



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

TALITA RIBEIRO GAGLIARDI

Imunidade intestinal em camarões *Litopenaeus vannamei*: expressão gênica espacial e o efeito da via de infecção pelo WSSV

Florianópolis

2020

Talita Ribeiro Gagliardi

Imunidade intestinal em camarões *Litopenaeus vannamei*: expressão gênica espacial e o efeito da via de infecção pelo WSSV

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Maria Perazzolo

Florianópolis

2020

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

Gagliardi, Talita Ribeiro

Imunidade intestinal em camarões *Litopenaeus vannamei* :
expressão gênica espacial e o efeito da via de infecção
pelo WSSV / Talita Ribeiro Gagliardi ; orientadora,
Luciane Maria Perazzolo, 2020.

104 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento,
Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Peneídeos.
3. Sistema imune. 4. Intestino médio. 5. RT-qPCR. I.
Perazzolo, Luciane Maria . II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

Talita Ribeiro Gagliardi

Imunidade intestinal em camarões *Litopenaeus vannamei*: expressão gênica espacial e o efeito da via de infecção pelo WSSV

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Luciane Maria Perazzolo
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Guilherme de Toledo e Silva
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Gislaine Fongaro
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Profa. Dra. Evelise Maria Nazari
Coordenadora do Programa

Profa. Dra. Luciane Maria Perazzolo
Orientadora

Florianópolis, 03 de abril de 2020

Dedico este trabalho aos meus pais e marido, amores da minha vida e meus grandes incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela oportunidade de realizar meus sonhos e por permitir a evolução constante.

À todos os mestres que passaram e deixaram muito de si. Em especial, ao cursinho comunitário ONG FENIX, representado pela Wanda, com certeza não chegaria aqui sem teu apoio.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento que foi muito importante para meu aprendizado.

À CAPES, pela concessão da bolsa e o financiamento deste projeto.

Minha orientadora querida Dra. Luciane Maria Perazzolo, que é um presente maravilhoso do universo, não tenho palavras para agradecer o acolhimento e a confiança depositada no meu trabalho, é um prazer ter você como orientadora/amiga.

Ao professor Dr. Rafael Diego da Rosa por todos os ensinamentos, amizade e pelo amor que exerce a profissão, são de profissionais como você que a universidade pública precisa.

À professora Dra. Margherita Barraco pelos agrados e o sorriso maravilhoso, além das histórias divertidíssimas.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura, a nossa grande famiLIAA (Gabriel, Mariana, Natan, Gustavo, Cairé, Nicolas, Iago e Breno) por ajudarem em todos os quesitos de vida, cada um de maneira especial, na convivência, nos ensinamentos, em materiais cedidos, pelas terças oficiais da caipira e memes. Um agradecimento especial ao Luiz e Flávio que sempre estiveram muito próximos, inclusive nos finais de semana.

Aos funcionários da universidade que facilitam nosso trabalho, em especial a Dona Lygia que alegra nosso dia com café e a Simone que sempre sorridente mantém nosso ambiente mais agradável.

Aos amigos cearenses (Pekena que representa minha família nordestina) que me ajudaram a ver a importância dos estudos com camarões e pela amizade no sentido mais puro. Sinto saudades desta convivência maravilhosa.

À minha amiga Silmara Fanti que desde a primeira graduação, além de mestre, sempre pude contar com sua amizade. Sil você é uma das pessoas mais incríveis que tive o prazer de conhecer nesta vida. Amo você!

Ao meu amigo Marcel que mesmo com tantas histórias está sempre por perto, mesmo que distante geograficamente. Marxinha como é bom poder contar com tua amizade em qualquer momento.

À família mais linda deste mundo: Priscila, Marcio e Vinicius Falvo por estarem comigo em todas as fases, com vocês aprendi o real significado da palavra lealdade/irmandade e agradeço imensamente a Deus por estarem sempre na minha vida.

Minhas queridas, Priscila Sepúlveda, Ingrid Brock, Leticia Fernanda e Thaís Lopes. Meus amores, obrigada pela amizade verdadeira. Vocês são demais! E eu amo vocês.

Aos meus queridos Elza e Arlito (*in memoriam*), Edna e Alencar, avós e avós por fazerem parte da minha vida e deixar na minha memória só lembranças boas, pelas joaninhas, comidas e tudo mais que consigo lembrar e sorrir, AMO vocês.

Agradecimentos especiais a minhas tias (Sérgia, Cris, Déia e Mama) vocês sempre estiveram presente na minha vida, apoiando cada passo, mesmo quando foram passos incertos. Muito Obrigada pela companhia nesta jornada.

À minha mãe Simone Alves Ribeiro Gagliardi, pai Renato Gagliardi e irmão Vinicius Ribeiro Gagliardi, todas as minhas vitórias com certeza serão sempre NOSSAS. Mãe, muito obrigada pelo amor e por não medir esforços e proporcionar uma boa educação. Pai, por me fazer acreditar que a universidade pública é de todos aqueles que almejam e se esforçam para isso. Ví, você sempre foi meu amor maior desde que nasceu, contaremos sempre um com o outro. Vocês são minhas fontes de inspiração, amo vocês acima de tudo nesta e nas próximas vidas.

Ao meu marido German Ayala Valencia, por me aguentar nas oscilações de humor, pelas análises estatísticas, pelas ondas de loucuras e mesmo assim ser meu melhor amigo, parceiro e me ensinar um pouquinho todos os dias, “*Só sei dançar com você*”.

Por último, ao universo, por tudo que ele me proporciona e por todas as pessoas presentes no texto acima e muitas que não estão e tive o prazer de encontrar nessa jornada. Gratidão!

*“Só podemos alcançar o impossível,
Se acreditarmos que é possível.”*
(Alice no País das Maravilhas, 1865).

RESUMO

Os camarões praticam canibalismo de animais doentes e moribundos, sendo a via oral uma importante via de infecção e entrada de patógenos, como o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). A exemplo dos insetos, o epitélio intestinal dos camarões deve possuir respostas imunológicas especializadas e regionalizadas que não são ainda conhecidas. Nesse contexto, o presente estudo avaliou o efeito da via de entrada do WSSV (oral ou sistêmica) sobre o perfil transcricional de genes associados à imunidade e a sua expressão espacial no intestino médio (IM) de camarões juvenis *Litopenaeus vannamei*. A expressão da maioria dos genes avaliados (47 no total) não foi diferencial em função a via de entrada do vírus. Contudo, quatro genes tiveram sua expressão reprimida pelo desafio oral: os PAMs *Litvan* ALF-A (4,4x *fold change*), *Litvan* ALF-C (4,8x) e *Litvan* ALF-G (6,4x) e o gene pertencente à via Toll de sinalização celular, *LvToll2* (4,7x). A entrada do vírus no organismo pela via sistêmica esteve associada com a modulação dos genes *Litvan* ALF-A (-2,3x) e *LvproPO1* (2,8x). Além disso, a expressão espacial de 37 genes foi avaliada nas porções anterior, medial e posterior do IM. Nos animais *naïve*, 22% dos genes apresentaram expressão diferencial em uma das regiões do IM (*Litvan* ALF-G, *Lvan*-Stylicin1, *Lvan*-Stylicin2, *LvIAP3*, *LvToll3*, *LvToll4*, *LvPPAE2* e *Lva2M-2*). Após o desafio dos animais com o WSSV, a expressão de 81% dos genes foi consideravelmente reprimida (PAMs, homeostasia, defesa antiviral, sistema proPO, via Toll, inibidores de proteases e PRPs), com três genes registrando níveis de expressão não quantificáveis (*LvToll3*, *LvToll4* e *Lva2M1*) e outros sendo reprimidos em todas as porções do IM: *LvPEN4* (2x a 5x), *LvproPO1* (4x a 6x), *LvPPAE2* (5x a 12x) e *Lva2M-2* (2x a 41x). Contudo, 19% dos transcritos foram induzidos pela infecção viral, estando eles relacionados à inibição de apoptose (2x *LvIAP3*), homeostasia (2,9x *LvHHAP*), defesa antiviral (2,3x *LvDcr1*) e sinalização celular (2x *LvHMGBa*). A região anterior do IM apresentou modulação exclusiva de alguns genes (*Litvan* ALF-A, *Litvan* ALF-B, *Litvan* ALF-C, *Litvan* ALF-G, *LvDscam*, *LvIAP3* e *LvDOME*), assim como a região medial (*LvHHAP*, *LvClot*, *LvTGII* e *LvSid-1*) e a posterior (*Litvan* PEN 1/2). A região anterior do IM de camarões demonstrou ser um importante sítio de expressão de moléculas antimicrobianas contra patógenos que adentram o camarão pela via oral. Estudos sobre a imunidade intestinal dos peneídeos podem auxiliar na compreensão da interação patógeno-hospedeiro e no desenvolvimento de novas estratégias para o controle de enfermidades nos cultivos. **Palavras-chave:** peneídeos; sistema imune; intestino médio; desafio sistêmico; desafio oral; RT-qPCR.

ABSTRACT

Shrimp practices cannibalism of moribund and infected animals, and the oral route is the most usual access to pathogen entry, such as the white spot syndrome virus (WSSV). As occurs in insects, the shrimp's intestinal epithelium should have specialized and regionalized immune responses that are currently unknown. In this study, we evaluated the effect of the WSSV entry route (oral or systemic) on the transcriptional profile of immune-related genes and their spatial expression in the midgut from juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*. Nevertheless, the viral entry route was not associated with the modulation of most of the evaluated genes, the oral challenge decreased the expression of three antimicrobial peptide genes: *Litvan* ALF-A (4.4x fold change), *Litvan* ALF-C (4.8x), and *Litvan* ALF-G (6.4x), and the Toll receptor gene, *LvToll2* (4.7x); the WSSV challenge by systemic route changed the expression of *Litvan* ALF-A (-2.3x) and *LvproPO1* (2.8x). Additionally, we investigated the spatial expression of 37 immune-related genes in the midgut (anterior, medial, and posterior region) from *naïve* animals (basal expression) and WSSV infected shrimp (48 h post-oral challenge). Around 20% of the genes showed differential expression in the midgut regions from unchallenged shrimp (*Litvan* ALF-G, *Lvan*-Stylicin1, *Lvan*-Stylicin2, *LvIAP3*, *LvToll3*, *LvToll4*, *LvPPAE2* and *Lvα2M-2*). Regarding the WSSV challenged shrimp, 81% of transcripts were quite repressed in, at least, one of the midgut regions (AMP, homeostasis, antiviral defense, proPO system, Toll signaling pathway, protease inhibitors, and PRP), including genes unable to be quantified (*LvToll3*, *LvToll4*, and *Lvα2M1*). Some few genes were repressed in all midgut regions, as the *LvPEN4* (2x a 5x), *LvproPO1* (4x a 6x), *LvPPAE2* (5x a 12x) and *Lvα2M-2* (2x a 41x). The WSSV infection promoted the induction of 19% of evaluated genes, whose transcripts were related to apoptosis inhibition (2x *LvIAP3*), homeostasis (2.9x *LvHHAP*); antiviral defense (2.3x *LvDcr1*) and cell signaling (2x *LvHMGBa*). Exclusive gene expression was particularly uncovered in the anterior midgut region (*Litvan* ALF-A, *Litvan* ALF-B, *Litvan* ALF-C, *Litvan* ALF-G, *LvDscam*, *LvIAP3*, and *LvDOME*), as well as in the medial (*LvHHAP*, *LvClot*, *LvTGII*, and *LvSid-1*) and posterior region (*Litvan* PEN 1/2). In conclusion, the anterior midgut region revealed to be an essential site to the expression of antimicrobial molecules against pathogens that invade the shrimp orally. Studies addressing the intestinal immunity can help to understand the host-pathogen interaction and support new strategies to disease control in shrimp farming.

Keywords: penaeid; immune system; midgut; systemic challenge; oral challenge; RT-qPCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplar adulto do camarão do Pacífico <i>Litopenaeus vannamei</i>	18
Figura 2 – Respostas imunológicas induzidas nos hemócitos.....	23
Figura 3 – Esquema representativo (fora de escala) do trato gastrointestinal do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	25
Figura 4 – Detalhes do desenho Experimental.....	32
Figura 5 – Coeficiente de Estabilidade dos genes candidatos à referência.....	42
Figura 6 – Expressão relativa de genes diferencialmente expressos no intestino médio de <i>Litopenaeus vannamei</i> após 48 h de uma infecção experimental <i>per os</i> com o WSSV.....	45
Figura 7 – Expressão relativa de genes diferencialmente expressos no intestino médio de <i>Litopenaeus vannamei</i> após 48 h de uma infecção experimental com o WSSV pela via sistêmica (injeção intramuscular).....	46
Figura 8 – Representação esquemática (fora de escala) das porções anterior, medial e posterior do intestino médio do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	60
Figura 9 – Gel de eletroforese representativo mostrando a detecção molecular do WSSV por <i>Nested-PCR</i>	60
Figura 10 – Coeficiente de Estabilidade dos genes candidatos à referência.....	67
Figura 11 – Análise global da expressão de genes associados ao sistema imune no intestino médio de <i>Litopenaeus vannamei</i>	69

Figura 12 – Distribuição do perfil transcricional de genes diferencialmente expressos nas porções do intestino médio em <i>Litopenaeus vannamei</i> não desafiados (<i>naïve</i>).....	70
Figura 13 – Efeito da presença do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) no intestino médio de <i>L. vannamei</i> sobre o perfil transcricional de genes associados ao sistema imune de camarões.....	72
Figura 14 – Diagrama de Venn indicando o número de genes associados ao sistema imune nas diferentes porções do intestino médio do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	73
Figura 15 – Diferenças nos níveis dos transcritos no intestino médio de camarões <i>L. vannamei</i> desafiados e não desafiados (<i>naïve</i>) com o WSSV. Os valores de expressão relativa estão apresentados como <i>fold-change</i> entre as médias das réplicas biológicas em cada porção do intestino médio (>2 - <i>fold-change</i> ; teste <i>t</i> de <i>Student</i> não pareado, $P<0,05$). Porção anterior (A), medial (B) e posterior (C).....	76
Figura 16 – Perfil transcricional de genes diferencialmente expressos em cada porção do intestino médio de camarões <i>L. vannamei</i> , após 48 horas do desafio oral com o WSSV.....	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sequência dos iniciadores referentes aos genes utilizados nas análises de expressão gênica (Capítulo 1).....	36
Quadro 2 – Sequência dos iniciadores referentes aos genes utilizados nas análises de expressão gênica (Capítulo 2).....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resposta transcricional no intestino médio de camarões, relacionada à via de infecção pelo WSSV. A diferença de expressão gênica entre os grupos experimentais **SW** (desafiados pela via sistêmica) e **OW** (desafiados pela via oral) e seus respectivos controles (**S** e **N**), está apresentada em valores de *fold-change* (*cut-off* ≥ 2). Valores em vermelho e azul indicam, respectivamente, a expressão gênica estatisticamente superior e inferior entre os grupos **SW/S** e **OW/N** (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). 44

LISTA DE SIGLAS

ALF Fator antilipopolissacarídeo

Cq Ciclo de quantificação

dsRNA *double stranded* RNA

IM Intestino médio

LPS Lipopolissacarídeos

MAMP Padrões moleculares associados a microrganismos

MP Membrana peritrófica

MAS Solução de Alsever modificada

mRNA *messenger* RNA, RNA mensageiro

miRNA micro RNA

PAM Peptídeos antimicrobianos

PEN – peneidina

pb pares de bases

PCR Reação em cadeia da polimerase

proPO Pró-fenoloxidase

PO – Fenoloxidase

PRP/R Proteínas de reconhecimento de padrões moleculares/receptor

RT-qPCR PCR quantitativa em tempo real

RNAi RNA de interferência

RISC Complexo multiproteico de silenciamento induzido por RNA

ROIS *reactive oxygen intermediates* Espécies reativas de oxigênio

TSV *Taura Syndrome Virus* Vírus da Síndrome de Taura

WSSV *white spot syndrome virus*- Vírus da Síndrome da Mancha Branca

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

mL – mililitro

μ L – microlitro

g – grama

mg – miligrama

μ g – micrograma

t – toneladas

μ M – micromolar

h – hora(s)

min – minuto(s)

s – segundo(s)

$^{\circ}$ C - graus Celsius

< - maior

> - menor

% - porcentagem

α - letra grega alfa

β - letra grega beta

Δ - letra grega delta

μ - micro

\pm - mais ou menos

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	18
CAPÍTULO 1	28
1 INTRODUÇÃO	29
2 OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 ANIMAIS	31
3.2 DIAGNÓSTICO WSSV.....	31
3.3 INFECÇÕES EXPERIMENTAIS COM O WSSV.....	33
3.3.1 Desafio pela via sistêmica	33
3.3.2 Desafio pela via oral	33
3.4 COLETA DOS INTESTINOS MÉDIOS	33
3.5 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA.....	34
3.6 ESCOLHA DOS INICIADORES	34
3.7 TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA POR PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR).....	40
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	41
4 RESULTADOS	42
5 DISCUSSÃO	47
CAPÍTULO 2	55
1 INTRODUÇÃO	56
2 OBJETIVOS	58

2.1 OBJETIVO GERAL.....	58
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	58
3 MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1 ANIMAIS	59
3.2 DESAFIO <i>per os</i> COM WSSV E COLETA DOS INTESTINOS MÉDIOS.....	59
3.3 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO (gDNA).....	61
3.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA.....	61
3.5 ESCOLHA DOS INICIADORES	61
3.6 TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA POR PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR).....	65
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	65
4 RESULTADOS.....	67
5 DISCUSSÃO	80
CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	92
REFERÊNCIAS.....	93

INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas, a produção aquícola mundial passou a desempenhar um papel importante para suprir a crescente demanda por alimentos, especialmente devido ao aumento a nível mundial da população e da pesca extrativista nos oceanos. Segundo dados recentes da FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura), o cultivo mundial de crustáceos representa cerca de 10 % da produção aquícola mundial (7,9 milhões de toneladas) do total produzido, sendo um dos segmentos do agronegócio com maior destaque econômico. Devido ao seu alto valor de mercado, o cultivo de crustáceos responde por 24,6% (US\$57,1 bilhões) do valor total gerado (FAO, 2018).

A espécie de crustáceo mais cultivada no mundo é o camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (**Figura 1**), que em 2016, representou 53% da produção mundial de crustáceos e cerca de 85 % da produção de peneídeos (FAO, 2018). Esse peneídeo é uma espécie naturalmente encontrada no Oceano Pacífico desde a província de Sonora, no México, até o sul de Tumbes, no Peru (PÉREZ FARFANTE; KENSLEY, 1997) e possui excelentes características zootécnicas tais como elevada e rápida taxa de crescimento, além de rusticidade no manejo (BRIGGS *et al.*, 2004).

Atualmente, os maiores produtores são os países asiáticos China, Vietnã, Indonésia, Índia e Tailândia, responsáveis por cerca de 80 % da produção mundial e, no continente americano, destacam-se o Equador, o México e o Brasil (FAO, 2018). No Brasil, a região Nordeste concentra (99,4% da produção total, sendo Rio Grande do Norte o principal produtor (43,2% da produção), seguido pelo Ceará (28,5%) (IBGE, 2018).

Figura 1 - Exemplar adulto do camarão do Pacífico *Litopenaeus vannamei*.



Fonte: Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura – LIAA

No ambiente marinho, os microrganismos constituem mais de 90% da biomassa viva, onde são essenciais para a ciclagem de nutrientes, geralmente estabelecendo associações simbióticas com os outros organismos marinhos (EGAN; GARDINER, 2016). Estima-se que a quantidade de bactérias e vírus no meio marinho possa atingir, respectivamente, 10^7 células/mL (MAEDA, 2002) e 10^8 partículas virais/mL (BERGH *et al.*, 1989; SUTTLE, 2005). Neste ambiente, os microrganismos podem associar-se a diferentes órgãos e tecidos dos organismos (MAEDA, 2002). Muitos microrganismos são patógenos oportunistas, como é o caso de muitas bactérias Vibrionáceas (VÉRON, 1965) e, sabe-se que muitas das doenças encontradas nos sistemas marinhos são resultantes de uma disbiose microbiana (distúrbio no microbioma natural do hospedeiro) associada ao aumento de infecções oportunistas ou polimicrobianas (EGAN; GARDINER, 2016).

Historicamente, a sustentabilidade da carcinicultura mundial enfrenta desafios advindos especialmente de doenças infecciosas causadas por bactérias e vírus. Bacterioses e viroses já causaram perdas econômicas de bilhões de dólares aos países produtores (LIGHTNER *et al.*, 2012; THITAMADEE *et al.*, 2016). A intensificação dos sistemas aliada a um manejo inadequado no cultivo, má nutrição e alterações bruscas na salinidade, oxigênio e temperatura da água, são potentes fatores estressores aos animais confinados e que debilitam o seu sistema imune, tornando-os susceptíveis ao estabelecimento de infecções microbianas e virais (KIBENGE, 2019).

Até o momento, o patógeno viral mais devastador para a carcinicultura é o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV, do inglês *White spot syndrome virus*) que, desde o seu surgimento na Ásia em 1992 e nas Américas em 1999, ocasionou perdas catastróficas ao setor, com valor estimado acima de 15 bilhões de dólares (LIGHTNER *et al.*, 2012; TANDEL *et al.*, 2017).

Todas as espécies de camarões peneídeos são altamente suscetíveis à infecção pelo WSSV (ESCOBEDO-BONILLA *et al.*, 2008), que podem ser infectados ao longo de todo seu ciclo de vida e em diferentes sistemas de cultivo (NUNES; FEIJÓ, 2016), resultando frequentemente em alta mortalidade. Uma vez infectados, os animais apresentam os primeiros sinais clínicos, como natação errática e diminuição das atividades metabólicas, o aparecimento eventual de manchas brancas na cutícula abaixo do exoesqueleto, resultante do acúmulo de sais de cálcio (WANG *et al.*, 1999; LIGHTNER *et al.*, 2012). Em cultivos tradicionais semi-intensivos, como em viveiros de terra, a mortalidade pode atingir 100%

entre 3 a 10 dias, após o surgimento dos primeiros sintomas (CHOU *et al.*, 1995; WANG, *et al.*, 1999).

O WSSV é um vírus envelopado cujo genoma é composto por um longo DNA de dupla fita circular (≈ 305 Kpb) que codifica para um total de 181 proteínas estruturais e não estruturais (ESCOBEDO-BONILLA *et al.*, 2008), sendo o único membro do gênero *Whispovirus*, da família Nimaviridae (MAYO, 2002). Sua replicação é nuclear e para maiores detalhes consultar as revisões de Escobedo-Bonilla e colaboradores (2008) e Verbruggen *et al.* (2016). Morfologicamente, os virions do WSSV são estruturas avolumadas (80-120 x 250-380 nm), em forma de bastonete (CHOU *et al.*, 1995; NADALA; LOH, 1998), com um nucleocapsídeo envolto por um envelope trilaminar e um apêndice em forma de cauda, cuja função é ainda desconhecida (DURAND *et al.*, 1997; NADALA; LOH, 1998).

O WSSV se replica em células de diferentes tecidos, especialmente as de origem ectodérmica e mesodérmica (CHANG *et al.*, 1996, KOU *et al.*, 1998), incluindo o tecido hematopoiético. Um fato relevante é que a infecção compromete seriamente o sistema imunológico dos camarões, uma vez que o WSSV se replica nas células imunocompetentes ou hemócitos (WANG *et al.*, 2002). Adicionalmente, análises ultraestruturais evidenciaram a presença do WSSV também no intestino médio (IM) dos animais, que é de origem endodérmica (ARTS *et al.*, 2007).

O modelo do ciclo de vida e morfogênese do WSSV foi sugerido por Escobedo-Bonilla e colaboradores (ESCOBEDO-BONILLA *et al.*, 2008). Ao longo dessas fases, uma grande variedade de interações moleculares ocorre entre o WSSV e seu hospedeiro (VERBRUGGEN *et al.*, 2016). Essas interações moleculares podem ser fatores-chave para a suscetibilidade do hospedeiro, além de oferecer subsídios para a criação de ferramentas que oportunizem formas de prevenção e/ou tratamento.

Os camarões se infectam com o WSSV através do consumo de tecido infectado por meio de canibalismo ou predação (transmissão horizontal) e, também, pelo contato de água ou dejetos contaminados. Animais mortos e moribundos podem ser uma fonte de transmissão de doenças (LO; KOU., 1998). A transmissão vertical do patógeno, ou seja dos parentais para a progênie, não está muito bem estabelecida em camarões, uma vez que virions geralmente são ausentes nos óvulos, sugerindo que os ovócitos que contêm o vírus não se maturam em óvulos (PRADEEP *et al.*, 2012). Contudo, outros autores sugerem uma transmissão vertical baseada na presença de virions na superfície dos óvulos ou por fezes contaminadas da ninhada

(ALDAY-SANZ, 2018).

Até 2004, o Brasil era livre de WSSV. No entanto, em dezembro daquele ano, o primeiro surto foi registrado em fazendas de camarões no município de Imaruí, sul do estado de Santa Catarina (SC). A carcinicultura catarinense foi altamente impactada pela síndrome da mancha branca, cuja produção de 4.189 t em 2004 caiu vertiginosamente nos anos seguintes, atingindo irrisórias 284,2 t em 2017 (EPAGRI, 2018). Até o presente momento, a atividade em SC não se restabeleceu e atualmente existem apenas 10 das 108 fazendas existentes em 2005. Na região Nordeste, surtos de mancha branca foram inicialmente relatados em 2008, em cultivos no Sul da Bahia (ABCC, 2016; NUNES; FEIJÓ, 2016), sendo que o vírus espalhou-se rapidamente para os estados vizinhos e reduzindo a produção em 21,2% nos últimos anos (IBGE, 2018).

Em vista deste cenário, torna-se fundamental tanto a adoção de medidas profiláticas que visem o controle das enfermidades nos cultivos, como também visando o aumento da imunocompetência dos animais, tornando-os menos suscetíveis. Neste contexto, estudos sobre os mecanismos de defesa dos camarões frente ao WSSV mostram-se primordiais fundamentais para o desenvolvimento futuro de ferramentas biotecnológicas de prevenção e tratamento de enfermidades.

ASPECTOS GERAIS SOBRE O SISTEMA IMUNE DOS CRUSTÁCEOS

A exemplo dos demais invertebrados, os crustáceos possuem apenas um sistema imune do tipo inato, não possuindo o sistema imune adaptativo presente nos vertebrados, caracterizado pela presença de linhagens clonais linfocíticas (células T e B), anticorpos e memória imunológica a longo prazo. A falta de um sistema imune adaptativo resulta na impossibilidade de se desenvolver vacinas (na concepção clássica desse termo) ou terapias baseadas no reconhecimento altamente específico de um antígeno, que os protejam contra infecções reincidentes (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014).

Contudo, estudos recentes demonstram que a capacidade de desenvolver memória imunológica, uma típica característica da imunidade adaptativa, é também presente nas respostas da imunidade inata de plantas, invertebrados e vertebrados (NETEA *et al.*, 2015; MELILLO *et al.*, 2018). Estudos recentes em outros invertebrados têm demonstrado que o contato prévio e não-letal com um determinado patógeno pode levar a alterações na expressão gênica de alguns imunofatores (*immune priming*), gerando uma resposta mais eficaz ou até

mesmo de resistência do hospedeiro, numa segunda exposição a esse mesmo patógeno (*specific primed response*) (PHAM *et al.*, 2007; IMLER, 2013). Como mecanismo geral, acredita-se que o *immune priming* induza a uma reprogramação epigenética, que mediante um segundo desafio apresentará uma resposta mais rápida e eficaz para a eliminação do patógeno e, por consequência, haverá uma maior sobrevivência do hospedeiro (MELILLO, 2018). Devido a essas e outras recentes descobertas, alguns autores atribuem a existência nos invertebrados de uma imunidade adaptativa alternativa (KURTZ; ARMITAGE, 2006; KURTZ; MILUTINOVI, 2016).

A recente descoberta de moléculas altamente variáveis contendo domínios de imunoglobulina (Ig) altera o conceito de que os crustáceos não sejam capazes de um reconhecimento mais específico dos patógenos (NG *et al.*, 2015). Em camarões, foram identificadas até o momento duas famílias de proteínas com domínios Ig hipervariáveis, Dscam (*Down syndrome cell adhesion molecule*) e FREP (*Fibrinogen-related protein*). A partir de um único gene podem ser geradas, por *splicing* alternativo, isoformas diferentes que podem reconhecer de forma bastante específica e diversa o mesmo microrganismo (ARMITAGE; PEUB; KURTZ, 2015). A produção de isoformas específicas de Dscam aumenta a probabilidade de reconhecimento e fagocitose dos microrganismos invasores (DONG; TAYLOR; DIMOPOULOS, 2006). A Dscam1 de camarões é capaz de induzir especificidade imune, após o desafio com um determinado patógeno mostrando capacidade de ligação significativamente maior ao mesmo patógeno posteriormente (HUNG *et al.*, 2013).

A primeira barreira de proteção dos crustáceos contra a entrada de patógenos é proporcionada por uma carapaça externa rígida (exoesqueleto), que reveste internamente o trato digestório que também possui enzimas e moléculas, algumas com atividade antimicrobiana (SOONTHORNCHAI *et al.*, 2010). Uma vez rompidas às barreiras físicas e químicas, os microrganismos alcançam a hemocele e podem desencadear a ativação de uma série de reações imunológicas no hospedeiro para neutralizar e eliminar estes agentes invasores.

De maneira geral, as respostas de defesa estão intimamente ligadas à hemolinfa dos crustáceos, que circula em um sistema aberto ou semiaberto. A hemolinfa é composta por uma fração celular, representada pelos hemócitos (células imunocompetentes) e uma fração líquida, representada pelo plasma, onde estão dissolvidos diversos fatores humorais (TASSANAKAJON *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2015).

Tais respostas são desencadeadas a partir do reconhecimento do agente invasor (ou de seus componentes estruturais) por proteínas de reconhecimento padrão/receptores (PRP/PRR, *pattern recognition proteins/receptors*), presentes no hospedeiro. Estas moléculas reconhecem especificamente os padrões moleculares exclusivos de microrganismos (MAMP, *microbial-associated molecular patterns*), especialmente os lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias Gram-negativas, as peptidoglicanas e ácido lipoteicóico das bactérias Gram-positivas, as β -1,3/1,6-glicanas dos fungos e os ácidos nucleicos [DNA simples-fita e RNA dupla-fita (dsRNA)] dos vírus (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2015). A partir do reconhecimento do não-próprio, diferentes respostas celulares e humorais são simultaneamente acionadas à indução/repressão de diferentes imunoreguladores e imunofetores, visando em conjunto, a proteção do organismo contra os patógenos (**Figura 2**).

Figura 2. Respostas imunológicas induzidas nos hemócitos de camarões.

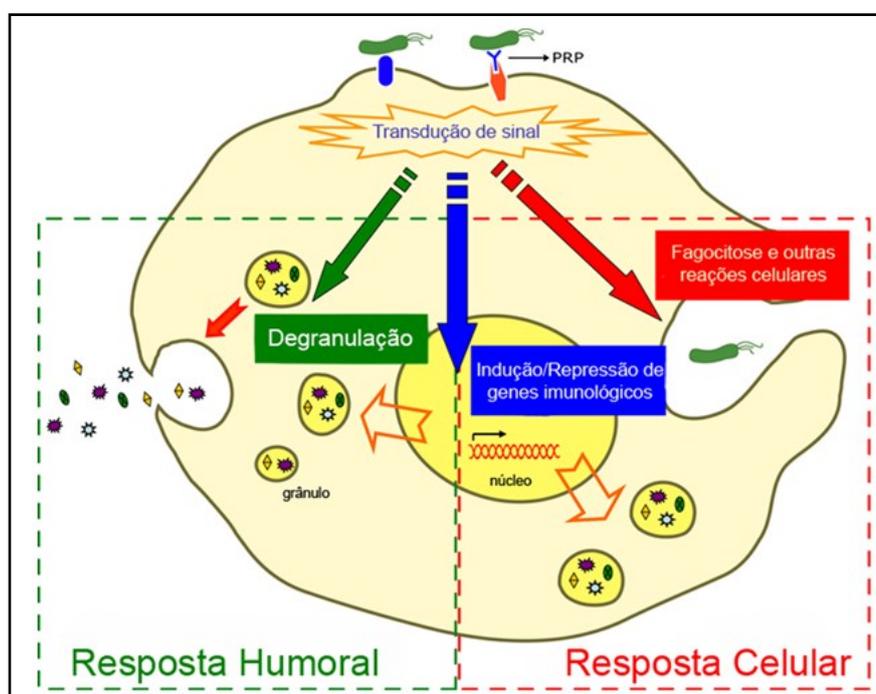


Figura 2. Após o reconhecimento dos patógenos via PRR/PRP, diferentes reações de defesa são ativadas, compreendendo: (1) respostas celulares como fagocitose, formação de nódulos e cápsulas, infiltração e formação de armadilhas extracelulares de ácidos nucleicos; (2) resposta humoral baseada na degranulação e liberação de diferentes imunofetores e imunoreguladores e, (3) indução e/ou repressão de genes associados ao sistema imune. Fonte: BARRACO e colaboradores (2014).

Entre os mecanismos atualmente reconhecidos em crustáceos, envolvidos na destruição de patógenos destacam-se: (1) o reconhecimento do não-próprio por receptores/proteínas de reconhecimento-padrão (PRR/PRP); (2) a ativação de vias de sinalização intracelular; (3) a fagocitose, encapsulamento e nodulação associadas à formação de armadilhas extracelulares de ácidos nucleicos; (4) a produção de moléculas microbidas, como as espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) e os peptídeos antimicrobianos (PAM); (5) a melanização mediada pelo sistema de ativação da pró-fenoloxidase (proPO), gerando moléculas intermediárias altamente citotóxicas; (6) a coagulação da hemolinfa; (7) a aglutinação celular mediada por lectinas e, (8) os sistemas antivirais mediados pela interferência por RNA (RNAi), citocinas análogas a *interferons*, apoptose e autofagia (TASSANAKAJON *et al.*, 2013; BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2014; LI; WENG; HE, 2019).

Os processos imunológicos acima mencionados estão muito bem caracterizados em crustáceos e todos estão intimamente associados à hemolinfa, caracterizando uma imunidade celular e humoral. No entanto, recentemente tem-se voltado à atenção para uma imunidade extra hemocitária, associada aos epitélios, como aqueles presentes no intestino dos camarões. Embora muito pouco ainda se conheça sobre a potencial imunidade intestinal em camarões, a participação do intestino na imunidade dos insetos já está muito bem caracterizada (CAPO; WILSON; DI CARA, 2019). Por exemplo, sabe-se que as células epiteliais do intestino médio de *Drosophila melanogaster* sintetizam moléculas antimicrobianas e citotóxicas, tais como os PAM e espécies reativas de oxigênio que protegem o hospedeiro contra o estabelecimento de patógenos (LEE *et al.*, 2019).

Em relação à morfologia do trato gastrointestinal dos decápodos, o mesmo é constituído pelo intestino anterior (incluindo a boca, esôfago e estômago), intestino médio e intestino posterior (reto e ânus), acrescido da glândula digestiva denominada hepatopâncreas (SOONTHORNCHAI *et al.*, 2010; MCGAW; CURTIS, 2013) (**Figura 3**). A maioria do intestino é revestida por uma cutícula quitinosa que separa o conteúdo luminal do epitélio, protegendo-o da abrasão ocasionada pelas partículas alimentares. A exceção é a região medial do intestino que é revestida apenas por uma membrana peritrófica quitinosa, acelular e porosa, que permite a absorção seletiva de nutrientes e é composta por fibrilas associadas à glicoproteínas e proteoglicanas (WANG *et al.*, 2012; MCGAW; CURTIS, 2013; SOONTHORNCHAI *et al.*, 2015).

Figura 3. Esquema representativo (fora de escala) do trato gastrointestinal do camarão *Litopenaeus vannamei*.

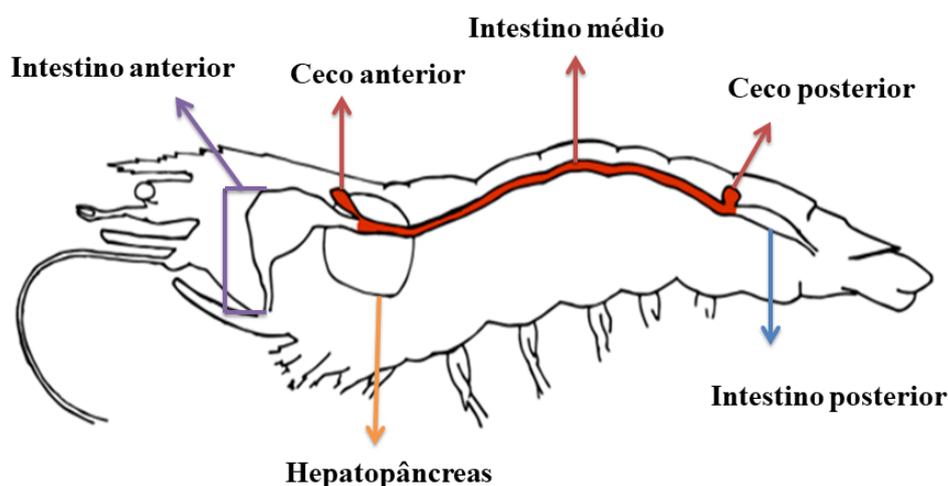


Figura 3. O trato gastrointestinal é dividido em intestino anterior [boca, esôfago e estômago (seta lilás)], hepatopâncreas (seta rosa), intestino médio (destacado em vermelho, contendo os cecos anterior e posterior) e intestino posterior [reto e ânus (seta azul)]. Adaptado de Farias e colaboradores (2019).

A prática de canibalismo entre os camarões é muito comum (LO; KOU, 1998) e estes animais podem facilmente infectar-se pelo trato gastrointestinal. Apesar das barreiras físicas (cutícula quitinosa) e químicas (enzimas digestivas, baixo pH, etc) presentes no intestino anterior, os microrganismos podem alcançar o intestino médio, ultrapassar a barreira conferida pela membrana peritrófica e adentrar no organismo via epitélio, tornando esta porção do intestino susceptível às infecções (ARTS *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2012). Em contrapartida, acredita-se que estratégias de defesa tenham sido evolutivamente impostas ao intestino para que estes animais sobrevivessem em ambientes ricos em microrganismos, há pelo menos 500 milhões de anos (GORDON; GREEN, 2018). Porém, a participação efetiva do epitélio intestinal na imunidade dos camarões está ainda por ser conhecida.

Outro fato curioso é que o intestino médio da mosca da fruta *Drosophila melanogaster* pode ser subdividido em até seis diferentes regiões, de acordo com dados morfométricos, histoquímicos e transcritômicos (CAPO; DI CARA, 2019). Em camarões, são poucos os estudos neste tema, porém no peneídeo *Penaeus monodon*, Soonthornchai e colaboradores (2010) avaliaram a expressão de seis genes imunológicos em duas porções do intestino médio: AM (anterior e medial) e PH (posterior do IM com intestino posterior), onde

os animais foram desafiados experimentalmente com o *V. harveyi*. Dos seis genes, o peptídeo antimicrobiano ALF3 apresentou diferença de expressão entre as partes, sugerindo que o intestino do camarão pode responder a uma infecção bacteriana de maneira diferente em diferentes partes do intestino médio. Posteriormente, o mesmo grupo identificou que existe uma distribuição assimétrica das comunidades bacterianas ao longo do intestino médio dos camarões (SOONTHORNCHAI *et al.*, 2015). Esses achados sugerem que os camarões, a exemplo de outros artrópodes, devam também possuir uma regionalização funcional e morfológica no intestino médio.

Nos últimos anos, nosso grupo (Laboratório de Imunologia Aplicada a Aquicultura - LIAA) tem dirigido esforços para elucidar o papel do intestino nas defesas antimicrobianas e antivirais de *L. vannamei*. Em um primeiro estudo, Silveira e colaboradores (2018) demonstraram que o trato gastrointestinal é um importante sítio de expressão de vários genes associados à imunidade de camarões *naïve* ou desafiados com bactérias *Vibrio harveyi* e WSSV. A expressão de alguns genes foi induzida no intestino médio após 48h do desafio bacteriano, mas nenhum dos genes avaliados foi modulado em resposta à infecção viral. A análise global do bacterioma intestinal de *L. vannamei* cultivados em sistema de bioflocos (BFT, *Biofloc technology*) e submetidos a uma infecção oral pelo WSSV foi apresentada e discutida por Pilotto e colaboradores (2018), bem como o efeito de uma alimentação suplementada com a cianobactéria *Arthrospira platensis* (espirulina) sobre o sistema imune dos camarões (PILLOTO *et al.*, 2019). Mais recentemente, o impacto das condições ambientais de cultivo sobre a imunidade intestinal de camarões foi avaliada por Pilotto e colaboradores (2020), onde os ambientes ricos em microrganismos encontrados nos cultivos BFT agem como imunoestimulantes alterando o perfil de expressão gênica no intestino médio.

Apesar destes avanços, até o momento não há evidências se, a exemplo dos insetos, os camarões apresentam uma expressão gênica espacial no intestino médio e, se a via de entrada no organismo pelo WSSV altera o perfil transcricional de genes imunológicos. Neste contexto, o presente trabalho avaliou a expressão de 47 genes pertencentes a 11 categorias funcionais associadas à imunidade em camarões *L. vannamei* desafiados com WSSV por uma das duas vias: oral (*per os*) ou sistêmica (intramuscular). Os resultados desta parte do estudo estão apresentados e discutidos no **Capítulo 1**. Adicionalmente, foi investigada a existência de expressão espacial no intestino médio de genes imunológicos, considerando as três porções

do IM (anterior, medial e posterior) e se o perfil transcricional é modificado em animais infectados pelo WSSV. Os resultados desta parte do estudo estão apresentados e discutidos no **Capítulo 2**.

Efeito da via de infecção do WSSV sobre a expressão de genes associados à imunidade intestinal de camarões *Litopenaeus vannamei*

1. INTRODUÇÃO

Nos estudos que avaliam o perfil transcricional de genes em diferentes tecidos de camarões infectados por patógenos (fungos, bactérias ou vírus), as infecções experimentais conhecidas por “desafios” são realizadas ou pela via sistêmica, através de injeções intramusculares (PHUOC *et al.*, 2009; GONÇALVES *et al.*, 2014; RAJA *et al.*, 2017; PALANIKUMAR *et al.*, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2018), ou por imersão dos animais em água contaminada (SOTO; LOTZ, 2003; CORTEEL *et al.*, 2009; SOONTHORNCHAI *et al.*, 2010) ou, ainda, pela via oral ou *per os*, que mimetiza a natureza canibal dos camarões.

Os desafios sistêmicos são realizados a partir de injeções intramusculares de um inóculo previamente preparado e que contém quantidades conhecidas do microrganismo, sendo imprescindível que todos os animais do experimento recebam, *a priori*, a mesma quantidade de microrganismo (ESCOBEDO-BONILLA *et al.*, 2008). Os desafios orais compreendem basicamente três metodologias: o inóculo é introduzido na cavidade oral dos animais por (1) escoamento com auxílio de uma micropipeta (PILOTTO *et al.*, 2018), (2) ou de uma microseringa flexível (gavagem) (ESCOBEDO-BONILLA *et al.*, 2005; GUITTERLE *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2016), ou ainda, (3) ofertando uma quantidade de tecido infectado, como alimento aos animais (THUONG, *et al.*, 2016; DOMINGUEZ-BORBOR *et al.*, 2019).

Ressalta-se que para qualquer uma destas metodologias é importante a padronização da técnica e da quantidade de microrganismo a ser ministrada nos animais que deve ser igualitária, para evitar resultados controversos. Apesar de alguns estudos informarem algumas padronizações para as infecções experimentais com camarões, alguns fatores limitantes, como diferenças na virulência da cepa, dose do vírus/bactéria, modo de administração e condições experimentais dos animais podem levar a resultados altamente controversos e não comparáveis entre si (ESCOBEDO-BONILLA *et al.*, 2006; GITTERLE *et al.*, 2006). Um fato relevante é que, apesar dos vários estudos disponíveis na literatura, não se tem ainda conhecimento se a via de entrada do patógeno (via de infecção) modifica/altera/modula a expressão de genes do sistema imune no intestino médio dos camarões.

Dentro deste contexto, o presente estudo propôs avaliar se a entrada do WSSV diretamente na circulação sanguínea ou pelo trato gastrointestinal está associada à alteração no perfil transcricional de genes imunológicos no intestino médio de camarões *L. vannamei*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da via de infecção pelo WSSV sobre o perfil transcricional de genes do sistema imune no intestino médio de *L. vannamei*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar a expressão de 47 genes pertencentes a 9 categorias funcionais da imunidade intestinal em camarões desafiados com WSSV, pelas vias oral e sistêmica (injeção intramuscular).

2.2.2 Verificar se existe uma expressão gênica diferencial no intestino médio associada à via de entrada do vírus no organismo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Afim de avaliar o efeito da via de entrada do WSSV no organismo dos camarões, utilizou-se amostras de intestino médio previamente extraídas em nosso laboratório e que se diferenciaram pelos métodos desafio viral: via *per os* (PILOTTO *et al*, 2018) e via sistêmica (injeção intramuscular) (SILVEIRA *et al*, 2018).

As amostras estavam armazenadas a -80°C e foram processadas para este trabalho, segundo descrito a partir do item 3.5. A quantidade de cópias genômicas virais utilizadas, bem como o detalhamento do desenho experimental do presente estudo está apresentado na **Figura 4**.

3.1 ANIMAIS

Camarões juvenis ($10 \pm 2\text{ g}$) da espécie *Litopenaeus vannamei* ($n = 60$) de ambos os sexos, aparentemente saudáveis e em fase de intermuda, foram cedidos de cultivos em água clara pelo Laboratório de Camarões Marinhos, do Departamento de Aquicultura (LCM/CCA/UFSC). Os animais foram transferidos para o Setor de Bioensaios do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (UFSC/CCB/LIAA), alocados em 2 tanques de 100 L (30 animais/tanque) contendo água do mar filtrada, aeração constante e renovação diária da água de 50%. Antes do início dos experimentos, os animais foram aclimatados por sete dias e alimentados uma vez ao dia, com ração Guabi (Potimar 1,6 mm com 35% de proteína bruta) a uma biomassa de 2% do peso corporal. A temperatura da sala foi mantida em 28°C e a água dos aquários de 26° a 28°C durante o período experimental. O detalhamento do desenho experimental está apresentado na (**Figura 4**).

3.2 DIAGNÓSTICO DO WSSV

A amplificação das sequências de DNA correspondentes ao WSSV nos animais, antes e depois dos desafios foi realizada com amostras de intestino médio por Reação em Cadeia da Polimerase em dois passos (*Nested PCR*), utilizando-se os iniciadores recomendados pela OIE (do inglês, *World organisation for animal health*) (LO *et al.*, 1996), apresentados no **Quadro 1**. As condições da primeira PCR para WSSV146 foram: 94°C por 4 min, com 39 ciclos de 55°C por 1 min, 72°C por 2 min. Na reação seguinte, as condições foram: 94°C por 1 min, com 39 ciclos de 55°C por 1 min, 72°C por 2 min e 72°C durante 5

min. Como controle positivo da reação, foram utilizadas amostras de gDNA de animais comprovadamente infectados com WSSV.

Figura 4. Detalhes do desenho experimental.

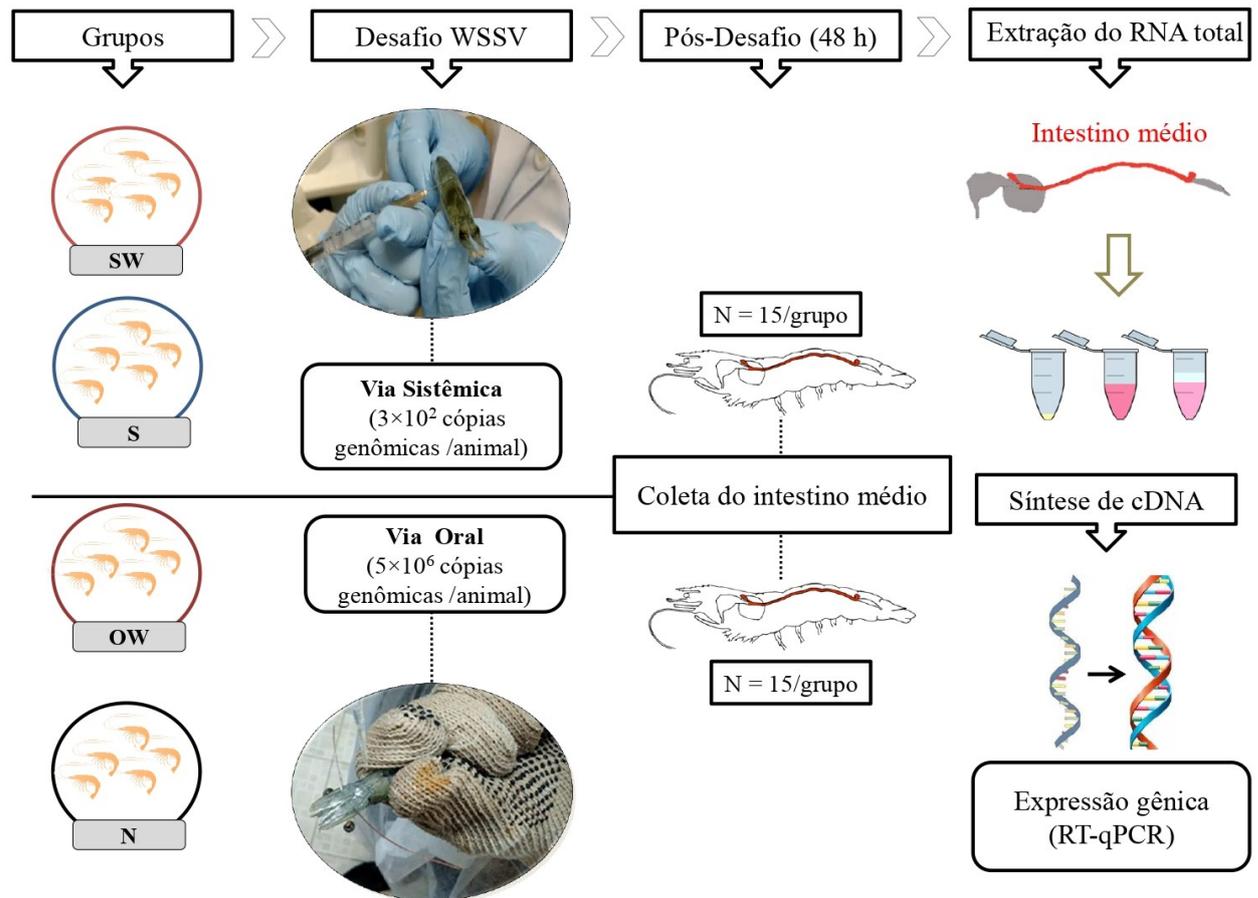


Figura 4. Os animais foram separados em quatro grupos experimentais, segundo a via de infecção: grupo **SW**: animais desafiados pela via sistêmica, injetados intramuscularmente com macerado de tecido infectado com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV); **S**: animais injetados com macerado de tecido livre de WSSV (controle do grupo SW); **OW**: animais desafiados pela via *per os*, pelo escoamento do inóculo viral na cavidade oral; **N**: animais *naïve*, não manipulados (controle do grupo OW). Após 48 h do desafio, os intestinos médios de 15 animais de cada grupo experimental foram coletados em três (3) *pools* de cinco (5) animais; as amostras foram processadas (extração de RNA total seguida pela síntese de cDNA) e a expressão gênica avaliada por transcrição reversa seguida por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR).

3.3 INFECÇÕES EXPERIMENTAIS COM O WSSV

3.3.1 Desafio pela via sistêmica

O preparo do inóculo viral foi adaptado de Goncalves e colaboradores (2014), onde 10 g de tecidos do abdômen de camarões, previamente diagnosticados positivos para o WSSV (LO *et al.*, 1996) foram homogeneizados em tampão Tris-NaCl estéril e gelado (330 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,4) (1:10; p:v) e centrifugados (3.000 ×g por 30 min a 4° C). O sobrenadante foi recuperado e centrifugado (12.000 ×g por 40 min a 4° C), filtrado (0,45 µm) e armazenado em nitrogênio líquido. Seguindo a mesma metodologia, foi preparado um inóculo livre de WSSV, utilizando tecido muscular de animais diagnosticados como negativos para o vírus. Para o desafio, foi injetada uma alíquota de 100 µL do inóculo viral, contendo 3×10^2 cópias genômicas, entre o primeiro e o segundo segmento abdominal da região dorsal dos camarões (n=15) (**Figura 4**). Essa dose foi previamente determinada, visando uma mortalidade de 50% dos animais (DL₅₀) em 15 dias. No grupo controle, os animais (n=15) foram injetados com mesmo volume de macerado de tecido livre de WSSV. Após 48 h do desafio, os intestinos médios foram coletados e processados como descrito no item 3.4 e divididos em três *pools* de cinco intestinos por grupo.

3.3.2. Desafio pela via oral

A infecção pelo método *per os* foi realizada em 15 camarões, utilizando-se o inóculo e a metodologia descritos em Pilotto e colaboradores (2018). Brevemente, 100 µL do inóculo contendo 5×10^6 cópias genômicas foram gentilmente introduzidos na cavidade oral com o auxílio de uma micropipeta (**Figura 4**), sem provocar qualquer injúria aos animais. Como grupo controle foram utilizados animais *naïve* (n= 15), que não foram manipulados. Após 48 horas do desafio, os intestinos médios foram coletados e processados (item 3.4) para as análises posteriores e divididos em três *pools* de cinco intestinos para cada grupo. A presença ou ausência do WSSV nos intestinos médios foi individualmente verificada por *Nested* PCR (LO *et al.*, 1996), antes do agrupamento dos intestinos em *pools*.

3.4 COLETA DOS INTESTINOS MÉDIOS

A dissecação dos intestinos médios foi realizada após os camarões serem sacrificados por hipotermia (0 °C por 15 min). Após a coleta, as amostras tiveram seu conteúdo intestinal

retirado por raspagem, lavadas com etanol 70% e água do mar estéril ou Tris-NaCl (10 mM, 330 mM; pH=7,4), e individualmente estocadas à -80 °C, em *RNAlater*TM (Sigma-Aldrich®). Posteriormente, as amostras foram retiradas do *RNAlater* e maceradas em TRIzolTM (Thermo Scientific®) (1:10, p/v) com o auxílio de pistilos estéreis acoplados ao homogeneizador VWR® Disposable Pellet Mixers and Cordless Motor. Após a centrifugação (12.000 ×g por 10 min a 4 °C), os sobrenadantes foram coletados e conservados a -20 °C para a etapa seguinte, de extração do RNA total.

3.5 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA

Amostras em TRIzol foram submetidas à extração com clorofórmio (5 TRIzol: 1 Clorofórmio) e centrifugadas a 12.000 ×g por 15 min à 4 °C. O RNA total foi, então, precipitado com isopropanol (1:1, v/v) e lavado com etanol 75% gelado. Em seguida, o precipitado foi suspenso em água livre de DNA/RNA/DNases/RNases à 65°C e as amostras tratadas com 1 U de DNase I (Thermo Scientific®) por 30 min à 37°C, visando a eliminação de DNA genômico (gDNA) contaminante. Após a inativação da DNase I com 5 mM EDTA à 65 °C por 10 min, as amostras foram precipitadas com 0,3 M acetato de sódio (pH 5,2) e isopropanol (1:1; v:v). Finalmente, o RNA total foi lavado com etanol 75% gelado e suspenso em água livre de DNA/RNA/DNases/RNases à 65 °C.

A concentração das amostras foi determinada pela leitura de absorbância à 260 nm ($A_{260nm} = 1$, equivalente a 40 µg RNA/ml) no espectrofotômetro NanoVue PlusTM. A razão entre as leituras a 260 nm e 280 nm foi utilizada como um indicativo da pureza do RNA obtido, sendo a integridade das amostras avaliada em gel de agarose (0,8%). Para a síntese de cDNA, 1 µg de RNA total foi reversamente transcrito na presença de 200 U da enzima RevertAid Reverse TranscriptaseTM (Thermo Scientific®), 0,5 mM de dNTP Mix (Sinapse®), 20 U da enzima RiboLockTM RNase Inhibitor (Thermo Scientific®) e 0,5 µg de oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Bioline®), em um volume final de 20 µL. As amostras foram incubadas a 42°C por 60 min e a enzima inativada a 65 °C por 15 min. As amostras de cDNA foram armazenadas (-20 °C) para utilização posterior.

3.6 ESCOLHA DOS INICIADORES

Para as análises de expressão gênica foram escolhidos 50 genes, compreendendo três genes de referência e 47 genes pertencentes às principais categorias funcionais associadas ao

sistema imune de crustáceos, sendo elas: (i) Peptídeos antimicrobianos - PAMs (14 genes), (ii) Vias de sinalização celular (6 genes); (iii) Proteínas de reconhecimento de padrões moleculares - PRPs (4 genes); (iv) Defesas antivirais (8 genes); (v) Citocinas (3 genes); (vi) Defesa antioxidante (2 genes); (vii) Homeostasia (4 genes); (viii) Sistema de ativação da proPO (4 genes) e (ix) Inibidores de proteases (2 genes). As sequências os iniciadores estão apresentadas no **Quadro 1**.

Quadro 1: Sequência dos iniciadores referentes aos genes utilizados nas análises de expressão gênica.

Sigla	Nome do gene	Nº GenBank	Sequência (5' - 3')	Produto de amplificação (pb)	Referência
Genes de Referência					
<i>LvRpS6</i>	40S ribosomal protein S6	FE080516	<i>Fw</i> - AGCAGATACCCTTGGTGAAG <i>Rv</i> - GATGCAACCACGGACTGAC	193	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>LvRpS3A</i>	S3A ribosomal protein	BF023924	<i>Fw</i> - GGCTTGCTATGGTGTGCTCC <i>Rv</i> - TCATGCTCTTGGCTCGCTG	101	De la Vega <i>et al.</i> , 2008
<i>LvActin</i>	β -actin	AF300705	<i>Fw</i> - CCACGAGACCACCTACAAC <i>Rv</i> - AGCGAGGGCAGTGATTTC	142	Wang <i>et al.</i> , 2007
Diagnóstico viral (WSSV)					
WSSV_146-F1R1			<i>Fw</i> - ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG <i>Rv</i> - TAATGCGGGTGTAATGTCTTACGA	1447	OIE
WSSV_146-F2R2			<i>Fw</i> - GTAAGTGCCTTCCATCTCCA <i>Rv</i> - TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT	941	OIE
Peptídeos antimicrobianos (PAMs)					
<i>Litvan</i> PEN 1/2	Penaeidin 1/2	Y14925	<i>Fw</i> - GTCTGCCTGGTCTTCTTGG <i>Rv</i> - GCAGCAATTGCGAGCATCTG	168	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>Litvan</i> PEN3	Penaeidin 3	AF390144	<i>Fw</i> - GTCTGCCTGGTCTTCTTGG <i>Rv</i> - GCGCTTGTGAGAAGGAAATTC	178	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>Litvan</i> PEN4	Penaeidin 4	DQ211701	<i>Fw</i> - GTCTGCCTGGTCTTCTTGG <i>Rv</i> - TTGCGGAGGGAATCCGTAG	321	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>Litvan</i> ALF-A	ALF Group A	EW713395	<i>Fw</i> - CTGATTGCTCTTGTGCCACG <i>Rv</i> - TGACCCATGAACTCCACCTC	113	Rosa <i>et al.</i> , 2013
<i>Litvan</i> ALF-B	ALF Group B	GQ227486	<i>Fw</i> - GTGTCTCCGTGTTGACAAGC <i>Rv</i> - ACAGCCCAACGATCTTGCTG	123	Rosa <i>et al.</i> , 2013
<i>Litvan</i> ALF-C	ALF Group C	FE058235	<i>Fw</i> - ATGCGAGTGTCTGTCCCTCAG <i>Rv</i> - TGAGTTTGTTCGCGATGGCC	115	Rosa <i>et al.</i> , 2013
<i>Litvan</i> ALF-D	ALF Group D	FE151634	<i>Fw</i> - TGTGTTGGTTGTGGCACTGG <i>Rv</i> - CAACGAGGTCAATGTCACCG	131	Rosa <i>et al.</i> , 2013
<i>Litvan</i> ALF-E	ALF Group E	FE069658	<i>Fw</i> - TGCTACGTGAATCGCAGTCC <i>Rv</i> - CGCTTCTCTCCGACAATG	100	Matos <i>et al.</i> , 2018

Quadro 1: Sequência dos iniciadores referentes aos genes utilizados nas análises de expressão gênica (continuação).

Peptídeos antimicrobianos (PAMs)					
<i>Litvan</i> ALF-F	ALF Group F	KJ000049	<i>Fw</i> - AAGCTCTCATTCTGGTCGG <i>Rv</i> - GGGTGTAAACGAAGTACGTGC	180	Matos <i>et al.</i> , 2018
<i>Litvan</i> ALF-G	ALF Group G	FE153496	<i>Fw</i> - CCGCTGCATGTCAAGTATCC <i>Rv</i> - TCAGCAGTAGCAGTGTACAGC	140	Matos <i>et al.</i> , 2018
<i>Lvan</i> -Stylicin1	Stylicin 1	MH108957	<i>Fw</i> - CACAAGAGTGCCACCGTG <i>Rv</i> - ACATTGCGAGTTATGGTAGCC	125	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>Lvan</i> -Stylicin2	Stylicin 2	MH108958	<i>Fw</i> - CACAAGAGTGCCACCGTG <i>Rv</i> - CACACAGGCTGCCGACATAA	151	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
Crustin <i>Lv</i>	Crustin Type IIa	AY488496	<i>Fw</i> - CGAACCAGAGACACCTGTTG <i>Rv</i> - CAGCACACTTGTAGTCGTT	217	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
C-type LYS	Conventional C-type Lysozyme	AY170126	<i>Fw</i> - CTTCGAGCTCTATGTTCTAGA <i>Rv</i> - TCAACCATTACAACGTCTGCA	217	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
Vias de sinalização celular					
<i>Lv</i> Toll1	Toll receptor 1	DQ923424	<i>Fw</i> - TCGACCATCCCTTTTACACC <i>Rv</i> - TTGCCTGGAAGGTCTGATTC	88	Wang <i>et al.</i> , 2012
<i>Lv</i> Toll 2	Toll receptor 2	JN180637	<i>Fw</i> -CATGCCTGCAGGACTGTTTA <i>Rv</i> - GGCCTGAGGGTAAGGTCTTC	158	Wang <i>et al.</i> , 2012
<i>Lv</i> Toll 3	Toll receptor 3	JN180638	<i>Fw</i> -TCGTACAACCAGCTGACGAG <i>Rv</i> - ATACTTCAGGTGGGCCACAG	195	Wang <i>et al.</i> , 2012
<i>Lv</i> Toll 4	Toll receptor 4	KT372179	<i>Fw</i> - CTTGCTGACTGGGCATTTGG <i>Rv</i> - TGGCTAGTCGTAATTCCTGC	127	Li <i>et al.</i> , 2018
<i>Lv</i> HMGBa	High-mobility group (HMGBa)	HQ228174	<i>Fw</i> - GGATGAGAAGGTCAAGTACG <i>Rv</i> - TCCTCGTCGTCTTCTCTC	186	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>Lv</i> HMGBb	High-mobility group (HMGBb)	HQ228175	<i>Fw</i> - GATGAAGGGATACAGGGGAC <i>Rv</i> - ATCACCTACTCCCATGTCAG	163	Goncalves <i>et al.</i> , 2014

Quadro 1: Sequência dos iniciadores referentes aos genes utilizados nas análises de expressão gênica (continuação).

Proteínas de reconhecimento de padrões moleculares (PRPs)					
<i>Lv</i> LGBP	Lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein (LGBP)	EU102286	<i>Fw</i> - ACCGCAGCATCAGTTATAACC <i>Rv</i> - GTCATCGCCCTTCCAGTTG	77	Wang et al., 2007
<i>Lv</i> β GBP	1,3-beta-D-glucan-binding protein (β GBP)	AY249858	<i>Fw</i> - ACGAGAACGGACAAGAAGTG <i>Rv</i> - TTCAGCATAGAAGCCATCAGG	137	Silveira et al., 2018
<i>Lv</i> AV	Antiviral Protein	JX983205	<i>Fw</i> - AACGATCATGAGGACAGGTG <i>Rv</i> - AATGAATCCCAGCGCATGAC	108	Silveira et al., 2018
<i>Lv</i> Dscam	Down syndrome cell adhesion molecule	GQ154653	<i>Fw</i> - AGGTGGACAATCCGTGGTG <i>Rv</i> - GGAGTGTATGTGTGACTGTG	160	Goncalves et al., 2014
Defesa antiviral					
<i>Lv</i> Dcr1	Dicer-1	EU676241	<i>Fw</i> -CCGGAGATAGAACGGTTCAGTG <i>Rv</i> -CGATAATTCTCCCAACACCTG	176	Yao et al., 2010
<i>Lv</i> Ago1	Argonaute 1	HM234689	<i>Fw</i> -TGCGTCATTTGCCATCCAT <i>Rv</i> -GCCATCTGGAGCGGAGAAG	65	Labreuche et al., 2010
<i>Lv</i> Dcr2	Dicer-2	HQ541163	<i>Fw</i> -AGGAAATGCAATGTCGTGGTT <i>Rv</i> -ACGAGCCCTCCCCCTAGATT	78	Chen et al., 2011
<i>Lv</i> Ago2	Argonaute 2	HM234690	<i>Fw</i> -GATGGCATGAAGTCTGCAGTTG <i>Rv</i> -TGCGCACGACCATCACTAAG	62	Labreuche et al., 2010
<i>Lv</i> Sid1	Sid-1	HM234688	<i>Fw</i> - CTTGCTGACTGGGCATTTGG <i>Rv</i> -TGGAAGCCTATCTCTGCAACTTG	63	Labreuche et al., 2010
<i>Lv</i> Pasha	Drosha-like protein (Pasha)	HQ692889	<i>Fw</i> -CAGCAGTCTTTGGACGAACTTG <i>Rv</i> -TCTGGGAGTTGCGGTCTATCTT	149	Chen et al., 2012
<i>Lv</i> Ars2	Arsenite-resistance protein 2-like protein (Ars2)	HQ692888	<i>Fw</i> -GCCATTTATTTGGGAGAGGAC <i>Rv</i> - CTGTAACTCCATCTGTTCCCTGAC	115	Chen et al., 2012
<i>Lv</i> TRBP1	Transactivating response RNA-binding protein isoform 1	HQ541157	<i>Fw</i> -CAAGAGTTGTGTATGCGCAG <i>Rv</i> -AGCACCACCCTGGATGATG	195	Gonçalves et al., 2014
Citocinas					
<i>Lv</i> SVC1	Single von Willebrand factor type C domain protein 1 (SVC1)	HQ541158	<i>Fw</i> -TGCCAACCTAGCTGAGCTTCA <i>Rv</i> -CCATCAGGGCACACGTATTTG	81	Chen et al., 2011
<i>Lv</i> AST	Astakine	HM473285	<i>Fw</i> - GACTGGGCGACTGTTCCTC <i>Rv</i> - GGTACGCAAGATTCAGCTCC	156	Goncalves et al., 2014
<i>Lv</i> IRF	Interferon regulatory factor (IRF)	KM277954	<i>Fw</i> - ACGCTGCCCTCTTCGCTAC <i>Rv</i> - ACGCTGTGAACCTGAAGTATCG	162	Rosa et al., 2013

Quadro 1: Sequência dos iniciadores referentes aos genes utilizados nas análises de expressão gênica (continuação).

Defesa antioxidante					
<i>Lv</i> CAT	Catalase (CAT)	AY518322	<i>Fw</i> - CATCCTTCATTCACACGCAG <i>Rv</i> - CTTGATGCCTTGGTCCGTC	245	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>Lv</i> NOS	Nitric oxide synthase (NOS)	GQ429217	<i>Fw</i> - GAGCAAGTTATTCGGCAAGGC <i>Rv</i> - TCTCTCCCAGTTTCTTGGCGT	104	Yao <i>et al.</i> , 2010
Homeostasia					
<i>Lv</i> Clot	Hemolymph clottable protein	DQ984182	<i>Fw</i> -ACCAAGGTCGTCTCATTAC <i>Rv</i> -TGTCCACTTCCAGGGTGTCTC	172	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>Lv</i> TGI	Transglutaminase I	EF081004	<i>Fw</i> - GAGCTTCAAGATCGAGGATCGA <i>Rv</i> - GCTGGTGTTCGTAGCGGTTATC	79	Yeh <i>et al.</i> , 2009
<i>Lv</i> TGII	Transglutaminase II	EU164849	<i>Fw</i> - GCCCGAGGACAGGGAAA <i>Rv</i> - GCGGTGGTCAGTGAATCCA	75	Yeh <i>et al.</i> , 2013
<i>Lv</i> HHAP	Hemocyte homeostasis-associated protein (HHAP)	FE124306	<i>Fw</i> - CAAGCAGGTCAAGCACGAG <i>Rv</i> - CTGGAACCACAATAGAAGCC	108	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
Sistema de Ativação da ProPO					
<i>Lv</i> proPO1	Prophenoloxidase 1 (proPO-1)	EU284136	<i>Fw</i> -CGGTGACAAAGTTCCTCTTC <i>Rv</i> -GCAGGTCGCCGTAGTAAG	122	Wang <i>et al.</i> , 2007
<i>Lv</i> proPO2	Prophenoloxidase 2 (proPO-2)	EU373096	<i>Fw</i> -GCGGAATGACTTTGGTCTCG <i>Rv</i> -AAGTGACGTCATCGGAGAGG	137	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>Lv</i> PPAE1	Prophenoloxidase-activating enzyme 1	FE086472	<i>Fw</i> - TCTACACAAGGGTCAGCAAG <i>Rv</i> - TGTCTCTAACATTCTTCAG	133	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>Lv</i> PPAE2	Prophenoloxidase-activating enzyme 2	FE090793	<i>Fw</i> - TCAGCAGGATTTGTGTTGCC <i>Rv</i> - GTCTCAGTGAAGCCCCATC	107	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
Inibidores de proteases					
<i>Lv</i> α2M-1	Alpha2-macroglobulin	EF073268	<i>Fw</i> - GGAGAGGAACGAGACCATC <i>Rv</i> - TCAGCTTGGCGTCGAAGTG	113	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>Lv</i> α2M-2	Alpha2-macroglobulin	DQ988330	<i>Fw</i> - TGCAGGTTCTAGTGTGGTAC <i>Rv</i> - CACCCAGGTAGTTCGATGAC	261	Goncalves <i>et al.</i> , 2014

3.7 TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA POR PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

As análises quantitativas de expressão gênica foram realizadas a partir de reações de transcrição reversa seguida por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) em equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* (Thermo Fisher Scientific®). As reações ocorreram em um volume final de 15 µL, contendo 1 µL de cDNA (diluído 1:20), 0,2 µM de cada iniciador e 7,5 µL de mix da reação (Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix 2×™ (Thermo Fisher Scientific®). As análises foram realizadas em duplicata e as sequências dos iniciadores estão apresentadas no **Quadro 1**. Para a amplificação, foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s e hibridização/extensão a 60°C por 1 min. A especificidade das reações foi confirmada pela análise de curvas de dissociação (60-95°C; 0,3°C/s), realizada após as etapas de amplificação.

Os valores de expressão relativa foram calculados com base nos valores de Cq dos genes de interesse em relação aos valores de Cq da referência ($\Delta Cq = Cq$ do gene alvo subtraído do Cq da referência). Os níveis de expressão foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008), utilizando a expressão dos intestinos médios do grupo *naïve* (camarões juvenis não manipulados, **N**) como condição calibradora no caso dos animais com desafio oral (**OW**) e o do grupo livre de WSSV (**S**) como calibrador dos animais desafiados via sistêmica (**SW**).

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Diferenças na expressão gênica foram consideradas estatisticamente significantes com $P < 0.05$ (*cutoff* de 2 *fold-change* no nível de expressão) usando teste *t-Student* não pareado. Para a construção dos gráficos de expressão, foi utilizado o programa *GraphPad Prism 8* (*GraphPad Software, Inc.*). As análises e a nomenclatura utilizadas neste trabalho foram baseadas nas recomendações do MIQE guidelines (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN *et al.*, 2009).

O programa RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>) foi utilizado para a escolha da melhor condição de referência entre três genes candidatos: *LvActin*, *LvRpS6* e *LvRpS3A*. A escolha foi baseada no cálculo do coeficiente de estabilidade dos genes candidatos utilizando o programa RefFinder, que leva em consideração a variação dos valores

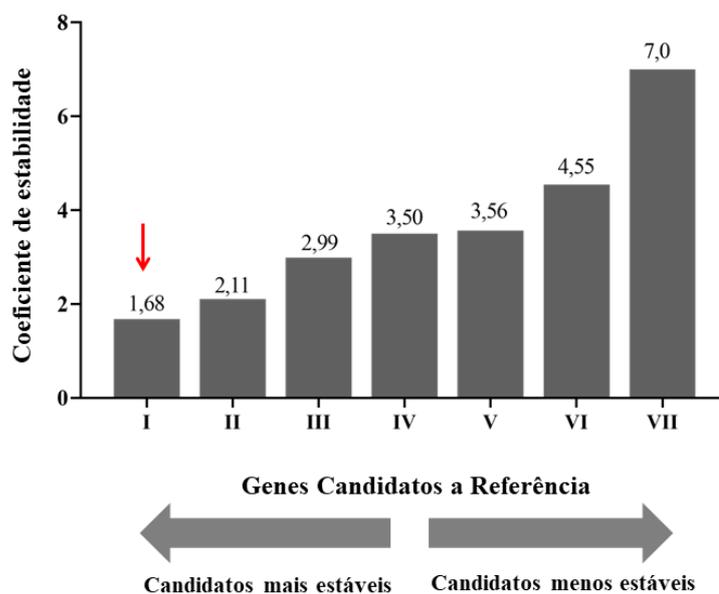
de Cq entre as diferentes amostras. Assim, quanto menor o valor do coeficiente, menor a variação de expressão do gene de referência entre as condições experimentais. Para uma análise mais apurada, foi considerada ainda a média geométrica dos valores de Cq das diferentes combinações dos genes candidatos (VANDESOMPELE *et al.*, 2002)

4. RESULTADOS

Em vista do pouco conhecimento acerca dos mecanismos de defesa relacionados à imunidade intestinal e com o intuito de avaliar se a via de infecção pelo WSSV altera o perfil transcricional no intestino médio dos camarões, foi avaliada a expressão quantitativa de 47 genes pertencentes a 9 categorias associadas às defesas antimicrobiana e antiviral e à homeostasia: (i) Peptídeos antimicrobianos - PAMs (14 genes), (ii) Vias de sinalização celular (6 genes); (iii) Proteínas de reconhecimento de padrões moleculares - PRPs (4 genes); (iv) Defesas antivirais (8 genes); (v) Citocinas (3 genes); (vi) Defesa antioxidante (2 genes); (vii) Homeostasia (4 genes); (viii) Sistema de ativação da proPO (4 genes) e (ix) Inibidores de proteases (2 genes).

Inicialmente, realizou-se a escolha da melhor condição de referência para os cálculos de expressão relativa, a partir da expressão dos três genes candidatos (proteínas ribossomais *LvRpS6* e *LvRpS3A* e actina *LvActin*). A condição que apresentou a menor variação de expressão foi a média geométrica dos três genes em conjunto (*LvRpS6*, *LvRpS3A* e *LvActin*) (Coeficiente de estabilidade = 1,68), como demonstrado na **Figura 5**.

Figura 5. Coeficiente de Estabilidade dos genes candidatos à referência.



Coeficientes de estabilidade dos valores de Cq dos genes e da média geométrica de suas diferentes combinações: (I) *LvRpS6*, *LvRpS3A* e *LvActin* (melhor estabilidade indicada pela seta vermelha); (II) *LvRpS3A* e *LvActin*; (III) *LvRpS3A* e *LvRpS6*; (IV) *LvRpS6*; (V) *LvRpS6* e *LvActin*; (VI) *LvRpS3A* e (VII) *LvActin*.

Em seguida, procedeu-se às análises de expressão gênica quantitativa em *pools* de intestinos do grupo infectado oralmente com WSSV (material diagnosticado WSSV positivo por *Nested* PCR; PILOTTO *et al.*, 2018) e intestinos do grupo infectado pela via sistêmica (a presença do WSSV não foi verificada; SILVEIRA *et al.*, 2018). Dos 47 genes analisados, apenas cinco (*Litvan* ALF-A, *Litvan* ALF-C, *Litvan* ALF-G, *LvToll2* e *LvproPO1*) apresentaram alteração no perfil de expressão no intestino médio associado à via de entrada do vírus (**Tabela 1**). Os resultados demonstraram que a infecção com WSSV pela via oral alterou um maior número de genes que a infecção pela via sistêmica.

Tabela 1. Resposta transcricional no intestino médio de camarões, relacionada à via de infecção pelo WSSV. A diferença de expressão gênica entre os grupos experimentais **SW** (desafiados pela via sistêmica) e **OW** (desafiados pela via oral) e seus respectivos controles (**S** e **N**), está apresentada em valores de *fold-change* (*cut-off* ≥ 2). Valores em vermelho e azul indicam, respectivamente, a expressão gênica estatisticamente superior e inferior entre os grupos **SW/S** e **OW/N** (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

Nome do Gene	Fold-change SW X S	Fold-change OW X N
Defesa antimicrobiana: peptídeos antimicrobianos (AMPs) e inibidores de proteases		
<i>Litvan</i> PEN 1/2	1,0	1,7
<i>Litvan</i> PEN3	1,2	0,7
<i>Litvan</i> PEN4	0,9	1,0
<i>Litvan</i> ALF-A	-2,3*	-4,4*
<i>Litvan</i> ALF-B	3,8	1,6
<i>Litvan</i> ALF-C	0,7	-4,8*
<i>Litvan</i> ALF-D	7,3	1,0
<i>Litvan</i> ALF-E	4,7	1,2
<i>Litvan</i> ALF-F	15,4	0,5
<i>Litvan</i> ALF-G	-2,3	-6,4*
<i>Lvan</i> -Stylicin1	0,6	0,5
<i>Lvan</i> -Stylicin2	0,5	0,5
II Crustin <i>Lv</i>	0,7	0,7
C-typeLys	-1,9	3,0
<i>Lva</i> 2M-1	3,0	0,8
<i>Lva</i> 2M-2	1,2	1,3
Vias de sinalização celular		
<i>Lv</i> Toll1	0,6	0,6
<i>Lv</i> Toll 2	0,7	-4,7**
<i>Lv</i> Toll 3	0,6	1,6
<i>Lv</i> Toll 4	0,9	-2,1
<i>Lv</i> HMGBa	-19,3	1,7
<i>Lv</i> HMGBb	1,3	0,6
Proteínas de reconhecimento de padrões moleculares (PRPs)		
<i>Lv</i> LGBP	-2,3	0,8
<i>Lv</i> βGBP	-3,2	-3,0
<i>Lv</i> AV	1,5	-2,3
<i>Lv</i> Dscam	0,9	0,5
Defesa antiviral		
<i>Lv</i> Dcr1	1,5	0,8
<i>Lv</i> Ago1	1,2	1,0
<i>Lv</i> Dcr2	0,9	1,6
<i>Lv</i> Ago2	0,8	2,6
<i>Lv</i> Sid 1	0,8	2,2
<i>Lv</i> PASHA	0,7	1,1
<i>Lv</i> Ars2	0,6	0,8
<i>Lv</i> TRBP-1	1,0	0,8
<i>Lv</i> SVC1	3,2	-2,5
Citocinas		
<i>Lv</i> AST	7,0	-3,8
<i>Lv</i> IRF	1,1	1,8
Defesa antioxidante		
<i>Lv</i> CAT	1,0	1,4
<i>Lv</i> NOS	0,9	0,7
<i>Lv</i> DUOX		
Homeostasia		
<i>Lv</i> CLOT	0,6	-2,0
<i>Lv</i> TGI	1,4	0,7
<i>Lv</i> TGII	2,5	2,0
<i>Lv</i> HHAP	-2,1	3,5
Sistema de Ativação da proPO		
<i>Lv</i> proPO 1	2,8*	0,8
<i>Lv</i> proPO 2	2,4	3,2
<i>Lv</i> PPAE 1	1,0	-3,3
<i>Lv</i> PPAE 2	3,7	-10,2

Quatro genes tiveram sua expressão reprimida no intestino médio após 48 horas que o vírus adentrou o organismo pela via oral: *Litvan ALF-A*, *Litvan ALF-C* e *Litvan ALF-G*, genes que codificam para os peptídeos antimicrobianos da família dos Fatores Anti-lipopolisacarídeos (ALF) e o *LvToll2* pertencente à via Toll de sinalização celular. A expressão dos genes *Litvan ALF-A* e *Litvan ALF-G* foi reprimida 4,4x e 6,4x, respectivamente, enquanto que o *Litvan ALF-C* e *LvToll2* apresentaram níveis similares de repressão gênica: 4,8x e 4,7x, respectivamente (Tabela 1, Figura 6).

Figura 6. Expressão relativa de genes diferencialmente expressos no intestino médio de *Litopenaeus vannamei* após 48 h de uma infecção experimental *per os* com o WSSV.

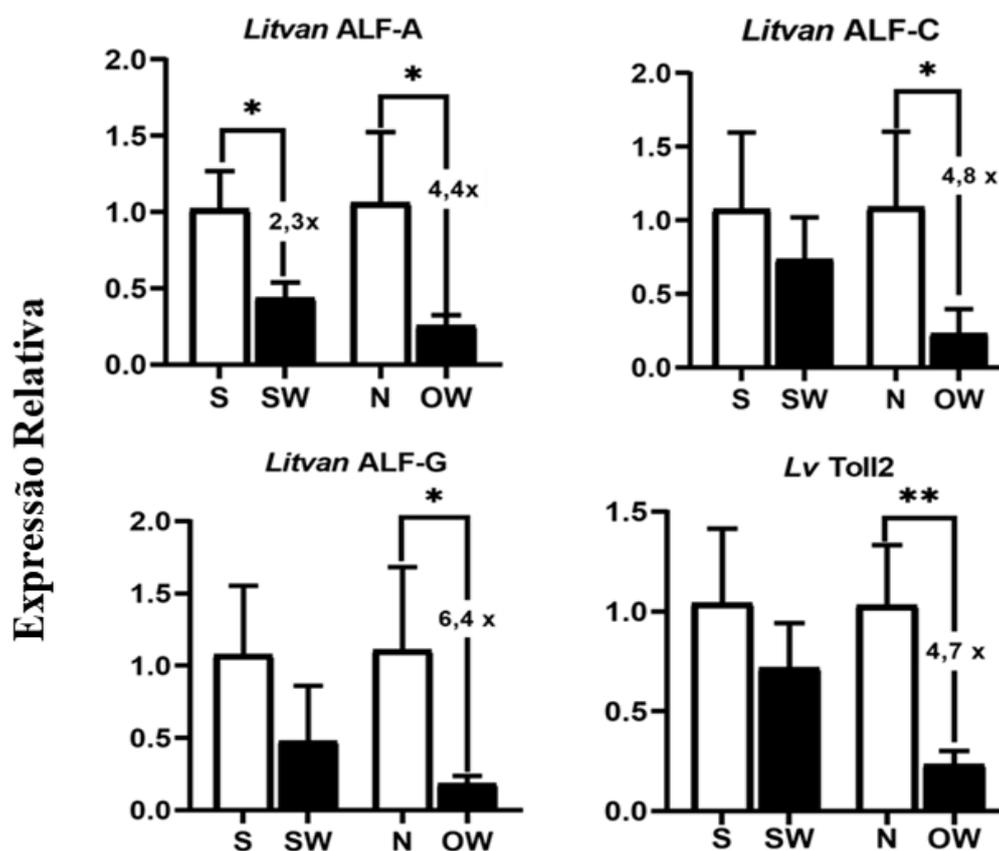


Figura 6. Os resultados das expressões relativas (três replicatas biológicas) são apresentados como média \pm desvio padrão e a diferença de expressão gênica entre os grupos experimentais SW (desafiados pela via sistêmica) e OW (desafiados pela via oral) e seus respectivos controles (S e N), está apresentada em valores de *fold-change* ($cut-off \geq 2$) e indicadas por asteriscos (* P < 0,05; ** P < 0,01) (teste *t-Student* não pareado).

No caso dos animais infectados pela via sistêmica, dos 47 genes analisados, dois apresentaram expressão diferencial em relação aos animais não desafiados: o gene *Litvan* ALF-A, cuja expressão foi 2,3x reprimida no intestino médio dos camarões desafiados (SW) e o gene *LvproPO1*, pertencente ao sistema de ativação da pró-fenoxidase, que ao contrário dos anteriores, teve a expressão modulada positivamente (3x superior ao controle) quando o WSSV esteve presente no intestino médio dos camarões (Figura 7).

Figura 7. Expressão relativa de genes diferencialmente expressos no intestino médio de *Litopenaeus vannamei* após 48 h de uma infecção experimental com o WSSV pela via sistêmica (injeção intramuscular).

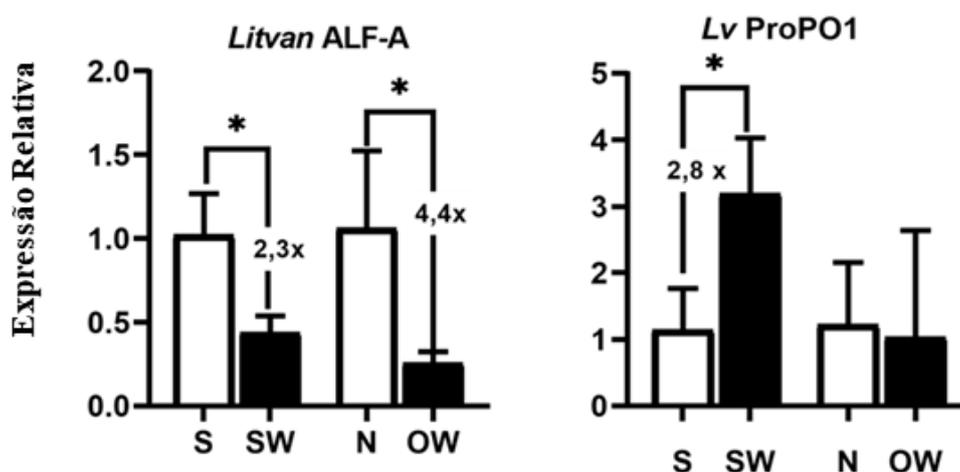


Figura 7. Os resultados das expressões relativas (três replicatas biológicas) são apresentados como média \pm desvio padrão e as diferenças. A diferença de expressão gênica entre os grupos experimentais SW (desafiados pela via sistêmica) e OW (desafiados pela via oral) e seus respectivos controles (S e N), está apresentada em valores de fold-change (cut-off ≥ 2) estatísticas entre os grupos SW / S e OW / N são indicadas por asteriscos (* P < 0,05; ** P < 0,01) (teste t-Student não pareado).

5. DISCUSSÃO

Com o surgimento do WSSV e com os prejuízos econômicos causados por essa enfermidade é imprescindível buscar uma maior compreensão dos mecanismos de suscetibilidade/resistência do hospedeiro ao vírus, a fim de encontrar meio de controle das infecções. Um dos métodos mais práticos para avaliar potenciais produtos para combater patógenos é através de testes de desafios. Saber quais doses, tempo e via de infecção se faz necessário para uma melhor avaliação e reprodutibilidade destes testes (WANG *et al.*, 1999).

Nos estudos que avaliam as estratégias de replicação do WSSV ou de expressão de genes endógenos, diferentes metodologias de desafios são utilizadas, tais como: (a) administração do inóculo viral pela via sistêmica através de injeção intramuscular (GONÇALVES *et al.*, 2014; SILVEIRA *et al.*, 2018; CANTELLI *et al.*, 2019), (b) alimentação dos animais com tecidos infectados (via *per os*) (THUONG *et al.*, 2016), (c) administração do inóculo viral pela via oral (PILOTTO *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2016) e, (d) exposição dos animais ao patógeno através de imersão em ambiente contaminado (SOTO; LOTZ, 2003; CORTEEL *et al.*, 2009; SOONTHORNCHAI *et al.*, 2010). Cada uma destas metodologias apresenta vantagens e limitações, sendo que a escolha de uma delas depende exclusivamente das análises a serem feitas e do objetivo do trabalho.

Para análises que exijam uniformidade metodológica entre todos os animais do experimento, como análises de expressão gênica e genômica funcional, a oferta de tecido infectado não se mostra a metodologia mais adequada, apesar de mimetizar uma real situação de infecção natural por canibalismo (ESCOBEDO-BONILLA *et al.*, 2006). Diferentemente dos outros desafios pela via *per os*, esta metodologia não permite se estabelecer ao certo se todos os animais ingeriram a mesma quantidade de alimento contaminado e, conseqüentemente, se os resultados serão confiáveis considerando os prováveis diferentes graus de infecção estabelecidos. Considera-se mais apropriado, nestes casos, o uso de metodologias com inóculos cuja quantidade do patógeno seja pré-estabelecida e conhecida, utilizando desafios pela via oral ou pela via sistêmica.

Escobedo-Bonilla e colaboradores (2006) padronizaram os procedimentos e a carga viral a ser ministrada via oral ou intramuscular, avaliando as estratégias de infecção pelo WSSV. A padronização de metodologias de desafio é fundamental para se obter a reprodutibilidade e a comparação entre diferentes estudos, considerando que a quantidade de vírus endocitado por cada indivíduo é diferente (ESCOBEDO-BONILLA *et al.*, 2006).

Apesar de a maioria dos estudos informarem as padronizações para os desafios experimentais, fatores limitantes como diferenças de virulência da cepa viral utilizada, dose administrada, via de infecção e as condições experimentais são os responsáveis por resultados controversos entre os diferentes estudos (ESCOBEDO-BONILLA *et al.*, 2006; GITTERLE *et al.*, 2006).

Desafios sistêmicos utilizando injeções intramusculares, apesar de serem métodos “artificiais” de infecção e, até certo ponto, “agressivos” pela injúria causada, permitem um controle bastante restrito quanto à quantidade de patógeno a ser ministrada aos animais de um mesmo grupo. Alguns estudos demonstraram que os desafios com injeção intramuscular em camarões são mais eficazes para obter níveis elevados e reprodutíveis de mortalidade, no entanto, essa forma de infecção não ocorre na natureza e as partículas virais não são confrontadas com as barreiras físicas e químicas dos camarões (ESCOBEDO-BONILLA *et al.*, 2005; THUONG *et al.*, 2016).

O presente estudo avaliou se a entrada do WSSV diretamente na circulação sanguínea ou pelo trato gastrointestinal está associada à alteração no perfil transcricional no intestino médio dos camarões. Para tal, doses distintas do mesmo inóculo viral foram utilizadas, sendo diferente segundo a via de infecção: 3×10^2 cópias genômicas virais/animal no grupo infectado pela via sistêmica e 5×10^6 cópias genômicas virais/animal no grupo infectado pela via oral. Nossos resultados demonstraram que a expressão da maioria dos genes do sistema imune não foi alterada pela via de infecção, contudo a presença do vírus no intestino médio (desafio oral) esteve associada à alteração de quatro genes, enquanto que a presença do vírus diretamente na via sistêmica do animal esteve associada à alteração de apenas dois genes.

Na infecção pela via sistêmica, o patógeno foi diretamente injetado no músculo atingindo rapidamente a circulação sanguínea e a dose utilizada foi capaz de promover uma mortalidade de 50% dos animais em 15 dias (SILVEIRA *et al.*, 2018). Já na infecção oral, observou-se o fenômeno oposto, sem registro de mortalidade após 15 dias de desafiados animais com alta carga viral (5×10^6 cópias genômicas/animal) (comunicação de Mariana R. Pilotto). Este fenômeno pode ser devido à exposição dos virions a uma variedade de barreiras físicas (cutícula quitinosa do estômago) e químicas (pH, enzimas, moléculas antimicrobianas) encontradas no estômago, antes de atingirem o intestino médio dos camarões. As barreiras físicas da primeira porção do trato gastrointestinal devem impedir o acesso do vírus ao tecido epitelial para que ocorra a sua endocitose e, as barreiras químicas podem destruir o envelope

viral presente no WSSV através de lise e/ou desnaturação de seus componentes, tornando-o inativo (HULTEN *et al.*, 2001).

No presente estudo, o WSSV foi detectado no intestino médio de camarões desafiados *per os*, o que significa que virions ultrapassaram as barreiras físico-químicas do estômago para, então, atingir as células colunares do epitélio do intestino médio. Embora o desafio *per os* simule uma das principais rotas naturais da infecção pelo WSSV (WU *et al.* 2001; LOTZ; SOTO 2002; BLAYLOCK; CURRAN; LOTZ, 2019), a quantidade de virions infecciosos que efetivamente alcançaram o intestino médio não foi aqui estabelecida, mas sabemos que não foi suficiente para matar os animais (comunicação de Mariana R. Pilotto).

Resultados similares foram obtidos por Escobedo-Bonilla e colaboradores (2005), avaliando a infecção por WSSV, via oral e sistêmica. No desafio oral houve uma redução de 10 vezes no título viral em comparação ao desafio intramuscular. As barreiras físico-químicas parecem ter impedido que o WSSV alcançasse as células epiteliais do intestino quando inoculado por via oral. Em outro estudo mais recente, também foi possível constatar que camarões contaminados com WSSV pela via oral não houve enfermidade, ao contrário do desafio sistêmico (THUONG., 2016).

Em insetos é conhecido que efetivamente, existe uma modulação gênica diferencial relacionada à via de entrada do vírus em *Drosophila* spp. Em um estudo de Ferreira e colaboradores (2014), ficou demonstrado que componentes da via de sinalização Toll participam na defesa antiviral contra o *Drosophila C virus* somente quando o patógeno infecta a mosca pela via oral e não pela via sistêmica, contudo não sabe-se se isto ocorre em camarões.

A categoria gênica cuja expressão foi alterada (modulação negativa) quando desafiados oralmente com o WSSV foram os peptídeos antimicrobianos (PAMs). Essas moléculas são conhecidas como “antibióticos naturais” de origem proteica amplamente distribuída entre os seres vivos e, que possuem efeitos antimicrobianos contra uma ampla gama de microrganismos (ROSA; BARRACO, 2010), incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos filamentosos, leveduras e, em alguns casos, também contra protozoários e vírus (GUANÍ-GUERRA *et al.*, 2010).

Os PAMs são efetores classicamente descritos como moléculas anfipáticas e catiônicas de baixo peso molecular (<10 kDa, entre 15-100 resíduos de aminoácidos). Em camarões, a maioria dos PAMs são armazenados nos grânulos de hemócitos e liberados após a

indução para matar diretamente os microrganismos e também ativar as respostas imunes (ROSA; BARRACO, 2010). Até o momento, são reconhecidas quatro (4) famílias gênicas de PAMs em camarões *L. vannamei*: as penaeidinas, as crustinas, os fatores antilipopolissacarídeos (ALF) e as stylicinas (TASSANAKAJON *et al.*, 2018). Recentemente, Farias e colaboradores (2019) detectaram pela primeira vez um peptídeo antimicrobiano sendo expresso em um tecido extra-hemocitário de camarões. A stylicina foi detectada em células colunares do ceco anterior do intestino médio de *L. vannamei*, por análises imunohistoquímicas. Este achado foi muito relevante, uma vez que evidenciou pela primeira vez a participação do epitélio intestinal na imunidade de camarões e suportando a hipótese de que os crustáceos contam com uma imunidade intestinal, a exemplo de outros artrópodes.

Os fatores antilipopolissacarídeos (ALF) possuem uma estrutura central β *hairpin* capazes de se ligar a componentes microbianos. Atualmente são reconhecidos sete membros da família ALF em camarões *L. vannamei*, classificados em grupos A, B, C, D, E, F e G (MATOS *et al.*, 2018). Notavelmente, os ALFs são conhecidos como moléculas altamente ativas contra uma ampla gama de bactérias, fungos e alguns vírus (DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2016).

No presente estudo o perfil de expressão gênica dos ALFs foi avaliado no intestino médio de *L. vannamei* em resposta ao desafio com WSSV 48 h após a infecção (oral ou sistêmico). Esse tempo foi escolhido com base em estudos prévios, que demonstraram ser o tempo onde a maior parte dos genes relacionados ao sistema imune apresentam as maiores diferenças nos níveis de transcritos nos hemócitos após uma infecção com WSSV (GONCALVES *et al.*, 2014). A infecção pelo WSSV, independentemente do tipo de desafio, reprimiu de 4,2 a 6,4x a expressão dos ALFs. Curiosamente, animais desafiados oralmente tiveram mais genes alterados (ALF dos grupos A, C e G com expressão reprimida de 4,4x, 4,8x e 6,4x, respectivamente) que os animais desafiados pela via sistêmica, onde somente o *Litvan* ALF A foi reprimido. Este resultado é surpreendente, pois em estudo com animais do mesmo grupo experimental, Silveira e colaboradores (2018) encontraram alteração apenas nos genes ALF-A, ALF-C e Dcr2 em animais desafiados com bactéria *V. harveyi*, no entanto, apesar de reprimidos os genes ALF-A e ALF-C após desafio com o WSSV, não obtiveram diferenças significativas.

Uma hipótese seria que a presença do vírus no intestino médio dos animais infectados pela via oral deva promover, de uma maneira ainda não compreendida, a repressão na expressão dos ALF-A, ALF-G e ALF-C. Contudo, não sabemos se o vírus se encontrava em estado replicativo e análises futuras irão elucidar esta questão.

Sabe-se que os ALF são exclusivamente expressos nos hemócitos (BACHÈRE et al., 2000) e que estas células normalmente infiltram-se em todos os tecidos (SOMBOONWIWAT et al., 2008), incluindo o intestino médio. A presença de hemócitos infiltrantes no intestino de camarões e sua importância na comunicação entre a imunidade da hemolinfa e a imunidade intestinal foi claramente demonstrada por Silveira e colaboradores (2018) e por Farias e colaboradores (2019). Como a maioria dos PAMs são exclusivamente expressos pelos hemócitos, a diminuição da expressão destes genes no intestino médio de animais infectados pode ser devido à migração dos hemócitos circulantes durante a infecção para outros tecidos, como o músculo onde o inóculo foi injetado. Efetivamente, nos animais infectados pela via sistêmica, apenas o ALF-A teve expressão diminuída. Não se sabe, todavia, se este grupo de ALFs são também expressos pelo epitélio intestinal e análises futuras de hibridização *in situ* poderão elucidar essa questão.

Silveira e colaboradores (2018) também observou diminuição na expressão de ALF-A em camarões infectados com WSSV pela via sistêmica. Esse perfil se alterou, contudo, em animais sob infecção bacteriana por *V. harveyi*, cuja expressão do ALF-A aumentou, sugerindo assim respostas frente a bactérias. Apenas os ALFs do grupos B e C são descritos como possuindo alguma relação com a defesa antiviral de camarões (BARRACO; ROSA, 2010). No presente trabalho, *Litvan* ALF-B não apresentou alteração nos níveis de transcritos frente aos desafios com WSSV. Contudo, *Litvan* ALF-C teve sua expressão reprimida quase 5x associada ao desafio oral. Já, durante infecções fúngicas, a expressão do ALF-A não é modulada, ocorrendo sim um aumento na expressão de outros grupos (B, C e D) (ROSA et al., 2013). Os ALF-A e ALF-C são geralmente expressos em níveis menores do que o *Litvan* ALF-B na espécie *P. monodon*, porém eles também possuem funções importantes na sobrevivência dos camarões em infecções contra bactérias e fungos (PONPRATEEP et al., 2012).

Atualmente existem poucos relatos na literatura sobre o ALF-G de *L. vannamei*. Matos e colaboradores (2018) detectaram a expressão deste PAM sendo exclusivamente em hemócitos e atividade *in vitro* contra bactérias e fungos, corroborando assim, nossa hipótese

de migração de hemócitos para explicar baixos níveis transcricionais obtidos. Sabe-se também que a expressão do ALF-G é por si só modulada por injúrias, sugerindo o envolvimento desses PAM na cicatrização de feridas ou na regeneração tecidual (MATOS et al., 2018). Contudo, o papel antiviral dos ALFs e associado à imunidade intestinal de camarões não está ainda estabelecido.

Assim como os ALFs, outro gene que apresentou repressão no número de transcritos no intestino médio associado ao desafio oral foi o *LvToll2* (4,7 x). Receptores da via Toll são proteínas da superfície celular inicialmente identificados na mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, estando relacionado à embriogênese e nas respostas antimicrobianas deste inseto (LEMAITRE et al., 1996). A via Toll em insetos quando envolvida com imunidade se refere principalmente à defesa contra fungos, bactérias gram-positivas e vírus (XI, RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2008).

Em *Drosophila* foi demonstrado que a expressão de PAMs é induzida de maneira específica pelas vias Toll e IMD, culminando na ativação de fatores de transcrição NF- κ B/Rel. Enquanto infecções por bactérias Gram-negativas induzem a expressão de peptídeos antimicrobianos pela via IMD, infecções por bactérias Gram-positivas e fungos induzem à expressão de PAMs pela via Toll (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007).

Curiosamente, Lan e colaboradores (2016) relataram que em uma espécie de lagostim *Procambarus charkii* o gene *PcToll2* pode regular positivamente a expressão de outros genes, os PAMs *PcALF1* e *PcALF2* e ativando assim o fator de transcrição *PcATF4*, na defesa contra bactérias gram-negativas. Em camarões a função dos genes da via Toll e como estes participam das infecções virais e ainda controverso. Atualmente, existem nove receptores Toll descritos em *L. vannamei*, sendo que os mais conhecidos são Toll 1, 2 e 3 (YANG et al., 2007; WANG et al., 2012) e recentemente foram clonados e identificados Toll 4, 5, 6, 7, 8 e 9 (LI et al., 2018).

Estudos anteriores mostraram que em peneídeos quando infectados via sistêmica com WSSV todos os receptores Toll (1, 2 e 3) são regulados positivamente nas brânquias (WANG et al., 2012), enquanto apenas a expressão de *LvToll1* aumenta durante a infecção por *Vibrio* (HAN-CHING et al., 2010; HOU et al., 2014). O *LvToll2* também pode ser aumentado por infecção da síndrome de Taura (TSV) (SOOKRUKSAWONG et al., 2013). Curiosamente, nos animais infectados via sistêmica neste estudo, não apresentaram alteração na expressão.

A coexpressão de PAMs e da via Toll sugere que esta via deva estar envolvida no controle da expressão de PAMs no intestino médio (SILVEIRA *et al.*, 2018). Wang e colaboradores (2012) evidenciou que a infecção por WSSV no intestino, pode levar à variação do nível de transcritos dos componentes da via Toll e que *LvToll2* participa de alguma forma desempenhando papéis importante no combate a infecção contra o vírus. Pode-se sugerir que a expressão deste gene seja majoritária em outros tecidos do animal.

Em nosso estudo, o único gene que teve um aumento de expressão associado à infecção com WSSV em animais infectados pela via sistêmica foi o *LvproPO1*, relacionado ao sistema de ativação da pró-fenoloxidase (proPO). Os componentes do sistema proPO são excitados pelos hemócitos durante as infecções, mediante o reconhecimento do não-próprio, sendo ativado por componentes de superfície de microrganismos, como LPS de bactérias Gram-negativas e β -1,3-glucanas de fungo (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006; AMPARYUP; CHAROENSAPSRI; TASSANAKAJON, 2013). O processo envolve uma série de reações químicas que liberam moléculas altamente tóxicas, como as quinonas e radicais livres com efeito microbicida e cujo produto final do sistema é a melanina (BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). Em relação ao papel imunológico do sistema proPO, sabe-se que esta via gera transitoriamente moléculas altamente citotóxicas para os microrganismos, tendo assim um papel antimicrobiano importante na destruição dos patógenos invasores.

Duas pró-fenoloxidases são conhecidas em camarões *L. vannamei* (*LvproPO1* e *LvproPO2*) (LAI; CHENG; KUO, 2005; YEH *et al.*, 2009). Wang e colaboradores (2006) observaram que a proPO1 é principalmente expressa de forma constitutiva em hemócitos de *L. vannamei*. Análises de hibridações *in situ* demonstraram que os sinais positivos apresentados em outros tecidos (brânquias, coração, músculo, tecido hematopoiético, hepatopâncreas e inclusive o ceco anterior do intestino médio) eram devidos à infiltração hemocitária. Em *P. monodon*, a proPO1 foi detectada no hepatopâncreas e no intestino médio (SOOTHORNCHAI *et al.*, 2010). No trabalho de Silveira e colaboradores (2018) também foi observada a expressão do gene da proPO1 no estômago, intestino médio e intestino posterior em *L. vannamei*.

Em um trabalho mais recente, feito com *P. monodon*, foi possível constatar uma regulação positiva do gene proPO-1 e uma regulação negativa proPO-2, após desafio sistêmico com WSSV, revelando assim um diferencial nas respostas desses dois tipos de

proPO durante a infecção pelo WSSV (RADHA et al., 2013). São necessárias técnicas complementares como hibridização *in situ* para se determinar o local de expressão gênica, visto que a expressão aumentada da proPO1 deva provavelmente ser pelos hemócitos infiltrados.

E, finalmente, os outros genes avaliados neste estudo não se alteraram frente ao desafio com o WSSV. Este resultado pode ser, em parte devido às análises no período de 48h após o desafio, que talvez tenha sido demasiado tardio para verificar alterações na expressão destes genes. Deve-se ainda considerar que a maioria destes genes tem expressão hemocitária e possivelmente não se expressem no epitélio intestinal.

Em conclusão, a via de entrada pelo WSSV oral ou sistêmica não esteve associada com a alteração no perfil transcricional da maioria dos genes avaliados neste estudo, no intestino médio de *L. vannamei*. A infecção pela via oral mostrou-se mais impactante, estando associada a uma repressão significativa de três genes codificantes para peptídeos antimicrobianos (ALF-A, ALF-C, ALF-G), e um gene pertencente à via Toll de sinalização celular (Toll2), enquanto a infecção pela via sistêmica alterou apenas dois dos genes avaliados (ALF-A e proPO1). O estudo sobre as diferentes rotas de entrada do WSSV no organismo de camarões pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias visando a prevenção de contágios nos cultivos.

Expressão espacial no intestino médio de genes associados à imunidade em camarões

***Litopenaeus vannamei* desafiados com WSSV**

1. INTRODUÇÃO

O epitélio intestinal é um sítio que se desenvolveu, evolutivamente, estabelecendo comunicação entre o sistema imune do animal e o mundo microbiano. O trato gastrointestinal dos camarões é dividido em quatro áreas funcionais: intestino anterior, hepatopâncreas, intestino médio e intestino posterior (SOONTHORNCHAI *et al.*, 2010). O intestino anterior é uma estrutura altamente especializada com função na digestão mecânica e extracelular, sendo composto pela boca, esôfago e estômago. O intestino médio inclui os cecos anterior e posterior e um longo tubo que regula os movimentos do conteúdo digerido e filtrado direcionando-o para o hepatopâncreas (DALL, 1983; SOONTHORNCHAI *et al.*, 2015). Parte dos nutrientes é absorvida pelo epitélio do intestino médio.

O hepatopâncreas ou glândula digestiva é um grande órgão que ocupa a maior parte da região dorsal do cefalotórax (GIBSON; BARKER, 1979) e recobre a parte inicial do intestino médio, sendo encarregado por funções análogas ao fígado e pâncreas dos vertebrados e pela absorção da maioria dos nutrientes. Já, o intestino posterior é constituído pelo reto e ânus e seus movimentos peristálticos rítmicos servem para eliminar as fezes e a membrana peritrófica, podendo ainda estar envolvido na captação de água e transporte de íons (ICELY; NOTT 1992; CONKLIN 1995; MCGAW; CURTIS, 2013).

Os intestinos anterior e posterior são internamente revestidos por uma cutícula de quitina que é renovada a cada muda (GUILLAUME; CECCALDI, 1999) e o intestino médio, por uma membrana peritrófica (MP). A MP é uma estrutura acelular composta por fibrilas de quitina, igualmente renovada durante a muda e que estabelece subdivisões funcionais no lúmen do intestino para facilitar a digestão, prevenindo a adesão de patógenos e partículas diretamente às células epiteliais (WANG *et al.*, 2012; SOONTHORNCHAI *et al.*, 2015). No caso de insetos, sabe-se que a inibição da formação de MP pode aumentar a suscetibilidade do hospedeiro à infecção por determinados vírus (WANG, 2000).

Em relação ao intestino médio dos insetos, considera-se que esta estrutura em indivíduos adultos de *Drosophila melanogaster* seja um tecido complexo composto por vários tipos celulares que desempenham diversas funções, como digestão, absorção de nutrientes e produção de hormônios (HUNG *et al.*, 2020). Inicialmente, esse tecido foi subdividido em três regiões especializadas: anterior, medial e posterior (DIMITRIADIS; 1991). Segundo suas propriedades morfológicas, histológica e transcricionais relacionadas ao sistema imune (DUBREUIL, 2004; BUCHON, 2013; MARIANE; SPRADILING, 2013).

Posteriormente, esta subdivisão foi ampliada para cinco regiões, cada uma delas apresentando além da morfologia diferenciada, o conteúdo enzimático e a expressão de transcritos para peptídeos antimicrobianos (BUCHON; OSMAN, 2015). Muito recentemente, contudo, o intestino médio da *Drosophila* foi dividido em seis regiões anatômicas principais, subdivididas em 14 sub-regiões de acordo com dados morfométricos, histoquímicos e transcriptômicos (CAPO; WILSON; DI CARA, 2019).

Outros estudos evidenciaram ainda que existe uma “setorização” da resposta imune no intestino médio deste inseto, onde a expressão de peptídeos antimicrobianos se concentra na região anterior. Os autores sugerem que as respostas imunes nesta região sejam intensificadas em função de um primeiro contato entre epitélio intestinal, as partículas alimentares e a microbiota (BOSCO-DRAYON *et al.*, 2012; NEYEN *et al.*, 2012; ERKOSAR *et al.*, 2014).

No caso dos camarões, há poucos relatos disponíveis sobre o papel do intestino na imunidade e, ao nosso conhecimento, o primeiro estudo avaliando a expressão gênica espacial no intestino médio de um peneídeo foi realizado por Soonthornchai e colaboradores (2010), no camarão tigre asiático, *Penaeus monodon*. Nesse trabalho, os animais foram submetidos a um desafio bacteriano (*V. harveyi*) por imersão e as análises de expressão gênica foram realizadas por PCR semiquantitativa e RT-qPCR, porém, nesta última análise, avaliando apenas duas porções do IM: AM (anterior e medial) e PH (posterior do IM conjuntamente ao intestino posterior). Como resultado eles encontraram que o nível transcricional de genes da categoria de peptídeo antimicrobiano ALF3, foi diferenciado nas porções do intestino médio e intestino posterior daquele peneídeo submetido à infecção bacteriana. Posteriormente, outro estudo demonstrou a participação do epitélio intestinal na produção de peptídeos antimicrobianos em *L. vannamei*, as stylicinas (*Lvan Stylicin-1* e *Lvan Stylicin-2*), são expressas nos hemócitos e também pelas células epiteliais colunares que revestem a parte anterior do intestino médio e seu ceco anterior (FARIAS *et al.*, 2019).

Com base nos resultados acima, espera-se que os crustáceos, a exemplo dos insetos, similarmente possuam um perfil transcricional diferencial e regionalizado no intestino médio, onde as respostas imunológicas são praticamente ainda desconhecidas neste tecido.

Atualmente muito se conhece sobre a imunidade dos camarões associada à sua hemolinfa (imunidade celular e humoral), mas praticamente nada ainda sobre o papel do intestino nas suas defesas antimicrobianas e antivirais. Adicionalmente, não há relatos na

literatura que comprovem a existência de um perfil transcricional diferencial de genes imunológicos e setorizado no intestino médio dos peneídeos. Considerando o acima exposto e o potencial papel imunológico do intestino médio em camarões, no presente estudo foi avaliada a expressão de diferentes genes imunológicos de peneídeos em três regiões (anterior, medial e posterior) do IM de *L. vannamei* desafiados ou não com o WSSV.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil transcricional de genes associados à imunidade em três diferentes porções do intestino médio (anterior, medial e posterior) de juvenis *L. vannamei* *naïves* e desafiados com o WSSV.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Identificar o perfil transcricional basal de 37 genes pertencentes a 11 categorias funcionais em camarões (*naïves*), bem como se existe uma expressão espacial no intestino médio destes genes;

2.2.2 Avaliar se a presença do WSSV altera/modula o perfil transcricional nas porções anterior, medial e posterior do intestino médio.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

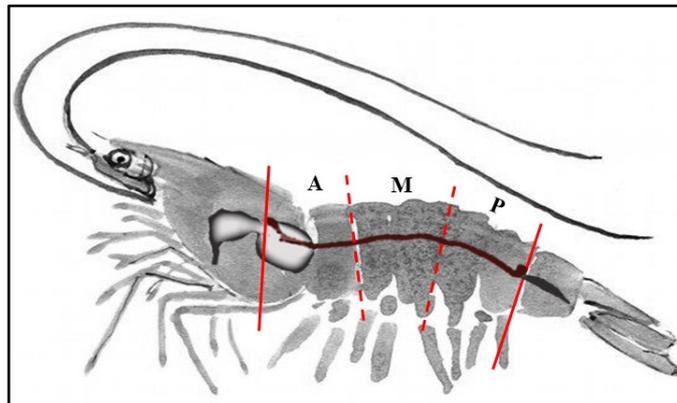
Camarões juvenis *Litopenaeus vannamei* (10 ± 2 g) (n=50), de ambos os sexos, aparentemente saudáveis e em fase de intermuda, foram cedidos de cultivos em água clara pelo Laboratório de Camarões Marinhos e transferidos para o Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (Centro de Ciências Biológicas, UFSC). O acondicionamento e alimentação dos animais foram realizados de maneira semelhante ao descrito no item 3.1 do Capítulo 1.

3.2 DESAFIO *PER OS* COM WSSV E COLETA DOS INTESTINOS MÉDIOS

O inóculo e a infecção pela via oral foram preparados/realizados segundo metodologia detalhada nos itens 3.2 e 3.3.2 do Capítulo 1. Trinta camarões foram infectados com 100 μ L do inóculo WSSV (5×10^6 cópias virais/animal) suavemente escoado pela cavidade oral com o auxílio de uma micropipeta, sem provocar injúrias e nenhuma mortalidade. Passadas 48 horas do desafio, os intestinos médios foram assepticamente dissecados e seccionados em três porções de igual tamanho, correspondentes às partes anterior, medial e posterior do intestino médio (**Figura 8**).

As intersecções foram feitas considerando o segmento abdominal, na porção anterior foi seccionada do ceco anterior (coberta pelo hepatopâncreas) até o final do primeiro segmento abdominal, a medial foi seccionada do início do segundo segmento abdominal até o final do terceiro e última porção (posterior) foi fragmentada do início do quarto até o final do quinto (incluindo o ceco posterior). O hepatopâncreas que recobre a porção anterior do intestino médio foi desprezado e não utilizada neste estudo. O conteúdo intestinal foi retirado por raspagem e cada parte lavada com Tris-NaCl (10 mM Tris, 330 mM NaCl, pH 7,4) estéril e a 4°C.

Figura 8. Representação esquemática (fora de escala) das porções anterior, medial e posterior do intestino médio do camarão *Litopenaeus vannamei*.



Os animais tiveram o intestino médio seccionados em três porções conforme a imagem: **A:** Região anterior do intestino médio; **M:** Região medial do intestino médio e **P:** região posterior do intestino médio.

Com o intuito de detectar a presença do WSSV no intestino dos animais desafiados, uma amostra de cada porção (anterior, medial e posterior do intestino médio) foi estocada em etanol 70%, o DNA genômico extraído e a presença do WSSV detectada por *Nested-PCR* (**Figura 9**) (LO *et al.*, 1996).

Figura 9. Detecção molecular do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) por *Nested-PCR* (941 pb), em camarões desafiados oralmente.

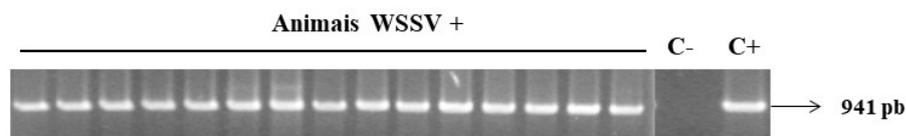


Figura 9. Animais 1 a 15; controle negativo (C-) e controle positivo (C+).

Somente amostras WSSV positivas foram utilizadas para a formação de 3 *pools* de 5 animais. No grupo controle foram utilizados intestinos de animais *naïve* (n= 15), não manipulados e, do mesmo modo, cada região do intestino médio foi agrupada em três *pools* de 5 animais. Todos os *pools* de amostra foram estocados em microtubos contendo *RNAlater™* (Sigma-Aldrich®) e, posteriormente macerados em *TRIzol®* (Thermo Scientific®) com o auxílio de pistilos estéreis acoplados ao homegeneizador *VWR® Disposable Pellet Mixers and*

Cordless Motor e centrifugadas (12.000 ×g por 10 min a 4 °C). Os sobrenadantes foram então coletados e conservados a -20 °C para a etapa seguinte, de extração do RNA total.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO (gDNA)

Para extração de DNA genômico (gDNA), as amostras de cada porção dos intestinos dos animais do grupo infectado e controle foram inicialmente lavados em Tris-NaCl (10 mM Tris, 330 mM NaCl, pH 7,4) e, em seguida, homogeneizados com uma solução de lise contendo 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5), 0,1 M NaCl, 0,05 M EDTA (pH 8,0), 1% SDS e proteinase K (Sigma-Aldrich®) (concentração final de 0,25 µg µl⁻¹). Após incubação por 1 h a 55 °C foi adicionado à mistura acetato de potássio 3 M (1: 2; v/v) e incubada por 30 min à 4 °C. Em seguida procedeu-se a uma centrifugação de 14.000 ×g por 10 min e incubação com RNase A (50 µg/mL) (Fermentas) a 37 °C por 30 min. A precipitação do gDNA foi realizada usando isopropanol (1:2; v/v) e a mistura foi em seguida centrifugada a 14.000 ×g por 30 minutos a 4 °C. O precipitado de gDNA foi, então, lavado com etanol 70% gelado e ressuspenso em água ultrapura (30 µl). A concentração e a pureza do gDNA foram verificadas em espectrofotômetro NanoVue plus™. O diagnóstico molecular do WSSV foi realizado através de *Nested*-PCR utilizando 30 ng de gDNA como descrito anteriormente no item 3.2 do Capítulo 1.

3.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA

O protocolo de extração de RNA total e síntese de cDNA foram realizadas como descrito no item 3.5 do Capítulo 1.

3.5. ESCOLHA DOS INICIADORES

Para as análises de expressão gênica, foram selecionados 41 genes incluindo quatro (4) genes de referência e 37 genes pertencentes a 11 categorias funcionais associadas ao sistema imune de crustáceos: (i) Peptídeos antimicrobianos - PAMs (10 genes); (ii) Inibidores de proteases (2 genes); (iii) Vias de sinalização celular (7 genes); (iv) Proteínas de reconhecimento de padrões moleculares - PRPs (1 gene); (v) Defesa antiviral (6 genes); (vi) Citocinas (3 genes); (vii) Defesa antioxidante (1 gene); (viii) Homeostasia (3 genes); (ix) Sistema de ativação da proPO (2 genes); (x) Inibidores de apoptose (1 gene) e (xi) associado à Endocitose (1 gene). As sequências dos iniciadores estão apresentadas no **Quadro 2**.

Quadro 2: Sequência dos iniciadores referentes aos genes utilizados nas análises de expressão gênica.

Sigla	Nome do gene	Nº GenBank	Sequência (5'- 3')	Produto de amplificação	Referência
Genes de Referência					
<i>Lv</i> EF1 α	Elongation factor 1-alpha	GU136229	<i>Fw</i> - TGGCTGTGAACAAGATGGACA <i>Rv</i> - TTGTAGCCCACCTTCTTGACG	103	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>Lv</i> RpS6	40S ribosomal protein S6	FE080516	<i>Fw</i> - AGCAGATACCCTTGGTGAAG <i>Rv</i> - GATGCAACCACGGACTGAC	193	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>Lv</i> RpS3A	S3A ribosomal protein	BF023924	<i>Fw</i> - GGCTTGCTATGGTGTGCTCC <i>Rv</i> - TCATGCTCTTGGCTCGCTG	101	De la Vega <i>et al.</i> , 2008
<i>Lv</i> Actin	β -actin	AF300705	<i>Fw</i> - CCACGAGACCACCTACAAC <i>Rv</i> - AGCGAGGGCAGTGATTC	142	Wang <i>et al.</i> , 2007
Diagnóstico viral (WSSV)					
WSSV_146-F1R1			<i>Fw</i> - ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG <i>Rv</i> - TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA	1447	OIE
WSSV_146-F2R2			<i>Fw</i> - GTAAGTCCCTTCCATCTCCA <i>Rv</i> - TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT	941	OIE
Peptídeos antimicrobianos (PAMs)					
<i>Litvan</i> PEN 1/2	Penaeidin 1/2	Y14925	<i>Fw</i> - GTCTGCCTGGTCTTCTTGG <i>Rv</i> - GCAGCAATTGCGAGCATCTG	168	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>Litvan</i> PEN3	Penaeidin 3	AF390144	<i>Fw</i> - GTCTGCCTGGTCTTCTTGG <i>Rv</i> - GCGCTTGTGAGAAGGAAAATTC	178	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>Litvan</i> PEN4	Penaeidin 4	DQ211701	<i>Fw</i> - GTCTGCCTGGTCTTCTTGG <i>Rv</i> - TTGCGGAGGGAATCCGTAG	321	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>Litvan</i> ALF-A	ALF Group A	EW713395	<i>Fw</i> - CTGATTGCTCTTGTGCCACG <i>Rv</i> - TGACCCATGAACTCCACCTC	113	Rosa <i>et al.</i> , 2013
<i>Litvan</i> ALF-B	ALF Group B	GQ227486	<i>Fw</i> - GTGTCTCCGTGTTGACAAGC <i>Rv</i> - ACAGCCCAACGATCTTGCTG	123	Rosa <i>et al.</i> , 2013
<i>Litvan</i> ALF-C	ALF Group C	FE058235	<i>Fw</i> - ATGCGAGTGTCTGTCCCTCAG <i>Rv</i> - TGAGTTTGTTCGCGATGGCC	115	Rosa <i>et al.</i> , 2013
<i>Litvan</i> ALF-G	ALF Group G	FE153496	<i>Fw</i> - CCGCTGCATGTCAAGTATCC <i>Rv</i> - TCAGCAGTAGCAGTGTACAGC	140	Matos <i>et al.</i> , 2018
<i>Lvan</i> -Stylicin1	Stylicin 1	MH108957	<i>Fw</i> - CACAAGAGTGCCACCGTG <i>Rv</i> - ACATTCGAGTTATGGTAGCC	125	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>Lvan</i> -Stylicin2	Stylicin 2	MH108958	<i>Fw</i> - CACAAGAGTGCCACCGTG <i>Rv</i> - CACACAGGCTGCCGACATAA	151	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
Crustin <i>Lv</i>	Crustin Type IIa	AY488496	<i>Fw</i> - CGAACCAGAGACACCTGTTG <i>Rv</i> - CAGCACACTTGTAGTCGTT	217	Goncalves <i>et al.</i> , 2014

Quadro 2: Sequência dos iniciadores referentes aos genes utilizados nas análises de expressão gênica (continuação).

Inibidores de proteases					
<i>Lv</i> α2M-1	Alpha2-macroglobulin	EF073268	Fw- GGAGAGGAACGAGACCATC Rv- TCAGCTTGGCGTCGAAGTG	113	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>Lv</i> α2M-2	Alpha2-macroglobulin	DQ988330	Fw- TGCAGGTTCTAGTGTGGTAC Rv- CACCCAGGTAGTCGATGAC	261	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
Vias de sinalização celular					
<i>Lv</i> Toll 2	Toll receptor 2	JN180637	Fw- CATGCCTGCAGGACTGTTTA Rv- GGCCTGAGGTAAGGTCTTC	158	Wang <i>et al.</i> , 2012
<i>Lv</i> Toll 3	Toll receptor 3	JN180638	Fw- TCGTACAACAGCTGACGAG Rv- ATACTTCAGGTGGGCCACAG	195	Wang <i>et al.</i> , 2012
<i>Lv</i> Toll 4	Toll receptor 4	KT372179	Fw- CTTGCTGACTGGGCATTTGG Rv- TGGCTAGTCGTAATTCCCGC	127	Li <i>et al.</i> , 2018
<i>Lv</i> Dorsal	Dorsal (Rel/NF-κB transcription factor)	FJ998202	Fw- TCACTGTTGACCCACCTTAC Rv- GAGGGCATCTTCAACATCAC	164	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>Lv</i> STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)	HQ228176	Fw- CATGGCTCTGGCAGATAAGC Rv- GCATCTGCTGGTCTCTCTTC	107	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>Lv</i> HMGBa	High-mobility group (HMGBa)	HQ228174	Fw- GGATGAGAAGGTCAAGTACG Rv- TCCTCGTCGTCTCCTCTC	186	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>Lv</i> DOME	JAK/STAT pathway receptor Domeless	KC346866	Fw- CTCAGGCTATGTTTCTCAGGATTCA Rv- CACGGCAGTTCCTTATGGTCT	147	Yan <i>et al.</i> , 2015
Proteínas de reconhecimento de padrões moleculares (PRPs)					
<i>Lv</i> Dscam	Down syndrome cell adhesion molecule	GQ154653	Fw- AGGTGGACAATCCGTGGTG Rv- GGAGTGTATGTGTGACTGTG	160	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
Defesa antiviral					
<i>Lv</i> Dcr1	Dicer-1	EU676241	Fw- CCGGAGATAGAACGGTTCAGTG Rv- CGATAATTCCTCCCAACACCTG	176	Yao <i>et al.</i> , 2010
<i>Lv</i> Ago1	Argonaute 1	HM234689	Fw- TCGTCATTTGCCATCCAT Rv- GCCATCTGGAGCGGAGAAG	65	Labreuche <i>et al.</i> , 2010
<i>Lv</i> Dcr2	Dicer-2	HQ541163	Fw- AGGAAATGCAATGTCGTGGTT Rv- ACGAGCCCTCCCCTAGATT	78	Chen <i>et al.</i> , 2011

Quadro 2: Sequência dos iniciadores referentes aos genes utilizados nas análises de expressão gênica (continuação).

Defesa antiviral					
<i>Lv</i> Ago2	Argonaute 2	HM234690	Fw-GATGGCATGAAGTCTGCAGTTG Rv-TGCGCACGACCATCACTAAG	62	Labreuche <i>et al.</i> , 2010
<i>Lv</i> Sid1	Sid-1	HM234688	Fw- CTTGCTGACTGGGCATTTGG Rv-TGGAAGCCTATCTCTGCAACTTG	63	Labreuche <i>et al.</i> , 2010
<i>Lv</i> TRBP1	Transactivating response RNA-binding protein isoform 1	HQ541157	Fw-CAAGAGTTGTGTATGCGCAG Rv-AGCACCACCCTGGATGATG	195	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
Citocinas					
<i>Lv</i> AST	Astakine	HM473285	Fw- GACTGGGCGACTGTTCTTC Rv- GGTACGCAAGATTCAGCTCC	156	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>Lv</i> IRF	Interferon regulatory factor (IRF)	KM277954	Fw- ACGCTGCCCTCTTTTCGTAC Rv- ACGCTGTGAACCTGAAGTATCG	162	Li <i>et al.</i> , 2015
<i>Lv</i> SVC1	Single von Willebrand factor type C domain protein 1	HQ541158	Fw-TGCCAACCTAGCTGAGCTTCA Rv-CCATCAGGGCACACGTATTG	81	Chen <i>et al.</i> , 2011
Defesa antioxidante					
<i>Lv</i> NOS	Nitric oxide synthase (NOS)	GQ429217	Fw- GAGCAAGTTATTCGGCAAGGC Rv- TCTCTCCCAGTTTCTTGGCGT	104	Yao <i>et al.</i> , 2010
Homeostasia					
<i>Lv</i> Clot	Hemolymph clottable protein	DQ984182	Fw-ACCAAGGTCGTCTCATTAC Rv-TGTCCACTTCCAGGGTGTC	172	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
<i>Lv</i> TGII	Transglutaminase II	EU164849	Fw- GCCCGAGGACAGGGAAA Rv- GCGGTGGTCAGTGAATCCA	75	Yeh <i>et al.</i> , 2013
<i>Lv</i> HHAP	Hemocyte homeostasis-associated protein (HHAP)	FE124306	Fw- CAAGCAGGTC AAGCAGGAG Rv- CTGGAACCACAATAGAAGCC	108	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
Sistema de Ativação da ProPO					
<i>Lv</i> proPO1	Prophenoloxidase 1 (proPO-1)	EU284136	Fw-CGGTGACAAAGTTCCTCTTC Rv-GCAGGTGCGCGTAGTAAG	122	Wang <i>et al.</i> , 2007
<i>Lv</i> PPAE2	Prophenoloxidase-activating enzyme 2	FE090793	Fw- TCAGCAGGATTTGTGTTGCC Rv- GTCTCAGTGAAGCCCCATC	107	Goncalves <i>et al.</i> , 2014
Morte Celular					
<i>Lv</i> IAP3	Inhibitor of apoptosis protein 3	GU903909	Fw-CGGTGACAAAGTTCCTCTTC Rv-GCAGGTGCGCGTAGTAAG	76	Wang <i>et al.</i> , 2007
Endocitose					
<i>Lv</i> Rab7	Rab7	FJ811529	Fw- CGAAGCGAGCACAACATGG Rv- TGTACAGCTCCACCTCTGAC	144	Goncalves <i>et al.</i> , 2014

3.6. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA POR PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

As reações de transcrição reversa seguida por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) utilizou o equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* (Thermo Fisher Scientific®). As reações foram realizadas em microplacas de 96 poços com um volume final de 15 µL contendo 1 µL de cDNA (diluídas 20 vezes), 0,2 µM de cada iniciador (**Quadro 2**) e 7,5 µL de Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix 2× (Thermo Fisher Scientific). As reações foram realizadas em duplicata de acordo com as seguintes condições: desnaturação a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s e hibridização/extensão a 60°C por 1 min. Ao término dos ciclos, foi realizada uma curva de dissociação (60-95°C; 0,3°C/s) das amostras para verificar a especificidade dos iniciadores.

Para as análises de expressão gênica, os resultados foram normalizados pela média geométrica de quatro genes de referência (*LvActin*, *LvEF1*, *LvRpS6* e *LvRpS3A*; **Quadro 2**) utilizando o programa RefFinder para calcular o coeficiente de estabilidade dos genes candidatos, como descrito no item 3.7 do Capítulo 1.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O perfil geral de expressão dos transcritos em cada região do intestino médio de animais *naïve* e desafiados com WSSV, está representado em *heatmaps* a partir dos valores normalizados com os genes de referência. A expressão basal dos genes foi avaliada nos animais não manipulados (camarões *naïve*), considerando cada região do intestino médio (anterior, medial e posterior). Para tal, os dados obtidos foram inicialmente submetidos a uma análise de variância (ANOVA) usando um teste de uma via, seguido pelo teste de comparação de médias de Duncan e os gráficos construídos no *GraphPad Prism 8* (GraphPad Software, Inc).

A expressão relativa dos genes nos animais desafiados com WSSV foi calibrada com o perfil de expressão do grupo não desafiado, considerando a expressão em cada porção do intestino médio. Os níveis de expressão entre os grupos foram calculados através da fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Diferenças na expressão gênica foram consideradas estatisticamente significantes $P < 0.05$ (*cutoff* de 2-fold *change* no nível de expressão) usando teste-t de *Student* não pareado. Para a construção dos

gráficos de expressão e diagrama de *Venn* foram utilizados os programas *GraphPad Prism 8* (GraphPad Software, Inc) e *Lucidchart* (<https://www.lucidchart.com>), respectivamente.

Os níveis de dissimilaridade dos genes diferencialmente expressos entre os grupos foram avaliados por análise de componentes principais (PCA), a partir dos valores de níveis de expressão $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Os *heatmaps* e PCA foram construídos utilizando o programa *Clustvis* (<http://https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>).

4. RESULTADOS

Com o intuito de identificar se existe uma expressão gênica espacial no intestino médio dos peneídeos, o perfil transcricional de 37 genes associados ao sistema imune foi investigado nas porções anterior, medial e posterior do intestino médio de camarões juvenis *L. vannamei naïve* e desafiados com o WSSV. Inicialmente, a melhor condição de referência foi escolhida para os cálculos de expressão relativa, representada pela média geométrica dos quatro genes candidatos *LvEF1 α* , *LvRpS6*, *LvRpS3A* e *LvActin* (coeficiente de estabilidade 2,51) (Figura 10).

Figura 10. Coeficiente de Estabilidade dos genes candidatos à referência.

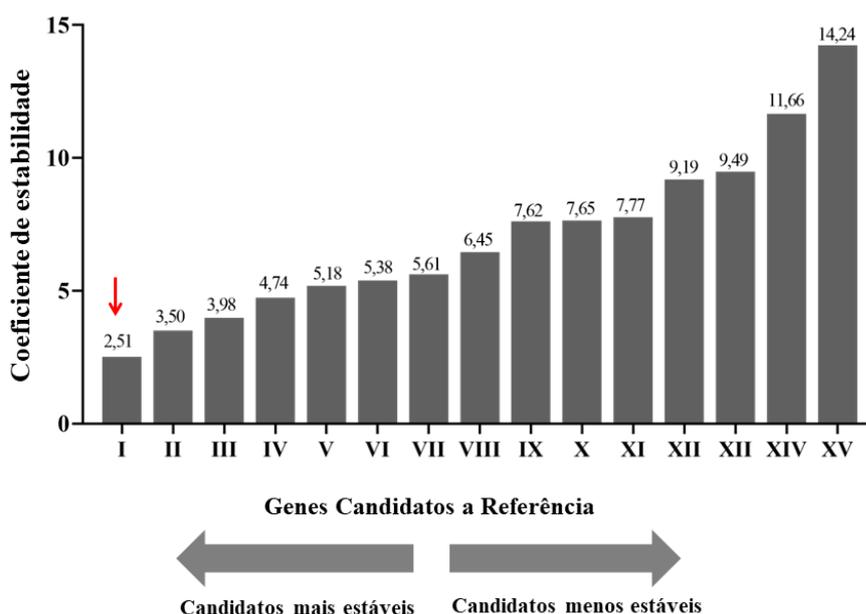


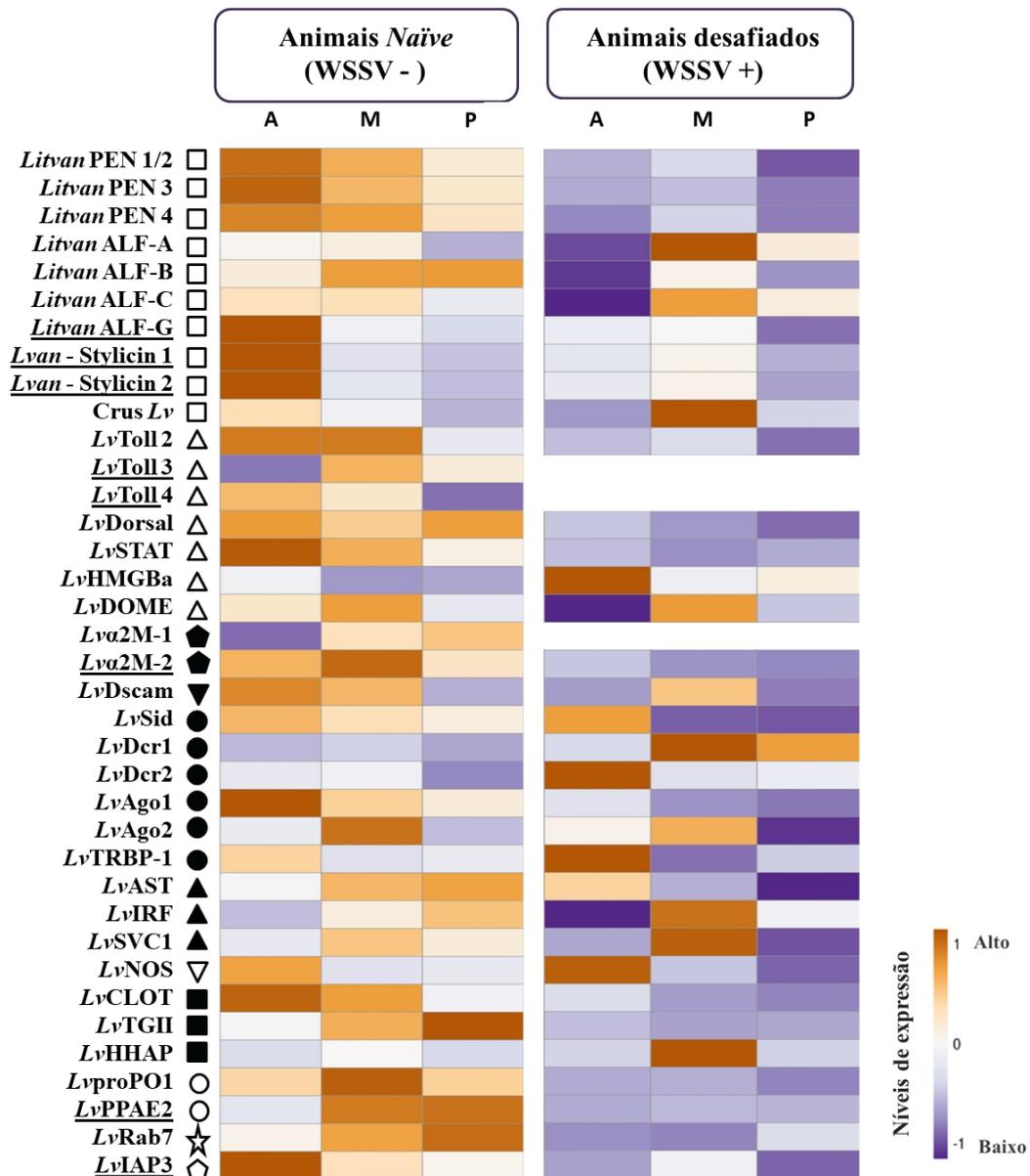
Figura 10. Coeficiente de estabilidade dos valores de Cq dos genes e da média geométrica de suas diferentes combinações: (I) *LvEF1 α* , *LvRpS6*, *LvRpS3A* e *LvActin* (melhor estabilidade indicada pela seta vermelha); (II) *LvEF1 α* , *LvRpS3A* e *LvActin*; (III) *LvRpS6*, *LvRpS3A* e *LvActin*; (IV) *LvRpS6* e *LvActin*; (V) *LvRpS6* e *LvRpS3A*; (VI) *LvEF1 α* , *LvRpS6* e *LvActin*; (VII) *LvEF1 α* , *LvRpS6* e *LvRpS3A*; (VIII) *LvRpS3A*; (IX) *LvRpS3A* e *LvActin*; (X) *LvActin*; (XI) *LvEF1 α* ; (XII) *LvEF1 α* e *LvActin*; (XIII) *LvEF1 α* e *LvRpS6*; (XIV) *LvEF1 α* e *LvRpS3A* e (XV) *LvRpS6*.

Os resultados deste capítulo serão apresentados da seguinte maneira: inicialmente será apresentada a análise global da expressão gênica em cada porção do IM de ambos os grupos *naïve* e desafiados com WSSV (Figura 11). Em seguida, será apresentada a expressão

espacial no IM de camarões *naïve*, representando a expressão basal destes genes (**Figura 12**). Após, o efeito da infecção oral pelo WSSV sobre o perfil transcricional será apresentado pela análise de componente principal (PCA) (**Figura 13 A**), por meio da dissimilaridade/similaridade da expressão gênica espacial entre os grupos experimentais. Além deste, um Diagrama de Venn elencará os genes que foram expressos de forma compartilhada entre as porções do IM (**Figura 13 B**). A análise individual dos genes diferencialmente expressos será apresentada, considerando o perfil transcricional em cada porção do intestino médio: anterior (**Figura 14 A**), medial (**Figura 14 B**) e posterior (**Figura 14 C**). E, finalmente, um esquema do camarão evidenciando o seu intestino médio setorizado será apresentado na (**Figura 15**), indicando os genes diferencialmente expressos em cada porção, por categoria funcional e em níveis crescentes de expressão relativa.

Todos os 37 genes avaliados foram expressos no IM de camarões *naïve*, porém em diferentes níveis entre as três porções (**Figura 11**). De maneira interessante, a presença do WSSV promoveu, após 48h do desafio, uma importante diminuição na expressão da maioria dos genes, sendo que alguns deles tiveram sua expressão reprimida ao nível não quantificável (*LvToll3*, *LvToll4* e *Lva2M1*) (**Figura 11**).

Figura 11. Análise global da expressão de genes associados ao sistema imune no intestino médio de *Litopenaeus vannamei*.



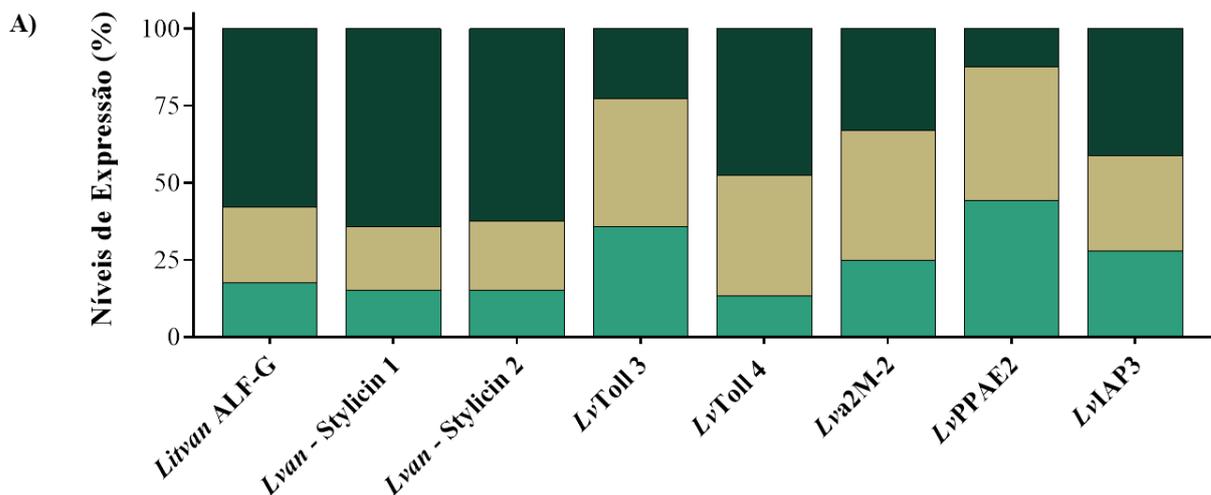
Categorias Funcionais

- | | | |
|--|-------------------------------|---------------------------|
| □ Peptídeos antimicrobianos | △ Vias de sinalização celular | ◆ Inibidores de proteases |
| ▼ Proteínas de reconhecimento de padrões moleculares | ● Defesa antiviral | ▲ Citocinas |
| ▽ Defesa antioxidante | ○ Sistema de ativação proPO | ■ Homeostasia |
| ◇ Inibidores de Apoptose | ☆ Endocitose | |

Figura 11. *Heatmap* apresentando o perfil de expressão de 37 genes imunológicos (**Quadro 2**) nas porções anterior (A), medial (M) e posterior (P) do intestino médio de camarões *Litopenaeus vannamei* *naïve* ou desafiados oralmente com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). Os genes que apresentaram expressão espacial diferencial no intestino médio de camarões *naïve* estão sublinhados. O nível de expressão relativa dos genes-alvos foi normalizado e cada célula no gráfico corresponde à média de expressão da triplicata biológica de uma condição experimental (>2 -fold-change, $P < 0,05$). A intensidade da cor indica a magnitude de expressão (alta = laranja; baixa = roxa), baseada na escala de cor presente na parte inferior, à direita do gráfico.

Considerando a expressão espacial, 8 dos 37 genes foram diferencialmente expressos ($p < 0,05$) entre as três porções do intestino médio (camarões *naïve*), sendo pertencentes a quatro categorias funcionais: peptídeos antimicrobianos (*Litvan* ALF-G, *Lvan* Stylicin-1 e *Lvan* Stylicin-2), vias de sinalização (*LvToll*3 e *LvToll*4), inibidores de proteases (*Lva*2M2), sistema de ativação da proPO (*LvPPAE*2) e inibidores de apoptose (*LvIAP*3) (**Figura 12 A**).

Figura 12. Distribuição do perfil transcricional de genes diferencialmente expressos nas porções do intestino médio em *Litopenaeus vannamei* não desafiados (*naïve*).



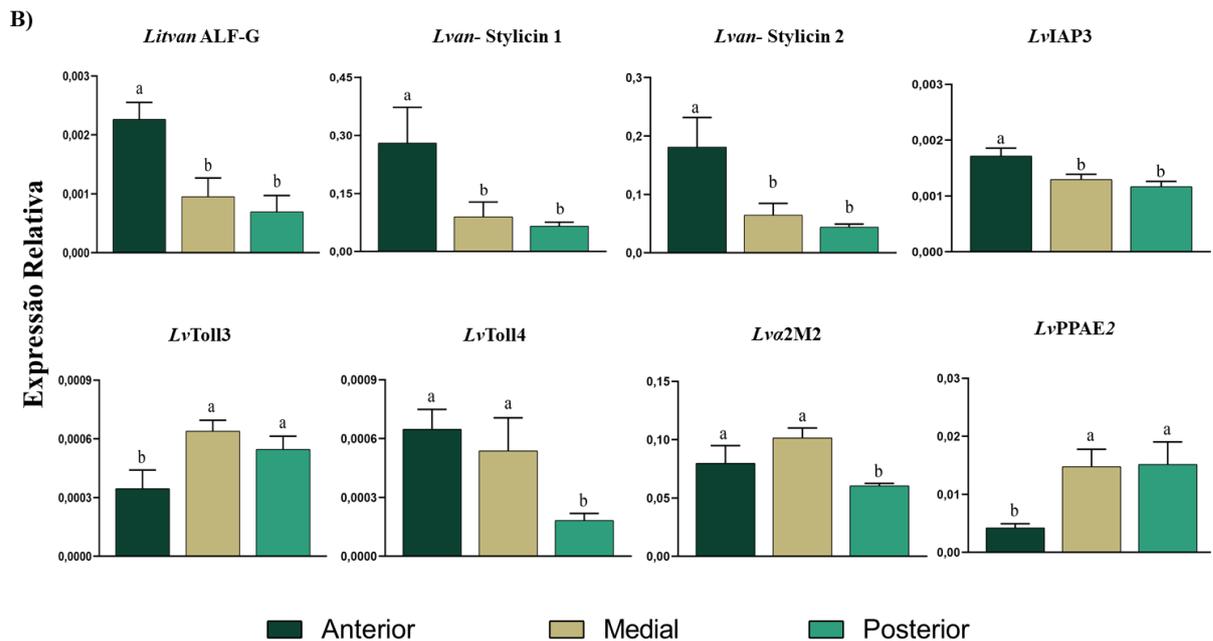


Figura 12. (A) Níveis percentuais das médias de expressão relativa (três réplicas biológicas) de genes diferencialmente expressos nas porções do intestino médio (anterior, medial e posterior) (B) Expressão relativa de genes com expressão espacial no intestino médio. Os valores de expressão relativa (três réplicas biológicas) estão expressos como médias \pm erro padrão da média (EPM) e as diferenças estatísticas estão indicadas por diferentes letras (dados foram normalizados, submetidos à análise de variância – ANOVA e teste de Duncan; $p < 0,05$).

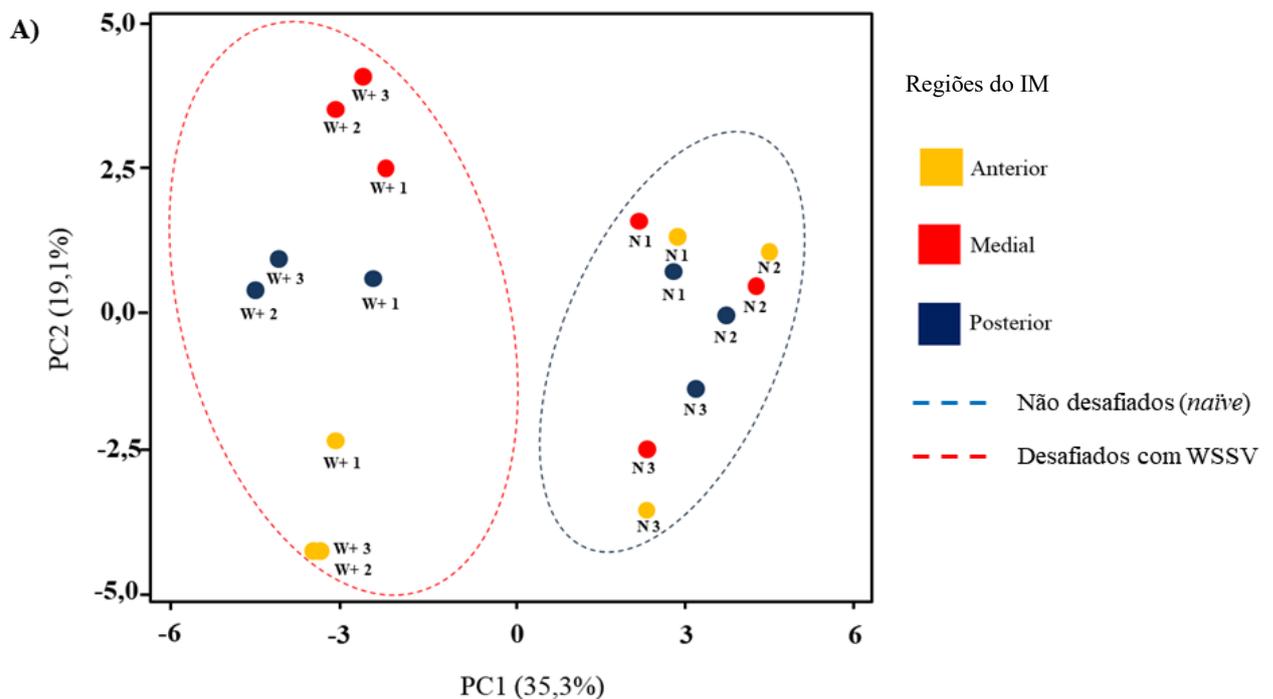
Avaliando a distribuição espacial dos genes no IM de *Litopenaeus vannamei* observou-se que os transcritos codificando para os peptídeos antimicrobianos *Litvan* ALF-G, *Lvan* Stylicin-1 e *Lvan* Stylicin-2 e o inibidor de apoptose *LvIAP3* se expressaram majoritariamente na parte anterior do IM (Figuras 12A e 12B). Por outro lado, os genes da via de sinalização Toll (*LvToll3*) e da enzima ativadora da pró-fenoxidase (*LvPPAE2*) foram majoritariamente expressos em ambas porções medial e posterior, enquanto o *LvToll4* e o inibidor de proteases *Lva2M-2*, foram majoritariamente expressos nas porções anterior e medial. Curiosamente, nenhum transcrito teve expressão majoritária na porção posterior do IM de camarões *naïve*.

Estes resultados em conjunto permitiram estabelecer o perfil basal de expressão de importantes genes associados ao sistema imune de camarões, onde a maioria deles ($n=29$) se expressa de maneira similar entre as três porções e apenas 8 genes apresentaram uma expressão regionalizada no IM de juvenis *naïve* de *L. vannamei*. Com base nestas

informações, buscou-se então identificar se a presença do WSSV nos animais, promoveria alguma alteração no perfil transcricional destes 37 genes.

Inicialmente, pela análise de componente principal (PCA) dos grupos não infectados e infectados foi possível observar uma variância de 35,3% na componente principal 1, indicando uma diferença marcante entre o perfil transcricional no IM de animais infectados daquele dos animais *naïve* (**Figura 13 A**). Sem o desafio viral, o perfil transcricional não diferiu em função da região do IM avaliada, mas sim provavelmente colocando em evidência a grande variabilidade genética dos animais que compuseram as triplicatas biológicas (**Figura A,B**). Já, a presença do vírus tornou o perfil transcricional mais similar por porção do IM aproximando o perfil entre os três *pools* da região anterior, entre os três *pools* da região medial e, o mesmo para a região posterior (**Figura 13 A,C**).

Figura 13. Efeito da presença do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) no intestino médio de *L. vannamei* sobre o perfil transcricional de genes associados ao sistema imune de camarões.



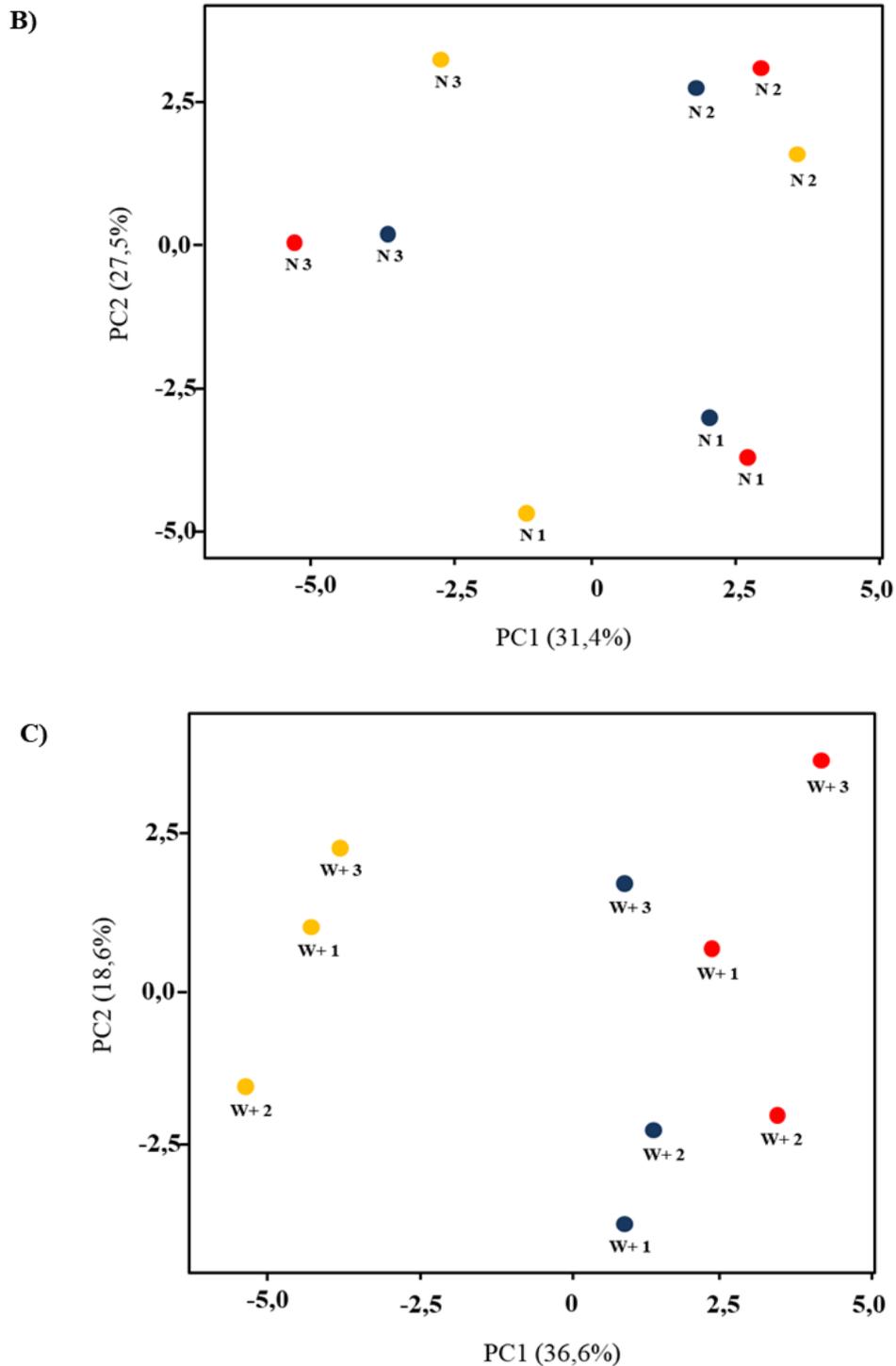


Figura 13. Análise de componentes principais – PCA (*Principal Component Analysis*) indicando as semelhanças e dissimilaridades de perfil transcritômico entre as regiões do intestino médio de *L. vannamei*: **(A)** análise considerando os animais *naïve* (3 *pools* de **N**) e desafiados com o WSSV (3 *pools* de **W+**); **(B)** análise considerando apenas os animais *naïve* (3 *pools* de **N**); **(C)** análise considerando apenas os animais desafiados (3 *pools* de **W+**).

Após constatarmos que o perfil transcricional efetivamente é alterado pela infecção com WSSV, buscou-se identificar quais destes genes tinham uma expressão espacial compartilhada ou exclusiva nas/entre porções do intestino médio (**Figura 14**). Vinte e um genes se expressaram diferencialmente em pelo menos uma das três regiões, sendo 13 genes expressos na porção anterior (destes, 7 genes com expressão exclusiva nesta porção), 12 expressos na medial (4 com expressão exclusiva nesta porção) e 9 expressos na porção posterior (1 com expressão exclusiva neste porção) (**Figura 14**).

Os resultados revelaram que sete dos 13 genes expressos na porção anterior do IM, foram exclusivamente modulados nesta região (*Litvan* ALF-A, *Litvan* ALF-B, *Litvan* ALF-C, *Litvan* ALF-G, *Lv*DOME, *Lv*Dscam e *Lv*IAP3). Já na porção medial, quatro dos 12 genes foram exclusivamente modulados nesta região (*Lv*Sid1, *Lv*CLOT, *Lv*TGII e *Lv*HHAP), e por fim dos 9 genes diferencialmente expressos no intestino posterior, apenas um (1) foi exclusivo desta região (*Litvan* PEN 1/2). De maneira interessante, a expressão de 4 genes (*Litvan* PEN 4, *Lv*proPO1, *Lv*PPAE2 e *Lv* α 2M-2) foi encontrada simultaneamente nas três regiões do IM quando os camarões estavam infectados pelo WSSV (**Figura 14**).

Figura 14 – Diagrama de Venn indicando o número de genes associados ao sistema imune nas diferentes porções do intestino médio do camarão *Litopenaeus vannamei*

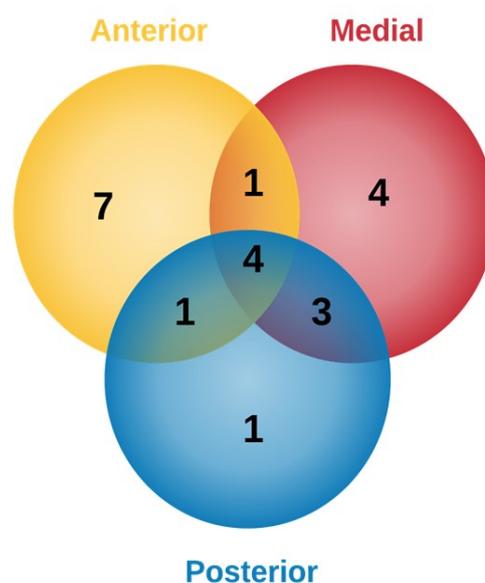
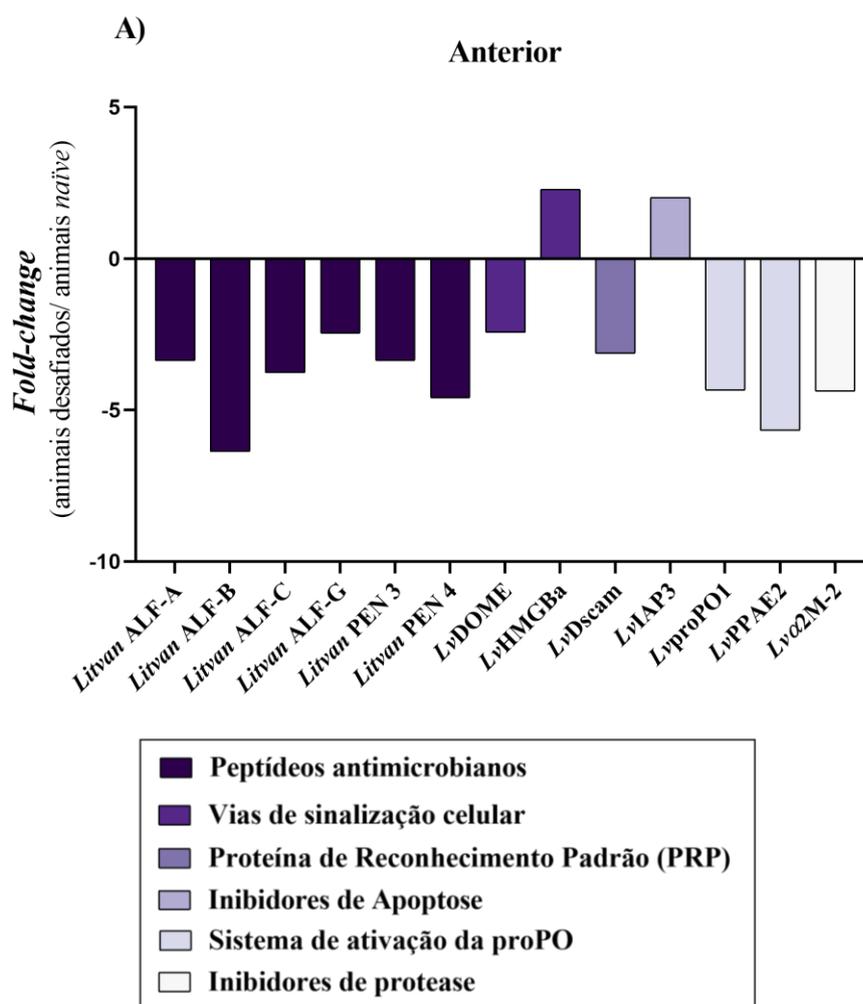


Figura 14. Diagrama de Venn (fora de escala) indicando o número de genes diferencialmente expressos nas diferentes porções (anterior, medial e posterior) do intestino médio de camarões desafiados com WSSV (48 h pós-desafio).

Entre as categorias funcionais diferencialmente expressas na porção anterior da animais infectados, destacaram-se os peptídeos antimicrobianos (6 de 10 genes avaliados), os das vias de sinalização celular (2 de 7 genes), proteínas de reconhecimento padrão (1 de 1 gene), inibidores de apoptose (1 de 1 gene), sistema de ativação da proPO (2 de 2 genes) e inibidores de proteases (1 de 2 genes). A grande maioria dos genes (11) foram regulados negativamente em presença do vírus, destacando-se os de maior nível de repressão o *Litvan* ALF-B (6,4x), *LvPPAE2* (5,7x), *Litvan* PEN 4 (4,6x), *Lv α 2M-2* (4,4x) e *LvproPO1* (4,3x). Outros quatro genes codificantes para peptídeos antimicrobianos foram reprimidos *Litvan* ALF-A (3,4x), *Litvan* ALF-C (3,8x), *Litvan* ALF-G (2,5x); *Litvan* PEN 3 (3,4x), além do *LvDOME* (2,4x) da via JAK/STAT e do *LvDscam* (3,1x), receptor da família de moléculas hipervariáveis. Adicionalmente, apenas dois genes modularam positivamente na porção anterior em presença do WSSV: o gene associado à alarminas *LvHMGBa* (2,3x) e o inibidor de apoptose, *LvIAP3* (2x) (**Figura 15A**).

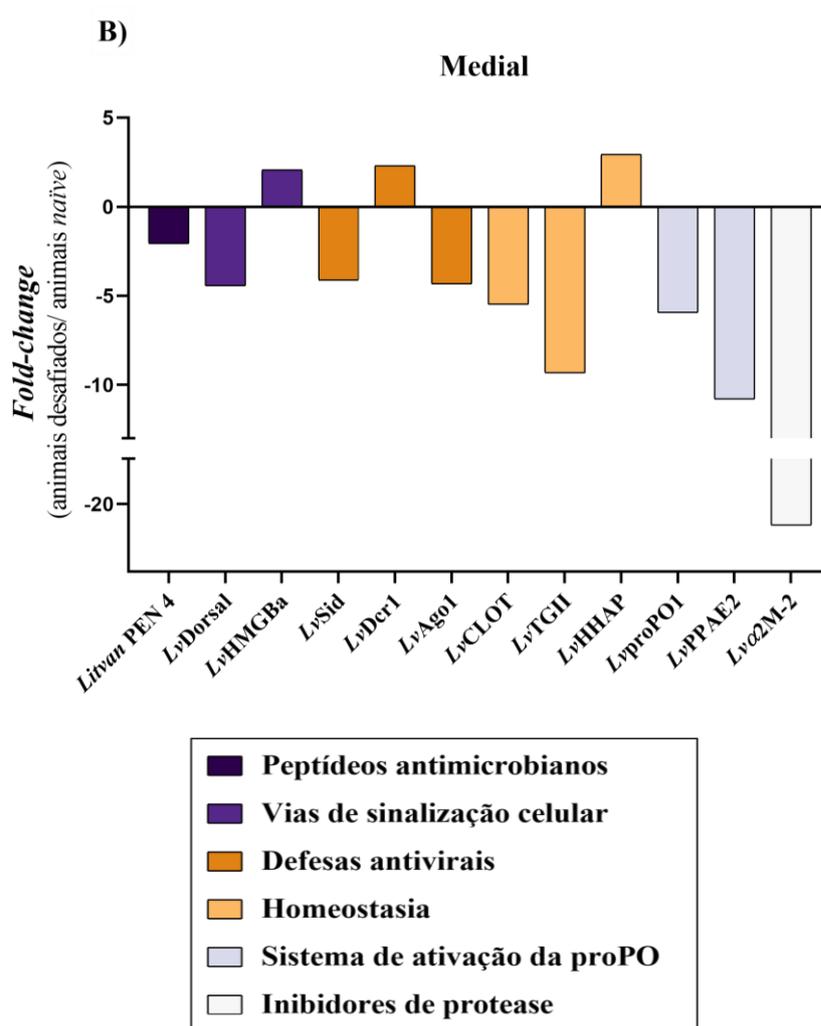
Figura 15. Diferenças nos níveis dos transcritos no intestino médio de camarões *L. vannamei* desafiados e não desafiados (*naïve*) com o WSSV. Os valores de expressão relativa estão apresentados como *fold-change* entre as médias das réplicas biológicas em cada porção do intestino médio (>2 -*fold-change*; teste *t* de *Student* não pareado, $P < 0,05$). Porção anterior (A), medial (B) e posterior (C).



Na região medial do intestino médio dos animais infectados, 12 genes de diferentes categorias funcionais mostraram-se diferencialmente expressos: peptídeos antimicrobianos (1), vias de sinalização celular (2), defesas antivirais (3), homeostasia (3), sistema de ativação da proPO (2) e inibidores de proteases (1). Destes, cinco transcritos tiveram sua expressão fortemente reprimida pela presença do WSSV no intestino médio: o *Lva2M-2* (21x), *LvPPAE2* (10,8x), *LvTGII* (9,3x), *LvproPO1* (5,9x) e *LvCLOT* (5,5x) (**Figura 15B**). Além

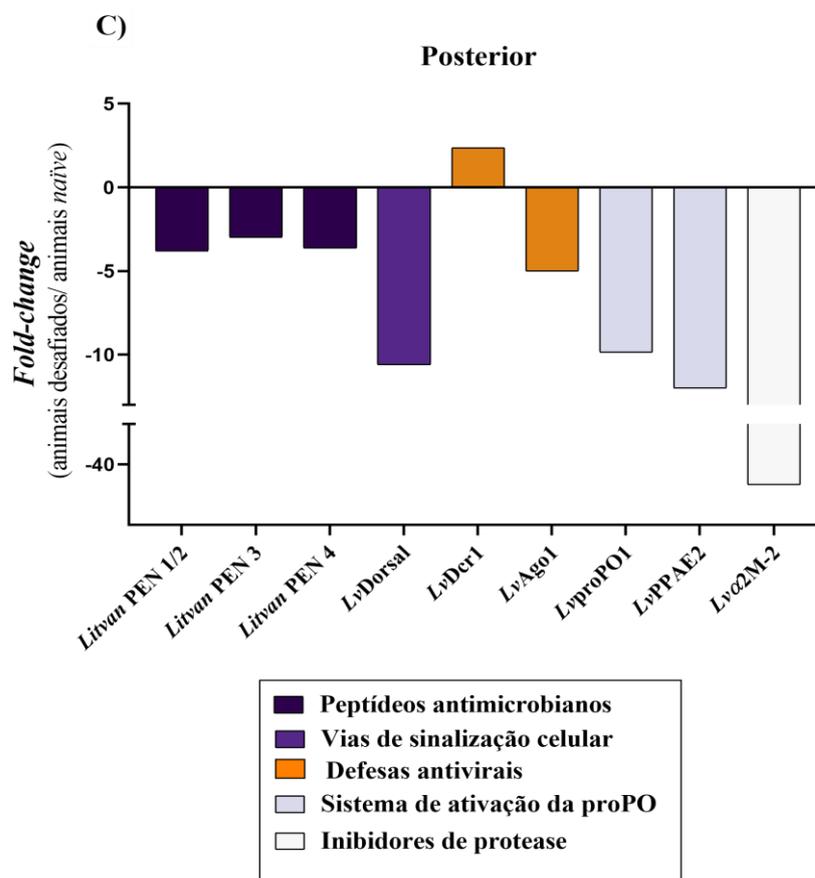
destes, outros genes foram reprimidos após 48h do desafio viral, como o *LvSid1* (4,1x) e *LvAgo1* (4,3x) do sistema RNAi, o gene pertencente a categoria de sinalização celular *LvDorsal* (4,4x) e o peptídeo antimicrobiano *Litvan* PEN4 (2x).

Por outro lado, apenas três genes foram modulados positivamente na porção medial associado à presença do WSSV: novamente o gene associado à alarminas, *LvHMGBa* (2x), o *LvDcr1* da via RNAi de defesa RNAi (2,3x) e o gene associado à homeostasia, *LvHHAP* (2,9x) (**Figura 15B**).



Por fim a última região do intestino médio avaliada, a posterior, apresentou um menor número de genes diferencialmente expressos (9) comparado às outras regiões. Contudo os maiores nível de repressão na expressão gênica foram encontrados nesta parte, destacando-se a modulação negativa de 41 vezes do gene *Lvα2M-2* (inibidor de proteases),

seguida pelo gene do sistema proPO, *LvPPAE2* (12x) e pelo fator de transcrição da via NF- κ B, *LvDorsal* (10,6x) (**Figura 15C**). A expressão de outros genes também foi reprimida de maneira importante, o gene pertencente ao sistema RNAi, *LvAgo1* (5x), seguida pelo gene do sistema proPO, *LvproPO1* (5,9x) e as peneidinas *Litvan* PEN 1/2 (3,8x), *Litvan* PEN 4 (3,6x) e *Litvan* PEN 3 (3x). Curiosamente, apenas um gene foi modulado positivamente pela presença do WSSV, o *LvDcr1* (2,3x) pertencente à categoria antiviral e ao sistema RNAi (**Figura 15C**).



Uma visão integrada destes resultados é apresentada pela **Figura 16**, onde 21 genes de oito categorias funcionais foram expressos de forma regionalizada no intestino médio de *L. vannamei* infectados pelo WSSV. Muitos deles foram expressos em mais de uma porção simultaneamente (**Figura 14**). A maioria dos genes ($n = 17$) teve a expressão reprimida pela presença do WSSV e apenas quatro genes foram modulados positivamente. Das categorias funcionais avaliadas, os genes pertencentes a três categorias associadas à endocitose, citocinas

e defesas antioxidantes não apresentaram alteração no seu perfil transcricional em função da infecção viral.

Figura 16. Perfil transcricional de genes diferencialmente expressos em cada porção do intestino médio de camarões *L. vannamei*, após 48 horas do desafio oral com o WSSV.

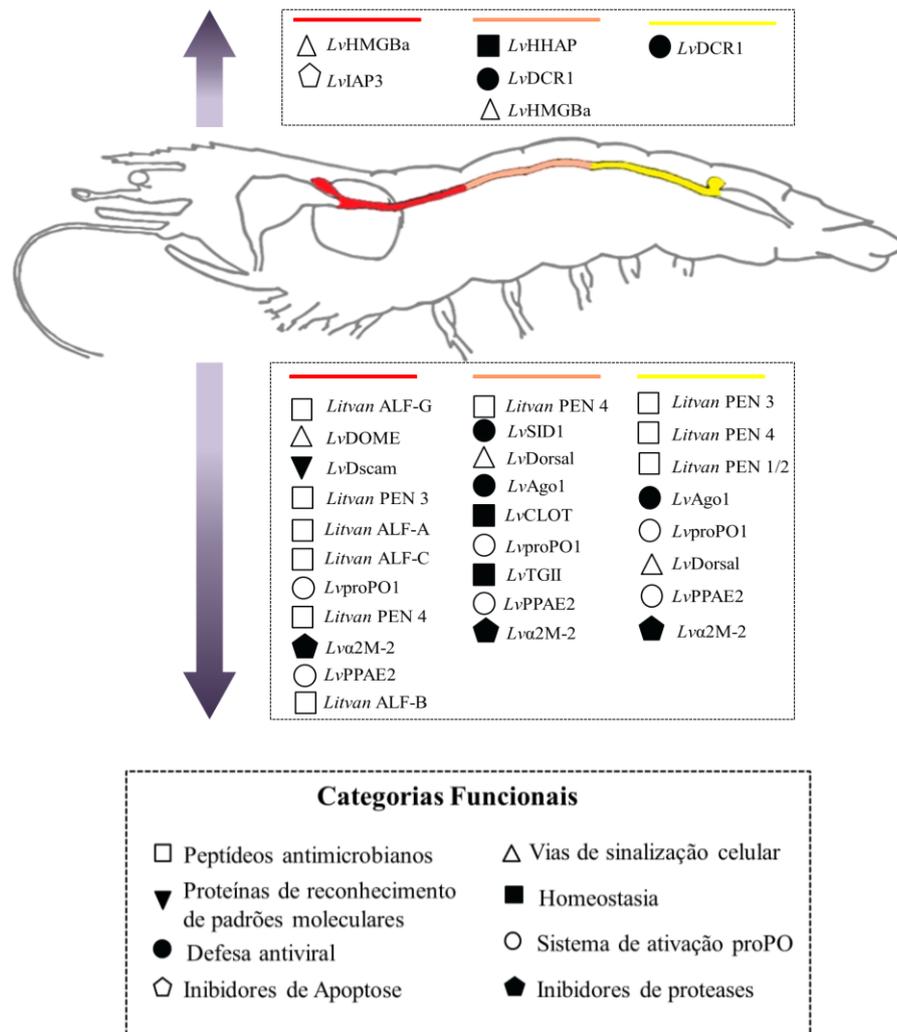


Figura 16. Esquema ilustrativo (fora de escala) de um camarão evidenciando o seu intestino médio setorizado nas porções anterior (vermelho), medial (rosa) e posterior (amarelo). Os genes diferencialmente expressos (>2 -fold-change; teste *t* de Student não pareado, $P < 0,05$) em cada porção e suas categorias funcionais respectivas, estão indicados em nível crescente de expressão pelo gradiente de cor das setas (baixa = lilás; alta = roxo). Na parte superior da imagem estão indicados os genes com expressão aumentada e, na parte inferior, os genes com expressão reprimida nos animais desafiados com WSSV em relação aos animais *naïve*.

5. DISCUSSÃO

Os camarões estão constantemente expostos a uma grande variedade de patógenos no ambiente aquático, como bactérias e vírus, que eventualmente podem representar uma ameaça para sua sobrevivência em ambientes confinados, como os cultivos. Desde que foi relatado pela primeira vez em 1992, o WSSV continua sendo o agente viral infeccioso mais ameaçador para os cultivos de camarões peneídeos (LIGHTNER *et al.*, 2012; THITAMADEE *et al.*, 2016).

Os estudos disponíveis que abordam os mecanismos moleculares dos camarões frente às infecções enfocam a expressão relativa de genes imunológicos em resposta a infecções microbianas, especialmente as causadas por bactérias do gênero *Vibrio* (YANG *et al.*, 2007; HONG *et al.*, 2009; SOONTHORNCHAI *et al.*, 2010, 2015; PONPRATEEP *et al.*, 2012, 2017; KOIWAI *et al.*, 2017; SILVEIRA *et al.*, 2018) e em resposta ao WSSV (LIU *et al.*, 2006; ROBALINO *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2002, 2007; RADHA, 2013; GONCALVES *et al.*, 2014; SILVEIRA *et al.*, 2018). Entretanto, a maioria destes trabalhos tem dado enfoque aos mecanismos de defesa associados à hemolinfa, permanecendo praticamente desconhecida a potencial imunidade intestinal nestes crustáceos e menos ainda, se esta imunidade pode estar associada a uma resposta diferencial por regiões do intestino médio, a exemplo dos insetos (DOMÍNGUEZ-BORBOR *et al.*, 2019).

Nos insetos, a porção posterior do intestino médio é responsável pela absorção de pequenos nutrientes e atua na regulação de genes associados à via IMD (*Immune Deficiency*) enquanto que o ventrículo anterior (estrutura semelhante ao ceco anterior) expressa principalmente os PAMs, em resposta a bactérias (CAPO; CHARROUX; ROYET, 2016). Nos decápodos, contudo, não há estudos desta natureza e sabe-se apenas que, na região anterior do intestino médio encontra-se uma pequena estrutura denominada “ceco anterior” que aparentemente está envolvida na produção de enzimas e manutenção do pH (MCGAW; CURTIS, 2013). E que na parte final, posterior, encontra-se o “ceco posterior” provavelmente associado à absorção de água e íons no IM. Ao nosso conhecimento, o presente estudo é o primeiro a trazer informações sobre a expressão regionalizada de genes associados à imunidade no intestino médio de um camarão peneídeo.

A expressão basal dos genes em animais saudáveis (*naïve*) foi de um modo geral, uniforme entre as porções do IM. Curiosamente, nenhum dos 37 genes avaliados foi majoritariamente expresso na porção posterior do IM. Na porção anterior, quatro genes foram

majoritariamente expressos, sendo eles relacionados à defesa antimicrobiana de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, os ALF-G (MATOS *et al.*, 2018) e antifúngica, as stylicinas 1 e 2 (ROLLAND *et al.*, 2010; FARIAS *et al.*, 2019). Estes resultados sugerem que, a exemplo dos insetos, esta porção do IM atue como uma barreira primária contra infecções microbianas. Efetivamente, a região anterior do intestino médio de *Drosophila* spp é reconhecidamente a porção em que a maioria dos PAMs são intensamente expressos, e deve atuar como uma barreira primária de defesa (BUCHON *et al.*, 2013).

Os PAMs são imunofatores importantes para a proteção dos organismos contra a invasão de patógenos, e em camarões, são produzidos pelos hemócitos. Atualmente são reconhecidas quatro famílias de PAMs: as peneidinas (DESTOUMIEUX *et al.*, 1997), os fatores anti-lipopolissacarídeos ou ALFs (GROSS *et al.*, 2001), as stylicinas (ROLLAND *et al.*, 2010) e as crustinas (BARTLETT *et al.*, 2002). Os ALFs são peptídeos antimicrobianos potentes e de amplo espectro. Por exemplo, os ALFs catiônicos do Grupo B são ativos contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, leveduras, fungos filamentosos e alguns vírus (ROSA; BARRACO, 2010). Por outro lado, os ALFs aniônicos do grupo D apresentam propriedades de ligação ao LPS prejudicadas e exibem atividade antimicrobiana muito baixa *in vitro* (ROSA *et al.*, 2013).

Além da expressão em hemócitos, a expressão de PAMs em tecidos epiteliais é considerada um importante mecanismo de defesa, em alguns invertebrados (DAVIS; ENGSTRÖM, 2012). Muito recentemente, um primeiro relato de expressão e detecção extra-hemocitária de um PAM de peneídeo foi publicado por Farias e colaboradores (2019). Nele, demonstrou-se que as stylicinas (1 e 2), além dos hemócitos, podem também ser expressas nas células epiteliais colunares do IM e no ceco anterior de *L. vannamei*. Nossos resultados corroboram esse achado de Farias e colaboradores (2019), onde encontramos expressão majoritária das stylicinas na porção anterior região do IM que inclui o ceco anterior.

Assim como observado para o PAMs, o gene codificante para um inibidor de apoptose (*LvIAP3*) foi mais expresso na parte anterior do IM. Possivelmente, estas moléculas estejam atuando em processos não relacionados à imunidade, mas à fisiologia do animal associada à regulação de apoptose.

De maneira interessante, o perfil transcricional da maioria dos genes avaliados (57%) foi modificado após 48 horas do desafio oral dos camarões com o WSSV. A grande maioria apresentou expressão reprimida no intestino médio, indo de níveis indetectáveis (*LvToll3*,

LvToll4 e *Lva2M-1*) a 41 vezes (*Lva2M-2*) em relação aos animais *naïve*. Contrariamente, alguns poucos genes (11%) modularam positivamente no IM em presença do WSSV (*LvHMGBa*, *LvIAP3*, *LvDcr1* e *LvHHAP*) (**Fig. 15**). A modulação negativa da expressão de muitos dos genes em período inicial da infecção (48h), poderia estar associada a mecanismos acionados pelo patógeno para reduzir as defesas imunológicas do hospedeiro e, assim, auxiliar no estabelecimento do processo infeccioso. Esta hipótese é corroborada pelo fato de imunofatores antimicrobianos, como quatro ALFs, terem tido expressão reprimida em até 6,4x na porção anterior do IM de animais desafiados. Interessantemente, ambos ALF-B e ALF-C são descritos na literatura como antimicrobianos associados à proteção contra infecções pelo WSSV [ALF-B (THARNTADA *et al.*, 2009) e ALF-B/ALF-C (PONPRATEEP *et al.*, 2012)].

No estudo de Tharntada e colaboradores (2009), a atividade antiviral do ALFPm3 (Grupo B) contra o WSSV foi analisada em culturas de células hematopoiéticas do lagostim *Pacifastacus leniusculus*, bem como em camarões vivos *P. monodon*. Os resultados mostraram claramente que injeções com o recombinante ALFPm3 foi capaz de reduzir a propagação do WSSV e prolongar a sobrevivência dos camarões. Outro estudo *in vivo* demonstrou também que o silenciamento pós-transcricional do ALFPm3 levava à morte do animal devido a um descontrole da microbiota (PONPRATEEP *et al.*, 2012). Esses achados em conjunto reforçam a idéia de que o ALF-B participe, de alguma forma ainda não elucidada, contra infecções pelo WSSV.

Em um estudo anterior do nosso grupo foi analisado no intestino médio de camarões *L. vannamei*, que após 48 horas de uma infecção sistêmica pelo WSSV, nenhum dos ALFs testados (A-D) tiveram sua expressão modulada (SILVEIRA *et al.*, 2018). Já nos animais aqui infectados pelo WSSV (via oral), alguns ALFs tiveram expressão reprimida (ALF-A, ALF-B, ALF-C e ALF-G). Estes resultados contrastantes entre os trabalhos podem ser devidos a diferenças metodológicas nos desafios oral e sistêmico, sendo possível que haja uma diferença na modulação relacionada à via de entrada do vírus. Efetivamente, uma modulação gênica diferencial relacionada à via de entrada do vírus já foi descrita em insetos (*Drosophila* spp) (FERREIRA *et al.*, 2014). Neste estudo ficou demonstrado que componentes da via de sinalização Toll participam na defesa antiviral contra o *Drosophila C virus* somente quando o patógeno infecta a mosca pela via oral e não pela via sistêmica.

Ademais, outros genes codificando para PAMs, as peneíginas (3 e 4), foram também reprimidos na porção anterior, além de outras regiões do IM quando os camarões estavam infectados pelo WSSV. Classicamente, essas peneíginas possuem atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e fungos filamentosos (DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2016). Essa família de PAMs é exclusiva de camarões da família Penaeidae e são constitutivamente expressas pelos hemócitos de *L. vannamei* (DESTOUMIEUX *et al.*, 1997). Até o momento não foi descrito nenhuma participação efetiva das peneíginas na defesa antiviral.

Além dos PAMs, os genes codificantes para o receptor Domeless (*LvDOME*) e para a proteína de reconhecimento padrão, Dscam (*LvDscam*), foram também reprimidos na porção anterior do IM, após 48 de desafio oral com o WSSV. O receptor Domeless (*LvDOME*) pertencente à via JAK/STAT já foi identificado no camarão *L. vannamei* (YAN *et al.*, 2015) e apresenta alta expressão em vários tecidos, incluindo o intestino. Após 48 horas da infecção via sistêmica com WSSV, registrou-se um aumento de expressão do gene no músculo dos animais (YAN *et al.*, 2015). Estes resultados contrastantes podem ser devido aos diferentes tecidos avaliados entre os trabalhos e a falta de um estudo que indique a expressão de DOME em células epiteliais.

Em nosso trabalho, o gene *LvDscam* teve sua expressão reprimida em presença do WSSV, no entanto, quando o vírus é ausente no IM de *L. vannamei*, a sua expressão pode aumentar até 4 vezes em camarões cultivados em água clara comparado aos cultivados em BFT (PILOTTO *et al.*, 2018). Em outro estudo, contrariamente aos nossos achados, o gene Dscam foi induzido nos hemócitos de *L. vannamei* infectados tanto pelo WSSV (CHIANG *et al.*, 2013), e por *Vibrio harveyi* (HUNG *et al.*, 2013). A expressão avaliada em tecidos diferentes (hemócitos x epitélio) pode ter sido o motivo de resultados diferentes entre os estudos com desafio.

Dois genes relacionados ao sistema de ativação proPO (*LvproPO1*, *LvPPAE2*) e um inibidor de protease (*Lv α 2M-2*) também foram reprimidos na porção anterior de animais desafiados com WSSV e similarmente nas outras partes do IM (medial e posterior). Curiosamente a expressão do *LvPPAE2* que tinha sido majoritária nas porções medial e posterior em camarões *naïve*, foi reprimida 10,8x e 12x respectivamente, nestas mesmas porções nos animais desafiados pelo vírus.

Sabe-se que em artrópodes, o processo de melanização é dependente da enzima fenoloxidase (PO), cuja ativação da sua forma zimógena (proPO) é mediada pelas enzimas ativadoras PPAEs (proPO-*activating enzymes*) (CERENIUS et al., 2010). Na via são transitoriamente geradas moléculas altamente citotóxicas que auxiliam na destruição dos patógenos invasores (BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2014), e a expressão reprimida das PPAEs poderia diminuir a capacidade do hospedeiro em responder à infecção viral. Estudos atuais sugerem que a PPAE2 contribua na defesa contra bactérias (QIAO et al., 2015), mas não há nada na literatura que relate este gene sendo associado à defesa contra o WSSV. Em um trabalho de Wang e colaboradores (2006), sinais de expressão da proPO foram detectados em células hemocitárias pela técnica de hibridização *in situ* e confirmadas por RT-PCR. Em *P. monodon*, a proPO foi detectada no hepatopâncreas e no intestino médio (SOONTHORNCHAI et al., 2010) e em *L. vannamei* observada no estômago, intestino médio e intestino posterior, sendo mais expresso no hepatopâncreas (SILVEIRA et al., 2018).

O potencial envolvimento dessas moléculas nas respostas antivirais permanece amplamente desconhecido. Estudos anteriores também mostraram uma regulação negativa dos genes proPO sobre o WSSV. Em um destes estudos, dois genes proPO foram isolados a partir de hemócitos de camarões *L. vannamei* proPO1 (LAI et al., 2005) e proPO2 (AI et al., 2009), nestes foi possível observar que quando os animais são infectados sistemicamente com WSSV, os níveis de ambas proPO também são regulados para baixo (AI et al., 2008; 2009), corroborando com nossos resultados. Em outro trabalho, após silenciamento da proPO1 ou proPO2 um aumento na suscetibilidade dos camarões a infecções bacterianas foi observado (AMPARYUP et al., 2009).

Muito dos efetores antimicrobianos dos camarões são produzidos principalmente nos hemócitos, a partir dos resultados é possível sugerir que houve uma redução significativa de hemócitos circulantes no intestino médio dos animais infectados com WSSV. Existe uma importância na comunicação de hemócitos infiltrantes e a imunidade relacionada ao intestino em camarões como descrito anteriormente (SILVEIRA et al., 2018).

Sabe-se que o sistema proPO deve ser estritamente regulado para evitar uma melanização generalizada no organismo do crustáceo. Para isso, os animais contam com inibidores plasmáticos de proteases, como a α 2-macroglobulina (α 2M) (HERGENHAHN; HALL; SODERHÄLL, 1988). A α 2M é uma glicoproteína plasmática abundantemente

expressa pelos hemócitos, altamente regulada após injúrias no animal e infecções microbianas (ARMSTRONG *et al.*, 2006; PERAZZOLO *et al.*, 2011).

Durante a infecção do hospedeiro, as proteases produzidas por patógenos podem atuar como importantes fatores de virulência, permitindo a invasão de patógenos por meio de tegumentos do hospedeiro e atuando como toxinas ou superestimulando as defesas imunológicas do hospedeiro. Por sua vez, o hospedeiro produz inibidores de protease que inativam e eliminam os fatores de virulência da protease produzidos pelos invasores (ARMSTRONG *et al.*, 2006).

Neste trabalho avaliamos a expressão de dois genes codificando α 2Ms (1 e 2), e, curiosamente, o *Lva2M-1* foi expresso em todas as porções do intestino dos animais *naïve*, não sendo porém quantificável nos animais infectados pelo WSSV. Corroborando com nosso resultado, Silveira e colaboradores (2018) relataram uma expressão não quantificável deste gene no intestino médio de *L. vannamei* estimulados por *V. harveyi*. Contudo, o *Lva2M-2* foi majoritariamente expresso nas porções anterior e medial de animais *naïve* e, após 48h de infecção oral pelo WSSV, registrou uma repressão crescente na expressão chegando a 41x na porção posterior do IM. Em outro estudo, Gonçalves e colaboradores (2014) relatam que o *Lva2M-2* modulou positivamente após 24 h de uma infecção sistêmica com WSSV, voltando aos níveis basais nas 48 h.

A forte repressão detectada no presente estudo, na expressão de um gene reconhecidamente hemocitário (PERAZZOLO *et al.*, 2011), indica que a quantidade de hemócitos infiltrantes no IM dos animais infectados com o WSSV deva ter sido drasticamente reduzida em decorrência destas células servirem para a replicação viral e/ou atuando na defesa contra o vírus.

Em relação aos genes que tiveram expressão aumentada em função da presença do WSSV na parte anterior do IM, destacam-se aquele codificante para o inibidor de apoptose *LvIAP3*, cuja expressão duplicou comparado aos animais *naïve*. Em *L. vannamei* existem três proteínas inibitórias de apoptose, sendo que IAP1 e IAP3 participariam na defesa contra o WSSV, enquanto que a IAP2 participaria na regulação das peneidinas, lisozimas, crustinas e ALFs (WANG *et al.*, 2013; KULKARNI *et al.*, 2014). O aumento de expressão desta IAP em camarões desafiados com o WSSV pode estar associado a uma inibição da apoptose do hospedeiro induzida precocemente pelo vírus. Sabe-se que muitos vírus desenvolveram mecanismos para inibir ou retardar o processo apoptótico do hospedeiro, como forma de

evitar uma resposta antiviral precoce e garantir a sua replicação (ROULSTON; MARCELLUS; BRANTON, 1999).

Sabe-se que os genes virais, como os codificados pelo WSSV são classificados em três fases sequenciais de expressão, considerando o processo infeccioso: fase muito precoce (IE), inicial (E) e fase tardia (L) (SÁNCHEZ-PAZ, 2010). O WSSV codifica genes IE para proteínas anti-apoptóticas, denominados WSV449 e WSV222 já sendo demonstrado que há bloqueio da apoptose em peneídeos associado à expressão destes genes virais (LEU *et al.*, 2009). Após a replicação do WSSV ter sido efetuada nas células, o patógeno para se propagar ativa o gene viral L, pró-apoptótico WSV230 (*icp11*) que induz uma apoptose tardia no camarão, levando à forte disseminação da progênie viral (BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). Em nosso estudo, o aumento dos níveis de transcritos *LvIAP3* não foi muito expressivo (2x) em 48h após infecção e, talvez, se tivesse sido avaliado em período anterior teríamos detectado uma expressão mais alta, indicando inibição da apoptose em estágio inicial da infecção, o que favorece o estabelecimento da infecção pelo WSSV.

Outra gene que apresentou diferenças de expressão em animais desafiados com WSSV, com aumento nos níveis transcricionais nas regiões anterior e medial do IM, foi um gene *LvHMGBa* que codifica para uma “alarmina” HMGBa. As alarminas são prontamente liberadas para sinalizar estresse ou dano às células ou tecidos durante infecções, da classe das DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*). Em vertebrados, a HMGB1 é uma alarmina prototípica que ativa a imunidade inata e possui uma função de alarme duplo. A proteína pode ser emitida para alertar as células adjacentes sobre a homeostase em perigo da célula liberadora de HMGB1 (ANDERSSON; YANG; HARRIS, 2018).

Em camarões *L. vannamei* foram clonados dois genes HMGB, *LvHMGBa* e *LvHMGBb* e, aparentemente, ambos interagem com proteínas envolvidas em vias imunológicas de sinalização intracelular, tais como o *LvSTAT* e *LvDorsal* (CHEN *et al.*, 2011). Em um trabalho recente foi possível observar a expressão de HMGBa no hepatopâncreas, intestino posterior e intestino médio de *L. vannamei* (SILVEIRA *et al.*, 2018). Em outro estudo a HMGBa foi induzida no hepatopâncreas de camarões desafiados com o WSSV atingindo valores máximos em 24h e voltando ao basal em 72 h (CHEN *et al.*, 2011). Esses resultados em conjunto sugerem que a expressão deste gene tenha sido induzida para “alertar” o sistema imune do camarão da presença do WSSV no intestino médio.

Assim como observado na porção anterior do IM, na porção medial a maior parte dos genes apresentou modulação negativa em camarões infectados pelo WSSV. O *LvDorsal* foi o único gene associado à via Toll que foi fortemente reprimido na porção medial e posterior, após 48 horas do desafio oral com o WSSV. Em insetos, sabe-se que o papel da via Toll na resistência a vírus em *D. melanogaster* é restrito à infecção oral, uma vez que não foi observada ativação desta via quando associado à infecção sistêmica. Quando investigado o papel desta via na resistência à infecção viral oral em *D. melanogaster* ficou evidenciado que vários componentes da via Toll, incluindo Spaetzle, Toll, Pelle e o fator de transcrição Dorsal do tipo NF-kB, são necessários para resistir à infecção oral pelo vírus *Drosophila C* (FERREIRA *et al.*, 2014). A partir do que se conhece com insetos e os resultados obtidos neste trabalho, sugere que *LvDorsal* e outros genes pertencente à via Toll, possa estar associado à defesa antiviral e à via de entrada do vírus em camarões. Maiores estudos são necessários para elucidar esta hipótese.

Em um estudo anterior com *L. vannamei*, a expressão de *LvDorsal* em brânquias após 48 horas de desafio com WSSV foi modulada negativamente 7,3x em relação ao grupo controle (ENCINAS-GARCIA *et al.*, 2019), sugerindo que o WSSV module este gene e outros pertencentes a via Toll para poder facilitar na replicação viral.

Surpreendentemente, a categoria funcional associada à homeostasia entra em evidência apenas na porção medial do IM, registrando repressão nos genes associados à coagulação da hemolinfa, *LvClot* e transglutaminase *LvTGII* e aumento dos níveis do gene associado à homeostasia *LvHHAP*. Em crustáceos, a coagulação da hemolinfa é resultante de ligações entre proteínas de coagulação (clot) mediadas pelas enzimas Ca-dependentes, transglutaminase (TG) (DURLIAT *et al.*, 1985). 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 e disseminação de patógenos, por ocasião de injúrias no meio aquático (LORAND & CONRAND, 1984).

Um estudo anterior feito por nosso grupo, o *LvClot* foi identificado como sendo um gene marcador de morte iminente em *L. vannamei* por dois patógenos: WSSV e pelo fungo *Fusarium solani* (GONCALVES *et al.*, 2014), uma vez que sua expressão é fortemente reduzida em animais em morte eminente advinda de infecções com doses letais por um destes dois patógenos. Embora os animais do presente estudo não estivessem em risco de morte

eminente, os genes *LvClot* e *LvTGII* também foram modulados negativamente, podendo sugerir que a modulação está associada efetivamente à infecção pelo WSSV.

Os genes codificantes para a transglutaminase (TG) tiveram também sua expressão aumentada no intestino de camarões infectados com o *V. parahaemolyticus* (Qi, *et al.*, 2017) o que demonstra que esses genes realmente parecem responder tanto à presença de patógenos, o que é contraditório ao nosso resultado, podendo sugerir que as transglutaminase tenha uma atividade antimicrobiana limitada e que maiores estudos para elucidar esta questão são necessários.

A HHAP é reconhecida como sendo uma proteína associada à homeostasia de hemócitos durante infecções virais através da inibição da apoptose em camarões pela potencial interação com um efetor de caspase (APITANYASAI *et al.*, 2015). Juntamente com o *LvIAP3*, os níveis de transcritos *LvHHAP* aumentaram em função do WSSV, podendo inferir que a apoptose nestes animais estaria, neste momento da infecção (48h), potencialmente inibida.

Alguns genes relacionados às defesas antivirais também foram inicialmente detectados (expressão) na porção medial do intestino médio dos camarões infectados com WSSV, no presente estudo. Os três genes que apresentaram alguma modulação foram (*LvSid-1*, *LvAgo-1* e *LvDcr1*) associados à via de RNAi. O gene *LvSid-1* foi reprimido exclusivamente na região medial, enquanto o *LvAgo-1* foi reprimido na região medial e posterior. Por fim, transcritos para a DICER 1 foram induzidos nas porções medial e posterior do IM.

O sistema de RNA de interferência (RNAi) representa um antigo e bem preservado mecanismo de defesa natural contra vírus e transposons, presente em todos organismos multicelulares (HANNON, 2002). Este sistema destaca-se por sua relevância na defesa antiviral dos artrópodes, sendo ativado nos invertebrados por RNAs dupla fita (dsRNA) produzidos pelos vírus durante a sua replicação no hospedeiro. Sua ação é baseada no silenciamento gênico pós-transcricional (HANNON, 2002; ROBALINO *et al.*, 2007).

O primeiro relato de defesa antiviral em camarões foi descrito por Robalino e colaboradores (2005) e muitos estudos posteriores se seguiram (ROBALINO *et al.*, 2007; ALIYARI; DING, 2009; OBBARD *et al.*, 2009; GUERTLER *et al.*, 2013). 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 camarões, sabe-se que longas moléculas exógenas de dsRNA podem ser internalizadas para o citoplasma através de canais proteicos de transmembrana denominados Sid-1 e sinalizar para a ativação do RNAi (LABREUCHE *et al.*, 2010). Em *L. vannamei*, a Sid-1 foi identificada, cujos níveis de transcritos aumentaram após injeções com dsRNA de sequência não-específica, sugerindo assim que a captação de dsRNAs pelas células de camarão deve ocorrer via Sid-1, como um exemplo de outros invertebrados (BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). Contudo o vírus não ultrapassa a membrana celular pela Sid-1, o que indica a redução deste gene durante a infecção viral, como ocorreu no presente estudo.

Nos crustáceos, a Dicer-1 está envolvida não apenas na via RNAi, mas também na maturação de microRNAs (miRNAs), uma categoria extensa de pequenos RNAs não codificantes envolvidos na regulação de quase todos os processos vitais. Os miRNAs desempenham papéis importantes na regulação endógena de genes no nível pós-transcricional e nas respostas antivirais dos crustáceos (HE *et al.*, 2015). Além disso, o gene Dicer-1 também mostrou ser um componente importante da biogênese do miRNA de camarão durante infecções por WSSV responsável por inibir a replicação do vírus (HUANG; ZHANG, 2012).

No presente estudo, o aumento de expressão do gene codificante para Dcr-1 após 48 horas da infecção com WSSV possa estar envolvido no processo de maturação de microRNAs (miRNAs), auxiliando possivelmente nas respostas antivirais. Em um estudo anterior, foi demonstrado que o gene Ago1 do hospedeiro interage com um miRNA viral (WSSV-miR197), sugerindo que esta interação possa bloquear as respostas antivirais (HUANG; ZHANG, 2012).

Finalmente na região posterior do IM o único gene que foi reprimido apenas nesta porção do intestino de *L. vannamei* quando infectados pelo WSSV, foi o *LvPEN1/2*. A proteína possui atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e fungos filamentosos (DESTOUMIEUX-GARZÓN *et al.*, 2016). Apesar de ausência de informações na literatura que apresente a expressão destes peptídeos durante uma infecção viral, a constante modulação em diferentes porções do IM, sugere que esta família possa estar

envolvida de alguma forma nos mecanismos de defesa do camarão durante uma infecção viral por WSSV.

Outro resultado aqui obtido foi à expressão basal de genes pertencentes à via Toll ser diferencial entre as regiões do IM (animais *naïve*). O gene *LvToll3* apresentou uma expressão maior na região medial e posterior do intestino médio de animais *naïves*. Contudo, após desafio com WSSV esse gene não foi mais quantificável, no IM dos animais tamanha foi a repressão ao nível transcricional. A via de sinalização Toll em insetos realiza um importante papel na resposta a infecções contra bactérias Gram-positivas e fungos (TASSANAKAJON *et al.*, 2018).

Em um estudo anterior com o *L. vannamei*, os autores sugeriram que as vias Toll e IMD são ativadas (*LvToll* 1-3) quando os animais são desafiados com WSSV. Estas vias estariam envolvidas na indução da expressão de PAMs (WANG *et al.*, 2012). A diferença contrastante entre os resultados pode ser pelo tempo de avaliação pós-desafio e pela via de entrada do WSSV. No estudo de Wang e colaboradores (2012), *LvToll3* foi regulado positivamente às 3 e 12 horas após a injeção, em nosso estudo avaliamos somente o tempo de 48 horas que mostrou uma repressão tanto em *LvToll3* quanto em alguns peptídeos antimicrobianos, podendo sugerir ainda que a via toll regula a expressão de alguns PAMs.

Em um relato recente, a expressão gênica de *LvToll3* diminuiu 4,4x após 48 horas em brânquias de *L. vannamei* (ENCINAS-GARCIA *et al.*, 2019). Apesar da defesa contra a infecção bacteriana da via de sinalização Toll já estar bem estabelecida nos camarões, ainda é desconhecida a maneira como essa via responde à infecção viral.

Em uma pesquisa recente de Li e colaboradores (2018) um novo Toll foi encontrado sendo expresso no intestino de camarões *L. vannamei*, denominado *LvToll4*. Os autores observaram que este gene juntamente com o *LvDorsal* participam da defesa contra o WSSV, induzindo a produção de alguns PAMs. Em nosso estudo, o gene *LvToll4* foi majoritariamente expresso nas regiões anterior e medial do intestino médio de camarões *naïve*, porém foi reprimido a níveis não quantificáveis em presença do WSSV, semelhante ao observado com o *LvToll3*. Possivelmente, o WSSV altere a expressão de componentes da via Toll em camarões para promover sua replicação.

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstraram a existência de uma expressão diferencial e espacial de genes relacionados à imunidade no intestino médio de juvenis *L. vannamei*. Após 48 horas de desafio oral com WSSV, a grande maioria dos

transcritos (17 genes) tiveram a expressão reprimida e alguns poucos (4 genes) induzida, em pelo menos uma das porções do intestino médio (anterior, medial e posterior). Trabalhos futuros são requeridos para elucidar melhor as interações entre os mecanismos e a imunidade associada ao epitélio intestinal.

CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que a expressão de vários transcritos associados ao sistema imune de *Litopenaeus vannamei* é regionalizada e diferencial em três porções do intestino médio (anterior, medial e posterior). A expressão da maior parte dos genes avaliados foi negativamente modulada em resposta à infecção viral (48 h pós desafio oral) em pelo menos uma das regiões, chegando a repressão não quantificável de genes associados a vias de sinalização e inibidor de proteases. Entre as três regiões a anterior teve modulação em um maior número de genes, seguida pela porção medial e posterior. As categorias gênicas funcionais que foram moduladas em presença do vírus exclusivamente em uma única parte do IM, foram na região anterior os fatores anti-lipopolissacarídeos (ALFs) que compõem uma família de peptídeos antimicrobianos e na região medial genes relacionados à categoria funcional de homeostasia. A via de entrada do WSSV no camarão não promoveu mudanças relevantes no perfil da maioria dos transcritos avaliados no intestino médio, apesar de a via *per os* estar associada à modulação negativa em maior número de genes, quando comparado à via sistêmica.

Como perspectivas para estudos futuros, seria interessante realizar inicialmente análise de hibridização *in situ* e/ou imunohistoquímica para determinar o sítio específico de expressão dos genes modulados neste trabalho. Outra análise seria avaliar morfológicamente as regiões do intestino médio e quantificar a microbiota endobionte, para determinar o limite das regiões e se estas apresentam outras subdivisões. Também, poderia ser estudado, outros tempos pós-infecção para avaliar a expressão gênica, bem como outros genes associados ao sistema imune. De posse destes resultados, estudos com genômica funcional devem ser realizados, avaliando o silenciamento de genes endógenos para elucidar o seu papel na imunidade intestinal dos camarões frente ao desafio por WSSV.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LITCHMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 8^o ed. Saunders, 2015.
- ABCC, Associação Brasileira de Criadores de Camarões Marinhos. **Produção brasileira de camarão cultivado por estado: dados reais de 2015**. 2016.
- AI, H. S. *et al.* Characterization of a prophenoloxidase from hemocytes of the shrimp *Litopenaeus vannamei* that is down-regulated by white spot syndrome virus. **Fish and Shellfish Immunology** 25: 28-39, 2008.
- AI, H. S. *et al.* A novel prophenoloxidase 2 exists in shrimp hemocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, n. 1, p. 59–68, 2009.
- ALDAY-SANZ, V. Specific Pathogen Free (SPF), Specific Pathogen Resistant (SPR) and Specific Pathogen Tolerant (SPT) as Part of the Biosecurity Strategy for Whiteleg Shrimp (*Penaeus vannamei* Boone, 1931). **Asian fisheries science**, p. 112–120, 2018.
- ALIYARI, R.; DING, S. W. RNA-based viral immunity initiated by the Dicer family of host immune receptors. **Immunological Reviews** , v.227, p.176-188, 2009.
- AMPARYUP, P.; CHAROENSAPSRI, W.; TASSANAKAJON, A Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, p.247-56, 2009.
- AMPARYUP, P.; CHAROENSAPSRI, W.; TASSANAKAJON, A. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 34, n. 4, p. 990–1001, 2013.
- ANDERSSON, U.; YANG, H.; HARRIS, H. High-mobility group box 1 protein (HMGB1) operates as an alarmin outside as well as inside cells. **Seminars in Immunology**, v. 38, n. November 2017, p. 40–48, 2018.
- ARMITAGE, S. A. O.; PEUSS, R.; KURTZ, J. Dscam and pancrustacean immune memory - A review of the evidence. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 48, n. 2, p. 315–323, 2015.
- ARMSTRONG, P. B. Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. **Immunobiology**, 2006.
- APITANYASAI, K. *et al.* Role of *Penaeus monodon* hemocyte homeostasis associated protein (PmHHAP) in regulation of caspase-mediated apoptosis, **Developmental & Comparative Immunology**, v. 53,2015.
- ARTS, J. A. J. *et al.* Haemocyte reactions in WSSV immersion infected *Penaeus monodon*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, n. 1, p. 164–170, 2007.
- BACHÈRE, E.; DESTOUMIEUX, D.; BULET, P. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: A comparison with other effectors of innate immunity. **Aquaculture**, v. 191, n. 1–3,

p. 71–88, 2000.

BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Avances en la Inmunología del Camarón. **Guía Práctica - Patología e Inmología de Camarones Penaeidos**. p. 237–304, 2014.

BARTLETT, T., *et al.* Crustins, Homologues of an 11.5-kDa Antibacterial Peptide, from Two Species of Penaeid Shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. **Marine Biotechnology**. v. 4, 278–293, 2002.

BERGH, O. *et al.* High abundance of viruses found in aquatic environments. **Nature**, v. 340, n. 6233, p. 467–468, 1989.

BLAYLOCK, R. B.; CURRAN, S. S.; LOTZ, J. M. White spot syndrome virus (WSSV) in cultured juvenile blue crabs *Callinectes sapidus*: Oral versus injection exposure, and feeding frequency effects. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 133, n. 2, p. 147–156, 2019.

BOSCO-DRAYON, V. *et al.* Peptidoglycan Sensing by the Receptor PGRP-LE in the *Drosophila* Gut Induces Immune Responses to Infectious Bacteria and Tolerance to Microbiota. **Cell Host & Microbe**, v.12, p.153–165, 2012.

BRIGGS, M. *et al.* Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific, **FAO**, 2004.

BRITES, D. *et al.* The Dscam homologue of the crustacean *Daphnia* is diversified by alternative splicing like in insects. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 7, p. 1429–1439, 2008.

BUCHON, N. *et al.* Morphological and Molecular Characterization of Adult Midgut Compartmentalization in *Drosophila*. **Cell Reports**, v. 3, p. 1725–1738, 2013.

BUCHON, N.; OSMAN, D. All for one and one for all: Regionalization of the *Drosophila* intestine. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 67, p. 2–8, 2015.

BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CANTELLI, L. *et al.* Dietary supplementation with sulfated polysaccharides from *Gracilaria birdiae* promotes a delayed immunostimulation in marine shrimp challenged by the white spot syndrome virus. **Aquaculture International**, v. 27, n. 2, p. 349–367, 2019.

CAPO, F.; CHARROUX, B.; ROYET, J. Bacteria sensing mechanisms in *Drosophila* gut: Local and systemic consequences. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 64, p. 11–21, 2016.

CAPO, F.; WILSON, A.; CARA, F. DI. The Intestine of *Drosophila melanogaster*: An Emerging Versatile Model System to Study Intestinal Epithelial Homeostasis and Host-Microbial Interactions in Humans. **Microorganisms**. n. 7, 2019.

CERENIUS, L. *et al.* Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity.

Trends Biochem Sci. v. 35, p. 575–583, 2010.

CHANG, P.S.; LO, C.F.; WANG, Y.C. Identification of white spot syndrome virus associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. **Diseases of Aquatic Organisms**, n. 27, p. 131–139, 1996.

CHEN, Y. H. *et al.* Two *Litopenaeus vannamei* HMGB proteins interact with transcription factors LvSTAT and LvDorsal to activate the promoter of white spot syndrome virus immediate-early gene ie. **Molecular Immunology**, v. 48, n. 5, p. 793–799, 2011.

CHIANG, Y.A. *et al.* Shrimp Dscam and its cytoplasmic tail splicing activator serine/arginine (SR)-rich protein B52 were both induced after white spot syndrome virus challenge. **Fish Shellfish Immunol.** V. 34, 2013.

CHOU HSIN-YIU *et al.* Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 23, n. 3, p. 165–173, 1995.

CONKLIN, D. E. Digestive Physiology and Nutrition, **Biology of the Lobster**, Academic Press, p. 441-463, 1995.

CORTEEL, M. *et al.* Molt stage and cuticle damage influence white spot syndrome virus immersion infection in penaeid shrimp. **Veterinary Microbiology journal**, v. 137, p. 209–216, 2009.

DALL, W. ; MORIARTY, D. J. W. Nutrition and digestion. **Internal Anatomy and Physiological regulations.** v. 5 p. 215–261, 1983.

DAVIS, M. M.; ENGSTRÖM, Y. Immune response in the barrier epithelia: lessons from the fruit fly *drosophila melanogaster*. **Journal of innate immunity**, v. 4, n. 3, p. 273–283, 2012.

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

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. *et al.* Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp penaeus penaeidins , a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (decapoda). **Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 45, p. 28398–28406, 1997.

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

DIMITRIADIS, V.K. Fine structure of the midgut of adult *Drosophila auraria* and its relationship to the sites of acidophilic secretion. **Journal of Insect Physiology**, v. 37, n. 3, p. 167-177, 1991.

DOMÍNGUEZ-BORBOR, C. *et al.* An effective white spot syndrome virus challenge test for

cultured shrimp using different biomass of the infected papilla. **MethodsX**, v. 6, p. 1617–1626, 2019.

DONG, Y.; TAYLOR, H. E.; DIMOPOULOS, G. AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. **PLoS Biology**, v. 4, n. 7, p. 1137–1146, 2006.

DUBREUIL, R.R. Copper cells and stomach acid secretion in the *Drosophila* midgut. **Int J Biochem Cell Biol.** v.36, n. 5, p.745-52, 2004.

DURAND, S. *et al.* Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). **Disease of Aquatic Organisms**, v. 29, n. 3, p. 205–211, 1997.

DURLIAT, M. Clotting Processes in Crustacea Decapoda, **Biol. Rev.**, v.60 , p. 473-498, 1985.

EGAN, S.; GARDINER, M. Microbial dysbiosis: Rethinking disease in marine ecosystems. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUN, p. 1–8, 2016.

ENCINAS-GARCÍA, T. *et al.* White spot syndrome virus down-regulates expression of histones H2A and H4 of *Penaeus vannamei* to promote viral replication. **Dis Aquat Org**, v.137, p.73-79. 2019.

EPAGRI. Síntese Informativa da Maricultura 2017. **Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca**, p. 1–8, 2018.

ESCOBEDO-BONILLA, C. M. *et al.* In vivo titration of white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* by intramuscular and oral routes. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 66, n. 2, p. 163–170, 2005.

ESCOBEDO-BONILLA, C. M. *et al.* Standardized white spot syndrome virus (WSSV) inoculation procedures for intramuscular or oral routes. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 68, n. 3, p. 181–188, 2006.

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

ERKOSAR, B.; LEULIER, F. Transient adult microbiota, gut homeostasis and longevity: Novel insights from the *Drosophila* model. **FEBS Lett**, p.4250–4257, 2014.

FARIAS, N. D. *et al.* *Litopenaeus vannamei* stylicins are constitutively produced by hemocytes and intestinal cells and are differentially modulated upon infections. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 86, p. 82-92, 2019.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. **FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nation** v. 35, p. 227, 2018.

FERREIRA, G. *et al.* The Toll-Dorsal Pathway Is Required for Resistance to Viral Oral Infection in *Drosophila*. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 12, 2014.

- GITTERLE, T. *et al.* Optimization of experimental infection protocols for the estimation of genetic parameters of resistance to White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. **Aquaculture**, v. 261, n. 2, p. 501–509, 2006.
- GONCALVES, P. *et al.* Molecular signatures at imminent death: Hemocyte gene expression profiling of shrimp succumbing to viral and fungal infections. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 42, n. 2, p. 294–301, 2014.
- GUANÍ-GUERRA, E. *et al.* Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. **Clinical Immunology**, v. 135, n. 1, p. 1–11, 2010.
- GUERRELHAS, A. C.B.; TEIXEIRA, A. P. G. Panorama da situação da mancha branca no nordeste. **Panorama da aquicultura**, v. ed. 129, 2012.
- GUERTLER, C. *et al.* Hemograma e sobrevivência de camarões marinhos após silenciamento do WSSV por RNA de interferência. **Pesq. Agropec. Bras**, v.48, n.8, p.983-990, 2013.
- GIBSON, R.; BARKER, P. The decapod hepatopancreas. **Oceanography and marine biology**. v. 17, p. 285, 1979.
- GORDOM, I.; GREEN, J. **Crustacean. Encyclopædia Britannica**, 2018. Disponível em: <<https://www.britannica.com/animal/crustacean>> Acesso em: Access Date:30 de abril de 2020.
- GUILLAUME, J.; CECCALDI, H. J. Physiologie digestive des crevettes. **Nutrition et alimentation des poissons et crustacés**, n. 15, p. 297–312,1999.
- GROSS, P. S. *et al.* Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the atlantic white shrimp, *L. setiferus*. **Developmental & comparative immunology**, 2001. v. 25, n. 7, p. 565–577.
- HANNON, G. J. RNA interference. **Nature**, v. 418, p. 244–251, 2002.
- HAN-CHING, W. K. C. *et al.* RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (*LvToll*) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, n. 1, p. 49–58, 2010.
- HE, Y. *et al.* Roles of small RNAs in the immune defense mechanisms of crustaceans. **Mol. Immunol.** v. 68, p. 399–403, 2015.
- HERGENHAHN, H. G.; HALL, M.; SODERHALL, K. Purification and characterization of an α 2-macroglobulin-like proteinase inhibitor from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Biochemical Journal**, v. 255, n. 3, p. 801–806, 1988.
- HONG, L. *et al.* Effect of dose and challenge routes of *Vibrio* spp . on co-infection with white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. v. 290, p. 61–68, 2009.
- HOU, F. *et al.* RNAi knock-down of shrimp *Litopenaeus vannamei* Toll gene and immune deficiency gene reveals their difference in regulating antimicrobial peptides transcription.

Developmental and Comparative Immunology, v. 44, n. 2, p. 255–260, 2014.

HUANG, T.; ZHANG, X. Functional Analysis of a Crustacean MicroRNA in Host-Virus Interactions. **J. Virol.** v.86, p. 12997–13004, 2012.

HULTEN, M. C. W. VAN *et al.* White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. **Virology**, v. 285, n. 2, p. 228–233, 2001.

HUNG, H. J. *et al.* Properties of *Litopenaeus vannamei* Dscam (LvDscam) isoforms related to specific pathogen recognition. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 35, n. 4, p. 1272–1281, 2013.

HUNG, H. J, A. *et al.* cell atlas of the adult *Drosophila* midgut. **PNAS**, v. 117, n. 3, p. 1514–1523, 2020.

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, 2010.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2018 PPM**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html>>. Acesso em: 18 de novembro de 2019.

ICELLY, J.D.; NOTT, J.A. Digestion and absorption: digestive system and associated organs. **Microscopic Anatomy of Invertebrates: Decapod, Crustacea**, V. 10, p. 147–201, 1992.

IMLER, J. Overview of *Drosophila* immunity: A historical perspective. **Developmental and comparative immunology**, 2013.

JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B. L.; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**, v. 211, n. 4, p. 213–236, 2006.

KIBENGE, F. S. Emerging viruses in aquaculture. **Current Opinion in Virology**, v. 34, p. 97–103, 2019.

KOIWAI, K. *et al.* Two hemocyte sub-populations of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. v. 85, p. 1–8, 2017.

KOU, G.-H. *et al.* Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. Advances in shrimp biotechnology. **Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology**, Bangkok, p. 267–271, 1998.

KULKARNI, A. D. *et al.* Evaluation of immune and apoptosis related gene responses using an RNAi approach in vaccinated *Penaeus monodon* during oral WSSV infection. **Marine Genomics**, v. 18, n. PA, p. 55–65, 2014.

KURTZ, J.; MILUTINOVI, B. Seminars in Immunology Immune memory in invertebrates. **Seminars in Immunology**, v. 28, p. 328–342, 2016.

- LABREUCHE, Y. *et al.* 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, p.1209–1218, 2010.
- LAI, C. Y.; CHENG, W.; KUO, C. M. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase from haemocytes of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 18, n. 5, p. 417–430, 2005.
- LAN, J. F. *et al.* PcToll2 positively regulates the expression of antimicrobial peptides by promoting PcATF4 translocation into the nucleus. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 58, p. 59–66, 2016.
- LEE, H. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO journal**, v. 23, p.4051-60, 2004.
- LEE, H. Y. *et al.* The role of commensal microbes in the lifespan of *Drosophila melanogaster*. **Aging**, v. 11, n. 13, p. 4611–4640, 2019.
- LEMAITRE, B. *et al.* The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/Cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell**, v. 86, n. 6, p. 973–983, 1996.
- LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. **Annual Review of Immunology**, v. 25, n. 1, p. 697–743, 2007.
- LEU, J. H. *et al.* Whispovirus. Lesser Known Large dsDNA Viruses - Current Topics in Microbiology and Immunology. **Spinger-Verlag Berlin Heidelberg**, 2009. p. 197–227.
- LI, F.; XIANG, J. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 34, n. 4, p. 973–980, 2013.
- LI H, *et al.* RNAi screening identifies a new Toll from shrimp *Litopenaeus vannamei* that restricts WSSV infection through activating Dorsal to induce antimicrobial peptides. **PLoS Pathog**, v. 14, 2018.
- LI, C. *et al.* WSSV–host interaction: Host response and immune evasion. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 84, p. 558–571, 2019.
- 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, 2012.
- LIU, B. *et al.* The effect of acute salinity change on white spot syndrome (WSS) outbreaks in *Fenneropenaeus chinensis*. **Aquaculture**, v. 253, n. 1–4, p. 163–170, 2006.
- 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, 2001.
- LO, C. F. *et al.* Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 25, n. 1–2, p. 133–141, 1996.

- LO, C. F.; KOU, G. H. Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: A review. **Fish Pathology**, v. 33, n. 4, p. 365–371, 1998.
- LORAND, L.; CONRAD, S.M. Transglutaminases. **Mol Cell Biochem**, v. 58, p. 9–35, 1984.
- MAEDA, M. Microbial communities and their use in aquaculture. p. 61–78, 2002.e. **The World Aquaculture Society**, p. 61–78, 2002.
- MARIANNE, A.; SPRADILING, A. C. Physiological and stem cell compartmentalization within the *Drosophila* midgut. **eLife**. p. 1-19, 2013.
- MATOS, G. M. *et al.* Massive gene expansion and sequence diversification is associated with diverse tissue distribution, regulation and antimicrobial properties of anti-lipopolysaccharide factors in shrimp. **Marine Drugs**, v. 16, n. 10, p. 1–17, 2018.
- MAYO, M. A. Virus taxonomy. **Archives of virology**, v. 147, n. 5, p. 1071–1076, 2002.
- MCGAW, I. J.; CURTIS, D. L. A review of gastric processing in decapod crustaceans. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 183, n. 4, p. 443–465, 2013.
- MELILLO, D. *et al.* Innate Immune Memory in Invertebrate Metazoans: A Critical Appraisal. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. August, p. 1915, 2018.
- MELNYK, C. W., MOLNAR, A., BAULCOMBE, D. C. Intercellular and systemic movement of RNA silencing. **EMBO J**, v.30, p. 3553–3563, 2011.
- NADALA, E. C. B. J.; LOH, P. C. A comparative study of three different isolates of white spot virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 33, p. 231–234, 1998.
- NEYEN, C. *et al.* Tissue- and Ligand-Specific Sensing of Gram-Negative Infection in *Drosophila* by PGRP-LC Isoforms and PGRP-LE. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 4, p. 1886–1897, 2012.
- NETEA, M. G. *et al.* Immune defence against *Candida* fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 10, p. 630–642, 2015.
- NG, T. H. *et al.* Review of Dscam-mediated immunity in shrimp and other arthropods. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 48, n. 2, p. 306–314, 2015.
- NUNES, A. J. P.; FEIJÓ, R. G. Convivência com o vírus da mancha branca no cultivo de camarão marinho no Brasil. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, v. 2, p. 30–36, 2016.
- OBBARD, D.J. *et al.* The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. **Philosophical Transactions of the Royal Society. Biological Sciences** , v.364, p.99-115, 2009.
- PRADEEP, B. *et al.* Biology , Host Range , Pathogenesis and Diagnosis of White spot syndrome virus. **Indian J. virol.**, v. 23, n. September, p. 161–174, 2012.

PÉREZ FARFANTE, I. K. Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World. Keys and diagnoses for the families and genera. **Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle**, Paris, v. V.175, p. 233 p, 1997.

PERAZZOLO, L.M. *et al.* Alpha2-macroglobulin from an Atlantic shrimp: Biochemical characterization, sub-cellular localization and gene expression upon fungal challenge, **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, 2011.

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

PILOTTO, M. *et al.* Exploring the Impact of the Biofloc Rearing System and an Oral WSSV Challenge on the Intestinal Bacteriome of *Litopenaeus vannamei*. **Microorganisms**, v. 6, n. 3, p. 83, 2018.

PILOTTO, M. *et al.* Potential immunomodulatory and protective effects of the Arthrospira-based dietary supplement on shrimp intestinal immune defenses. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 88, p. 47-52, 2019.

PILOTTO, M. *et al.* Environmental rearing conditions are key determinants of changes in immune gene expression patterns in shrimp midgut. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 106, 2020.

PONPRATEEP, S. *et al.* Gene silencing reveals a crucial role for anti-lipopolysaccharide factors from *Penaeus monodon* in the protection against microbial infections. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 32, n. 1, p. 26–34, 2012.

PONPRATEEP, S. *et al.* Alpha-2-macroglobulin is a modulator of prophenoloxidase system in pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 62, p. 68–74, 2017.

QI, C. *et al.* Transcriptomic and morphological analyses of *Litopenaeus vannamei* intestinal barrier in response to *Vibrio parahaemolyticus* infection reveals immune response signatures and structural disruption, **Fish Shellfish Immunol**, v.70, p. 437–450, 2017.

QIAO, G. *et al.* Comparison of immune response of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after multiple and single infections with WSSV and *Vibrio anguillarum*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 44, n. 1, p. 257–264, 2015.

RADHA, S.; MULLAINADHAN, P.; ARUMUGAM, M. Detection of two distinct types of hemolymphatic prophenoloxidase and their differential responses in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, upon infection by white spot syndrome virus. **Aquaculture**, v. 376–379, p. 76–84, 2013.

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.* Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in

addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and. **Journal of virology**, v. 79, n. 21, p. 13561–13571, 2005.

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

ROSA, R. D. *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. 17–19, 2013.

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

ROULSTON, A.; MARCELLUS, R. C.; BRANTON, P. E. Viruses and Apoptosis. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 53, p. 577–628, 1999.

SÁNCHEZ-PAZ, A. White spot syndrome virus: An overview on an emergent concern. **Veterinary Research**, v. 41, n. 6, 2010.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nat Protoc.** v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SILVEIRA, A. S. *et al.* An immune-related gene expression atlas of the shrimp digestive system in response to two major pathogens brings insights into the involvement of hemocytes in gut immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 79, p. 44–50, 2018.

SOMBOONWIWAT, K. *et al.* Localization of anti-lipopolysaccharide factor (ALFPm3) in tissues of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and characterization of its binding properties. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 10, p. 1170–1176, 2008.

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, 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, 2010.

SOONTHORNCHAI, W. *et al.* Interaction of *Vibrio* spp. with the inner surface of the digestive tract of *Penaeus monodon*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–18, 2015.

SOTO, M. A.; LOTZ, J. M. Transmission , Virulence , and Recovery Coefficients of White Spot Syndrome Virus (WSSV) and Taura Syndrome Virus (TSV) Infections in Kona Stock *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 15, n. July 2015, p. 48–54, 2003.

STENTIFORD, G. D. *et al.* Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 141–157,

2012.

SUTTLE, C. A. Viruses in the sea. **nature**, v. 437, p. 356-361, 2005.

TANDEL G.M. *et al.* Current status of viral diseases in Indian shrimp aquaculture. **Acta virologica** 61: 131 – 137, 2017.

TASSANAKAJON, A. *et al.* Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 4, p. 954–967, 2013.

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

THARNTADA, S. *et al.* Role of anti-lipopolysaccharide factor from the black tiger shrimp , *Penaeus monodon* , in protection from white spot syndrome virus infection Printed in Great

THITAMADEE, S. *et al.* Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. **Aquaculture**, v. 452, p. 69–87, 2016.

THUONG, K. VAN *et al.* Per os infectivity of white spot syndrome virus (WSSV) in white-legged shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and role of peritrophic membrane. **Veterinary Research**, v. 47, n. 1, p. 1–12, 2016.

THUONG, K. VAN. Experimental studies on the portal of entry of White spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. Ghent University. **Faculty of Veterinary Medicine**, 2016. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1854/LU-8172969>. Acesso em: 22 de outubro de 2019.

VANDESOMPELE, J.,P. K. *et al.* Accurate normalisation of realtime quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p. 1–12, 2002.

VERBRUGGEN, B. *et al.* Molecular mechanisms of white spot syndrome virus infection and perspectives on treatments. **Viruses**, v. 8, n. 1, p. 1–29, 2016.

VÉRON, 1965. Vibrionaceae, **WoRMS**. Disponível em: <http://www.marinespecies.org/>. Acesso em: 05 de janeiro de 2020.

WANG, H. *et al.* Identification of icp11 , the most highly expressed gene of shrimp white spot syndrome virus (WSSV). v. 74, p. 179–189, 2007.

WANG, P. H. *et al.* The shrimp IKK-NF- κ B signaling pathway regulates antimicrobial peptide expression and may be subverted by white spot syndrome virus to facilitate viral gene expression. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 10, n. 5, p. 423–436, 2013.

WANG, L. *et al.* Structure and partial protein profiles of the peritrophic membrane (PM) from the gut of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 33, n. 6, p. 1285–1291, 2012.

WANG, Y. T. *et al.* White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the

- shrimp *Penaeus merguensis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 52, n. 3, p. 249–259, 2002.
- WANG, Q. *et al.* Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. **Aquaculture**, v. 170, n. 3–4, p. 179–194, 1999.
- WANG, Y. C.; CHANG, P. S.; CHEN, H. Y. Tissue distribution of prophenoloxidase transcript in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 20, n. 3, p. 414–418, 2006.
- WANG, Y. G. *et al.* Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 39, n. 1, p. 1–11, 1999.
- WANG, Y. T. *et al.* White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 52, n. 3, p. 249–259, 2002.
- XI, Z.; RAMIREZ, J. L.; DIMOPOULOS, G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 7, 2008.
- YAN, M. *et al.* Immunology Identification of a JAK / STAT pathway receptor domeless from Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 44, p. 26–32, 2015.
- YANG, H. *et al.* Dual oxidases participate in the regulation of intestinal microbiotic homeostasis in the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 59, p. 153-163, 2016.
- YANG, L.-S. *et al.* A Toll receptor in shrimp. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 8, p. 1999–2008, 2007.
- YEH, M. S. *et al.* A second proPO present in white shrimp *Litopenaeus vannamei* and expression of the proPOs during a *Vibrio alginolyticus* injection, molt stage, and oral sodium alginate ingestion. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 26, n. 1, p. 49–55, 2009.