Condições da PCR de detecção do WSSV, o primeiro passo após a desnaturação inicial é repetido 39 vezes (etapas 2ª 4) e depois segue a extensão final. No segundo passo a repetições começam no passo 4 em número de 35 e termina com a extensão final

Primeiro Passo (Total de Ciclos=40)		
Nº da Etapa	Tempo	Temperatura
Desnaturação Inicial	120s	94°C
2	60s	94°C
3	90s	55°C
4	120s	72°C
Extensão Final	300s	72°C
Segundo Passo (Total de Ciclos=36)		
Nº da Etapa	Tempo	Temperatura
Desnaturação Inicial	120s	94°C
2	60s	55°C
3	120s	72°C
4	60s	94°C
5	60s	55°C
6	60s	72°C
Extensão Final	300s	72°C

3.5 PCR PARA A ANÁLISE DOS MINISSATÉLITES

Foram analisadas por metodologia PCR três regiões minissatélites: ORF 75 (repetições de 45 e 102 pares de base), ORF 94 (repetições de 54 pares de base) e ORF 125 (repetições de 69 pares de base). Iniciadores específicos foram desenhados para essas três regiões (descritos na Tabela 3).

Após um processo de padronização as melhores condições de ciclagem para cada região foram determinadas (descritas na Tabela 4).

Para a padronização da metodologia de PCR para a detecção dos minissatélites estudados (ORF 75, ORF 94, ORF 125) foram utilizados os mesmos iniciadores descritos na Tabela 3. O DNA foi extraído de 52 amostras previamente identificadas como positivas para a presença do WSSV. Todas as reações foram realizadas com amostras individuais. A padronização feita deixando-se constantes as concentrações dos reagentes e alterando-se a temperatura de anelamento. Para todas as regiões foram testadas 5 temperaturas de anelamento diferentes, as quais foram escolhidas a partir da temperatura de melting de cada iniciador, variando entre 50-55°C para a ORF 75 e 55-60°C para as ORFs 94 e 125.

3.6 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR

Os produtos de PCR foram purificados com a enzima Illustra Exostar Enzymatic PCR segundo as condições do fabricante. O sequenciamento foi realizado no próprio LABCAI. A reação de sequenciamento foi realizada segundo protocolos padrões (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit ABI Prism, versão 3.1) em um sequenciador automático ABI3730 9applied Biosystems).

3.7 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

Para a avaliação da qualidade dos dados gerados na ABI3730 foi utilizado o software Phred 0.020425 (ERWING *et al.*, 1998). A seguir foi utilizado um n amostral de 2 a 3 indivíduos de cada espécie para cada região para fazer o alinhamento das sequencias, para isso foi programa Clustal-X (THOMPSON *et al.*, 1997). Em seguida aos alinhamentos foi feita a análise comparativa pela procura e identificação das diferenças nucleotídicas.

Tabela 3 - Nomes, seqüências e referenciais dos iniciadores utilizados para as PCr's de análise das regiões microssatélites de interesse.

Denominação do Iniciador	Seqüência	Referência
ORF 75 F	5'-GAAGCAGTATCTCTAACAC-3'	PRADEEP <i>et al.</i> , 2008
ORF 75 R	5'-CAACAGGTGCGTAAAAGAAG -3'	PRADEEP <i>et al.</i> , 2008
ORF 94F	5'-TCTACTCGAGGAGGTGACGAC-3'	PRADEEP <i>et al.</i> , 2008
ORF 94 R	5'-AGCAGGTGTGTACACATTTCATG-3'	PRADEEP <i>et al.</i> , 2008
ORF 125 F	5'-CGAAATCTTGATATGTTGTGC-3'	DIEU <i>et al.</i> , 2004
ORF 125 R	5'-CCATATCCATTGCCCTTCTC-3'	DIEU <i>et al.</i> , 2004

Tabela 4 - Condições de ciclagem das PCR's de análise das regiões microssatélites de interesse.

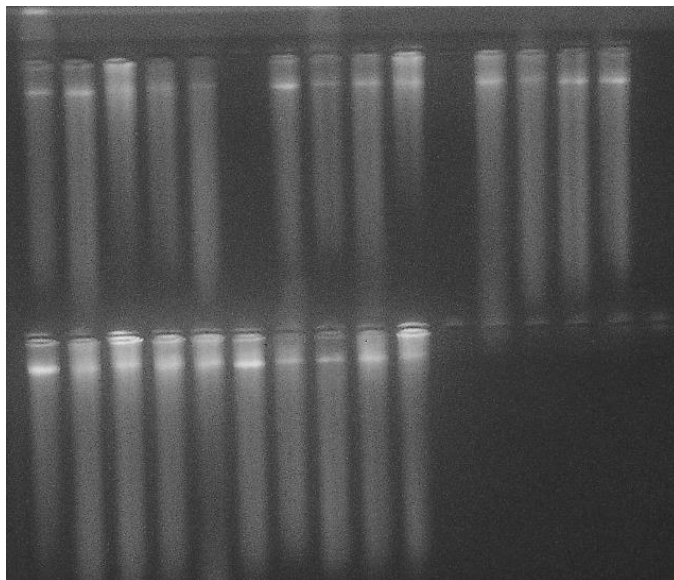
Região Minissatélite	[] Iniciadores	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Nº de Ciclos
ORF 75	25pmol	95° C por 60s	95° C por 30s	54°C	72°C por 80s	36
ORF 94	25pmol	95°C por 300s	95° C por 20s	60°C	72°C por 75	40
ORF 125	25pmol	95° por 60s	95°C por 30s	60°C	72°C por s ...	40

4. RESULTADOS

4.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Foram extraídas um total de 52 amostras (caranguejo, siri, camarão nativo e camarão de cultivo) previamente identificadas como positivas para a presença do WSSV. Foi obtido DNA íntegro e de boa qualidade, evidenciado pelas bandas fortes e definidas da Figura 9. Por outro lado, também foi possível observar a presença de material com diferentes graus de degradação em boa parte das amostras. Em algumas amostras, o procedimento de extração não resultou em DNA genômico.

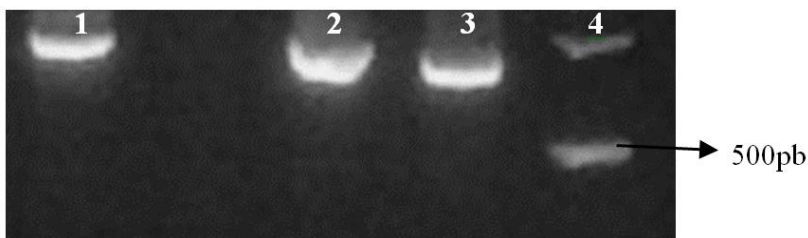
Figura 9 - Gel representativo do material obtido a partir da extração das amostras realizada pelo protocolo padrão do LABCAI, evidenciando a presença de DNA íntegro (bandas definidas e fortes) assim como degradado (arrasto). Amostras de caranguejo (poços 1 ao 10), amostras de siri (poços 11 ao 16), amostras camarão de cultivo (poços 17 ao 26) e amostras de camarão nativo (27 ao 32).



4.2 DETECÇÃO DO WSSV

As amostras utilizadas no presente trabalho foram certificadas, previamente, como positivas para a presença do WSSV. Um resultado representativo dessa certificação prévia pode ser observado abaixo, na Figura 10.

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose (2%) representativa dos produtos amplificados por PCR a partir do DNA genômico de pleópodes de *L. vannamei*. 1: controle positivo da reação. 2 e 3: Amostras de campo 4: Marcador de peso molecular 1Kb.



4.3 PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE PCR PARA DETECÇÃO DE MINISSATÉLITES

As temperaturas ótimas de anelamento para cada ORF estão descritas na Tabela 4. Após os ensaios de padronização das reações de PCR, as concentrações dos reagentes foram assim estabelecidas: tampão 1X, 200 μ M de cada dNTP, 2 mM de $MgCl_2$, 200 pmol de cada iniciador e 0,5 U de enzima Taq DNA polimerase (Fermentas). Todos os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%, tendo sido padronizado o volume de 2 μ L de GelRed™ (Uniscience) para cada 7 μ L de amostra aplicada no gel. Foram utilizados os marcadores de DNA de 1KB e de 100pb.

Os resultados das padronizações efetuadas para cada uma das ORFs podem ser visualizados nos géis representativos das Figuras 11, 12 e 13

Figura 11 - Produtos de PCR da ORF 75 em sua temperatura ótima de anelamento (54°C), sendo: 1- amostra de caranguejo, 2- amostra de camarão, 3 e 4- amostras de siri, 5- marcador de 1Kb e 6- marcador de 100pb.



Figura 12 - Produtos de PCR da ORF 94 em sua temperatura ótima de anelamento (60°C), sendo 1- amostra de caranguejo, 2- amostra de siri, 3- marcador de 100pb e 4- marcador de 1Kb.

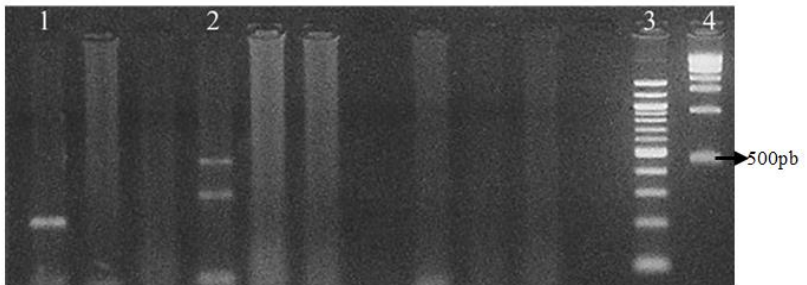
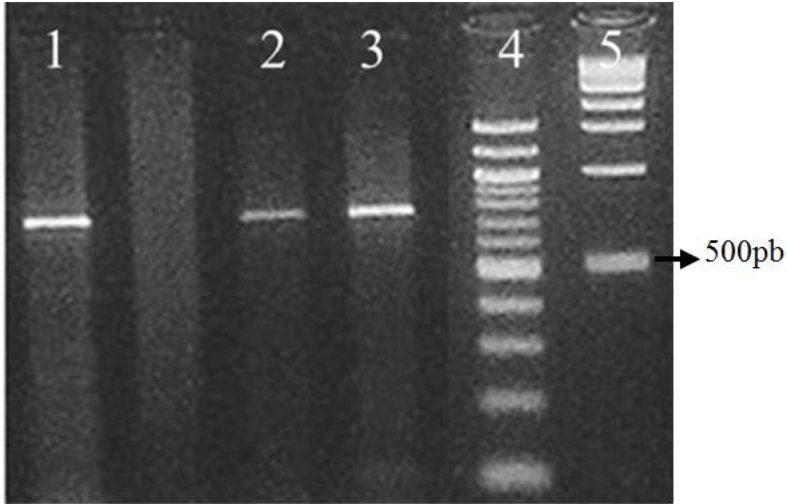


Figura 13 - Produtos de PCR da ORF 125 em sua temperatura ótima de anelamento (60°C), sendo 1- amostra de caranguejo, 2- amostra de camarão, 3- amostra de siri, 4- marcador de 100pb, 5- marcador de 1Kb.



4.4. AMPLIFICAÇÃO DOS MINISSATÉLITES

Após a padronização das condições de ciclagem para cada região minissatélite, diversos ensaios de PCR foram efetuados para a obtenção de produtos para sequenciamento. Todos os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%. Verificou-se a presença de bandas dos tamanhos esperados, conforme MÜLLER, *et al.*, tanto para as amostras de caranguejo (*N. granulatta*) como para as de camarão (*L. vannamei*) em todas as regiões minissatélites de interesse. Os tamanhos esperados nos isolados de Santa Catarina para cada ORF são: ORF 75: entre 783 a 786 pb, ORF 94: entre 1.015 a 1.100pb, ORF 125: entre 659 a 684.

4.4.1. ORF 75

Figura 14 - Produto de PCR da ORF 75 para *Litopenaeus vannamei*, sendo 1- amostra de camarão de cultivo, 2- marcador de 100pb e 3- marcador de 1Kb.

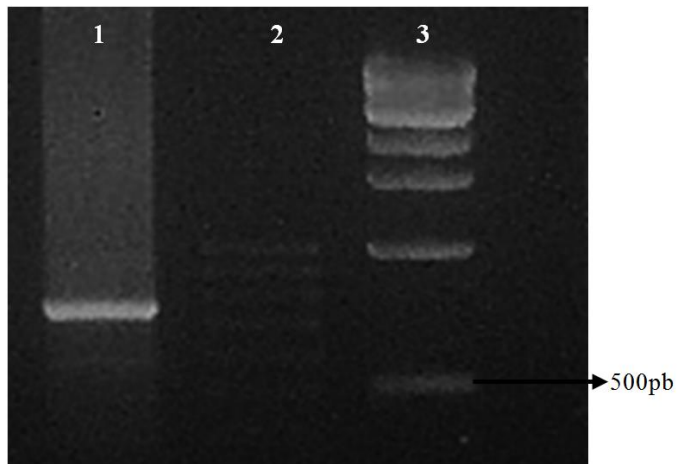
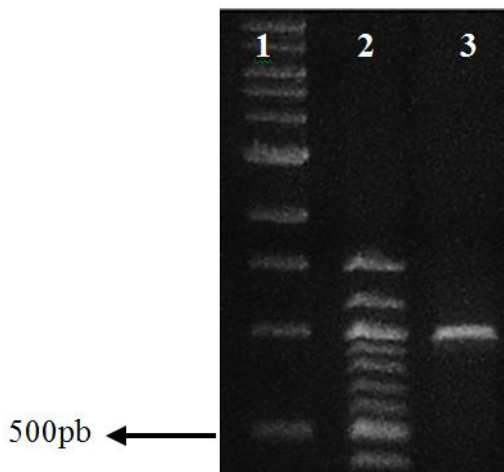


Figura 15 - Produto de PCR da ORF 75 para *Neohelice granulata*, sendo 1 e 2- marcador de 100pb e 3- amostra de caranguejo nativo.



4.4.2. ORF 94

Figura 16 - Produto de PCR da ORF 94 para *Litopenaeus vannamei*, sendo 1- amostra de camarão de cultivo, 2- marcador de 100pb e 3- marcador de 1Kb.

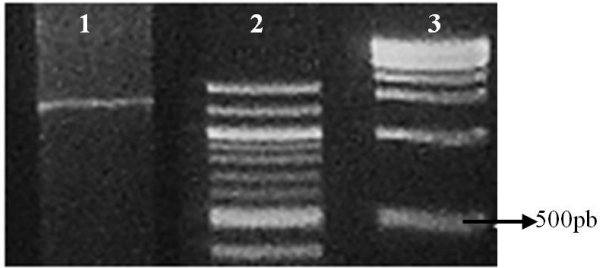
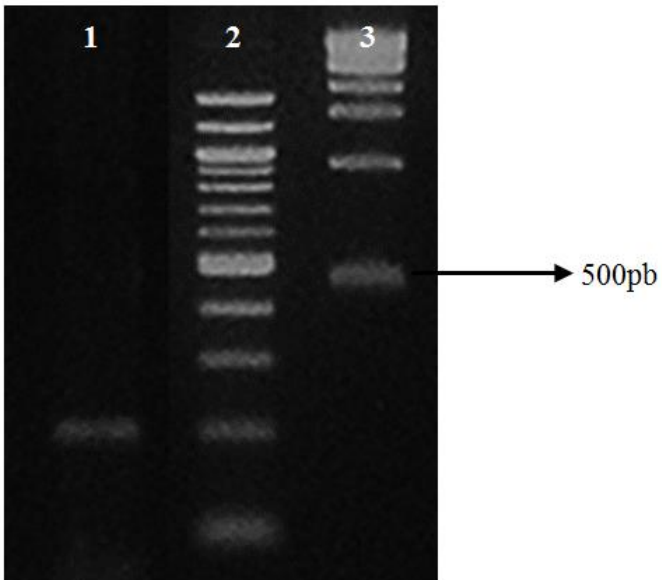


Figura 17 - Produto de PCR da ORF 94 para *Neohelice granulata*, sendo 1- amostra de caranguejo nativo, 2- marcador de 100pb e 3- marcador de 1Kb.



4.4.3. ORF 125

Figura 18 - Produto de PCR da ORF 125 para *Litopenaeus vannamei* sendo 1- amostra de camarão de cultivo, 2- marcador de 100pb e 3- marcador de 1Kb.

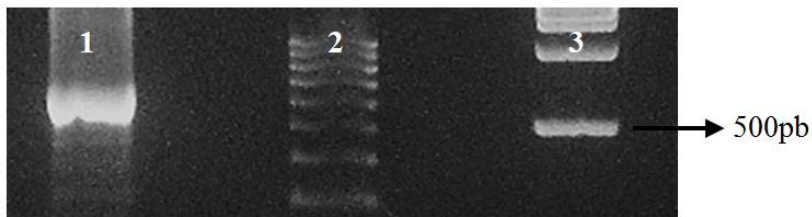
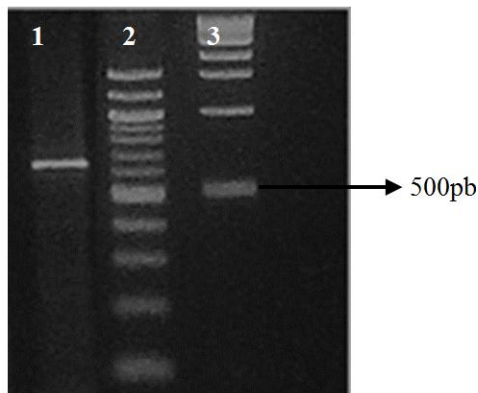


Figura 19 - Produto de PCR da ORF 125 para *Neohelice granulata*, sendo 1- amostra de caranguejo nativo, 2- marcador 100pb e 3- marcador 1Kb.



4.5 SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR

Após o processamento dos dados e a análise das sequências não foi possível identificar mutações referentes à ORF 125. As mudanças de nucleotídeos encontradas nessa ORF não refletiram nenhum padrão evidente entre as espécies e regiões.

Algumas diferenças, que podem ser possíveis mutações, em relação às sequencias obtidas para as ORFs 75 (posições 40, 89 e 119) e 94 (posição 45) entre *Litopenaeus vannamei* e *Neohelice granulata*

foram encontradas. Algumas diferenças nessas mesmas duas ORFs foram encontradas entre as amostras de *Litopenaeus vannamei* de Santa Catarina e do Piauí. Outro resultado da análise foi que as diferenças encontradas nas amostras de *L. vannamei* do Piauí são semelhantes às diferenças encontradas nas amostras de *N. granulatta* de Santa Catarina.

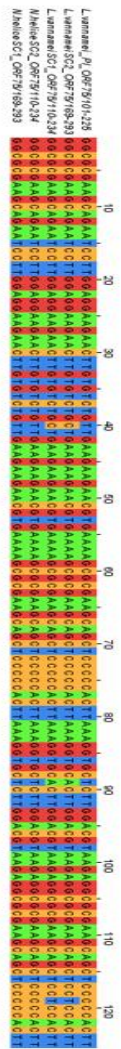


Figura 10. Alinhamento representativo das sequências de ORF7 obtidas para *Leptogasterus namatae* e *Meloboris gyalusa*.

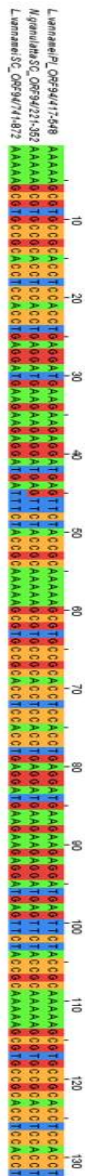


Figura 11. Alinhamento representativo das sequências de ORF94 obtidas para *Leptogasterus namatae* e *Meloboris gyalusa*.

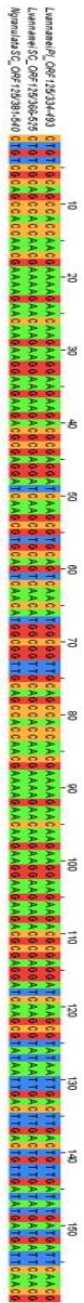


Figura 12. Alinhamento representativo das sequências de ORF12 obtidas para *Leptogasterus namatae* e *Meloboris gyalusa*.

5. DISCUSSÃO

Segundo Lo *et al.* (1996) o vírus da síndrome da mancha branca dissemina-se rapidamente pelo ambiente e possui uma vasta gama de hospedeiros, os quais incluem não apenas camarões peneídeos, mas também copépodes, caranguejos, lagostas e lagostins. Os autores ainda ressaltam que várias espécies de crustáceos nativos têm sido reportadas como hospedeiros assintomáticos, servindo de reservatório para o WSSV.

O caranguejo *Neohelice granulatta*, antigamente chamado de *Chasmagnathus granulatta*, é uma espécie nativa presente no sul do Brasil. No estado de Santa Catarina ele pode ser encontrado por uma grande extensão do estuário de Lagoa Grande, exatamente onde as fazendas de camarão (*Litopenaeus vannamei*) estão localizadas. Esse crustáceo é abundante tanto nos tanques de cultivo quanto nas margens (MARQUES *et al.*, 2011). Dados não publicados de trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório (LABCAI) observaram que, quando infectados em laboratório, os caranguejos nativos (*N. granulatta*) sobrevivem até 120h pós infecção, enquanto camarões de cultivo (*L. vannamei*) sobrevivem apenas 72h pós infecção. Esse tipo de comparação é mais difícil de ser feita com indivíduos infectados em campo, pois não sabemos exatamente o momento em que foram infectados, ou seja, não é possível determinar a quanto tempo se deu a infecção, mas evidências obtidas por nosso grupo demonstram que *N. granulatta* parece reagir de maneira diferente de *L. vannamei*, por não desenvolver aparentemente os mesmos sintomas e/ou ser mais resistente ao WSSV. Assim, os indivíduos de caranguejo nativo encontrados nos tanques e nos ambientes naturais de Santa Catarina poderiam estar desenvolvendo um papel de espécie reservatório para o vírus da síndrome da mancha branca (MARQUES *et al.*, 2011). De acordo com Waikhom *et al.* (2006), a passagem de um isolado de WSSV por diferentes hospedeiros induziria à variação genômica e alteraria a patogenicidade do vírus. Os VNTRs (*Variable Number Tandem Repeat*) associados com três minissatélites, ORF 94, ORF 75 e ORF 125, foram propostos como marcadores em estudos epidemiológicos do WSSV (DIEU *et al.* 2004, MARKS *et al.* 2004, SHEKAR *et al.* 2005, WONGTEERASUPAYA *et al.* 2003).

Tendo em vista as informações acima foi formulada uma das hipóteses que permeiam o presente trabalho, ou seja, o WSSV obtido de indivíduos de caranguejo nativo (*N. granulatta*) poderia trazer algumas diferenças em seu genoma. Como, segundo Escobedo-Bonilla *et al.*

(2008), os isolados apresentam 99,3% de similaridade na composição de nucleotídeos, se encontrássemos essas variações seriam nas regiões não tão conservadas do genoma do WSSV, ou seja, as regiões VNTRs associadas a ORFs. Uma vez que a maioria dos trabalhos de genotipagem tem utilizado as três ORFs 75, 94 e 125 (MULLER *et al.*, 2010; TANG *et al.*, 2012; HOA *et al.*, 2011), decidimos utilizá-las para genotipar as amostras de caranguejo nativo positivas para WSSV que tínhamos na coleção do LABCAI.

Muitos estudos têm utilizado essas regiões para caracterizar e genotipar diferentes isolados ao redor do mundo. Dois isolados brasileiros foram caracterizados e comparados com base nessas regiões por MULLER *et al.*, 2010. Nesse estudo os autores analisaram amostras de *L. vannamei* em duas regiões do Brasil (Santa Catarina e Bahia) e compararam com amostras de outros isolados do WSSV provenientes de diferentes países das Américas como, por exemplo, Estados Unidos, México, Honduras, Panamá e Nicarágua. Todas as amostras do sul do país mostraram o mesmo padrão para as regiões VNTRs analisadas (ORF 75, ORF 94 e ORF 125). Na região da ORF 94 foi encontrada uma SNP na região 48, porém segundo Dieu *et al.* 2004, até hoje todos os isolados genotipados possuem uma modificação SNP nessa região. Em nosso estudo não encontramos uma SNP na região 48, mas sim na região 45. As amostras da Bahia, no estudo de Müller *et al.*, 2010, mostraram um padrão completamente diferente das amostras de Santa Catarina para as três regiões VNTRs de interesse, o que demonstra que esses marcadores genéticos são eficientes para a genotipagem dos diferentes isolados do WSSV. O presente estudo não pode confirmar, porém trouxe evidências de diferenciação por SNPs entre as espécies (*L. vannamei* e *N. granulatta*) e entre as regiões estudadas (Santa Catarina e Piauí).

Outro exemplo mais recente vem da Arábia Saudita, TANG *et al.* 2012 utilizaram as ORFs 125 e 94 para genotipar e caracterizar 15 isolados provenientes da Arábia Saudita e conduzir uma análise filogenética envolvendo outros 8 isolados do vírus da síndrome de Taura (Taura Syndrome Vírus-TSV) com o objetivo de determinar a origem da linhagem do WSSV no país do estudo. Após analisarem os resultados da genotipagem dos 15 isolados, os autores chegaram a conclusão de que os dados conseguidos não eram capazes de determinar a origem do WSSV nas fazendas da Arábia Saudita. Portanto podemos dizer que a utilização desses marcadores genéticos (ORF 75, ORF 94 e ORF 125) nem sempre se demonstra eficiente, podendo essa eficiência estar vinculada a certos tipos de isolados, portanto a utilização de mais

regiões VNTRs como essas, por exemplo ORF 14/15 e ORF 23/24, que possam trazer evidências de mutações torna-se extremamente importante, pois assim a probabilidade de se conseguir um maior número de informações aumenta e assim pode-se fazer uma análise mais completa e concisa.

Dieu *et al.* (2010) desenvolveram um estudo para genotipar e avaliar 17 isolados provenientes de três diferentes regiões do Vietnã (Regiões Norte, Central e Sul). Os autores salientam que as regiões VNTRs presentes no genoma do WSSV possuem diferentes perfis e comportamentos, o que pode influenciar na hora da escolha das mesmas dependendo do objetivo que se tem ao trabalhar com a genotipagem dos isolados do WSSV. Em um estudo dos mesmos autores (Dieu *et al.*, 2004), é demonstrado que existem cinco regiões no genoma do WSSV que podem ser utilizadas como marcadores moleculares para estudos epidemiológicos, duas regiões de grandes deleções (ORF14/15 e ORF23/24) e as três regiões VNTRs utilizadas nesse estudo (ORF75, ORF94 e ORF125). Dieu *et al.* 2010 ainda sugerem que as regiões de deleção devem ser utilizadas para estudos evolutivos, onde a ORF23/24 demonstra-se mais eficiente para escalas temporais intermediárias e a ORF14/15 seria mais eficiente para escalas temporais mais longas.

No tocante das regiões VNTRs (ORFs 75, 94 e 125) os autores afirmam que essas regiões aparentam ser mais variáveis que as regiões de deleção (ORF14/15 e ORF23/24), portanto as regiões de minissatélites deveriam ser utilizadas para escalas temporais pequenas. Podemos concluir então que a escolha das regiões a serem estudadas nesse trabalho prosseguiu de forma correta, pois as amostras estudadas estão inseridas em uma escala temporal evolutiva muito pequena, mais ou menos 3 anos (2005 a 2008), sendo então necessário utilizar regiões com maior taxa de mutação. Tendo em vista os resultados conseguidos no presente trabalho consideramos interessante a inclusão das outras duas regiões VNTRs (ORF 14/15 e ORF 23/24) em estudos futuros visando conseguir mais informações que possibilitem uma análise mais completa dos isolados brasileiros.

Por outro lado, outros fatores de razões metodológicas podem ter influenciado nos resultados do presente trabalho. A qualidade do DNA obtido da extração das amostras utilizadas nesse trabalho foi satisfatória, porém em grande parte delas havia a presença de arrasto na corrida dos géis, o que evidencia a existência de material degradado. Ainda no tocante à extração, por experiência do nosso grupo com o protocolo de extração utilizado, adaptado de MACIEL (2002), é obtida uma média de concentração de DNA entre 1.500 a 2.500 ng/ μ L, é importante ressaltar

que as amostras utilizadas nos estudos de nosso laboratório usam o congelamento e a estocagem em freezer -80°C como método de conservação padrão. A maioria das amostras utilizadas no presente estudo, conservadas em etanol 95%, obtiveram uma média de concentração entre 300 a 500 $\text{ng}/\mu\text{L}$, o que nos mostra que para elas o método utilizado não foi tão eficiente como de costume. Uma parte das amostras não foi utilizada no presente estudo pois não foi possível obter DNA de boa qualidade e nem quantidade suficiente para as técnicas de biologia molecular aqui efetuadas. Segundo BITENCOURT *et al.* (2007), a padronização de protocolos para a extração de DNA é um processo trabalhoso e que compreende mudanças em diversos parâmetros seguidas por vários testes, para avaliar pontos específicos que podem estar danificando as amostras de DNA. Os mesmos autores, ao avaliarem diferentes protocolos de extração de DNA de amostras do crustáceo *Aegla longirostri*, puderam observar que os métodos de conservação influenciaram na qualidade e na quantidade de material obtido, chegando à conclusão que o congelamento de amostras frescas demonstrava ser mais eficiente do que a conservação por tempo prolongado dos espécimes em etanol, que é justamente o caso das amostras do presente estudo. Um ajuste do protocolo padrão de extração de DNA ao tipo de conservação das amostras, ou seja, amostras fixadas, poderia ser realizado para tentar se obter DNA de melhor qualidade, além de incluir novos indivíduos para ampliar o número de amostras utilizadas, o que por sua vez nos daria um maior número de sequências para serem analisadas comparativamente.

Outro fator que pode ter influenciado no resultado foi o n amostral utilizado na análise comparativa das sequências obtidas. Uma média de 2-3 indivíduos para cada espécie em cada região. A obtenção de padrões de alterações pode ser diagnosticada de forma mais segura quando se tem um grande número de indivíduos para comparação. O número restrito de indivíduos limitou a análise comparativa e dos eventuais padrões de mutações diferenciais que poderiam existir entre as espécies.

Novos estudos com mais regiões do WSSV que apresentam mudanças nucleotídicas como, por exemplo, as regiões de deleção ORF14/15 e ORF23/24, assim como a utilização de um maior n amostral e de outras espécies infectadas pelo vírus da síndrome da mancha branca em diferentes localidades, poderão contribuir para o melhor entendimento da evolução genômica e epidemiológica do WSSV em Santa Catarina e no Brasil.

6. CONCLUSÃO

Diante os resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que:

- a padronização da metodologia de PCR para a detecção das ORFs 75, 94 e 125 em WSSV provenientes de amostras de *L. vannamei* e de *N. granulatta* foi alcançada, obtendo-se, de forma eficiente, produtos para as três regiões genômicas alvo para ambas espécies;
- a padronização das condições de ensaio de PCR para as diferentes ORFs (ORF 75, ORF 94 e ORF 125) a partir de DNA obtido de amostras conservadas em etanol 95% foi conseguida;
- o sequenciamento dos fragmentos amplificados foi eficiente, tendo como resultado sequências de boa qualidade;
- a análise comparativa entre as espécies (*Litopenaeus vannamei* e *Neohelice granulatta*) da região minissatélite ORF125, não foi capaz de identificar mutações como deleções e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nas sequências obtidas;
- os resultados dos sequenciamentos análise comparativa dos mesmos, trouxe diferenças do tipo SNPs nas regiões minissatélites ORF 75 e ORF125 entre *Litopenaeus vannamei* e *Neohelice granulatta*, assim como entre *L. vannamei* de Santa Catarina e do Piauí. Um maior número de sequências de um maior número de indivíduos é necessário para melhor consolidar esse resultado

REFERÊNCIAS

- ARTS J.A.J.; TAVERNE-THIELE, A.J.; SAVELKOUL, H.F.J.; ROMBOUT, J.H.W.M. Haemocyte reactions in WSSV immersion infected *Penaeus monodon*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, p. 164-170, 2007.
- BITENCOURT, J.V.T.; RORATTO, A.P.; BARTHOLOMEI-SANTOS, M.L.; SANTOS, S. Comparison of different methodologies for DNA extraction from *Aegla longirostri*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, p-989-994, 2007.
- CHANG, P. S.; LO, C. F.; WANG, Y. C.; KOU, G. H. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (wsbv) target organs in the shrimp *penaeus monodon* by in situ hybridization. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 27, p. 131-139, 1996.
- CHEN, L. L.; WANG, H. C.; HUANG, C. J.; PENG, S. E.; CHEN, Y. G.; LIN, S. J.; CHEN, W. Y.; DAI, C. F.; YU, H. T.; WANG, C. H.; LO, C. F.; KOU, G. H. Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. **Virology**, v. 301, p. 136-147, 2002.
- DIEU, B.T.M.; MARKS, H.; SIEBENGA, J.J.; GOLDBACH, R.W.; ZUIDEMA, D.; DUONG, T.P.; VLAK, J.M. Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam. **Journal of General Virology**, v. 85, 3607–3618, 2004.
- DIEU, B.T.M.; MARKS, H.; ZWART, M.P.; VLAK, J.M. Evaluation of white spot syndrome virus variable DNA loci as molecular markers of virus spread at intermediate spatiotemporal scales. **Journal of General Virology**, vol. 91, p. 1164-1172, 2010.
- ESCOBEDO-BONILLA C.M.; ALDAY-SANZ, V.; WILLE, M.; SORGELOOS, P.; PENSART, M.B.; NAUWYNCK, H.J. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. **Journal of fishes diseases**, v. 31, p- 1-18, 2008.
- FEGAN, D.; CLIFFORD III, H.C. Health management for viral diseases in shrimp farms. In: **BROWDY, C. L.; JORY, D. E.** editors. The New

Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture, 2001.

HOA, T.; ZWART, M.P.; PHUONG, N.T.; VLAK, J.M.; JONG, M.C.M. Transmission of white spot syndrome virus in improved-extensive and semi-intensive shrimp production systems: A molecular epidemiology study. **Aquaculture**, v.313, p-7-14, 2011.

HOSSAIN, M. S.; CHAKRABORTY, A.; JOSEPH, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Detection of new hosts for white spot syndrome virus using nested polymerase chain reaction. **Aquaculture**, v. 198, p. 1-11, 2001.

INOUE, K.; MIWA, S.; OSEKO, N.; NAKANO, H.; KIMURA, T.; MOMOYAMA, K.; HIRAOKA, M. Mass mortalities of cultured Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscope evidence of the causative virus. **Fish Pathology**, v. 29, p. 149-158, 1994.

LEU, J.-H.; CHANG, C.-C.; WU, J.-L.; HSU, C.-W.; HIRONO, I.; AOKI, T.; JUAN, H.-F.; LO, C.-F.; KOU, G.-H.; HUANG, H.-C.. Comparative analysis of differentially expressed genes in normal and white spot syndrome virus infected *Penaeus monodon*. **BMC Genomics**, v. 8, p. 120, 2007.

LIGHTNER, D. V. (ed.) **A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for disease of cultured penaeid shrimp**. World Aquaculture Society. Baton Rouge. 1996.

LIGHTNER, D. V.; REDMAN, R. M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture**, v. 164, p. 201-220, 1998.

LO, C. F.; HSU, H. C.; TSAI, M. F.; HO, C. H.; PENG, S. E.; KOU, G. H.; LIGHTNER, D. V. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 35, p. 175-185, 1999.

LO, C. F.; LEU, J. H.; HO, C. H.; CHEN, C. H.; PENG, S. E.; CHEN, Y. T.; CHOU, C. M.; YEH, P. Y.; HUANG, C. J.; CHOU, H. Y.; WANG, C. H.; OU, G. H. Detection of baculovirus associated with White spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase

chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 25, p. 133-141, 1996.

MACIEL, M. L. T. **Contribuição para o desenvolvimento de uma proposta de monitoramento e certificação sanitária em cultivo de camarão marinho no Estado de Santa Catarina**. 2002.

38p.Dissertação de mestrado. Curso de pós-graduação em Aqüicultura. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

MARKS, H.; GOLDBACH, R.W.; VLAK, J.M.; VAN HULTEN, M.C.W. Genetic variation among isolates of White spot syndrome virus. **Archives of Virology**, v. 149, p. 673–697, 2004.

MARQUES, M.R.F.; MOSER, J.R.; MÜLLER, I.C. Virologia de crustáceos e métodos moleculares de diagnóstico. **In: Sanidade de organismos aquáticos no Brasi**. Org.: Ângela Teresa Silva-Souza. Maringá, PR: Abrapoa, 2006.

MARQUES, J.S.; MÜLLER, I.C.; MOSER, J.R.; SINCERO, T.C.; MARQUES, M.R.F. Wild captured crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851), a new host for white spot syndrome virus (WSSV) . **Aquaculture**, v. 318, p. 20-24, 2011.

MAYO, M. A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. **Archives of Virology**, v. 147, p. 1655-1663, 2002.

MELLO, G.L.; FARIAS, A.P. Policultivo de tilápias e camarões marinhos - Os resultados das primeiras experiências em Laguna - SC. **Panorama da Aquicultura**, v. 17 (102), p.42-47, 2007.

MÜLLER, I.C.; ANDRADE, T.P.D.; TANG-NELSON, K.F.J.; MARQUES, M.R.F.; LIGHTNER, D.V. Genotyping of *white spot syndrome virus* (WSSV) geographical isolates from Brazil and comparison to other isolates from the Americas. **Diseases of Aquatic Organisms**, vol.88(2), p. 91-98, 2010

NADALA, E.C.B. JR; LOH, P.C. A comparative study of three different isolates of white spot virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.33, p. 231-234, 1998.

NAUWYNCK, H.J. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, v. 31, 1–18, 2008.

NUNAN, L. M.; POULOS, B. T.; LIGHTNER, D. V. The detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) and Yellow Head Virus (YHV) in imported commodity shrimp. **Aquaculture**, v. 160, p.19-30, 1998.

OSTRENSKY, A.; BOEGER, W.A. principais problemas enfrentados atualmente pela aqüicultura brasileira In: **Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer** Ed.: OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO D. Brasília, 276 p., 2008.

PADREEP, B.; SHEKAR, M.; GUDKOV, N.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Genotyping of white spot syndrome virus prevalence in shrimp farms of India. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 78, p. 189-198, 2008.

SEIFFERT, W. Q. A Mancha Branca em Santa Catarina. **Revista Panorama da Aqüicultura**, no 87, 2005.

SEIFFERT, W. Q. Cultivo de Crustáceos. **In: Fundamentos de Aqüicultura**. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004.

SEIFFERT, W.; WINCKLER, S.; MAGGIONI, D. A mancha branca em Santa Catarina. **Revista da ABCC**, no1, p. 34-36, 2005.

SHEKAR M, KARUNASAGAR I, KARUNASAGAR I. Abundance, composition and distribution of simple sequence repeats and dinucleotide compositional bias within WSSV genomes. **Journal of Genetics**, v. 86, p. 69-73, 2007.

SHEKAR, M.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. A computer based identification of variable number tandem repeats in white spot syndrome virus genomes. **Curr Sci**, v. 89, p. 882–887, 2005.

SHI, Z.; WANG, H.; ZHANG, J.; XIE, Y.; LI, L.; CHEN, X.; EDGERTON B-F.; BONAMI J-R. Response of crayfish, *Procambarus clarkii*, haemocytes infected by white spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, v.28, p. 151–156, 2005.

SUBASINGHE, R. P. Epidemiological approach to aquatic animals health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. **Preventive Veterinary Medicine**, v.67, p. 117-124, 2005.

TANG, K.F.J.; NAVRRO, S.A.; PANTOJA, C.R.; ARANGUREN, F.L.; LIGHTNER, D.V. New genotypes of white syndrome virus (WSSV) and taura syndrome virus (TSV) from Kingdom of Saudi Arabia. **Diseases of aquatic organisms**, v. 99, p. 179-185, 2012.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. **Nucleic Acids Res.**, vol. 25, p. 4876-4882, 1997.

VASEEHARAN, B.; JAYAKUMAR, R.; RAMASAMY, P. PCR-based detection of white spot syndrome virus in cultured and captured crustaceans in India. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 443-447, 2003.

WAIKHOM, G.; JOHN, K.J.; GEORGE, M.R.; JEYSEELAN, M.J.P. Differential host passing alter pathogenicity and induces genomic variation in white spot syndrome virus. **Aquaculture**, vol. 261, p. 54-63, 2006.

WANG, Q.; WHITE, B.L.; REDMAN, R.M.; LIGHTNER, D.V. *Per os* challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. **Aquaculture**, v. 170, p. 179-194, 1999.

WANG, Q.; NUNAN, L.M.; LIGHTNER, D.V. Identification of genomic variations among geographic isolates of white spot syndrome virus using restriction analysis and southern blot hybridization. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 43, p. 175-181, 2000

WONGTEERASUPAYA, C.; PUNGCHAI, P.; WITHYACHUMNARNKUL, B.; BOONSAENG, V.; PANYIM, S.; FLEGEL, T.W.; WALKER, P.J. High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates in Thailand. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 54, p. 253-257, 2003.