



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

Breno Rangel Moreira Corã

Efeito do desafio viral e das condições de cultivo sobre o perfil transcricional no intestino médio de genes associados à imunidade de camarões *Litopenaeus vannamei*

Florianópolis
2021

Breno Rangel Moreira Corã

Efeito do desafio viral e das condições de cultivo sobre o perfil transcricional no intestino médio de genes associados à imunidade de camarões *Litopenaeus vannamei*

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina
como requisito para a obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciane Maria Perazzolo

Florianópolis

2021

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

Corã, Breno Rangel Moreira

Efeito do desafio viral e das condições de cultivo sobre o perfil transcricional no intestino médio de genes associados à imunidade de camarões *Litopenaeus vannamei* / Breno Rangel Moreira Corã ; orientadora, Luciane Maria Perazzolo, 2021.

53 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 3. Crustáceos. 4. *Litopenaeus vannamei*. 5. Imunidade de invertebrados. I. Perazzolo, Luciane Maria. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Breno Rangel Moreira Corã

Efeito do desafio viral e das condições de cultivo sobre o perfil transcricional no intestino médio de genes associados à imunidade de camarões *Litopenaeus vannamei*

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas

Florianópolis, 07 de Maio de 2021.

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Luciane Maria Perazzolo
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Gislaine Fongaro
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Msc. Gabriel Machado Matos
Avaliador
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado à minha irmã e aos meus queridos e amados pais, pilares da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a todos os professores que tive o privilégio de ser aluno, sou grato por terem compartilhado de seus conhecimentos, histórias e experiências de vida.

Em especial, agradeço minha orientadora Prof.^a Dr.^a Luciane Maria Perazzolo, sua excelência dentro da sala de aula e sua disposição e prontidão em ensinar alunos e orientandos, são fonte de inspiração. Muito obrigado por compartilhar sua trajetória, sua história e sua humanidade com as limitações alheias, também por ter assumido essa árdua tarefa em me orientar. Tenha certeza, Prof., que és fator de soma na vida de quem tem o privilégio em conhecê-la, muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Rafael Diego Rosa por todos os ensinamentos e pelo dom em transmitir seus conhecimentos, não houve perguntas que não foram respondidas com o maior apreço possível, adequado ao nível de compreensão daqueles que perguntaram.

Gostaria de agradecer aos colegas que fizeram ou ainda fazem parte do Laboratório de Imunologia Aplicado à Aquicultura pela oportunidade de conviver e aprender com todos. Admiro cada um de vocês (Mariana, Gabriel, Cairé, Natan, Gustavo, Nicolas, Luiz, Leandra, Juliana e Leonardo), em especial sou imensamente grato à Talita e ao Flavinho, por todo suporte e cuidado que recebi, vocês são incríveis.

Ao PIBIC/CNPq pela bolsa de iniciação científica e, juntamente à CAPES, pelo financiamento do projeto.

Aos funcionários da universidade que facilitam nosso trabalho, em especial a Simone e a Leila, que nunca deixaram de me receber nos corredores desta universidade, com um sorriso e palavras de incentivo.

Aos meus amigos dessa jornada universitária, Fernanda (Feh), esse ser “brizado” que tenho tanto carinho. Ao Ivan (Ivanete) cujo a beleza só é superada pela antipatia e desprezo por qualquer ser que não seja ele mesmo, e ao Matheus (Jimmy), seu bom coração e inteligência sempre me encantou.

À minha amiga Priscila Cassol por ter permanecido comigo nessa jornada biológica. Foram cinco anos de muitas descobertas, lágrimas, sorrisos e acima de tudo, entrega, assumimos nossa amizade com todos os nossos defeitos e qualidades e mesmo assim seguimos dançando juntos, sem medo de sermos reais e falhos. Muito obrigado pelo suporte.

À Eulália, sem dúvida você foi um divisor em minha vida, uma amizade inesperada, mas vitalícia, me trouxe representatividade e esperança, me fez movimentar em um momento

em que eu estava estagnado. Não tenho como retribuir tudo que recebi de você, muito obrigado, minha amiga.

Quero agradecer a todas as pessoas pretas que vieram antes de mim, todos que lutaram pelo direito de estudar, trabalhar ou de simplesmente existir. Tenho muito orgulho da nossa história, mesmo que tentaram apagar nossas conquistas e nos privar do direito a uma vida plena. Mas já dizia Conceição Evaristo “eles combinaram de nos matar e nós combinamos de não morrer”, somos resistência.

Aos meus amados avós (Maria do Carmo, Lazaro, Maria da Conceição e Oscar), por ter construído lares de amor e respeito, onde fui muito amado, tenho sorte de ser neto de vocês. Às minhas tias, em especial minha madrinha Adriana e minha tia Patrícia, vocês estiveram em todas as minhas melhores memórias de vida e sei que virão muitas outras.

À minha irmã Lorena, por ter herdado as melhores qualidades dos nossos pais, seu caráter e seu senso de responsabilidade estão acima do julgamento. Muito obrigado por não ter desistido de você, eu estarei ao seu lado sempre.

Por último e mais importante, não tenho palavras para agradecer aos meus pais, Joelma Corá e Paulo Cesar Corá. Talvez eu tenha que agradecer ao universo, porque ser filho de vocês é definitivamente o maior presente que eu poderia ter recebido nesta existência. Vocês dois são meu porto seguro, quando tudo desmorona é no cuidado de vocês que me levando mais uma vez. Pai, muito obrigado por ter feito tudo que podia para permitir que seus filhos tivessem oportunidades na vida. Mãe, você é a melhor mãe do mundo. Você me inspira, sua teimosia foi necessária para lutar e conquistar seus sonhos. A maior herança que os pais podem deixar para seus filhos é a educação, mas você nos deu algo além, você nos deu sonhos, muito obrigado por tudo.

Vida, nada me debes! Vida, estamos em paz! (Nervo, A. 1916)

RESUMO

O vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) tem acometido os cultivos de camarões peneídeos em todo o mundo ocasionando grandes prejuízos econômicos. Pouco se conhece sobre a participação do epitélio intestinal na imunidade do *Litopenaeus vannamei*, apesar da via oral ser uma das principais rotas de entrada de patógenos nestes animais. Sistemas alternativos de cultivo de camarões, como a tecnologia em bioflocos (BFT), emerge como uma forma mais sustentável de cultivo e sanitariamente mais seguro. O presente estudo teve por objetivo avaliar o perfil transcricional no intestino médio (IM) de cinquenta genes associados à imunidade em camarões juvenis *Litopenaeus vannamei* cultivados em BFT ou em água clara (grupo controle, AC) e 48h após, desafiados oralmente com o WSSV (grupos BFT.W e AC.W, respectivamente). Para as análises considerou-se a alteração no perfil transcricional relacionada ao desafio viral em animais de um mesmo cultivo BFT.W/BFT e AC.W/AC. Dentre os genes avaliados, seis transcritos apresentaram expressão aumentada no grupo BFT.W: homeostasia (*LvHMGBa* 2.2x; "alarminas"; *LvHHAP* 4.1x; homeostase de hemócitos; *LvTGI* 3.8x; coagulação da hemolinfa), defesa antiviral (*LvAgo2* 2.0x; cortador de RNAi) e defesa antimicrobiana (*LvproPO* 2.3x; sistema de ativação de pró-fenoloxidase; *LvCrustina* IIa 2.4x; peptídeo antimicrobiano). A presença do WSSV no intestino médio de camarões cultivados em água clara (AC.W AC) parece ter reprimido a expressão de *LvDscam* (2,7x; proteínas hipervariáveis para o reconhecimento do padrão molecular de microrganismos), bem como do *LvDuox1* (4,3x; dupla oxidase), aumentando contudo a expressão de *LvToll3* (2,7x), pertencente à via de sinalização de Toll. Estes achados em conjunto sugerem que o cultivo em bioflocos associado à presença do WSSV no intestino médio dos camarões promoveram um aumento na expressão de um maior número de genes, quando comparado aos animais em água clara. O ambiente rico em microrganismos, oferecido pelo sistema de bioflocos, pode agir como agente imunoestimulante para camarões, possivelmente, melhorando suas defesas de forma integrada (hemolinfa e epitelial). O significado fisiológico destes resultados não é ainda compreendido e maiores estudos deverão ser conduzidos. Estudos dessa natureza poderão auxiliar na busca de candidatos a marcadores moleculares das condições de saúde dos camarões, bem como fornecer *insights* futuros sobre o papel do ambiente de cultivo na interação patógeno-hospedeiro.

Palavras-chaves: *Litopenaeus vannamei*, imunidade epitelial, WSSV, expressão gênica, defesa antiviral

ABSTRACT

The white spot syndrome virus (WSSV) causes economic losses on shrimp farms around the world periodically. The participation of the intestinal epithelium on antiviral and antimicrobial defenses of shrimp is poorly known, although the oral route represents a central route to pathogen entry. Biofloc technology (BFT) represents an alternative shrimp culture by providing sustainable and biosafety rearing and remove nitrogen compounds through absorption by the microorganism community. The present study proposed to evaluate the transcriptional profile of fifty immune-related genes in *Litopenaeus vannamei* midgut reared in biofloc (BTF) or clean water (AC, control) and, 48h after, challenged with WSSV (BTF.W and AC.W, respectively). The analysis considered the change in the transcriptional profile from challenged animals reared in the same system (BFT.W/BFT and AC.W/AC). Among the evaluated genes, six transcripts showed increased expression in BFT.W group, belong different functional categories, such as: homeostasis (*LvHMGBa* 2.2x; "alarmins"; *LvHHAP* 4.1x; hemocyte homeostasis; *LvTGI* 3.8x; hemolymph coagulation), antiviral defense (*LvAgo2* 2.0x; RNAi cutter) and antimicrobial defense (*LvproPO* 2.3x; pro-phenoloxidase activation system; *LvCrustina IIa* 2.4x; antimicrobial peptide). The WSSV presence in the shrimp midgut reared in clear water (AC.W AC) suppressed the expression of *LvDscam* (2.7x; hypervariable proteins) and *LvDuox1* (4.3x; dual oxidase), and increasing the expression of *LvToll3* (2.7x; Toll signaling pathway). Our findings suggest that biofloc culture associated with the presence of WSSV in the shrimp midgut increased the expression of several immune-related genes. Additionally, the microorganism-rich environment offered by the BFT system may act as an immunostimulant, altering the gene expression profile in the midgut and, probably, promoting activation of the gut defenses. The physiological meaning of these findings is not yet understood, and further studies are needed to find potential molecular markers to assess the health conditions of shrimp and reveals insights into the host-pathogen interaction.

Palavras-chaves: *Litopenaeus vannamei*, epithelial immunity, WSSV, gene expression, antiviral defense

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplar adulto do camarão <i>L. vannamei</i>	16
Figura 2 - Representação esquemática das principais funções hemocitárias em ostras e camarões.	20
Figura 3 - Esquema representativo (fora de escala) do trato gastrointestinal do camarão <i>L. vannamei</i>	23
Figura 4 Desenho experimental.....	26
Figura 5 - Expressão relativa de genes diferencialmente expressos no intestino médio de <i>L. vannamei</i> cultivados em bioflocos, após 48h do desafio viral.	34
Figura 6 - Expressão relativa de genes diferencialmente expressos no intestino médio de <i>L. vannamei</i> cultivados em água clara, após 48h do desafio viral.....	35
Figura 7 - Expressão gênica diferencial no intestino médio de camarões <i>L. vannamei</i> , associada à infecção pelo WSSV.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sequências de iniciadores utilizados nas análises de expressão relativa de genes relacionados ao sistema imune de <i>L. vannamei</i>	29
Tabela 2 - Genes associados ao sistema imune que apresentaram expressão diferencial no intestino médio de camarões cultivados em bioflocos (BFT) e água clara (AC) e desafiados com o WSSV.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALF: *Anti-lipopolysaccharide fator* (Fator antilipopolissacarídeo)

Cq: Ciclo de quantificação

dsRNA: *double stranded RNA* (RNA de dupla fita)

dT: Oligonucleotídeo formado por bases T

ERO: Espécie reativa de oxigênio

ERN: Espécie reativa de nitrogênio

IM: Intestino médio

LPS: Lipopolissacarídeos

MAMP: Padrões moleculares associados a microrganismos

MAS: Solução de Alsever modificada

mRNA: RNA mensageiro

miRNA: micro RNA

PAM: Peptídeos antimicrobianos

Kb: quilo bases

PCR: Reação em cadeia da polimerase

proPO: Pró-fenoloxidase

PRP/R: *Pathogen/Receptor-associated molecular pattern* (Proteínas de reconhecimento de padrões moleculares/receptor)

qPCR: PCR quantitativa em tempo real

RT: *Reverse Transcription* (Transcriptase reverse)

RNAi: RNA de interferência

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

ROS: Reactive oxygen species

WSSV: *White Spot Syndrome Virus* (Vírus da Síndrome da Mancha Branca)

LISTA DE 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

\geq : maior ou igual

< : menor

\leq : menor ou igual

% : porcentagem

α : letra grega alfa

β : letra grega beta

Δ : letra grega delta

μ : micro

\pm : mais ou menos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Animais.....	25
3.2 Desafio <i>per os</i> dos camarões com o WSSV e coleta dos intestinos médios	26
3.3 Extração dos RNA totais e síntese de cDNA	27
3.4 Realização da PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR).....	28
3.5 Iniciadores utilizados.....	28
3.6 Análises estatísticas	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	44
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

Segundo a previsão populacional da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), o nosso planeta terá 9 bilhões de pessoas até a primeira metade do século XXI (FAO, 2018). A preocupação em atender as necessidades de uma numerosa população acarreta um enorme desafio a ser enfrentado, principalmente considerando a capacidade mundial de produção alimentar.

Nesse contexto, o setor aquícola (pesca extrativista e aquicultura) caracteriza-se como uma importante fonte para suprir a demanda alimentícia global (FAO, 2018). O esgotamento de estoques marinhos naturais e a estagnação da pesca extrativista impõe limitações para manter a demanda por alimentos de alto valor proteico. Por outro lado, o cultivo de organismos aquáticos ou aquicultura tem contribuído para suprir essa demanda a nível mundial (OLIVEIRA, 2009).

A aquicultura mundial apresentou em termos percentuais, no ano de 2018, 66,11% em piscicultura, 21,32% em malacocultura, 11,43% em carcinicultura (cultivo de crustáceos) e 1,11% no cultivo de outros organismos (FAO, 2020). Dentre os diversos organismos cultivados destacam-se os crustáceos, devido ao seu alto valor de mercado. A produção mundial de crustáceos foi de 9,4 milhões de toneladas em 2018, gerando um lucro de 69,3 bilhões de dólares (ASCHE *et al.*, 2020; FAO, 2020).

Dentre as espécies cultivadas de camarões marinhos, o camarão-branco-do-pacífico *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) (**Figura 1**), destaca-se por sua dominância no cenário da carcinicultura mundial. Essa espécie é encontrada naturalmente no Oceano Pacífico, desde a província de Sonora, no México, até o sul de Tumbes, no Peru (PEREZ FARFANTE, 1997) e possui excelentes características zootécnicas como elevada taxa de crescimento, tolerância à alta densidade de estocagem, às salinidades extremas, a baixas temperaturas e rusticidade no manejo, características essas, que contribuem para ser a espécie de peneídeo dominante nos cultivos (SMITH; BRIGGS, 2005). Conforme os dados da FAO (2020), o cultivo de *L. vannamei* representou 52,9 % da produção dentre crustácea no âmbito mundial em 2018.

Segundo o último levantamento da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) os principais produtores mundiais de camarão marinho são respectivamente, no Oriente, a China, a Indonésia, o Vietnã, a Índia e, no Ocidente, o Equador e o México (FAO, 2020). O Brasil está na 10ª posição mundial, produzindo 54,3 mil toneladas

de camarões em 2019, destacando-se a região Nordeste, responsável por quase toda produção do país, ou seja, 99,6%. Os estados do Ceará e do Rio Grande do Norte foram responsáveis por 30,8% e 38,2%, respectivamente, em 2019 (IBGE, 2019).

Figura 1- Exemplar adulto do camarão *L. vannamei*



Fonte: Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA) – UFSC.

A carcinicultura nacional e mundial vem constantemente sofrendo grandes prejuízos econômicos, devido especialmente à incidência de doenças infecciosas causadas majoritariamente por bactérias e vírus (LIGHTNER *et al.*, 2012; THITAMADEE *et al.*, 2016). Os camarões, assim como os demais organismos aquáticos, estão em constante contato com uma ampla diversidade de microrganismos que constituem mais de 90% da biomassa marinha viva (EGAN; GARDINER, 2016). Esses microrganismos possuem um papel essencial na ciclagem de nutrientes, além de estabelecerem associações simbióticas com outros organismos marinhos (EGAN; GARDINER, 2016). Contudo, em situações de estresse e depleção do sistema imune do hospedeiro, muitos microrganismos podem tornar-se patógenos, devido a uma disbiose. Destaque a isso, dá-se aos ambientes estressores nos cultivos, especialmente relacionados às práticas de manejo incorretas, tais como, baixa qualidade de água e baixa qualidade nutricional dos alimentos (APPRILL, 2017). Essas condições propiciam à imunodepleção dos animais e a subsequente instalação de agentes potencialmente patogênicos, como bactérias e fungos ou patógenos obrigatórios, como alguns vírus.

Dentre as infecções que acometem os peneídeos, destacam-se as infecções bacterianas causadas por bactérias do gênero *Vibrio* spp e as infecções virais, causadas principalmente pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV, *White Spot Syndrome Virus*) (THITAMADEE *et al.*, 2016).

O WSSV é considerado o vírus mais devastador da história mundial da carcinicultura, desde a sua primeira detecção em 1992, em Taiwan, chegando às Américas em 1999 (LIGHTNER *et al.*, 2012). O prejuízo econômico para o setor a nível mundial, provocado pelo WSSV foi estimado em 15 bilhões de dólares (TANDEL *et al.*, 2017).

Único membro do gênero *Whispovirus*, o WSSV é um vírus envelopado, único representante da família *Nimaviridae* (MAYO, 2002); possui genoma de DNA dupla fita (aproximadamente 305 Kb), que codifica 181 proteínas estruturais e não-estruturais (ESCOBEDO-BONILLA *et al.*, 2008). Os virions (80 ± 120 nm de diâmetro por 250 ± 380 nm de comprimento) contêm um nucleocapsídeo em forma de bastonete envolto por um envelope trilaminar e, como curiosidade, apresenta um apêndice em formato de flagelo (NADALA; LOH, 1998). A replicação desse vírus é nuclear e observa histologicamente a hipertrofia dos núcleos celulares infectados, uma cromatina marginalizada e muitos corpos de inclusão (LO; KOU, 1998). 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.

A propagação do WSSV entre camarões, ocorre pelo contato com a água ou dejetos contaminados. Embora os mecanismos de infecções ainda não sejam completamente compreendidos, especula-se duas potenciais vias de entrada do WSSV no hospedeiro; através da glândula antenal, (nefrocomplexo) proposto por (LIU *et al.*, 2021). Outra via potencial de contaminação é a prática de canibalismo ou predação praticado por esses animais (transmissão oral), já que animais infectados, moribundos ou mortos podem ser uma fonte de transmissão viral (LO; KOU, 1998). Não há relato na literatura de transmissão vertical (dos parentais para prole). Partículas virais foram localizadas na camada de tecido conjuntivo que circundam os órgãos reprodutores de machos e fêmeas, no caso do ovário, partículas virais foram detectadas em células foliculares, oogônias, oócitos (PRADEEP *et al.*, 2012), no entanto, não foi detectado a presença viral nos ovos maduros, o que sugere que o vírus mataria às células reprodutivas em estágios anteriores a maturação (LO *et al.*, 1997). Após os primeiros sinais da enfermidade nos animais, a infecção pelo WSSV pode causar mortalidades de 100% nos cultivos entre 3 a 10 dias (CHOU *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1999; ZHAN *et al.*, 1998).

Até 2004, o Brasil era um dos únicos países latino-americanos livres de registros por infecções pelo WSSV, sendo que a carcinicultura catarinense estava em destaque no cenário nacional. No entanto, em dezembro daquele ano, um forte surto de mancha branca ocorreu em fazendas do Norte de Santa Catarina (cidade de Imaruí), declinando vertiginosamente a produção de 4.189 toneladas em 2004 para 2.765 toneladas em 2005 (ALVES; CEPA, 2017). Desde então, a atividade não se restabeleceu por completo no estado e, em 2019, a produção de camarões em SC foi de apenas 405,67 toneladas (aumento de 30%, em relação a 2018), contando atualmente com 31 produtores. Além disso, desde 2005, surtos de mancha branca também têm sido registrados na região Nordeste do Brasil, causando mortalidade e sérios prejuízos em especial nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte (NUNES; FEIJÓ, 2016).

Frente a essa realidade, a busca por medidas profiláticas que visem o controle de doenças nos cultivos, bem como o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas que promovam a seleção de animais mais resistentes/tolerantes, são ainda de extrema relevância para a sustentabilidade da carcinicultura brasileira. Neste contexto, formas mais sustentáveis de cultivo surgem como uma alternativa aos sistemas tradicionais, visando uma maior produtividade e segurança sanitária. Nos cultivos tradicionais (viveiros de terra em áreas próximas ao oceano) são feitas trocas constantes de água e os resíduos gerados são descartados no ambiente, normalmente sem tratamento prévio. Essa prática é ambientalmente incorreta e uma das principais formas de se propagar patógenos entre as fazendas de camarões (MOSS *et al.*, 2012). Dentre os sistemas alternativos para cultivo de camarões, destaca-se o sistema superintensivo em bioflocos (*BioFloc Technology* ou BFT) que surgiu no final dos anos 90, simultaneamente para camarões nos Estados Unidos e para tilápias, em Israel (AVNIMELECH, 1999; TAW, 2010). Essa tecnologia caracteriza-se por um sistema fechado, com ausência ou redução da troca de água, diminuindo assim a possibilidade de contaminar o ambiente com descartes de água do cultivo que eventualmente possa conter patógenos.

O biofoco é definido como macroagregados formados por diatomáceas, pelotas fecais, exoesqueleto, restos de organismos mortos, bactérias e protozoários (TAW, 2010). Os bioflocos encontrados nesse sistema são formados a partir da adição de fontes de carbono (glicose, sacarose e melaço), nos tanques, visa aumentar a razão entre o carbono e o nitrogênio na água. Desta forma, o ambiente estimula o crescimento de bactérias heterotróficas (DO ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2017; EMERENCIANO; GAXIOLA; CUZO, 2013). Os bioflocos representam

uma rica fonte proteica visto que há registros de que em cultivos de *L. vannamei*, do qual mais de 29% do consumo diário dos animais é proveniente deles (BURFORD *et al.*, 2004).

À parte do valor nutricional, estudos demonstram que a comunidade bacteriana residente nos bioflocos contribui com o controle de doenças de forma indireta, agindo como “probióticos” e promovendo competição por espaço, substrato e nutrientes com microrganismos potencialmente patogênicos (EMERENCIANO; GAXIOLA; CUZO, 2013). Na literatura é registrado uma melhora do estado de saúde geral dos camarões e também uma redução na ocorrência de enfermidades associadas ao cultivo em bioflocos (KIM *et al.*, 2015, 2014). Entretanto, os mecanismos que levam à melhora do *status* imunológico dos animais têm sido pouco investigados, principalmente no que diz respeito ao aumento da resistência ou tolerância às infecções virais.

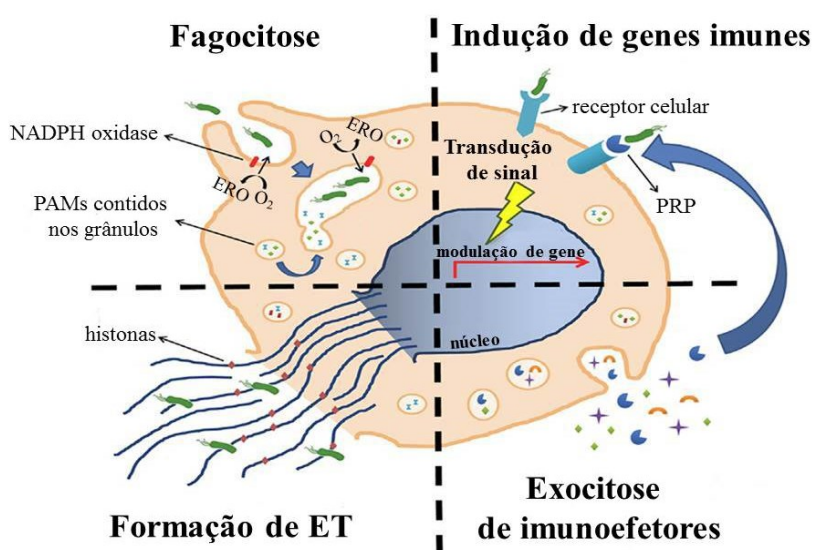
O primeiro relato de uma potencial imunoestimulação associada ao cultivo em bioflocos relatou melhora em algumas das respostas imunológicas de *L. vannamei*, avaliadas por meio de parâmetros imunológicos e de maior sobrevivência dos animais após desafio com o vírus da mionecrose infecciosa ou IMNV (EKASARI *et al.*, 2014). Mais recentemente, nosso grupo avaliou o impacto do ambiente de cultivo sobre a imunidade associada ao intestino de *Litopenaeus vannamei* cultivados em dois sistemas contrastantes: o BFT (tanques *indoor*) e água verde (tanques *outdoor*, análogo aos viveiros de terra). A expressão de 30 genes foi avaliada sendo que, 25 deles tiveram seus níveis de expressão relativa superiores no intestino médio de camarões cultivados em bioflocos, destacando-se genes associados à ativação da pró-fenoloxidase (melanização), vias de sinalização celular, peptídeos antimicrobianos e RNA de interferência e evidenciando o papel imunoestimulante do cultivo em bioflocos (PILOTTO *et al.*, 2020).

Em relação aos mecanismos de defesa dos crustáceos, a exemplo dos demais invertebrados, possuem um sistema imune do tipo inato, não possuem 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 para esses animais (na concepção clássica do termo) ou até mesmo terapias baseadas no reconhecimento altamente específico de um antígeno, que os protejam contra infecções reincidentes (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014).

É visto que a primeira barreira de proteção dos crustáceos contra a entrada de patógenos é proporcionada por uma carapaça externa rígida (exoesqueleto), que reveste igualmente o interior do trato digestório desses animais e, que também possui enzimas e moléculas com atividade antimicrobiana (SOONTHORNCHAI *et al.*, 2010). Uma vez rompidas as barreiras físico-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, análoga ao sangue dos vertebrados, consiste em uma fração celular, composta pelas células imunocompetentes ou hemócitos, estas células normalmente infiltram-se em todos os tecidos (SOMBOONWIWAT *et al.*, 2008), incluindo o intestino médio, e de uma fração líquida constituída pelo plasma, onde estão dissolvidos os fatores humorais (TASSANAKAJON *et al.*, 2013), essas respostas celulares e humorais atuam em sinergia para protegê-los dos patógenos invasores (**Figura 2**).

Figura 2 - Representação esquemática das principais funções hemocitárias em ostras e camarões.



(I) reconhecimento do não-próprio por receptores/proteínas de reconhecimento-padrão (PRRs/PRPs); (II) ativação de vias de sinalização intracelular; (III) fagocitose, encapsulamento, formação de nódulos, formação de armadilhas extracelulares de ácidos nucleicos; (IV) produção de moléculas microbicidas, como as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ERO e ERN, respectivamente) e os peptídeos antimicrobianos (PAM); (V) melanização

mediada pelo sistema de ativação da pró-fenoloxidase (proPO), gerando moléculas intermediárias altamente citotóxicas; (VI) coagulação da hemolinfa e, (VII) os sistemas antivirais mediados pela interferência por RNA (RNAi), (VIII) citocinas análogas a interferons, apoptose e autofagia (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008; LI; WENG; HE, 2019).

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 lipoteicoico 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; LICHTMAN; PILLAI, 1967; MONCRIEFFE; GROSSMANN; GAY, 2008). 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**).

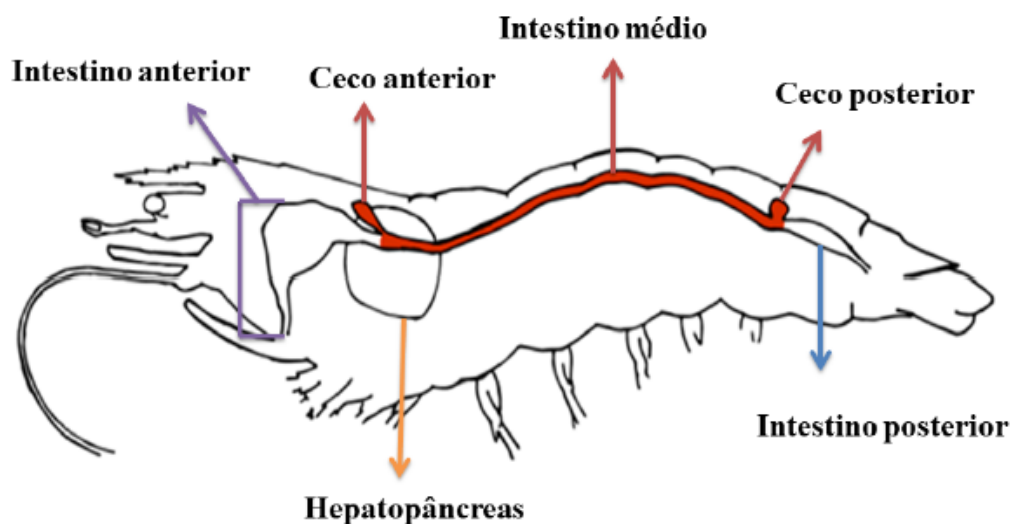
Dentre os mecanismos envolvidos no reconhecimento e eliminação de patógenos nos crustáceos, destaca-se: Após o reconhecimento, os microrganismos estranhos são fagocitados e podem ser destruídos pelas espécies reativas de oxigênio (ERO), através do complexo NADPH oxidase e moléculas de defesa (peptídeos antimicrobianos, enzimas hidrolíticas e outros imunofetores) armazenados nos grânulos e que se fundem ao fagossomo. Outro mecanismo desencadeado após a exposição a agentes microbianos ou danos nos tecidos, os hemócitos liberam armadilhas extracelulares de DNA (ET) associadas a histonas e peptídeos antimicrobianos que estão contidos nos grânulos. Um dos mecanismos efetores é a indução de genes imunológicos, hemócitos podem ser ativados por diferentes mecanismos, incluindo danos no tecido, estresse e reconhecimento microbiano por proteínas/receptores de reconhecimento padrão (PRP), levando à indução da expressão de alguns genes associados ao sistema imune. Efetores imunológicos armazenados em grânulos ou vesículas citosólicas são liberados no plasma, nos espaços extracelulares e/ou nas cavidades corporais do molusco e dos crustáceos. (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008; LI; WENG; HE, 2019).

De maneira geral, as respostas de defesa acima elencadas estão intimamente associadas à hemolinfa. No entanto, como mencionado anteriormente, uma das potenciais vias de entrada de

patógenos é a via oral, através do trato gastrointestinal. A exemplo dos insetos, os camarões devem também possuir uma imunidade realizada pelo epitélio intestinal. Sabe-se que em insetos, a participação do intestino nas respostas imunológicas é bem caracterizada pela literatura (CAPO; WILSON; DI CARA, 2019). Em *Drosophila melanogaster*, as células epiteliais intestinais sintetizam moléculas antimicrobianas e citotóxicas, o que diminuem as chances de um patógeno se estabelecer e iniciar processos infecciosos no potencial hospedeiro (LEE *et al.*, 2019).

Em relação à morfologia do trato gastrointestinal dos decápodas, 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 (MCGAW; CURTIS, 2013; SOONTHORNCHAI *et al.*, 2010) (**Figura 3**). O intestino anterior e posterior, são internamente revestidos por uma cutícula quitinosa rígida e impermeável, que separa o conteúdo luminal do epitélio, protegendo-o da abrasão ocasionada pelas partículas alimentares. Já, o intestino médio (IM) é revestido por uma membrana peritrófica quitinosa acelular e porosa, composta por fibrilas associadas à glicoproteínas e proteoglicanas, que permite a absorção seletiva de nutrientes nessa região (SOONTHORNCHAI *et al.*, 2010). A presença de uma membrana peritrófica quitinosa no IM permite que microrganismos possam se aderir diretamente às células epiteliais e, devido a isso, essa parte medial do intestino é uma porta de entrada ou ligação de microrganismos patogênicos.

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



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) em GAGLIARDI (2020).

Uma vez ultrapassada as barreiras físicas (cutícula quitinosa) e químicas (enzimas digestivas, baixo pH) presentes na porção anterior do intestino, os microrganismos podem alcançar o intestino médio, região do sistema gastrointestinal mais susceptível às infecções (ARTS *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2012). Ao superar a barreira conferida pela membrana peritrófica, o microrganismo patogênico pode adentrar no hospedeiro via epitélio, acessar a hemocele por onde circula a hemolinfa, e ativar no hospedeiro uma série de mecanismos imunológicos de reconhecimento, sinalização e resposta, visando a neutralização e eliminação dos microrganismos invasores (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

Nos últimos anos, nosso grupo tem dirigido esforços para elucidar o papel do intestino médio nas defesas antimicrobianas e antivirais do camarão *L. vannamei*. O primeiro trabalho foi realizado por Silveira e colaboradores (2018), onde foi avaliado o perfil transcricional de genes de expressão hemocitária em cada parte do trato gastrointestinal de *L. vannamei*. Este estudo evidenciou, pela primeira vez, a importância dos hemócitos infiltrantes nos tecidos fazendo uma comunicação entre a imunidade sistêmica (associada à hemolinfa) e a imunidade epitelial (intestino médio) em camarões. A partir destes primeiros achados, outros estudos se

sucederam, demonstrando a participação do epitélio intestinal na produção de efetores imunológicos como peptídeos antimicrobianos stylicinas (FARIAS *et al.*, 2019), o potencial efeito imunoestimulante de ambientes ricos em microrganismos como os cultivos em BFT (PILOTTO *et al.*, 2020). Adicionalmente, a análise global do bacterioma intestinal de *L. vannamei* cultivados em bioflocos e submetidos à infecção oral pelo WSSV foi descrita por (PILOTTO *et al.*, 2018).

Nessa linha geral de estudo, o presente trabalho propôs avaliar o perfil transcricional de genes pertencentes 10 categorias funcionais associadas à imunidade, no intestino médio de *L. vannamei* cultivados em bioflocos e água clara e, posteriormente desafiados oralmente com o WSSV. A identificação de expressão diferencial de genes associados à defesa antiviral e antimicrobiana em camarões poderá servir como ferramenta para estudos futuros visando a seleção de reprodutores mais resistentes e/ou tolerantes a infecções virais nos cultivos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da infecção oral pelo WSSV sobre o perfil transcricional de genes associados à imunidade, no intestino médio de camarões juvenis *L. vannamei* cultivados em duas diferentes condições de cultivo

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Identificar e comparar os níveis de transcritos diferencialmente expressos em camarões cultivados em bioflocos (BFT) e desafiados com WSSV (BFT.W) e entre camarões cultivados em água clara (AC) e desafiados com o WSSV (AC.W).

2.2.2. Avaliar nestes animais, a expressão de 50 genes no intestino médio, pertencentes a 10 categorias funcionais associadas à imunidade de peneídeos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As análises correspondentes à expressão gênica foram realizadas com amostras de DNA complementar (cDNA) armazenadas à -20°C , previamente extraídas de intestino médio de camarões provenientes de um estudo anterior, conduzido no Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA) (PILOTTO *et al.*, 2018). Sendo assim, os itens 3.1, 3.2 e 3.3 correspondem às etapas já realizadas e os itens 3.4, 3.5 e 3.6 foram as etapas desenvolvidas no presente estudo.

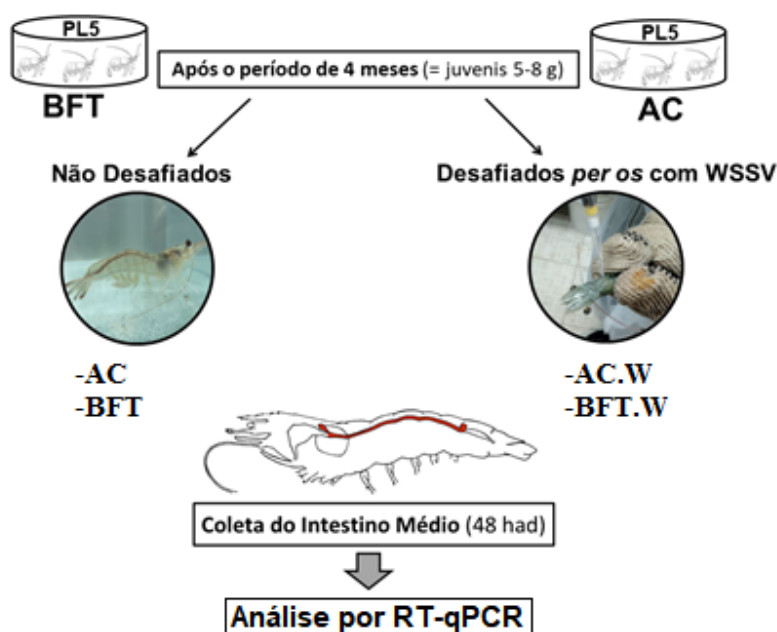
3.1 Animais

Foram obtidas pós-larvas em estágio 5 (PL5= 5 dias de idade) da espécie *L. vannamei* da linhagem HB12 e livre de WSSV. Esses animais foram adquiridos da empresa Aquatec LTDA (Canguaretama, Rio Grande do Norte, Brasil) e transferidos para o Laboratório de Camarões Marinhos (LCM, Centro de Ciências Agrárias, UFSC). Imediatamente após a chegada das PLs no LCM, esses animais foram alocados aleatoriamente em 8 tanques internos de 9m^3 /tanque, divididas de acordo com o tipo de cultivo: sistema de bioflocos (BTF; 4 tanques) e Água Clara (AC; 4 tanques), em uma densidade de 300 e 20 PLs/ m^3 , respectivamente. A renovação diária de água do mar foi de 80% nos tanques com água clara, enquanto nos tanques com bioflocos, só era adicionada água para repor a água evaporada. Os tanques foram condicionados com aeração constante, mantendo o nível de oxigenação acima de 5mg L^{-1} , a temperatura foi monitorada e mantida em $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e salinidade mantida em 34-35‰, detalhes em (PILOTTO *et al.*, 2018). Após 4 meses de cultivo, cerca de 30% dos camarões, já em estágio de juvenis (5-8 g), foram amostrados aleatoriamente para confirmar a ausência de WSSV, utilizando a técnica de Nested-PCR (LO *et al.*, 1997). Então, 120 animais de cada sistema foram transferidos para o Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA, Departamento de Biologia celular, Embriologia e Genética (BEG), UFSC), separados em dois grupos experimentais ($n= 120$ / cada) e aclimatados por 3 dias antes do desafio oral.

3.2 Desafio *per os* dos camarões com o WSSV e coleta dos intestinos médios

O inóculo viral foi preparado conforme descrito por (PILOTTO *et al.*, 2018), a partir de tecidos de animais comprovadamente infectados pelo WSSV. Resumidamente, os tecidos do abdômen de camarão infectado com WSSV foram homogeneizados numa solução Tris-salina (Tris 20 mM, NaCl 330 mM, pH 7,4) (1:10 p/v) utilizando um misturador manual. O tecido homogeneizado foi centrifugado duas vezes ($2.000 \times g$ por 20 min e $9000 \times g$ por 10 min) à 4 °C e o sobrenadante filtrado (0,45 μ m), aliquotado e armazenado a -80° C. Oitenta camarões de cada condição foram desafiados com WSSV com 100 μ L contendo 5×10^6 cópias virais, gentilmente escoados na cavidade oral, com o auxílio de uma micropipeta, sem causar injúrias ao animal. Os animais restantes (n=40/grupo) não foram manipulados (**Figura 4**).

Figura 4 Desenho experimental



Pós-larvas estágio 5 (PL₅ = cinco dias de idade) da linhagem HB12 de *L. vannamei* foram cultivadas durante quatro meses em dois sistemas de cultivo: Tecnologia Bioflocos (BFT) (4 tanques) e água clara (AC) (4 tanques), com uma densidade inicial de 300 e 20 PL₅.m⁻³, respectivamente. Camarões juvenis livres de WSSV (5-8 g) de cada condição (n = 80) foram individualmente desafiados com WSSV via oral (5×10^6 cópias de genoma viral). Os animais restantes (n = 40 / condição) não foram manipulados. 48 horas (had) após o desafio, os intestinos médios

de camarão não desafiados (BFT e AC) e desafiados com WSSV (BFT.W e AC.W) (n = 40/condição) foram recolhidos e processados para que fossem analisado por RT-qPCR (Adaptado de Pilotto et al., 2018)

Após 48h do desafio oral, 80 animais de cada cultivo e desafiados com WSSV (BTF.W e AC.W) e 40 animais de cada cultivo não desafiados (BTF e AC), foram eutanasiados por hipotermia e os seus intestinos médios dissecados após ter o conteúdo intestinal retirado por raspagem e lavado duas vezes com etanol 70% e água do mar estéril. A detecção do WSSV foi realizada individualmente em todos os intestinos dos animais desafiados, para confirmar a presença do vírus por Nested-PCR (LO *et al.*, 1997). Por fim, 40 intestinos WSSV-positivos de ambos os sistemas de cultivo (BFT.W e AC.W) e 40 intestinos WSSV-negativos (BTF e AC) foram selecionados para as análises de expressão gênica do presente estudo. Posteriormente, foram formados quatro *pools* de 10 intestinos por condição para serem utilizados nas análises de expressão gênica.

3.3 Extração dos RNA totais e síntese de cDNA

Intestinos médios de indivíduos de cada condição e agrupados em *pools* (BTF.W, AC.W, BTF e AC) conservados em TRIzol[®] (Thermo Scientific[®]) à -80 °C foram processados para a extração de RNA total a partir de homogeneização com clorofórmio (5 TRIzol[®]:1 clorofórmio). Após centrifugação (12.000 ×g por 15 min a 4°C), o RNA foi precipitado com isopropanol (1:1, v/v) e lavado com etanol 75% gelado. O precipitado de RNA foi então suspenso em água livre de DNA/RNA/DNases/RNases a 65°C. Em seguida, as amostras foram tratadas com 1 U de DNase I (Thermo Scientific[®]) por 30 min a 37°C. Após a inativação da DNase I com EDTA (5 mM) por 65°C a 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 qualidade e a concentração do RNA total foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% e espectrofotometria, respectivamente. A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 1 µg de RNA total, utilizando a enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Sicientific[®]), na presença de 0,5 mM de dNTP Mix, 20 µM do iniciador oligo(dT)¹²⁻¹⁸ e inibidor de RNase, seguindo recomendação do fabricante.

3.4 Realização da PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

As amplificações foram realizadas utilizando o equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* (Thermo Fisher Scientific®), na presença de 1 µL de cDNA (diluído 20x), 0,5 µL (0,3 µM) dos iniciadores e 7,5 µL de Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix e 6 µL de água ultrapura (volume final de 15 µL). 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. 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).

3.5 Iniciadores utilizados

Para as análises de expressão gênica foram escolhidos 53 genes, compreendendo três genes de referência de expressão constitutiva e 50 genes pertencentes às principais categorias funcionais associadas ao sistema imune e homeostase de crustáceos, sendo elas: : (i) vias de sinalização celular (16 genes); (ii) RNA de interferência (RNAi) (8 genes); (iii) proteínas de reconhecimento-padrão (PRPs) (4 genes); (iv) sistema de ativação da pró-fenoxidase (2 genes); (v) homeostase (5 genes); (vi) citocinas (4 genes); (vii) sistema REDOX (4 genes); (viii) Morte celular (1 gene); (ix) Inibidor de proteases (2 genes) e (x) Peptídeos antimicrobianos (4 genes). Os iniciadores utilizados estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1 Sequências de iniciadores utilizados nas análises de expressão relativa de genes relacionados ao sistema imune de *L. vannamei*.

Sigla do Gene	Categoria Funcional	Nº GenBank	Sequência (5' - 3')		(pb)	Referência
Genes de referência			<i>Fw</i>	<i>Rv</i>		
<i>LvEF1α</i>	<i>Elongation factor 1-alpha</i>	GU136229	TGGCTGTGAACAAGATGGACA	TTGTAGCCCACCTTCTTGACG	103	Coelho et al., 2016
<i>LvL40</i>	<i>Ubiquitin/ribosomal L40 fusion protein</i>	KJ831563	GAGAATGTGAAGGCCAAGATC	TCAGAGAGAGTGCACCATC	104	Coelho et al., 2016
<i>LvRpS3A</i>	<i>S3A ribosomal protein</i>	BF023924	GGCTTGCTATGGTGTGCTCC	TCATGCTCTGGCTCGCTG	101	Goncalves et al., 2014
<i>LvActin</i>	<i>β-actin</i>	AF300705	CCACGAGACCACCTACAAC	AGCGAGGGCAGTGATTTTC	142	Quispe et al., 2016
Via de sinalização						
<i>LvCactus</i>	<i>Cactus (IκB)</i>	JX014314	AGTGACCTGAGAACCCTTCAC	CACACACTGACACTATCTCC	151	Li et al., 2012
<i>LvCaudal</i>	<i>Caudal-like homeobox (CDX-1-like) transcription factor</i>	XP_027220715	CGCTACATCACCATCAGGAG	TCTTCATCTGCTCCGCTCC	115	LIAA (UFSC)
<i>LvDorsal</i>	<i>Dorsal (Rel/NF-κB transcription factor)</i>	FJ998202	TCACTGTTGACCCACCTTAC	GAGGGCATCTTCAACATCAC	164	Huang et al., 2010
<i>LvHMGBa</i>	<i>High-mobility group (HMGBa)</i>	HQ228174	GGATGAGAAGGTCAAGTACG	TCCTCGTCGTCTCCTCTC	186	Chen et al., 2011
<i>LvHMGBb</i>	<i>High-mobility group (HMGBb)</i>	HQ228175	GATGAAGGGATACAGGGGAC	ATCACCTACTCCCATGTCAG	163	Chen et al., 2011
<i>LvIMD</i>	<i>Immune deficiency (Imd)</i>	FJ592176	AAGGTTCGAGGTCAGCGAAC	GATCATCTGGGTGAGTCTGG	192	Wang et al., 2009
<i>LvJAK</i>	<i>Janus Kinase (JAK)</i>	KP310054	TGCTGTTCCGACTGCGTTTC	GAATTCGTTGGCGTGGAAG	117	Song et al., 2015
<i>LvPelle</i>	<i>Pelle (IRAK1)</i>	KC346864	GTTTATGGCTACTCGGCAGATCC	CATGTGAGAGCTTTTGTGGGACTTC	128	Li et al., 2014
<i>LvRelish</i>	<i>Relish (Rel/NF-κB transcription factor)</i>	EF432734	CTACATTCTGCCCTTGACTCTGG	GGCTGGCAAGTCGTTCTCG	124	Huang et al., 2009
<i>LvSTAT</i>	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)</i>	HQ228176	CATGGCTCTGGCAGATAAGC	GCATCTGCTGGTCTCTCTTC	107	Chen et al., 2011
<i>LvToll1</i>	<i>Toll receptor 1</i>	DQ923424	TCGACCATCCCTTTACACC	TTGCCTGGAAGGTCTGATTC	88	Wang et al., 2012
<i>LvToll2</i>	<i>Toll receptor 2</i>	JN180637	CATGCCTGCAGGACTGTTTA	GGCCTGAGGGTAAGGTCTTC	158	Wang et al., 2012
<i>LvToll3</i>	<i>Toll receptor 3</i>	JN180638	TCGTACAACCAGCTGACGAG	ATACTTCAGGTGGGCCACAG	195	Wang et al., 2012
<i>LvTRAF6</i>	<i>Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6 (TRAF6)</i>	HM581680	GTCCGTCTTCTAAGTCACTG	CTCATTTCCGTTAGCTGAGC	178	Wang et al., 2011
<i>LvTube</i>	<i>Tube (IRAK4)</i>	JN180645	TGACAGATTCCAGTGGATCATGC	CTTCCAAGATGTGCGCTAACTGTG	128	Li et al., 2014
<i>LvIKKξ</i>	<i>IκappaB kinase-epsilon (IKK-ε)</i>	JN180644	TTGGCTCTTTCCAGGACAC	TTTTATGGCTGCCAGGAGTC	88	Wang et al., 2013

Tabela 1 – Sequências de iniciadores utilizados nas análises de expressão relativa dos genes relacionados ao sistema imune. (continuação)

Sigla do gene	Categoria funcional	Nº GenBank	Sequência (5' - 3')		(pb)	Referência
	RNAi		Fw	Rv		
LvAgo1	<i>Argonaute 1</i>	HM234689	TGCGTCATTTGCCATCCAT	GCCATCTGGAGCGGAGAAG	65	Labreuche et al., 2010
LvAgo2	<i>Argonaute 2</i>	HM234690	GATGGCATGAAGTCTGCAGTTG	TGCGCACGACCATCACTAAG	62	Labreuche et al., 2010
LvArs2	<i>Arsenite-resistance protein 2-like protein (Ars2)</i>	HQ692888	GCCATTTATTTTGGGAGAGGAC	CTGTAACTCCATCTGTTCTCTGAC	115	Chen et al., 2012
LvDcr1	<i>Dicer-1</i>	EU676241	CCGGAGATAGAACGGTTCAGTG	CGATAATTCCTCCCAACACCTG	176	Yao et al., 2010
LvDcr2	<i>Dicer-2</i>	HQ541163	AGGAAATGCAATGTCGTGGTT	ACGAGCCCTCCCCTAGATT	78	Chen et al., 2011
LvPasha	<i>Drosha-like protein (Pasha)</i>	HQ692889	CAGCAGTCTTTGGACGAACTTG	TCTGGGAGTTGCGGTCTATCTT	149	Chen et al., 2012
LvSid1	<i>Sid-1</i>	HM234688	GAAGCGATTGGCAGTCTATGAAC	TGGAAGCCTATCTCTGCAACTTG	63	Labreuche et al., 2010
LvTRBP1	<i>Transactivating response RNA-binding protein isoform 1</i>	HQ541157	CAAGAGTTGTGTATGCGCAG	AGCACCACCCTGGATGATG	195	Chen et al., 2011
Proteínas de reconhecimento de padrões moleculares - PRPs						
LvDscam	<i>Down syndrome cell adhesion molecule</i>	GQ154653	AGGTGGACAATCCGTGGTG	GGAGTGATGTGTGACTGTG	160	Chou et al., 2009
LvFrep	<i>Fibrinogen-related protein (FREP)</i>	FE071367	TAGGTGATTACTCGGCGAAC	TAATACTCCACGCAGTCGAG	127	Coelho et al., 2016
LvGal	<i>Galectin</i>	KF179103	AATGCTTTCACACGAGCAGC	GTCTTCAATCCAGACACAGG	237	Pilotto et. al., 2020
LvβGBP	<i>High density lipoprotein/1,3-beta-D-glucan-binding protein (βGBP)</i>	AY249858	ACGAGAACGGACAAGAAGTG	TTCAGCATAGAAGCCATCAGG	137	LIAA (UFSC)
Sistema proPO						
LvproPO2	<i>Prophenoloxidase 2 (proPO-2)</i>	EU373096	GCGGAATGACTTTGGTCTCG	AAGTGACGTCATCGGAGAGG	137	Ai et al., 2009
LvPPAE2	<i>Prophenoloxidase-activating enzyme 2 (PPAE2)</i>	FE090793	TCAGCAGGATTTGTGTTGCC	GTCTCAGTGAAGCCCCATC	107	Pang et al., 2014
Manutenção da Homeostase						
LvClot	<i>Hemolymph clottable protein</i>	DQ984182	ACCAAGGTCGTCTCATTAC	TGTCCACTTCCAGGGTGTC	172	Goncalves et al., 2014
LvHHAP	<i>Hemocyte homeostasis-associated protein (HHAP)</i>	FE124306	CAAGCAGGTCAAGCACGAG	CTGGAACCACAATAGAAGCC	108	Goncalves et al., 2014
LvHSP90	<i>HSP90</i>	HQ008268	TCTACATGACCGAACCCATC	GGTCTTCTGTTCTTCGTACTTC	143	Qian et al., 2012
LvTGI	<i>Transglutaminase I</i>	EF081004	GAGCTTCAAGATCGAGGATCGA	GCTGGTGTTCGTAGCGGTTATC	79	Yeh et al., 2013
LvTGII	<i>Transglutaminase II</i>	EU164849	GCCCGAGGACAGGGAAA	GCGGTGGTCAGTGAATCCA	75	Yeh et al., 2013

Tabela 1 – Sequências de iniciadores utilizados nas análises de expressão relativa dos genes relacionados ao sistema imune. (continuação)

Sigla do gene	Categoria funcional	Nº GenBank	Sequência (5' - 3')		(pb)	Referência
Citocinas			<i>Fw</i>	<i>Rv</i>		
LvAST	<i>Astakine</i>	HM473285	GACTGGGCGACTGTTCTTC	GGTACGCAAGATTCAGCTCC	156	Liang et al., 2015
LvIntegrin	<i>Integrin (β integrin)</i>	GU131148	GCAGTGGTATGAGCATTAGTG	GGTAATCCTCTGCTTGACTG	135	Zhang et al., 2012
LvIRF	<i>Interferon regulatory factor (IRF)</i>	KM277954	ACGCTGCCCTCTTTCGCTAC	ACGCTGTGAACCTGAAGTATCG	162	Li et al., 2015
LvSVC1	<i>Single von Willebrand factor type C domain protein 1 (SVC1)</i>	HQ541158	TGCCAACCTAGCTGAGCTTCA	CCATCAGGGCACACGTATTTG	81	Chen et al., 2011
Sistema Redox						
LvCAT	<i>Catalase (CAT)</i>	AY518322	CATCCTTCATTCACACGCAG	CTTGATGCCTTGGTCCGTC	245	Goncalves et al., 2014
LvGST	<i>Glutathione S-transferase (GST mu-class)</i>	AY573381	CACCTACGAACACTACGAAC	GGTTCTTGAAGCCGTGCGAG	194	Goncalves et al., 2014
LvNOS	<i>Nitric oxide synthase (NOS)</i>	GQ429217	GAGCAAGTTATTCGGCAAGGC	TCTCTCCCAGTTTCTTGGCGT	104	Yao et al., 2010
LvDuox1	<i>Dual oxidase (Duox)</i>	MG734366.1	GGTACAAGTTCGAGGTCGCG	TGGTGACATCCTTCCGCTCC	173	LIAA (UFSC)
Morte Celular						
LvH3	<i>Histone H3</i>	EE572298	TGTCGCTCTTCGTGAGATCC	GGAATCGCAGGTCAGTCTTG	119	Goncalves et al., 2014
Inibidor de Protease						
Lv α 2M-1	<i>Alpha2-macroglobulin 1 (α2M-1)</i>	EF073268	GGAGAGGAACGAGACCATC	TCAGCTTGCCGTGGAAGTG	113	Goncalves et al., 2014
Lv α 2M-2	<i>Alpha2-macroglobulin 2 (α2M-2)</i>	DQ988330	TGCAGGTTCTAGTGTGGTAC	CACCCAGGTAGTCGATGAC	261	Goncalves et al., 2014
Peptídeos antimicrobianos						
Lv Crustina	<i>Crustin Lv (Type IIa)</i>	AY488496	CGAACCAGAGACACCTGTTG	CAGCACACTTGTAGTCGTTG	113	Bartlett et al., 2002
Litvan ALF-A	<i>ALF Group A</i>	EW713395	CTGATTGCTCTTGTGCCACG	TGACCCATGAACTCCACCTC	113	Rosa et al., 2013
Litvan ALF-B	<i>ALF Group B</i>	GQ227486	GTGTCTCCGTGTTGACAAGC	ACAGCCCAACGATCTTGCTG	123	Rosa et al., 2013
Litvan ALF-C	<i>ALF Group C</i>	FE058235	ATGCGAGTGTCTGTCTCAG	TGAGTTTGTTCGCGATGGCC	115	Rosa et al., 2013

3.6 Análises estatísticas

O programa RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>) foi utilizado para a escolha da melhor condição de referência entre os 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).

Os níveis de expressão foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando-se os dados de expressão do grupo AC (camarões cultivados em água clara) como condição calibradora para a comparação AC.W/AC e o grupo BFT (camarões cultivados em bioflocos) como calibrador na comparação BFW.W/BFT. A diferença na expressão foi considerada estatística através do teste-*t Student* não-pareado (*fold-change cut-off* de ≥ 2 , $p \leq 0,05$). Para a construção dos gráficos de expressão, foi utilizado o programa GraphPad Prism 8 (Graph Software, Inc.).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de o cultivo de camarões em bioflocos ser um sistema promissor dentro da carcinicultura, especialmente em regiões que houve surtos virais, poucos ainda são os estudos abordando a relação patógeno-hospedeiro e ambiente de cultivo. Neste contexto, o presente estudo avaliou o perfil transcricional de 50 genes pertencentes a 10 categorias funcionais associadas à imunidade dos peneídeos, no intestino médio (IM) de camarões *L. vannamei* cultivados em distintos sistemas, bioflocos (BFT) e água clara (AC). De um modo geral, os resultados aqui obtidos demonstram que a presença do WSSV no intestino médio de camarões *L. vannamei* esteve associada com a alteração no perfil de expressão de alguns transcritos relacionados ao sistema imune, especialmente nos animais cultivados em bioflocos (BFT.W).

Dos 50 transcritos avaliados, 9 tiveram sua expressão modulada em função da infecção viral. Notavelmente, camarões cultivados em BFT apresentaram um maior número de genes modulados (6) que os animais cultivados no sistema controle, em água clara (3) (**Tabela 2**).

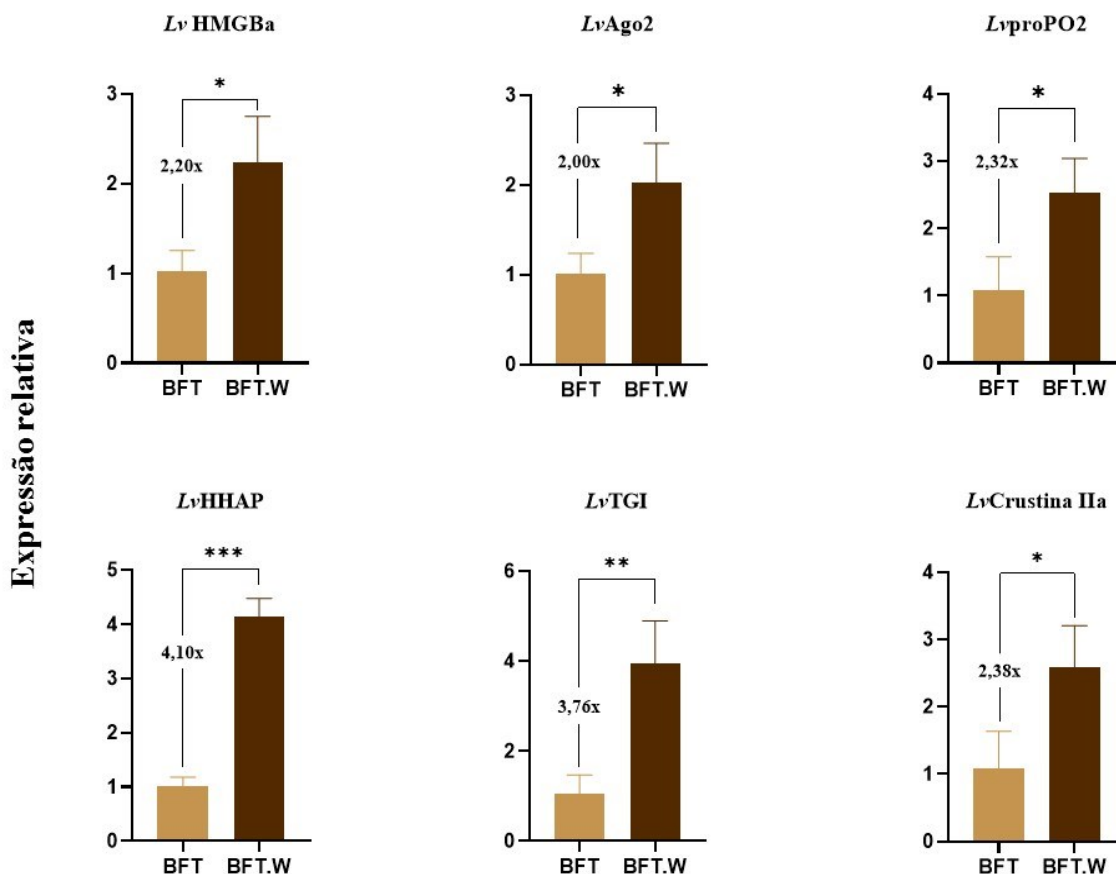
Tabela 2 - Genes associados ao sistema imune que apresentaram expressão diferencial no intestino médio de camarões cultivados em bioflocos (BFT) e água clara (AC) e desafiados com o WSSV.

Categoria Gênica	Nomenclatura	Expressão Gênica	
		AC.W/AC	BFT.W/BFT
Vias de sinalização			
<i>LvHMGBa</i>	High-mobility group (HMGBa)	2,33	2,20*
<i>LvToll3</i>	Toll receptor 3	2,74*	0,78
Sistema RNAi			
<i>LvAgo</i>	Argonoute 2	1,66	2,00*
Proteínas de reconhecimento de padrões			
<i>LvDscam</i>	Down syndrome cell adhesion molecule	-2,67*	1,49
Sistema proPo			
<i>LvproPO2</i>	Pró-fenoloxidase 2	5,06	2,32*
Manutenção da homeostase			
<i>LvHHAP</i>	Hemocyte homeostasis-associated protein	3,89	4,10***
<i>LvTGI</i>	Transglutaminase I	1,56	3,76**
Sistema Redox			
<i>LvDuox</i>	Duol Oxidase (DUOX)	-4,26*	1,10
Peptídeos antimicrobianos			
<i>Crustina Lv</i>	Crustin <i>Lv</i> (Type IIa)	1,60	2,38*

Expressão gênica em PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) entre os grupos estão representadas em valores de *fold-change*. Em vermelho estão os transcritos com maior expressão diferencial e em azul os de menor expressão diferencial, considerando a comparação entre os grupos AC.W/C e BFT.W/BFT. Os genes foram considerados diferencialmente expressos quando a expressão apresentou *fold-change* ≥ 2 e * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$ ou *** $P < 0,0001$.

A presença do vírus no intestino médio de camarões cultivados em BFT promoveu uma modulação positiva de seis genes pertencentes às categorias funcionais de vias de sinalização (*LvHMGBa*, 2,2x), RNAi (*LvAgo*, 2,0x), sistema proPO (*LvproPO2*, 2,32x), manutenção da homeostase (*LvHHAP*, 4,10x e *LvTGI*, 3,36x) e peptídeos antimicrobianos (*LvCrustina IIa*, 2,38x) (**Figura 5**).

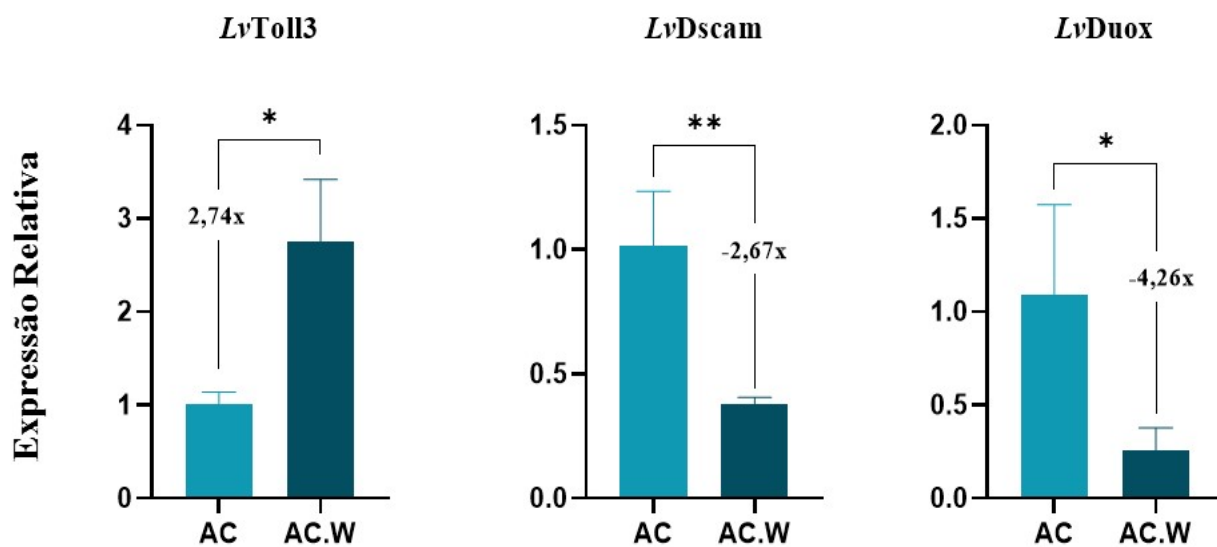
Figura 5 - Expressão relativa de genes diferencialmente expressos no intestino médio de *L. vannamei* cultivados em bioflocos, após 48h do desafio viral.



A diferença de expressão gênica entre os animais cultivados em bioflocos desafiados(BFT.W) e não desafiados (BFT) está apresentada em valores de *fold-change* (cut-off ≥ 2) e indicadas por asteriscos (* P < 0,05; ** P < 0,01 e *** P < 0,0001) (teste t-Student não pareado). Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão.

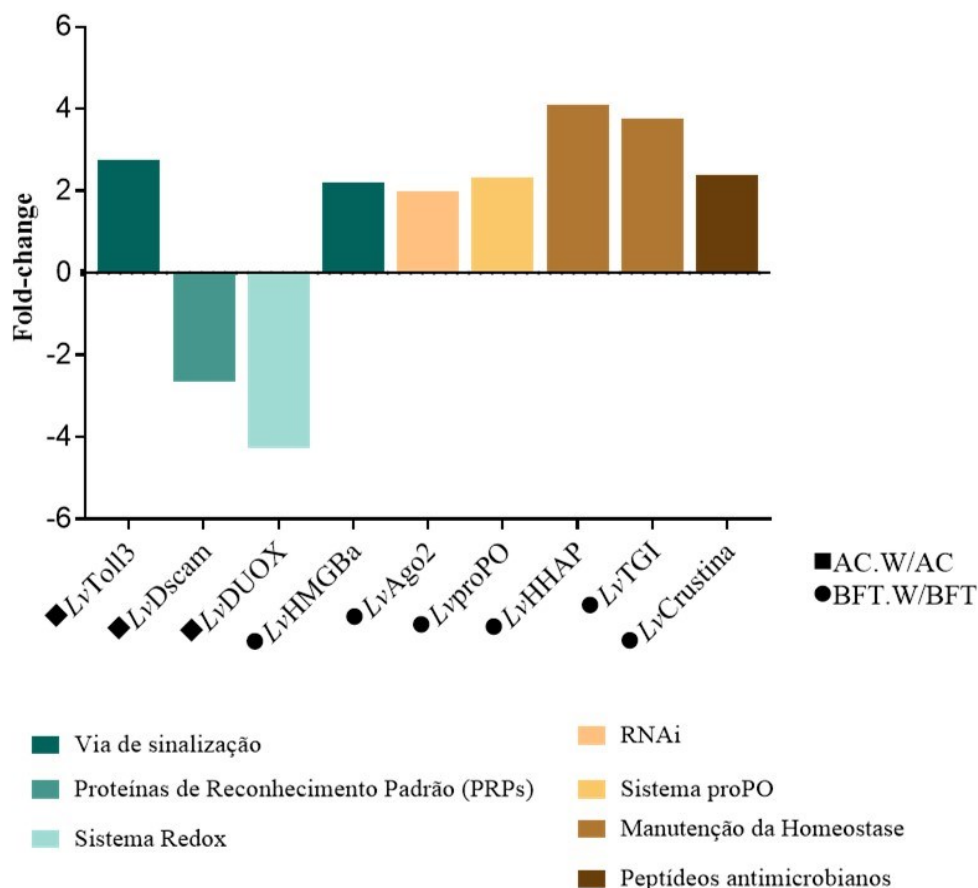
Em relação ao perfil transcricional dos animais cultivados em água clara, apenas um gene foi induzido, o *LvToll3* (2,74 x), pertencente à via Toll de sinalização, enquanto dois transcritos foram reprimidos em função da infecção viral: o *LvDscam* (-2,67x) pertencente à categoria proteínas/receptores de reconhecimento padrão e o *LvDuox I* (-4,26x) do sistema Redox (**Figura 6**). Uma visão geral da expressão gênica diferencial associada à infecção viral nos camarões cultivados em BFT (BFT.W/BFT) ou água clara (AC.W/AC) pode ser visualizada na **Figura 7**.

Figura 6 - Expressão relativa de genes diferencialmente expressos no intestino médio de *L. vannamei* cultivados em água clara, após 48h do desafio viral.



A diferença de expressão gênica entre os animais cultivados em água clara desafiados (AC.W) e não desafiados (AC) está apresentada em valores de *fold-change* (*cut-off* ≥ 2) e indicadas por asteriscos (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$) (teste t-Student não pareado). Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão.

Figura7 - Expressão gênica diferencial no intestino médio de camarões *L. vannamei*, associada à infecção pelo WSSV



Diferenças nos níveis dos transcritos dos genes que apresentaram expressão significativamente diferente (*fold-change cut off* ≥ 2 ; teste *t* de Student não pareado, $P < 0,05$) entre os grupos BFT.W/BFT e AC.W/AC.

Um gene que apresentou diferenças de expressão em animais desafiados com WSSV, com aumento nos níveis transcricionais associado ao cultivo em bioflocos foi o *LvHMGBa* que codifica para uma “alarmina” conhecida por HMGB (*high mobility group box protein*). A família HMGB é caracterizada por proteínas altamente conservadas, presentes apenas em organismos multicelulares, estando envolvidas na manutenção da estrutura da cromatina e apresentando um importante papel na regulação da expressão gênica em eucariotos (SESSA; BIANCHI, 2007). As alarminas são prontamente liberadas para sinalizar estresse ou dano às células ou tecidos durante infecções, e por isso são classificadas como moléculas DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*). Em vertebrados, a HMGB é uma alarmina prototípica que ativa a imunidade inata e possui uma função de alarme duplo. A proteína pode ser expressa para alertar as células

adjacentes sobre a homeostase em perigo da célula liberadora de HMGB (ANDERSSON; YANG; HARRIS, 2018).

Em um estudo realizado por Pilotto e colaboradores (2020) ficou demonstrado que o cultivo em BFT afeta a expressão de genes imunológicos no intestino médio de *L. vannamei*, dentre eles o *LvHMGBa* que dobrou sua expressão no intestino médio dos animais cultivados em BFT, comparados ao grupo controle (água clara). Em outro estudo, realizado por Gagliardi (2020), o gene *LvHMGBa* teve sua expressão induzida na região anterior e medial do intestino médio de *L. vannamei* após desafio por via oral com WSSV comparado ao grupo não desafiado. Esses resultados em conjunto sugerem o envolvimento da proteína HMGBa nos processos de “alerta” imunológicos a patógenos virais infectando os camarões.

Outro gene pertencente à categoria de via de sinalização que apresentou expressão diferencial foi o *LvToll3*, porém sua expressão foi diferencial apenas nos animais desafiados e cultivados em água clara (AC.W/AC). Genes Toll foram identificados pela primeira vez na mosca-da-fruta, *D. melanogaster*, esses genes codificam para um grupo de receptores de superfície celular e apresentam um importante papel no desenvolvimento embrionário na determinação do eixo dorso-ventral (ANDERSON; NUSSLEIN-VOLHARD, 1984). Além de desempenhar função na embriogênese, os receptores Toll estão implicados nas respostas imune destes insetos (LEMAITRE *et al.*, 1996). Em camarões, esses receptores também conservaram os domínios LRR e TLR, semelhante ao "Toll" de *D. melanogaster*.

Além dos receptores “Toll” e seu ligante Spätzle, outros componentes dessa via também foram identificados em camarões, como MyD88, proteínas adaptadoras Tube e Pelle, ativador TRAF6, NF-kB (I κ B) e fator de transcrição NF-kB Dorsal (WEN *et al.*, 2013). Por apresentar inúmeros componentes já identificados, a ativação da via Toll em camarões pode estar associada à regulação da expressão de peptídeos antimicrobianos, como ocorre em insetos (LI *et al.*, 2012). Estudos recentes demonstraram que a expressão de *LvToll3* pode ser positivamente regulada por meio de injeções de dsRNA comerciais nos camarões, simulando uma infecção viral uma vez que dsRNA são padrões moleculares virais (GUANZON; MANINGAS, 2018).

Segundo estudo realizado por Wang e colaboradores (2012), o gene Toll3 foi positivamente regulado em *L. vannamei*, frente ao desafio intramuscular com o WSSV e apresenta expressão significativa em hemócitos, epitélios e no intestino. Contudo, a

expressão extra-hemocitária pode estar associada à infiltração hemocitárias nos tecidos e isso não foi discutido pelos autores. Em outro estudo, o gene Toll3 foi mais expresso no intestino de camarões branco do pacífico após desafio sistêmico com WSSV ou com a bactéria Gram-negativa *Vibrio alginolyticus* quando comparado a outros tecidos como hepatopâncreas, brânquias e músculos (WANG *et al.*, 2012). Em relação aos resultados obtidos em nosso estudo, o desafio viral pela via oral induziu aumento na expressão de *LvToll3* no intestino médio (IM) de camarões apenas no grupo cultivado em água clara e não nos em BFT. Foi observado por Pilotto e colaboradores (2018) que o gene *LvToll3* também foi mais expresso no grupo cultivado em água clara em razão ao grupo cultivado em BFT após o desafio oral com o WSSV, sugerindo que maiores níveis de expressão deste gene estão associados conjuntamente ao sistema em água clara e ao desafio viral. Porém maiores estudos deverão ser conduzidos para elucidar o papel do gene Toll3 frente a infecções orais pelo WSSV nos animais cultivados em água clara.

Em relação aos genes de defesa antiviral da via RNA de interferência (RNAi) o único gene que modulou no IM em função da infecção viral foi o *LvAgo2*, cuja expressão foi duplicada nos animais em bioflocos. O Argonauta 2 (*Ago2*) pertence a uma família de proteínas altamente conservada que compõe o núcleo catalítico do complexo proteico de silenciamento ou RISC (LIU, 2004). Argonautas portando são caracterizadas como *slicer* do complexo RISC por serem capazes de destruir dsRNA (HAMMOND *et al.*, 2001). O mecanismo de RNAi ativado por dsRNA viral é baseado no silenciamento pós-transcricional de genes (ESCOBEDO-BONILLA *et al.*, 2008; ROBALINO *et al.*, 2007). Nesse processo, o dsRNA desencadeia a destruição do RNA mensageiro (RNAm) homólogo à sua própria sequência (silenciamento sequência específica).

Em Pilotto e colaboradores (2020), que avaliou genes relacionados à defesa antiviral em *L.vannamei* cultivados em bioflocos e em água verde (dois sistemas de cultivos) foi demonstrado que o gene *LvAgo2* foi super expresso nos animais em bioflocos (11,5 vezes superior). A super expressão de *LvAgo2*, somada a de outros importantes genes do sistema imune de camarões, sugere fortemente o efeito imunoestimulante do ambiente em bioflocos para *L. vannamei* (PILOTTO *et al.*, 2020).

Outro gene avaliado em nosso estudo, pertencente à categoria de Proteínas/Receptores de reconhecimento padrão, foi o *LvDscam* cuja expressão foi diferencial e reprimida nos animais infectados e cultivados em água clara (-2,67x) comparado ao grupo *naïve* (AC). Os genes *Dscam* (*down syndrome cell adhesion*

molecule) codificam para proteínas de reconhecimento padrão hipervariáveis e ubíquas entre os artrópodes, que possuem domínios de imunoglobulina (Ig) (NG *et al.*, 2015). O mecanismo de *splicing* alternativo a partir de um único gene de Dscam, pode gerar milhares de isoformas diferentes, podendo reconhecer o mesmo patógeno de maneira específica e diversa (ARMITAGE; PEUSS; KURTZ, 2015). A descoberta dessas moléculas introduziu novos conceitos e definições sobre sistema imune, ultrapassando os limites clássicos em imunologia pois, poderia haver “especificidade e memória” mesmo na ausência de um sistema imune adaptativo em invertebrados (NG *et al.*, 2015). Assim sendo, abrem novas perspectivas para estudos que visam terapias no controle a infecções nesses táxons.

Estudos recentes indicam ainda a existência de uma memória treinada (*trained immunity*) em plantas, invertebrados e vertebrados, baseada em *immune priming* (NETEA; VAN DER MEER, 2017). Neste mecanismo de memória treinada ocorreriam modificações funcionais em células do sistema imune inato do hospedeiro após sobreviver a um primeiro contato contra o agente patogênico. Essas modificações podem incluir desde alterações na expressão de receptores de superfície celular até modulação na expressão de imunofatores e imunoreguladores, o que desencadearia uma resposta “otimizada” do hospedeiro frente a um segundo contato contra o mesmo patógeno (NETEA; VAN DER MEER, 2017).

Interessante ressaltar que, no presente estudo, o gene *LvDscam* foi reprimido pela presença do WSSV no intestino médio de camarões cultivados em água clara e isso contrasta com os resultados descritos por Hung e colaboradores (2013), cuja expressão de *LvDscam* aumentou oito vezes após 24h do desafio intramuscular de *L. vannamei* pelo WSSV. As metodologias usadas em ambos trabalhos são diferentes, bem como o tecido avaliado. Em (HUNG *et al.*, 2013), o desafio foi feito injeção intramuscular e o no presente estudo foi via oral, além de os tecidos avaliados terem sido hemócitos no caso de (HUNG *et al.*, 2013). Essas diferenças metodológicas poderiam ser responsáveis por perfis transcricionais distintos, possivelmente, o vírus presente diretamente no intestino inibiu a expressão desse gene neste tecido.

Outra possível justificativa para a expressão maior do *LvDscam* no grupo não desafiado poderia estar relacionada à alta abundância de bactérias Gram-negativas do gênero *Vibrionaceae* no intestino dos animais do grupo AC em comparação com os outros três grupos (AC.W, BFT, BFT.W), previamente identificada por Pilotto e colaboradores

(2018) após a realização do bacterioma no intestino médio desses animais. Possivelmente o gene *LvDscam* possa ser mais facilmente modulado em presença de grande quantidade de bactérias *Vibrionaceae*, que possuem alguns representantes patógenos oportunistas, do que em presença do WSSV.

Na categoria sistema de ativação da pró-fenoloxidase, no presente estudo o gene *LvproPO2* foi diferencialmente expresso nos animais cultivados em bioflocos e desafiados com WSSV. O sistema proPO é reconhecido como um dos principais mecanismos de reconhecimento antimicrobiano e responsável pela melanização em artrópodes, sendo ativado por componentes da superfície dos microrganismos, como LPS de bactérias Gram-negativas e β -1,3-glicanas de fungos (AMPARYUP *et al.*, 2012; ANGTHONG *et al.*, 2010; BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). Desta forma, uma vez ativada as células imunocompetentes, ocorre a degranulação ou lise hemocitária, deflagrando a liberação de várias moléculas imunofetoras, das quais estão presentes as moléculas do sistema proPO, gerando uma cascata de reações locais. O processo envolve uma série de reações químicas que promovem a formação de moléculas altamente tóxicas, como as quinonas e radicais livres com efeito microbicida e cujo o processo resultante é a melanização local (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). Já 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.

Existem pelo menos dois genes codificando para pró-fenoloxidases em camarões *L. vannamei* (*LvproPO1* e *LvproPO2*) (LAI; CHENG; KUO, 2005; YEH *et al.*, 2009). Componentes da proPO1 são constitutivamente expressos pelos hemócitos, embora a proPO tenha sido já detectada em outros tecidos, como brânquias, coração, músculo, hepatopâncreas e inclusive no ceco anterior do intestino médio, no entanto, essa detecção deva ser referente à infiltração hemocitária (SILVEIRA *et al.*, 2018; WANG; CHANG; CHEN, 2006). Já um estudo realizado por (AI *et al.*, 2009) foi detectado expressão de proPO2 em hemócitos, intestino médio, coração e brânquias, mas não houve detecção da proPO2 na musculatura e hepatopâncreas.

Relatos anteriores informam que camarões infectados via intramuscular com WSSV apresentaram menores níveis de ambas proPO1 e proPO2 (AI *et al.*, 2009). Igualmente, Gagliardi (2020) relata repressão de até 9,5x na expressão de *LvproPO1* no IM de *L. vannamei* desafiados oralmente com o WSSV. Muito dos efetores

antimicrobianos dos camarões são produzidos e armazenados principalmente nos hemócitos, como é o caso da proPO. Em vista dos resultados obtidos em (GAGLIARDI, 2020), sugere-se que níveis mais baixos de expressão da proPO2 poderiam estar relacionados à redução de hemócitos infiltrados no intestino ou a uma inibição induzida pelo WSSV. Porém, ambos os estudos acima não foram realizados com animais cultivados em BFT. No presente estudo, o grupo cultivado em BFT e posteriormente desafiados apresentou maior expressão deste gene, reforçando a hipótese de haver um efeito imunestimulante do cultivo em bioflocos.

Dois genes pertencentes à categoria manutenção da homeostase apresentaram maior expressão induzida no grupo BFT.W confrontado com o grupo BFT, *LvHHAP* e *LvTGI* (4,10x e 3,76x, respectivamente). O gene *LvHHAP*, proteína associada à homeostase hemocitária ou HHAP (do inglês *Hemocyte homeostasis-associated protein*), é expresso nos hemócitos e apresentam um importante papel na regulação e controle hemocitário. Estudos com outro peneídeo, *Penaeus monodon*, demonstraram que o silenciamento do gene HHAP acarretou na redução do número efetivo de hemócitos circulantes, deformações e lise destas células (PRAPAVORARAT *et al.*, 2010). O mesmo estudo indica que o *PmHHAP* regula a homeostase dos hemócitos ao inibir a morte celular por apoptose por meio da ativação da caspase. De maneira interessante, em nosso estudo detectamos a indução de *LvHHAP* no IM de camarões desafiados com WSSV e cultivados em BFT. Esses dados sugerem que em animais imunestimulados em função do cultivo em BFT, apresentam maior expressão do *LvHHAP*, o que pode estar associado a um recrutamento e manutenção de maior número de hemócitos circulantes na região intestinal, devido a presença do vírus.

Neste contexto, seria interessante investigar a ocorrência de populações de hemócitos na região intestinal e acompanhar a expressão de HHAP em diferentes tempos pós infecção com o objetivo de se obter maiores informações e compreensão do papel desse gene correlato a mobilização e manutenção das populações hemocitárias frente ao desafio viral.

Outro gene pertencente à manutenção da homeostase com expressão diferencial foi o gene envolvido no processo de coagulação da hemolinfa, transglutaminase I (*LvTGI*). Sabe-se que a 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 a disseminação de patógenos pela hemocele, por ocasião de injurias no meio aquático. Nos

crustáceos, a coagulação é dependente da enzima transglutaminase (TGase) que promove ligações entre proteínas *Clot* levando à formação de coágulos estáveis (DURLIAT, 1985).

O aumento na expressão do gene relacionado à coagulação de hemolinfa, o *LvTGI* associados à imunidade intestinal foi observado em um estudo com animais desafiados com *Vibrio parahaemolyticus* (QI *et al.*, 2017) e em intestinos de camarões expostos a altas concentrações de sulfeto assim como alteração em sua microbiota (DUAN *et al.*, 2019). O aumento na expressão do gene *LvTGI*, em nosso estudo, nos animais cultivados em BFT e desafiados com WSSV deve estar associado na manutenção geral da homeostasia animal. Portanto, mais estudos são necessários para melhor compreender esse resultado associado à infecção viral nos animais cultivados em bioflocos.

Em nosso estudo, a expressão do gene *LvDuox* foi reprimida pela presença do WSSV no intestino médio. Duol-oxidases são proteínas transmembranas presentes em células ubíquas, como as do coração, intestino, brânquias e hepatopâncreas de camarões, geradoras de espécies reativas de oxigênio (ROS, *reactive oxygen species*) (KIM; LEE, 2014). ROS incluem radicais livres de oxigênio e alguns agentes oxidantes formados pela redução parcial do oxigênio, como superóxido (O_2^-), hidroxil (OH^\cdot), ozônio (O_3) e hidrogênio derivado de superóxido peróxido (H_2O_2) (JUVEN; PIERSON, 1996). Em *D. melanogaster*, espécies reativas de oxigênio são os principais imunofatores na imunidade intestinal, sendo expresso no intestino no hospedeiro durante infecções naturais (HA *et al.*, 2005).

Em camarões, a DUOX foi inicialmente identificada em outro penéide, *Marsupenaeus japonicus* (INADA *et al.*, 2013). Recentemente foi demonstrado que a expressão de *LvDuox* foi significativamente induzida no intestino médio de *L.vannamei* após o desafio com a bactéria *V. parahaemolyticus* E1 (VPE1) (CHEN *et al.*, 2018). Em nosso estudo a expressão de *LvDuox* foi reprimida após desafio viral (4x) pelo WSSV. Contrariamente, a expressão do gene *MjDUOX* foi induzida após o desafio viral pelo WSSV, e a taxa de sobrevivência decaiu durante o desafio viral em animais que sofreram silenciamento do gene *MjDUOX*. Mais estudos são necessários para melhor compreensão do mecanismo antiviral do DUOX. No entanto, a função e regulação deste gene frente a homeostase da microbiota intestinal é largamente conhecido.

Por fim, a expressão do gene *Crustina* tipo IIa, pertencente à categoria de peptídeos antimicrobianos, foi induzida nos animais infectados com o WSSV e cultivados em bioflocos. *Crustinas* são peptídeos antimicrobianos (PAMs) ricos em cisteína, são

catiônicos e anfipáticos contendo domínio WAP (*Whey Acidic Protein*) na extremidade C-terminal (SMITH *et al.*, 2008). O domínio WAP é um domínio conservado contendo oito resíduos de cisteína, formado por um núcleo composto por quatro dissulfeto característico, que também é encontrado em muitas proteínas que apresentam propriedades inibidoras de protease ou funções regulatórias no crescimento e diferenciação de tecido (RANGANATHAN *et al.*, 2000).

As Crustinas do Tipo II estão presentes principalmente em peneídeos e possuem uma região hidrofóbica rica em resíduos de glicina (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2007). Em um estudo realizado com *L. vannamei* demonstrou que a expressão da Crustina tipo IIa nos hemócitos não foi induzida após desafio intramuscular com o WSSV (BARRETO *et al.*, 2018). No entanto não foi o que ocorreu em nossos estudos, possivelmente por diferença do meio de cultivo, metodologia no desafio viral e tecido avaliado. Animais cultivados em BFT seriam imunoestimulados pelo próprio meio de cultivo, rico em microrganismo, o que não ocorreria em animais cultivados em água clara como o estudo realizado por Barreto e colaboradores (2018). Por fim, Crustinas tipo IIa, foram identificadas apenas em hemócitos e brânquias, sugerindo uma provável infiltração hemocitária no caso das brânquias, o que também sugerimos frente aos dados aqui apresentados. Mais estudos são necessários para elucidar os resultados de expressão desse peptídeo no grupo BFT.W, já que não se tem relato de *LvCrustina* tipo IIa na defesa antiviral.

Em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo sugerem a atuação sinérgica de hemócitos infiltrados e epitélio intestinal na imunidade dos peneídeos, uma vez que os genes avaliados possuem majoritariamente expressão hemocitária (SILVEIRA *et al.*, 2018). A participação do epitélio intestinal na produção de efetores imunológicos como os peptídeos antimicrobianos stylicinas, como dito anteriormente, foi já demonstrado (FARIAS *et al.*, 2019). Para confirmar essa hipótese, faz-se necessário estudos futuros de hibridização *in situ* para demonstrar o (s) sítio (s) de expressão destes genes e a existência de tipos específicos de hemócitos que possam residir no intestino e que atuem na defesa destes animais contra patógenos. Além disso, nossos resultados reforçam que o cultivo em BFT tenha um efeito imunoestimulante para os camarões, possivelmente melhorando seu estado geral de saúde e imunocompetência geral, como sugerido por estudos anteriores (PILOTTO *et al.*, 2020).

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que o cultivo em BFT associado à presença do WSSV no intestino médio dos camarões promoveu a alteração na expressão de um maior número de genes que os animais no cultivo controle, em água clara. Os genes que tiveram expressão diferencial no IM (*LvHMGBa*, *LvAgo*, *LvproPO2*, *LvHHAP*, *LvTGI* e *LvCrustina IIa*) dos animais em BFT, foram induzidos pela presença do WSSV no intestino médio, diferentemente do observado nos animais cultivados em água clara onde a presença do vírus induziu apenas um gene, o *LvToll3* e reprimiu outros dois genes, o *LvDscam* e *LvDuox*.

Das dez categorias funcionais avaliadas, sete apresentaram pelo menos um gene alterado. As categorias gênicas que sofreram alterações de expressão em função do desafio viral nos camarões cultivados em dois diferentes cultivos, foram aquelas associadas à defesa antimicrobiana (sistema proPO, proteínas de reconhecimento padrão-PRP, sistema Redox e peptídeos antimicrobianos), defesa antiviral (RNA de interferência) e homeostasia (coagulação, homeostasia hemocitária e alarminas). A dimensão em termos fisiológicos destes achados ainda não é plenamente compreendida, no entanto, estudos futuros deverão ser conduzidos para elucidar questões envolvendo a relação entre o ambiente de cultivo e a resposta do hospedeiro frente a um patógeno.

Como perspectivas, sugerimos análises de hibridização *in situ* para identificar se há expressão simultânea dos transcritos diferencialmente expressos em hemócitos e epitélio intestinal. No caso de a expressão diferencial de genes identificada ser proveniente de hemócitos infiltrados no IM, avaliar a existência de sub-populações de hemócitos que residam no intestino médio e atuem na imunidade intestinal do camarão e, realizar silenciamento gênico pós-traducional pela técnica de RNAi, de genes de interesse, como a alarmina *LvHMGBa*, o que poderia contribuir para elucidar o seu papel fisiológico na defesa contra vírus e também na manutenção e controle da microbiota, assim como a taxa de sobrevivência desses animais cultivados em BFT e desafiado com o vírus da síndrome da mancha branca. Adicionalmente, estudos mais aprofundados poderiam investigar se alguns dos genes diferencialmente expressos poderiam servir como candidatos a marcadores moleculares para a seleção genética futura de camarões tolerantes e/ou resistentes, contribuindo para o controle de infecções virais que ainda assolam os cultivos de camarões.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, K. Abul; LICHTMAN, H. Andrew; PILLAI, Shiv. Immunologia - celular e molecular. **Angewandte Chemie International Edition**, [S. l.], v. 6, n. 11, p. 951–952, 1967.
- AI, Hua Shui *et al.* A novel prophenoloxidase 2 exists in shrimp hemocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 59–68, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.07.017>
- ALVES, Alex; CEPA, Engenheiro-agr Epagri. Maricultura. [S. l.], 2017.
- AMPARYUP, Piti *et al.* Pattern recognition protein binds to lipopolysaccharide and β -1,3-glucan and activates shrimp prophenoloxidase system. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 287, n. 13, p. 10060–10069, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.294744>
- ANDERSON, Kathryn; NUSSLEIN-VOLHARD, Christiane. Information for D-V pattern of *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. **Nature**, [S. l.], 1984.
- ANDERSSON, Ulf; YANG, Huan; HARRIS, Helena. High-mobility group box 1 protein (HMGB1) operates as an alarmin outside as well as inside cells. **Seminars in Immunology**, [S. l.], v. 38, n. February, p. 40–48, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.02.011>
- ANGTHONG, Pacharaporn *et al.* Cloning and characterization of a melanization inhibition protein (PmMIP) of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 464–468, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.05.014>
- APPRILL, Amy. Marine Animal Microbiomes: Toward Understanding Host–Microbiome Interactions in a Changing Ocean. **Frontiers in Marine Science**, [S. l.], v. 4, n. July, p. 1–9, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00222>
- ARMITAGE, Sophie A. O.; PEUSS, Robert; KURTZ, Joachim. Dscam and pancrustacean immune memory - A review of the evidence. **Developmental and Comparative Immunology**, [S. l.], v. 48, n. 2, p. 315–323, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.03.004>
- ARTS, Joop A. J. *et al.* Haemocyte reactions in WSSV immersion infected *Penaeus monodon*. **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 164–170, 2007.

- Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.10.003>
- ASCHE, Frank *et al.* The economics of shrimp disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, [S. l.], n. March, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107397>
- AVNIMELECH, Yoram. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture**, [S. l.], v. 176, n. 3–4, p. 227–235, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00085-X)
- BARRACCO, Margherita Anna; PERAZZOLO, Luciane Maria; ROSA, Rafael D. Avances en la Inmunología del Camarón. **Guía Técnica: Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos**, [S. l.], p. 169–224, 2008.
- BARRACCO, Margherita Anna; PERAZZOLO, Luciane Maria; ROSA, Rafael Diego. Avances en la Inmunología del Camarón. *In: Guía Técnica - Patología e inmunología de camarones penaeidos*. [S. l.: s. n.]. p. 237–287. *E-book*.
- BARRETO, Cairé *et al.* Specific molecular signatures for type II crustins in penaeid shrimp uncovered by the identification of crustin-like antimicrobial peptides in *litopenaeus vannamei*. **Marine Drugs**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 5–7, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md16010031>
- BURFORD, Michele A. *et al.* The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. **Aquaculture**, [S. l.], v. 232, n. 1–4, p. 525–537, 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00541-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00541-6)
- BUSTIN, Stephen A. *et al.* The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, [S. l.], v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- CAPO, Florence; WILSON, Alexa; DI CARA, Francesca. The Intestine of *Drosophila melanogaster*: An Emerging Versatile Model System to Study Intestinal Epithelial Homeostasis and Host-Microbial Interactions in Humans. **Microorganisms**, [S. l.], v. 7, n. 9, p. 336, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090336>
- CHEN, Y. *et al.* Molecular characterization of the dual oxidase (LvDuox) gene from the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Invertebrate Survival Journal**, [S. l.], v. 15, p. 316–326, 2018.
- DO ESPÍRITO SANTO, Carlos Manoel *et al.* Soybean molasses as an organic carbon

source in the farming of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a biofloc system.

Aquaculture Research, [S. l.], v. 48, n. 4, p. 1827–1835, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/are.13020>

DUAN, Yafei *et al.* Transcriptomic and microbiota response on *Litopenaeus vannamei* intestine subjected to acute sulfide exposure. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 88, p. 335–343, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.021>

DURLIAT, MICHÈLE. CLOTTING PROCESSES IN CRUSTACEA DECAPODA. **Biological Reviews**, [S. l.], v. 60, n. 4, p. 473–498, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1985.tb00620.x>

EGAN, Suhelen; GARDINER, Melissa. Microbial Dysbiosis: Rethinking Disease in Marine Ecosystems. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. JUN, p. 1–8, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00991>

EKASARI, Julie *et al.* Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 332–339, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.09.004>

EMERENCIANO, Mauricio; GAXIOLA, Gabriela; CUZO, Gerard. Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. *In: Biomass Now - Cultivation and Utilization*. [S. l.]: InTech, 2013. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/53902>

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**, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 1–18, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00877.x>

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. **Nature and Resources**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 210, 2018.

FAO. **World fisheries and aquaculture in review**. [S. l.: s. n.]. v. 35 *E-book*.

FARIAS, Natanael Dantas *et al.* *Litopenaeus vannamei* stylicins are constitutively produced by hemocytes and intestinal cells and are differentially modulated upon infections. **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 86, n. November 2018, p. 82–92, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.021>

GAGLIARDI, Talita. Imunidade intestinal em camarões *Litopenaeus vannamei* : expressão gênica espacial e o efeito da via de infecção pelo WSSV Florianópolis Talita Ribeiro Gagliardi Imunidade intestinal em camarões *Litopenaeus vannamei* : expressão

gênica espacial e o efeito d. [S. l.], p. 105, 2020. Disponível em:

<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/215806/PBCD0122-D.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>

GUANZON, David Angelo V.; MANINGAS, Mary Beth B. Functional elucidation of LvToll 3 receptor from *P. vannamei* through RNA interference and its potential role in the shrimp antiviral response. **Developmental and Comparative Immunology**, [S. l.], v. 84, p. 172–180, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.01.020>

HA, Eun Mi *et al.* An antioxidant system required for host protection against gut infection in *Drosophila*. **Developmental Cell**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 125–132, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.11.007>

HAMMOND, Scott M. *et al.* Argonaute2 2001scott. [S. l.], v. 293, n. August, p. 1146–1151, 2001.

HUNG, Hsin Yi *et al.* Properties of *Litopenaeus vannamei* Dscam (LvDscam) isoforms related to specific pathogen recognition. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 1272–1281, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.045>

IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2019. [S. l.], p. 1–12, 2019.

INADA, Mari *et al.* Deciphering of the Dual oxidase (Nox family) gene from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*: Full-length cDNA cloning and characterization. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 34, n. 2, p. 471–485, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.026>

JIRAVANICHPAISAL, Pikul *et al.* Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: Characterization and expression pattern. **Developmental and Comparative Immunology**, [S. l.], v. 31, n. 5, p. 441–455, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.08.002>

JUVEN, Benjamin J.; PIERSON, Merle D. Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation. **Journal of Food Protection**, [S. l.], v. 59, n. 11, p. 1233–1241, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.11.1233>

KIM, Min Su *et al.* Growth performance and immunological and antioxidant status of Chinese shrimp, *Fennerpenaeus chinensis* reared in bio-floc culture system using probiotics. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 47, n. 1, p. 141–146, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.08.027>

KIM, Su-Kyoung *et al.* Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific

- white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. **Aquaculture Research**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 362–371, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/are.12319>
- KIM, Sung-Hee; LEE, Won-Jae. Role of DUOX in gut inflammation: lessons from *Drosophila* model of gut-microbiota interactions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 3, n. JAN, p. 1–12, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00116>
- LAI, Ching Yi; CHENG, Winton; KUO, Ching Ming. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase from haemocytes of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 18, n. 5, p. 417–430, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.10.004>
- LEE, Hye-Yeon *et al.* The role of commensal microbes in the lifespan of *Drosophila melanogaster*. **Aging**, [S. l.], v. 11, n. 13, p. 4611–4640, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/aging.102073>
- LEMAITRE, Bruno *et al.* The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette ". **Cell**, [S. l.], v. 86, n. imd, p. 973–983, 1996.
- LI, Chaozheng *et al.* Identification, Characterization, and Function Analysis of the Cactus Gene from *Litopenaeus vannamei*. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 11, p. e49711, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049711>
- LI, Chaozheng; WENG, Shaoping; HE, Jianguo. WSSV–host interaction: Host response and immune evasion. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 84, n. October 2018, p. 558–571, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.043>
- LIGHTNER, D. V. *et al.* Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of Invertebrate Pathology**, [S. l.], v. 110, n. 2, p. 174–183, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.006>
- LIU, Jidong. Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. **Science**, [S. l.], v. 305, n. 5689, p. 1437–1441, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1102513>
- LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- LO, CF *et al.* Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. **Diseases of Aquatic Organisms**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 53–72, 1997. Disponível

em: <https://doi.org/10.3354/dao030053>

LO, Chu-Fang; KOU, Guang-Hsiung. Virus-associated White Spot Syndrome of Shrimp in Taiwan: A Review. **Fish Pathology**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 365–371, 1998.

Disponível em: <https://doi.org/10.3147/jsfp.33.365>

MAYO, M. A. Virology Division News. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 147, n. 5, p. 1071–1076, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s007050200036>

MCGAW, Iain J.; CURTIS, Daniel L. A review of gastric processing in decapod crustaceans. **Journal of Comparative Physiology B**, [S. l.], v. 183, n. 4, p. 443–465, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0730-3>

MONCRIEFFE, Martin C.; GROSSMANN, J. Günter; GAY, Nicholas J. Assembly of oligomeric death domain complexes during toll receptor signaling. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 283, n. 48, p. 33447–33454, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M805427200>

MOSS, Shaun M. *et al.* The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture. **Journal of Invertebrate Pathology**, [S. l.], v. 110, n. 2, p. 247–250, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.01.013>

NADALA, E. Cesar B.; LOH, Philip C. A comparative study of three different isolates of white spot virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, [S. l.], v. 33, n. 3, p. 231–234, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.3354/dao033231>

NETEA, Mihai G.; VAN DER MEER, Jos W. M. Trained Immunity: An Ancient Way of Remembering. **Cell Host & Microbe**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 297–300, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.02.003>

NG, Tze Hann *et al.* Reprint of “Review of Dscam-mediated immunity in shrimp and other arthropods”. **Developmental and Comparative Immunology**, [S. l.], v. 48, n. 2, p. 306–314, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.07.017>

OLIVEIRA, Rafael C. O Panorama Da Aqüicultura No Brasil: a Prática Com Foco Na. **Risco Ambiental e Sociedade**, [S. l.], v. 2, p. 71–89, 2009.

PEREZ FARFANTE, Isabel and KENSLEY Brian. Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World . Keys and Diagnoses for the Families and Genera. **Mémoires du Muséum national d’Histoire naturelle**, [S. l.], v. 175, n. November, p. 233, 1997.

PILOTTO, Mariana *et al.* Exploring the Impact of the Biofloc Rearing System and an Oral WSSV Challenge on the Intestinal Bacteriome of *Litopenaeus vannamei*. **Microorganisms**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 83, 2018. Disponível em:

<https://doi.org/10.3390/microorganisms6030083>

PILOTTO, Mariana Rangel *et al.* Environmental rearing conditions are key determinants of changes in immune gene expression patterns in shrimp midgut.

Developmental & Comparative Immunology, [S. l.], v. 106, n. April 2020, p. 103618, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103618>

PRAPAVORARAT, Adisak *et al.* A Novel Viral Responsive Protein Is Involved in Hemocyte Homeostasis in the Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 285, n. 28, p. 21467–21477, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.130526>

QI, Cancan *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 Immunology**, [S. l.], v. 70, p. 437–450, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.004>

RANGANATHAN, Shoba *et al.* The whey acidic protein family : A new signature motif and three-dimensional structure by comparative modeling. [S. l.], v. 3263, n. 99, p. 106–113, 2000.

ROBALINO, Javier *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**, [S. l.], v. 31, n. 6, p. 539–547, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.08.011>

SESSA, Luca; BIANCHI, Marco E. The evolution of High Mobility Group Box (HMGB) chromatin proteins in multicellular animals. **Gene**, [S. l.], v. 387, n. 1–2, p. 133–140, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.08.034>

SILVEIRA, Amanda 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 & Comparative Immunology**, [S. l.], v. 79, p. 44–50, 2018. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.10.005>

SMITH, S.; BRIGGS, M. The introduction of *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris* into the Asia-Pacific region. **International Mechanisms for the Control and Responsible Use of Alien Species in Aquatic Ecosystems. Report of an Ad Hoc Expert Consultation, 27-30 August 2003, Xishuangbanna, People's Republic of China.**, [S. l.], p. 19–167, 2005. Disponível em:

[2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:book&genre=conference&sid=ProQ:Aquatic+Science+&+Fisheries+Abstracts+\(ASFA\)+Aquaculture+Abstracts&a](http://search.proquest.com/docview/19453412?accountid=14643%5Cnhttp://mlbsfx.sibi.usp.br:3410/sfxlcl41?url_ver=Z39.88-</p>
</div>
<div data-bbox=)

SMITH, Valerie J. *et al.* Crustins : Enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. *[S. l.]*, p. 758–772, 2008. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.12.002>

SOONTHORNCHAI, Wipasiri *et al.* Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi*.

Developmental & Comparative Immunology, *[S. l.]*, v. 34, n. 1, p. 19–28, 2010.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.07.007>

TANDEL, G. M. *et al.* Current status of viral diseases in Indian shrimp aquaculture.

Acta virologica, *[S. l.]*, v. 61, n. 02, p. 131–137, 2017. Disponível em:

https://doi.org/10.4149/av_2017_02_01

TASSANAKAJON, Anchalee *et al.* Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. **Fish & Shellfish Immunology**, *[S. l.]*, v. 34, n. 4, p.

954–967, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.021>

TAW, Nyan. Biofloc Technology Expanding At White Shrimp Farms. **Global**

Aquaculture Advocate, *[S. l.]*, n. June, p. 20–22, 2010.

THITAMADEE, Siripong *et al.* Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. **Aquaculture**, *[S. l.]*, v. 452, p. 69–87, 2016. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.028>

VANDESOMPELE, Jo *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Rock Mechanics and**

Rock Engineering, *[S. l.]*, v. 3, n. 7, p. 2–12, 2002. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s00603-018-1496-z>

WANG, Pei Hui *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of two novel Toll (LvToll2 and LvToll3) and three putative Spätzle-like Toll ligands

(LvSpz1-3) from *Litopenaeus vannamei*. **Developmental and Comparative**

Immunology, *[S. l.]*, v. 36, n. 2, p. 359–371, 2012. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.007>

WANG, Yu Chi; CHANG, Poh Shing; CHEN, Houng Yung. Tissue distribution of prophenoloxidase transcript in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish**

and Shellfish Immunology, [*S. l.*], v. 20, n. 3, p. 414–418, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.05.003>

WEN, Rong *et al.* Shrimp MyD88 responsive to bacteria and white spot syndrome virus. **Fish & Shellfish Immunology**, [*S. l.*], v. 34, n. 2, p. 574–581, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.034>

YEH, Maw Sheng *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**, [*S. l.*], v. 26, n. 1, p. 49–55, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.10.003>