



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

“CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS  
EXPRESSAS EM BRÂNCUIAS DO CAMARÃO BRANCO  
*Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) INFECTADO *VERSUS* NÃO  
INFECTADO COM O VÍRUS DA MANCHA BRANCA (WSSV)”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

Orientadora: Maria Risoleta Freire Marques

**PEDRO ALEXANDRE VALENTIM NETO**

Florianópolis, 2011

V155c Valentim Neto, Pedro Alexandre

Caracterização do perfil diferencial de proteínas expressas em brânquias do camarão branco *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) infectado versus não infectado com o vírus da mancha branca (WSSV) [tese] / Pedro Alexandre Valentim Neto ; orientadora, Maria Risoleta Freire Marques. - Florianópolis, SC, 2011.

148 p.: il., graf., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Camarão - Criação - Santa Catarina. 3. Camarão - Doenças. 4. Vírus da síndrome da mancha branca. 5. Proteínas. I. Marques, Maria Risoleta Freire. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

CDU 639.3

**Caracterização do perfil diferencial de proteínas expressas em  
brânquias do camarão branco *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)  
infectado *versus* não infectado com o vírus da mancha branca (WSSV)**

Por

PEDRO ALEXANDRE VALENTIM NETO

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

**DOUTOR EM AQUICULTURA**

e aprovada em sua forma final pelo Programa de  
Pós-Graduação em Aquicultura.

---

Prof. Evoy Zaniboni Filho, Dr.  
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

---

Dra. Maria Risoleta Freire Marques – *Orientadora*

---

Dr. Carlos Peres Silva

---

Dr. Daniel Macedo Lorenzini

---

Dr. Jose Camillo Novello

---

Dr. Walter Quadros Seiffert



*Ao meu pai Francisco de Castro Valentim (in memoriam),  
minha mãe Maria das Graças Lopes Valentim,  
meus irmãos Rouse, Rozenda, Valentim Filho e  
meus adorados sobrinhos Ana Graça,  
Inah, Sarah, Luana e Yuri .  
Dedico.*



## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, razão de todas as coisas.

À professora Dra. Maria Risoleta Freire Marques pela orientação durante o doutorado, confiança, ensinamentos e acolhida.

À toda equipe do LABCAI, pela ajuda, compreensão, amizade, companheirismo e momentos divertidos.

À Ana Paula de Medeiros Fraga meu braço direito e às vezes o esquerdo também em todos os momentos desta longa e difícil jornada.

À Juliana Moser, pela amizade e todos os momentos juntos de trabalho e dificuldades.

À Daniela Soares pelas coletas, trocas de idéias e sugestões durante o trabalho.

À FINEP pela concessão dos recursos que viabilizaram a execução deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado (Amazônia Azul).

Ao Secretário da Pós-graduação em Aquicultura Carlito Klunk, por toda dedicação e disposição em ajudar.

Aos professores do curso de pós-graduação em Aquicultura pela contribuição na minha formação com os conhecimentos passados.

Aos que não foram citados, mas que direta ou indiretamente apoiaram e fizeram parte desta conquista.

À Rachel Costa Sabry, amiga de todas as horas com quem compartilhei muito da vida e dos aprendizados.

À Wanessa de Melo Costa, pela amizade, carinho e atenção.

À minha família, por sempre me apoiar e incentivar, mesmo distantes sempre estiveram presentes.

Ao professor Dr. Hernán F. Terenzi coordenador do Centro de Biologia Molecular e Estrutural

(CEMBIME) pelo apoio nas análises na espectrometria de massa.

Ao professor Dr. Luís Drude de Lacerda pela concessão da bolsa junto à CAPES

Ao professor Dr. Afonso Celso Dias Bainy pelas contribuições no doutorado.

À professora Dra. Tereza Cristina Vasconcelos Gesteira, em especial, pois graças a ela iniciei minha carreira científica e a quem tenho muito carinho e estima.

*“Crescemos em número a ponto de nossa presença estar perceptivelmente incapacitando nosso planeta, como uma doença. À semelhança das doenças humanas, quatro são os resultados possíveis: destruição dos organismos invasores da doença, infecção crônica, destruição do hospedeiro ou simbiose – um relacionamento duradouro, beneficiando mutuamente hospedeiro e invasor”.*

***James Lovelock***  
***A vingança de Gaia***



## RESUMO

A carcinicultura tem crescido muito nos últimos anos devido à grande demanda do mercado consumidor. No entanto, o surgimento de enfermidades representa uma ameaça concreta para a manutenção dos níveis de produção do setor. Entre as enfermidades virais, podemos citar aquela causada pelo vírus da síndrome da mancha branca como uma das principais responsáveis por afetar o cultivo de camarão marinho em nível mundial. Este trabalho teve como objetivo caracterizar o perfil diferencial de proteínas expressas em brânquias do camarão branco, *Litopenaeus vannamei*, infectado com o vírus da síndrome da mancha branca (*White spot syndrome vírus*, WSSV). Espécimes de *L. vannamei* sobreviventes foram coletados em cultivos na região norte e sul do estado de Santa Catarina, de 2008 a 2009, entre Maio e Setembro, período no qual são registradas temperaturas mais baixas na região. A segunda parte do estudo foi realizada com camarões *L. vannamei* livres de patógeno específico (*specific pathogen free*, SPF), os quais foram divididos em dois grupos, sendo um deles inoculado (inoculação intramuscular) com o WSSV. Os camarões (grupo inoculado e grupo controle) foram mantidos em laboratório e monitorados continuamente por um período de 72 horas, após a inoculação. Foi realizada a coleta de brânquias e pleópodes. A confirmação da presença do WSSV nos camarões coletados no campo e naqueles inoculados em laboratório foi realizada através de PCR *nested*. Posteriormente, a análise proteômica foi realizada através de eletroforese bidimensional (2-DE), seguida de coloração dos géis por nitrato de prata e/ou CBB (G-250). O perfil de proteínas, revelado com base na análise densitométrica dos géis, foi, então, comparado entre os camarões positivos para o WSSV e aqueles sem a presença do vírus. Dentre os *spots* (proteínas) presentes nos perfis eletroforéticos determinados para cada um dos grupos, um total de 56 foi associado à expressão diferencial entre os camarões infectados e camarões não infectados pelo WSSV. Oito *spots* foram observados nos animais coletados no campo, enquanto 48 deles foram observados nos animais inoculados em laboratório. A identificação das proteínas expressas diferencialmente foi realizada através de espectrometria de massa MALDI/TOF. As proteínas identificadas podem ser agrupadas de acordo com as suas funções celulares, revelando proteínas envolvidas nas respostas de defesa do hospedeiro, no metabolismo energético, na resposta ao estresse e na apoptose celular. Estas proteínas podem ser consideradas como biomarcadores moleculares potenciais, cuja

identificação pode contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos de defesa, susceptibilidade e tolerância ao WSSV, bem como, para o delineamento de novas estratégias para minimizar o impacto e combater a enfermidade.

*Palavras-chave:* WSSV, camarão, proteína, 2-DE, vírus.

## ABSTRACT

The shrimp industry has considerably grown in recent years due to the high demand of the the consumer market. However, the emergence of diseases represents a real threat to the maintenance of the production levels in the marine shrimp farming worldwide. Among the viral diseases, the white spot syndrome can be considered as the most important affecting farmed shrimp worldwide. The present study aimed to characterize the differential profile of proteins expressed in gills of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, infected with white spot syndrome virus (WSSV). Farmed shrimp (symptomatic and asymptomatic) were collected in the northern and southern regions of Santa Catarina, Brazil, from 2008 to 2009, between May and September, when lower temperatures are registered in the state. In an another experiment, specific pathogen free (SPF) shrimps were divided into two groups and one of them was challenged with WSSV. Shrimp (inoculated and control) were kept under laboratory conditions and continuously monitored for a period of 72 hours after muscular inoculation. Gill tissue and pleopods were collected. The presence of WSSV in both field and laboratory shrimp was confirmed by *nested* PCR. Subsequently, the proteomic analysis was performed using two-dimensional electrophoresis (2-DE), followed by gel staining with Coomassie Brilliant Blue (G-250) and/or silver nitrate. The protein profile revealed by densitometry was then compared between WSSV positive shrimp and those negative for the virus. Among the *spots* (proteins) seen in the electrophoretic profiles obtained for each group of shrimp, a total of 56 spots was associated with a differential protein expression between WSSV infected and non-infected shrimp. Eight spots were seen in farmed shrimp, whereas 48 spots were seen in shrimp inoculated in the laboratory. The identification of the differentially expressed proteins was performed by mass spectrometry (MALDI/TOF) and revealed proteins involved in several cellular roles, such as, host defense response, energetic metabolism, stress response and apoptosis. These proteins can be considered as potential molecular biomarkers which validation can contribute to better understand defense, susceptibility and tolerance mechanisms to WSSV, as well as to draw new strategies to minimize the impact and control the disease.

*Key words:* WSSV, shrimp, protein, 2-DE, virus.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Eletroforese representativa do resultado da <i>nested</i> PCR para a detecção do WSSV em amostras de camarão .....	81
<b>Figura 2.</b> Eletroforese representativa do resultado da PCR para a detecção do IHNV em amostras de camarã.....	82
<b>Figura 3:</b> 2-DE de proteínas precipitadas com TCA 15% em PBS e TCA 8% em Acetona .....	83
<b>Figura 4:</b> 2-DE de proteínas precipitadas com TCA 8% em Acetona e TCA 8% em Acetona com maior centrifugação.....	84
<b>Figura 5:</b> 2-DE de proteínas precipitadas com TCA 8% em Acetona e TCA 10% e DTT 0,1% em Acetona.....	86
<b>Figura 6:</b> 2-DE de proteínas precipitadas com TCA 10% e DTT 0,1% em PBS e TCA 10% e DTT 0,1% em Acetona.....	87
<b>Figura 7:</b> 2-DE de proteínas precipitadas com TCA 10% e DTT 0,1% em PBS com ou sem limpeza com <i>Clean-up</i> kit.....	90
<b>Figura 8:</b> 2-DE de proteínas limpas com <i>Clean-up</i> Kit e submetidas ou não a limpeza com <i>PD MiniTrap G-10</i> .....	91
<b>Figura 9:</b> 2-DE de 150 ou 250 µg de proteínas coradas com nitrato de prata ou CBB .....	94
<b>Figura 10:</b> 2-DE de camarões com e sem WSSV.....	95
<b>Figura 11:</b> 2-DE perfil de proteínas das brânquias de <i>L. vannamei</i> ...	109
<b>Figura 12:</b> Espectrograma representativo obtido a partir da digestão triptica do spot/proteína (198) da amostra de brânquias de <i>Litopenaeus vannamei</i> coletados no campo e infectados naturalmente pelo WSSV .....	113
<b>Figura 13:</b> Géis 2-DE representativos do perfil de proteínas das brânquias de <i>L. vannamei</i> 72 horas após a infecção por WSSV .....	151
<b>Figura 14:</b> Espectrograma representativo obtido a partir da digestão triptica do spot/proteína (494) da amostra de brânquias de <i>Litopenaeus vannamei</i> infectados pelo WSSV.....	162



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Protocolo 1 IEF .....	76
<b>Tabela 2:</b> Protocolo 2 IEF .....	76
<b>Tabela 3:</b> Protocolo 3 IEF .....	77
<b>Tabela 4:</b> Proteínas alteradas em brânquias do camarão branco infectadas com WSSV, identificadas por PMF .....	111
<b>Tabela 5:</b> Quantificação da carga viral durante 72 horas após infecção com WSSV no camarão <i>L. vannamei</i> .....	144
<b>Tabela 6:</b> Proteínas alteradas pela infecção por WSSV em brânquias de <i>L. vannamei</i> identificadas por PMF .....	153



## LISTA DE ABREVIATURAS

ACN - Acetonitrila

BGBP -  $\beta$ -1,3-glucano proteína de reconhecimento padrão

BSA - Albumina Bovina Sérica

CBB - Azul de Coomassie Brilhante G-250

CHAPS - 3 - [(3-Cholamidopropyl)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanesulfonato

CTAB - Brometo de cetil-trimetilamônio

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídio trifosfatado

DTT - Ditioneitol

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

IEF - Focalização Isoelétrica

IHHNV - Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética

IMNV - Vírus da Mionecrose Infecciosa

IPG - Gradiente imobilizado de pH

LP - Lipopolisacarídeo

MALDI-TOF - Dessorção/ionização a laser em matriz assistida - tempo de voo

MS - Espectrometria de massa

MW - Massa molecular

OIE - Organização Internacional de Epizootias

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS - Tampão fosfato-salino

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PCR *nested* - PCR de dois passos

PGBP - proteína de reconhecimento/ligação de peptidoglicana

PGN - peptidoglicana

PMF - Impressão digital de peptídeo  
PMSF - Fluoreto de fenilmetil-sulfonil  
PO - Fenoloxidase  
Pool - Amostra composta  
Primer - Iniciador  
proPO - Pró-fenoloxidase  
PRP - Proteína de reconhecimento de padrões  
PSA - Persulfato de amônia  
*q*PCR - PCR em tempo real  
SDS - Dodecil sulfato de sódio  
SPF - Livre de patógenos específicos  
Spot - Ponto que delimita proteínas  
Strip - Tira desidratada de poliacrilamida  
TCA - Ácido tricloroacético  
TE - Tampão Tris/EDTA  
TEMED - Tetrametiletilenodiamina  
TFA - Ácido trifluoracético  
Tris - Hidroximetilaminometano  
TSV – Vírus da Síndrome de Taura  
V - Volt  
WSS - Síndrome da Mancha Branca  
WSSV - Vírus da Síndrome da Mancha Branca  
YHV - Vírus da Cabeça Amarela  
2-DE - Eletroforese bidimensional

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>24</b>
1. Cultivo de camarões.....	24
2. Principais enfermidades em camarões peneídeos.....	28
3. O Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV).....	35
4. Imunologia de crustáceos.....	38
5. Mecanismos de defesa em crustáceos.....	43
5.1. Proteínas de Reconhecimento de Padrões (PRPs).....	44
5.2. Lectinas.....	47
6. Resposta celular.....	49
6.1. Apoptose.....	49
6.2. Acomodação viral.....	52
7. Imunoestimulantes.....	54
8. Proteômica no diagnóstico e no estudo de enfermidades de camarões.....	55
9. Espectrometria de massa na análise de proteínas.....	56
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>Padronização da metodologia de Eletroforese Bidimensional (2-DE) para a determinação do perfil diferencial de proteínas no camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> infectado naturalmente com WSSV</b> .....	<b>59</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>59</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>60</b>
1. A proteômica e seus avanços.....	60
<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>62</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>63</b>
3.1. Objetivo Geral.....	63
3.2. Objetivos Específicos.....	64
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>64</b>
4.1. Coleta do material biológico.....	64

4.2. Identificação dos grupos positivos e negativos para WSSV e IHHNV .....	65
4.2.1. Extração de DNA genômico.....	65
4.2.2. PCR.....	66
4.2.2.1. PCR <i>nested</i> para detecção do WSSV .....	66
4.2.2.2. PCR para detecção do IHHNV .....	67
4.3. Homogeneização de proteínas .....	68
4.4. Precipitação de proteínas .....	69
4.4.1. TCA 15% em PBS.....	69
4.4.2. TCA 8% em Acetona.....	70
4.4.2.1. TCA 8% em Acetona com maior centrifugação .....	70
4.4.3. TCA 10% e DTT 0,1% em PBS .....	71
4.4.4. TCA 10% e DTT 0,1% em Acetona.....	72
4.5. Limpeza de proteínas.....	73
4.5.1. <i>Clean-up Kit</i> .....	73
4.5.2. <i>PD MiniTrap G-10</i> .....	74
4.6. Dosagem de proteínas.....	74
4.6.1. Método de Bradford.....	74
4.7. Reidratação do strip .....	75
4.8. Focalização Isoelétrica – 1º Dimensão .....	75
4.8.1. Programa de Focalização Isoelétrica .....	76
4.8.2. Armazenamento do strip após Focalização Isoelétrica ..	77
4.9. Equilíbrio do strip com DTT e Iodoacetamida .....	77
4.10. Eletroforese em SDS-PAGE – 2º Dimensão .....	78
4.11. Métodos de coloração.....	79
4.11.1. Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) .....	79
4.11.2. Nitrato de Prata.....	79
4.12. Digitalização das imagens .....	80
4.13. Análise dos géis .....	80
4.14 Análise estatística .....	81

<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
5.1. Identificação dos grupos positivos e negativos para WSSV e IHHNV .....	81
5.1.1. PCR <i>nested</i> para detecção do WSSV .....	81
5.1.2. PCR para detecção do IHHNV .....	82
5.2. Precipitação de proteínas .....	83
5.2.1. TCA 15% em PBS e TCA 8% em Acetona .....	83
5.2.2. TCA 8% em Acetona e TCA 8% em Acetona com maior centrifugação .....	84
5.2.3. TCA 8% em Acetona e TCA 10% com DTT 0,1% em Acetona .....	85
5.2.4. TCA 10% e DTT 0,1% em PBS e TCA 10% e DTT 0,1% em Acetona .....	87
5.2.5. TCA 10% e DTT 0,1% em PBS com e sem <i>Clean-up</i> ... ..	89
5.2.6. TCA 10% e DTT 0,1% em PBS com <i>Clean-up</i> com e sem <i>PD Minitrap G-10</i> .....	90
5.3. Clarificação e dessalificação das amostras .....	92
5.3.1. <i>Clean-up Kit</i> .....	92
5.3.2. <i>PD MiniTrap G-10</i> .....	92
5.4. Dosagem de proteínas .....	92
5.5. Programação da Focalização Isoelétrica .....	93
5.6. Concentração de proteínas e métodos de coloração.....	93
5.7. Análise dos géis .....	94
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>96</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>176</b>

## **CAPÍTULO 2**

<b>Proteínas diferenciais em brânquias de <i>Litopenaeus vannamei</i> naturalmente infectado com o vírus da síndrome da mancha branca.....</b>	<b>97</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>97</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>98</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>101</b>
2.1. Coleta de animais .....	101

2.2. Detecção do WSSV .....	102
2.3. Quantificação da carga viral do WSSV .....	103
2.4. Extração de proteínas das brânquias .....	103
2.5. 2-DE .....	104
2.6. Análise das imagens .....	105
2.7. Digestão da proteína em gel .....	106
2.8. MALDI-TOF/PMF .....	107
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>108</b>
3.1. Comparação do perfil de proteínas expressas entre camarões WSSV positivos e controle.....	108
3.2. Identificação das proteínas .....	110
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>114</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>124</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>124</b>

### **CAPÍTULO 3**

<b>Expressão diferencial de proteínas em brânquias de <i>Litopenaeus vannamei</i> infectado com o vírus da síndrome da mancha branca..</b>	<b>138</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>138</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>139</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>142</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>143</b>
3.1. Material biológico.....	143
3.2. Detecção do WSSV .....	144
3.3. Extração de proteínas das brânquias .....	145
3.4. 2-DE .....	146
3.5. Análise de imagens.....	147
3.6. Digestão da proteína em gel .....	148
3.7. MALDI-TOF/PMF .....	149
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>150</b>
4.1. Comparação do perfil de proteínas expressas entre camarões WSSV-infectados e controle.....	150
4.2. Identificação de Proteínas.....	151
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>163</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>175</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>176</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>176</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. Cultivo de camarões

A contribuição da aquicultura para o fornecimento mundial de pescado, crustáceos, moluscos e outros animais aquáticos tem aumentado seguidamente, passando de 3,9 % da produção total em 1970 a 36 % em 2006. No mesmo período, o crescimento da produção aquícola foi mais rápido que o crescimento da população e, assim, o seu fornecimento *per capita* passou de 0,7 kg em 1970 a 7,8 kg em 2006, o qual supõe um crescimento médio anual de 7,0 %. A aquicultura proporcionou 47 % do fornecimento mundial de pescado para alimentação em 2006 (FAO 2008).

A aquicultura de camarões peneídeos é uma indústria importante nas Américas, estando baseada quase que inteiramente sobre o cultivo do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*. No ano de 2004, carcinicultores em quatorze países do Hemisfério Ocidental produziram mais de 200 mil toneladas de camarão, gerando mais de US \$ 2 bilhões em receita, e empregando mais de 500.000 pessoas (LIGHTNER, 2011).

A atividade de cultivo do camarão ocupa uma posição de destaque no contexto do setor pesqueiro brasileiro, tanto do ponto de vista da organização da cadeia produtiva, como da participação na geração de emprego, renda e divisas, contribuindo de forma bastante positiva para o estabelecimento de uma nova estrutura produtiva permanente no meio rural litorâneo. Adicionalmente, a carcinicultura já promove uma verdadeira e importante inclusão social, haja vista que a participação de micros, pequenos e médios produtores correspondem a 95% do total de empreendimentos do setor (ROCHA, 2007).

A atividade da aquicultura estuarina ou maricultura vem demonstrando ser uma alternativa viável, do ponto de vista socioeconômico, para a manutenção das comunidades de pescadores artesanais e rurais adjacentes, evitando-se o êxodo dessas populações para os centros urbanos, o que, nos últimos anos, vem aumentando o cinturão da miséria na periferia das cidades brasileiras (ROCHA, ROCHA, FREITAS, 1998).

Os crustáceos pertencem a um grupo zoológico antigo e bem sucedido, constituído por mais de 42.000 espécies, sendo a maioria aquática. Este grupo inclui inúmeras espécies muito apreciadas para o consumo humano, como camarões, lagostas, lagostins, caranguejos e siris, cuja captura vem ameaçando a manutenção dos estoques naturais. O cultivo de crustáceos, principalmente de camarões, desponta neste

contexto como uma importante alternativa para a produção rápida e em alta escala de espécies para alimentação humana, auxiliando ainda a proteger as populações naturais de uma extração excessiva (BARRACCO, 2004).

Assim sendo, o cultivo de camarões tem um papel econômico importante e seu uso na aquicultura tem se expandindo rapidamente em vários países tropicais. Entre os desdobramentos positivos da carcinicultura estão o aumento do suprimento de alimento de alta qualidade e a geração de empregos. Entretanto, os métodos de cultivo inadequados, são fatores de estresse e, conseqüentemente, provocam uma série de alterações fisiológicas nos organismos cultivados, dentre elas, a depressão do sistema imune, predispondo os animais a doenças de causa e etiologia diversas. A ameaça representada pelas doenças, particularmente aquelas causadas por agentes infecciosos, tem sido reconhecida como um gargalo para a carcinicultura, ocasionando perdas econômicas significativas (GARGIONI, BARRACCO, 1998; MARQUES, BARRACCO, 2000; FIGUEIREDO, LOPES, LEAL, 2008; VAZQUEZ et al., 2009).

Os organismos aquáticos estão sujeitos à influência de inúmeros fatores ambientais resultantes dos ritmos diários e sazonais característicos dos ecossistemas costeiros e estuarinos. Muitas vezes, o estresse ambiental decorrente de atividades antrópicas pode ser um fator determinante para o aparecimento ou incremento na prevalência das doenças em crustáceos (MOULLAC, HAFFNER, 2000).

As doenças em peneídeos cultivados incluem síndromes de etiologia infecciosa e não-infecciosa. Dentre estas últimas, existem várias doenças comuns em camarões cultivados, cujas manifestações são decorrentes de fatores ambientais, como parâmetros de qualidade de água críticos (temperatura, salinidade e pH), desequilíbrios ou carências nutricionais, presença de xenobióticos (pesticidas, por exemplo), além daquelas associadas a fatores genéticos (LIGHTNER, 1996; BAINY, 2000; GALINDO-REYES et al., 2000; MARQUES, BARRACCO, 2000).

Segundo Barbieri-Júnior e Ostrensky (2002), a ocorrência de enfermidades é uma das maiores preocupações para os produtores de camarões marinhos. Os organismos vivos estão em estreita relação com o ambiente onde vivem formando um sistema único. De fato, muitas enfermidades ocorrem em condições ambientais desfavoráveis aumentando o impacto em um ambiente adverso para os animais.

O cultivo de camarões constitui um importante recurso de renda e emprego em muitos países. Entretanto, doenças infecciosas têm afetado

mundialmente a produção de camarão em diferentes regiões. Por essa razão, a prevenção de doenças é uma prioridade e a imunologia de camarões vem se tornando uma área primordial de pesquisa (RODRÍGUEZ, MOULLAC, 2000).

De acordo com Perazzolo et al. (2002), a modulação de alguns parâmetros imunológicos e/ou fisiológicos, como resposta às condições de estresse, pode funcionar como um importante indicador do estado de saúde, especialmente em animais cultivados, como camarões. Uma avaliação rápida e precisa desses fatores pode ser crucial para se obter sucesso na produção.

A utilização de métodos práticos e confiáveis para uma análise rápida do estado de saúde do camarão cultivado ainda é incomum entre os produtores. Os problemas de saúde são normalmente detectados em estágio avançado em sistemas de cultivo por meio de crescimento reduzido, comportamento anormal ou mesmo por mortalidade generalizada. Esta situação pode ser melhorada utilizando-se melhor o conhecimento disponível sobre as alterações fisiológicas, bioquímicas e imunológicas, bem como da gestão e das condições de estresse, induzidas pelo cultivo. O manejo frequente causa estresse para os animais por meios físicos (variações de temperatura, por exemplo), químicos (qualidade da água, entre outros) ou fatores biológicos (nutricionais ou infecciosos), o que pode resultar em uma redução da resistência imunológica do camarão e, assim, facilitar o estabelecimento de infecções (PERAZZOLO et al., 2002).

Apesar do crescimento expressivo na produção mundial de camarão cultivado, também tem sido elevada a perda periódica devido a doenças. Uma estimativa conservadora para a perda total por enfermidades nos últimos 15 anos pode ser da ordem de US\$ 15 bilhões. Isto ilustra a importância e necessidade do controle de doenças na indústria camaroneira (FLEGEL et al., 2008).

## **2. Principais enfermidades em camarões peneídeos**

Doenças têm causado um grande impacto na carcinicultura nas Américas desde que esta se tornou uma atividade comercial significativa a partir da década de 1970. A etiologia das doenças infecciosas de importância econômica para camarões cultivados pode ser variada. Podem ser causadas por bactérias, fungos, protistas, riquétsias, metazoários e vírus. Muitas das doenças causadas por bactérias, fungos e protozoários são gerenciadas usando boas práticas de manejo, saneamento de rotina e o uso de quimioterápicos. No entanto, as

doenças virais têm sido muito mais problemáticas quanto ao seu gerenciamento, sendo responsáveis pelas epizootias de maior custo. Infecções por vírus frequentemente são as mais devastadoras e não existem formas de tratamento eficaz após a infecção instalada (ROCH, 1999; BACHÈRE, 2000; LIGHTNER, 2011).

De acordo com FLEGEL (2001), a investigação das respostas de defesa dos camarões a patógenos virais como, por exemplo, os causadores da Doença da Cabeça Amarela (*Yellow Head Virus*, YHV), da Síndrome da Mancha Branca (*White Spot Syndrome Virus*, WSSV), da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (*Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus*, IHHNV) e da Síndrome de Taura (*Taura Syndrome Virus*, TSV), os quais têm causado grandes perdas para os produtores nas últimas duas décadas, é fundamental. Mais recentemente, em 2006, Poulos et al., caracterizaram o vírus causador da mionecrose infecciosa, (*Infectious Mionecrosis Virus*, IMNV) que teve grande impacto sobre os cultivos no Nordeste do Brasil.

O YHV, vírus da cabeça amarela, foi caracterizado como um vírus de RNA, de acordo com BOONYRATPALIN et al., 2003 e CHANTANACHOOKIN et al. 1993. Com base na morfologia das partículas virais negativamente coradas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), no conteúdo de RNA (WONGTEERASUPAYA et al. 1995) e em informações sobre a seqüência do seu material genético, o YHV é um sensopositivo, vírus de RNA fita simples, Okavirus da família Roniviridae (RAIDAL et al., 2004). O YHV infecta células, tanto de origem ectodérmica quanto mesodérmica (BOONYARATPALIN et al. 1993, CHANTANACHOOKIN et al. 1993, KASORNCHANDRA et al. 1995). Com base nos dados de TEM, o YHV é um vírus com 150-170 nm por 40 a 50 nm, de forma cilíndrica com uma franja contínua de projeções, chamadas espículas, que se irradiam para fora cerca de 11 nm do envelope exterior (WONGTEERASUPAYA et al. 1995).

Já o WSSV tem forma cilíndrica, ligeiramente elíptica. O virião mede 121 nm x 276 nm (WONGTEERASUPAYA et al., 1995). Ele é um vírus de DNA dupla fita, e foi, inicialmente, classificado na família Baculoviridae (WANG et al., 1995). Em classificação mais recente, passou a integrar a família Nimaviridae (MAYO, 2002). Uma das suas particularidades é o elevado número de hospedeiros que apresenta, incluindo uma grande variedade de crustáceos (camarões, lagostas e copépodes), além de larvas de insetos. Em peneídeos, já foi detectado em pós-larvas, juvenis e adultos (CHANG, CHEN, WANG, 1998). Sua

transmissão pode ser horizontal, através da água ou pela canibalização de camarões infectados (CHOU et al., 1995) ou vertical, passando para a prole durante a reprodução (LO et al., 1997).

O IHHNV é um vírus de DNA de fita única, muito pequeno, considerado o menor de todos os vírus de peneídeos. O virião tem forma icosaédrica, é nu e mede 22 nm de diâmetro. (OIE, 2003). Considerando suas características morfológicas e aspectos físico-químicos, foi classificado no gênero *Brevidensovirus*, família *Parvoviridae* (BONAMI et al., 1990). O primeiro registro de IHHN no Brasil foi feito por Bueno (1991), em camarões *Penaeus monodon* e *L. vannamei* que apresentavam redução significativa na taxa de crescimento e deformações cuticulares externas, particularmente no rosto. Posteriormente, o IHHNV foi registrado em cultivos intensivos e semi-intensivos da espécie *L. vannamei* por Gesteira e Andrade (2002) e Martins (2003). De modo geral, pode-se dizer que essa enfermidade tem registro rotineiro em análises histológicas e pela técnica de PCR realizadas em camarões provenientes de fazendas e larviculturas nordestinas, embora não haja registro de mortalidade relacionado com a sua ocorrência (GESTEIRA, 2006). Recentemente, em Santa Catarina, Moser (2005) encontrou uma prevalência natural alta do IHHNV (54,8%) em uma população de *L. vannamei* sobrevivente.

O TSV, cujo material genético é RNA de fita simples, pertence à família *Dicistroviridae*, gênero *Cripavirus*. O virião nu tem forma icosaédrica, 32 nm de diâmetro e se replica no citoplasma das células (MAYO, 2002). Seu primeiro registro data de 1991, no Equador, sendo então, considerado como uma das maiores enfermidades registradas em cultivos de *L. vannamei*, e passou a ser designada como síndrome de Taura a partir de 1992 (JIMENEZ, 1992). Apesar do *L. vannamei* ser seu principal hospedeiro, no qual ataca pós-larvas, juvenis e sub-adultos, esse vírus pode infectar outras espécies (LIGHTNER, 1999).

O IMNV é um vírus de RNA, de forma esférica e 40 nm de diâmetro, pertencente à família *Totiviridae*. Testes de desafio, realizado por Tang et al. (2005), demonstram que a espécie *L. vannamei* é a mais suscetível à infecção por este vírus, em comparação com *Penaeus monodon* e *Litopenaeus stylirostris*. De acordo com Graf et al. (2003), este vírus pode ser transmitido horizontalmente. Os indivíduos infectados apresentam opacidade muscular, principalmente nos últimos segmentos abdominais, que podem se tornar avermelhados devido à necrose dos músculos estriados. A mortalidade observada nas populações atingidas ocorre de forma gradativa e persistente (GESTEIRA, 2006).

Para entender a patogênese de qualquer doença, o conhecimento das interações entre o patógeno e o hospedeiro é crítico. A relação vírus-hospedeiro pode resultar em respostas de defesa características contra o invasor e pode também ocasionar mudanças metabólicas e moleculares, entre elas alterações no nível de expressão de determinados genes do hospedeiro, o que pode favorecer a replicação viral (WANG et al., 2007).

No que diz respeito a agentes patogênicos, a pesquisa da GAA revelou que 60% das perdas registradas nos cultivos foram atribuídas a vírus e cerca de 20% a bactérias. Assim, a maioria dos esforços no conhecimento e no controle de doenças (80%) deve ser claramente focada em patógenos virais e bacterianos. Na verdade, esse tem sido o caso nos anos recentes. O esforço enfocando o controle de doenças em organismos cultiváveis tem enfatizado a prevenção, e isso exige o desenvolvimento de boas ferramentas de diagnóstico, pessoal treinado e uma melhor compreensão do hospedeiro e sua relação com os patógenos (FLEGEL et al., 2008).

Desta forma, as doenças virais têm sido as causas mais importantes das perdas econômicas registradas na carcinicultura em muitos países. Para se ter uma idéia do aumento no número de doenças de etiologia viral, em 1990, Lightner, Bell, Redman, registraram seis viroses afetando camarões peneídeos. Em 1992, o número de viroses conhecidas passou para doze (LIGHTNER, 1996). Em 2001, foram registradas dezesseis viroses em camarões cultivados (FEGAN, CLIFFORD, 2001). Madhavi et al. (2002), referem-se à ocorrência de vinte e duas enfermidades virais diferentes afetando a carcinicultura mundial. A necessidade de um melhor controle destas doenças infecciosas em camarões cultivados tem intensificado o interesse no sistema imune e nas respostas metabólicas de defesa de crustáceos, particularmente de camarões (ROBALINO et al., 2009).

Para entender a patogênese de qualquer doença, o conhecimento das interações entre o patógeno e o hospedeiro é crítico. A relação vírus-hospedeiro pode resultar em respostas de defesa características contra o invasor e pode também ocasionar mudanças metabólicas e moleculares, entre elas alterações no nível de expressão de determinados genes do hospedeiro, o que pode favorecer a replicação viral (WANG et al., 2007).

No que diz respeito a agentes patogênicos, a pesquisa da GAA revelou que 60% das perdas registradas nos cultivos foram atribuídas a vírus e cerca de 20% a bactérias. Assim, a maioria dos esforços no conhecimento e no controle de doenças (80%) deve ser claramente

focada em patógenos virais e bacterianos. Na verdade, esse tem sido o caso nos anos recentes. O esforço enfocando o controle de doenças em organismos cultiváveis tem enfatizado a prevenção, e isso exige o desenvolvimento de boas ferramentas de diagnóstico, pessoal treinado e uma melhor compreensão do hospedeiro e sua relação com os patógenos (FLEGEL et al., 2008).

Desta forma, as doenças virais têm sido as causas mais importantes das perdas econômicas registradas na carcinicultura em muitos países. Para se ter uma idéia do aumento no número de doenças de etiologia viral, em 1990, Lightner, Bell, Redman, registraram seis viroses afetando camarões peneídeos. Em 1992, o número de viroses conhecidas passou para doze (LIGHTNER, 1996). Em 2001, foram registradas dezesseis viroses em camarões cultivados (FEGAN, CLIFFORD, 2001). Madhavi et al. (2002), referem-se à ocorrência de vinte e duas enfermidades virais diferentes afetando a carcinicultura mundial. A necessidade de um melhor controle destas doenças infecciosas em camarões cultivados tem intensificado o interesse no sistema imune e nas respostas metabólicas de defesa de crustáceos, particularmente de camarões (ROBALINO et al., 2009).

Até 2004, os vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) e da Cabeça Amarela (YHV), não tinham sido registrados no Brasil, mas outras enfermidades de importância econômica, como a causada pelo IHNV e pelo TSV, já haviam sido detectadas em camarões peneídeos cultivados no país. Porém, as maiores perdas na produção resultaram do surgimento da Mionecrose Infecciosa Viral (IMNV), registrada em fazendas de engorda de camarão marinho na Região Nordeste (NUNES, MARTINS, GETEIRA, 2004). Após as notícias da presença do Vírus da Mancha Branca em fazendas de cultivo na região de Laguna em Santa Catarina, tem havido uma ação conjunta de técnicos, produtores e órgãos governamentais, tanto em nível estadual como federal, buscando minimizar o impacto da doença para a carcinicultura brasileira (PAREDES, 2005). A enfermidade foi diagnosticada e notificada à Organização Internacional de Epizootias (OIE) em janeiro de 2005. Os sintomas ocorreram em novembro de 2004 e tudo leva a crer que a qualidade da água e do solo foram os fatores determinantes para o surgimento da enfermidade (SEIFFERT, WINCKLER, MAGGIONI, 2005).

### **3. O Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV)**

O agente causador da doença da mancha branca (*White Spot Disease*, WSD) é o vírus da síndrome da mancha branca (*White Spot*

*Syndrome Virus*, WSSV), conforme mencionado acima. O WSSV é um vírus grande, com uma densidade de aproximadamente 1,2 g/ml (LIGHTNER, 2011). Ele pertence ao gênero Whispovirus, família Nimaviridae (MAYO, 2002). Este vírus é baciliforme, envelopado, com um nucleocapsídeo na forma de bastão, contendo um genoma de aproximadamente 300 kpb), composto por DNA circular dupla-fita (CHEN et al., 2002; TAN, SHI, 2008; ZHANG et al., 2004). A análise das manifestações do WSSV em diferentes regiões parece indicar que alguns fatores podem funcionar como gatilhos importantes no estabelecimento da doença (MARQUES, MOSER, MÜLLER, 2006; MÜLLER et al., 2010).

A síndrome da mancha branca (*White Spot Syndrome*, WSS) afeta a maior parte dos cultivos de camarão marinho no mundo e tem sido associada a impactos econômicos devastadores em diferentes regiões (MACIEL, MARQUES, 2003). O agente etiológico, o WSSV, é extremamente patogênico e generalista, podendo infectar uma vasta gama de hospedeiros e crustáceos decápodes. Recentemente, por exemplo, a presença deste vírus foi detectada em uma espécie nativa de caranguejo (*Chasmagnathus granulata*), coletada em áreas adjacentes a cultivos de *L. vannamei* em Santa Catarina (MARQUES et al., 2011) e, ainda em siris (*Callinectes* sp) e camarões nativos (*Farfantepenaeus paulensis*, *F. brasiliensis* e *Litopenaeus schmitti*) (COSTA, 2010). Portanto, a sobrevivência desses crustáceos depende de um eficiente sistema de defesa não só contra esse patógeno, mas também contra vários tipos de microrganismos e parasitas, especialmente porque eles vivem em um ambiente onde esses agentes microbianos são abundantes (SODERHALL, CERENIUS, 1998).

Embora notável progresso tenha sido feito sobre a caracterização do WSSV, o mecanismo de infecção e as respostas celulares do hospedeiro ainda não estão bem compreendidos (LI et al., 2007).

O emprego de metodologias rápidas e sensíveis de monitoramento do estado de saúde dos animais em condições de cultivo pode possibilitar uma tomada de decisão em curto espaço de tempo, podendo vir a evitar assim, as grandes perdas econômicas por quebras significativas de produção. Segundo Bachère (2000), a prevenção e o controle das doenças são agora prioridades para sustentabilidade da carcinicultura.

Comparativamente, existe pouca informação publicada disponível sobre os mecanismos das respostas moleculares em camarões contra agentes virais em relação a outros artrópodes. Grande parte da literatura tem sido focada na utilização de vírus para o controle biológico, tanto de

pragas como de vetores de doenças. Entretanto, o rápido aumento global no cultivo de camarões peneídeos e as perdas econômicas registradas devido a patógenos virais, alteraram este quadro, particularmente nos últimos dez anos. A urgência para resolver esses problemas tem levado a um exame mais detalhado das respostas de camarões peneídeos a doenças virais na esperança de encontrar novos métodos de controle da doença (FLEGEL, 2007).

Nas duas últimas décadas, estudos que relatam observações de campo e resultados de experimentos em laboratório parecem indicar que camarões peneídeos podem ser capazes de apresentar uma resposta adaptativa, específica para patógenos, as quais não podem ser explicadas pelo conhecimento corrente sobre suas respostas de defesa celular e humoral (FLEGEL, 2007; LORGERIL et al., 2008). Um dos aspectos a ser destacado parece ser aquele relacionado com a tolerância a infecções virais simples ou múltiplas, sem sinais clínicos intensos ou histológicos da doença; um fenômeno aparentemente comum para crustáceos e alvo recente de discussão, devido à capacidade de recuperação que alguns animais apresentam após infecção e outros que possuem o vírus, mas por mecanismos ainda desconhecidos não manifestam a doença (FLEGEL, 2007; FLEGEL, SRITUNIALUCKSANA, 2011).

O conhecimento das estratégias de infecção utilizadas por um determinado patógeno, bem como o estudo das alterações metabólicas e das respostas de defesa por ele desencadeadas no hospedeiro, pode trazer importante contribuição para a compreensão de uma dada enfermidade e para o delineamento de estratégias preventivas e sanitárias mais eficazes para a carcinicultura (MOULLAC, HAFFNER, 2000; MARQUES, BARRACCO, 2000). Desta forma então, a busca por alternativas viáveis ao produtor que, eventualmente, permitam minimizar a quebra de produção e aumentar, assim, a qualidade do produto final, pode representar uma contribuição efetiva para o crescimento do setor aquícola.

#### **4. Imunologia de crustáceos**

Os invertebrados marinhos estão em constante contato, em seu ambiente natural, com uma grande diversidade de microrganismos, incluindo múltiplos vírus, que podem constituir uma séria ameaça à sua sobrevivência. Contudo, o evidente sucesso desse grupo zoológico, ao longo de 500 milhões de anos de sua história evolutiva, indica a presença de um sistema imunológico eficiente e capaz de protegê-los

contra a invasão por agentes causadores de doenças (BARRACCO, PERAZZOLO, ROSA, 2007).

Os camarões, assim como os demais animais aquáticos, vivem em um ambiente rico em microrganismos. Desde os primórdios do estudo das doenças infecciosas, é de conhecimento comum que a água é o maior veiculador de agentes patogênicos. Muitos desses microrganismos fazem parte da microbiota destes animais, ou seja, vivem na superfície e no intestino dos camarões, não causando doença. Neste último caso, esses microrganismos auxiliam na digestão dos alimentos e competem com outros agentes microbianos que podem causar doenças. Para sobreviver nesse meio inóspito, os camarões, assim como outros animais, desenvolveram mecanismos para identificar a presença de patógenos e combatê-los (FIGUEIREDO, LOPES, LEAL, 2008).

A primeira linha de defesa desses animais é conferida pela presença de uma carapaça externa rígida, ou exoesqueleto, que funciona como uma barreira físico-química protetora. Além disso, todo o trato digestivo desses animais, que é a principal via de entrada de microrganismos, é repleto de enzimas, capaz de inativar e digerir a maioria dos microrganismos que não faz parte de sua microbiota natural (BARRACCO, PERAZZOLO, ROSA, 2007).

A imunidade inata desempenha um papel crítico no controle inicial da infecção viral, bem como na iniciação e posterior direção da resposta imune (BARBER, 2001). Por conseguinte, devido à sua ação primordial para a sobrevivência do organismo, esta resposta depende da ação de diversos órgãos para combater os processos inflamatórios e infecciosos. Esses órgãos atuam de forma orquestrada, cada qual com a sua função determinada, e, em geral, integram processos sequenciais e interdependentes (FIGUEIREDO, LOPES, LEAL, 2008).

Essa resposta é o resultado de uma cascata de eventos múltiplos, de convergência orientada, para a eliminação do sinal que provocou a reação de reconhecimento. A multiplicidade de mecanismos pode ser grande dentro de um indivíduo, dentro de várias classes ou dentro do filo. Esta multiplicidade é uma consequência da importância da resposta (e/ou do conjunto de respostas) a ser desencadeada. É raro que uma função relevante, como a resposta de defesa, seja alcançada através de um mecanismo simples em um organismo (DU PASQUIER, 2001).

O sistema imune é responsável pela defesa do organismo. Essa proteção é conferida por um grande conjunto de células e órgãos diferentes. O entendimento desse sistema é necessário, pois alterações em seu funcionamento podem diminuir ou incrementar a capacidade dos animais de responder a desafios do ambiente. Efeitos nocivos para o

sistema imune são comumente observados em algumas situações da prática aquícola, como por exemplo: práticas de manejo incorretas; cultivo com densidades de estocagem acima da capacidade de suporte do sistema; má nutrição ou dieta desbalanceada; alterações ambientais, como aumento ou diminuição (brusca ou por tempo prolongado) da temperatura da água; baixa qualidade do meio aquático, entre outras. A diminuição da resposta imune em animais, sob tais condições, está associada a quadros de estresse agudo ou crônico (MARQUES, BARRACCO, 2000; FIGUEIREDO, LOPES, LEAL, 2008).

O sistema imune inato é uma forma universal e antiga de defesa do hospedeiro contra a infecção (JANEWAY, MEDZIHITOV, 2002). Como destacado anteriormente, a primeira linha de defesa dos crustáceos é conferida pela presença da carapaça externa rígida, ou exoesqueleto, que funciona como uma barreira físico-química protetora. Quando essa barreira é transposta, não sendo suficiente para impedir a penetração de patógenos, desencadeia-se no hospedeiro uma série de reações imunológicas complexas com o objetivo de neutralizar e eliminar os agentes invasores (BARRACCO, PERAZZOLO, ROSA, 2007).

A exemplo de outros invertebrados, os crustáceos apresentam apenas um sistema imune inato, diferentemente dos vertebrados que possuem, além desse, um sistema imune adquirido (também chamado adaptativo), o qual se caracteriza por uma grande especificidade e memória imunológica (VARGAS-ALBORES, BARRACCO, 2001). O sistema imune inato é baseado em componentes celulares e humorais do sistema circulatório, os quais interagem para detectar e eliminar microrganismos e parasitas estranhos potencialmente perigosos (BACHÈRE, 2000; BARRACCO, PERAZZOLO, ROSA, 2007).

O mecanismo de defesa em crustáceos depende completamente do sistema imune inato que é ativado quando padrões moleculares associados a patógenos são reconhecidos por proteínas solúveis ou presentes na superfície das células do hospedeiro, como as lectinas, além de peptídeos antimicrobianos, e proteínas de reconhecimento de padrões, as quais, em parte, ativam mecanismos efetores humorais e celulares para destruir patógenos invasores (VAZQUEZ et al., 2009).

Estudos sobre a imunidade em espécies de vertebrados e invertebrados sugerem que o mecanismo de defesa em invertebrados pode ser considerado precursor da imunidade de vertebrados. Esse evento requer a participação de grupos celulares e fatores humorais gerados contra antígenos específicos, como tem sido demonstrado em mamíferos (HOFFMANN et al., 1999; IWANAGA, LI 2005). Em

invertebrados há pouca evidência identificando qualquer um desses fatores como antígeno-específico. Entretanto, algumas células e fatores celulares livres na hemolinfa mostram alta especificidade pelo não-próprio ou por células defeituosas, similarmente como demonstrado para os anticorpos de vertebrados (YEATON, 1981; VASTA et al., 1999).

Os crustáceos possuem um sistema circulatório aberto, onde nutrientes, oxigênio, hormônios e células são distribuídos na hemolinfa. Os hemócitos (células circulantes) podem ser análogos aos leucócitos dos vertebrados, porque estão envolvidos principalmente no reconhecimento e eliminação do não-próprio (MARQUES, BARRACCO, 2000; BARRACCO, PERAZZOLO, ROSA, 2007; SRITUNIALUKSANA, SODERHALL, 2000), bem como, na coagulação (CERENIUS et al., 1994; VAZQUEZ et al., 1997). Estudos relacionados à imunidade de invertebrados têm procurado identificar mecanismos de defesa e rotas bioquímicas ativadas durante uma infecção, e, ainda, na identificação de fatores celulares ou livres na hemolinfa envolvidos na destruição de patógenos, regulação e reparo de danos celulares (VAZQUEZ et al., 2009).

## **5. Mecanismos de defesa em crustáceos**

Em invertebrados as barreiras físicas são o primeiro obstáculo para deter microrganismos patogênicos (SODERHALL, 1982; VAZQUEZ et al., 2009). Quando ela está danificada e os microrganismos invadem o tecido, caminhos proteolíticos ocorrem instantaneamente, permitindo a eliminação ou destruição de micróbios invasores (RATCLIFFE et al., 1985). O mecanismo efetor para resposta imune de invertebrados inclui a cascata de coagulação, a qual evita perda de hemolinfa, estimula oxidação de metabólitos e a produção de melanina pela ativação do sistema da pró-fenoloxidase (proPO) (SRITUNIALUKSANA, SODERHALL, 2000; VARGAS-ALBORES, YEPIZ-PLASCENCIA, 2000). A ativação da pró-fenoloxidase estimula outros processos importantes na resposta imune, como fagocitose, encapsulação e formação de nódulos (SODERHALL, ASPÁN, DUVIC, 1990; SMITH, CHISHOLM, 2001).

Segundo Bachère (2000), a resposta imune em artrópodes ocorre em três etapas ou estágios. O primeiro estágio corresponde ao reconhecimento dos fatores estranhos e ao início da resposta imune, envolvendo a participação de hemócitos e proteínas plasmáticas (MARQUES, BARRACCO, 2000). Os principais sistemas de defesa atualmente reconhecidos nos crustáceos são: (1) coagulação da

hemolinfa; (2) melanização mediada pelo sistema pró-fenoloxidase; (3) reconhecimento e aglutinação celular mediada por lectinas; (4) sistemas antibacterianos, antifúngicos e antivirais mediados por peptídeos, RNA de interferência e por proteínas de reconhecimento padrão; (5) produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio; e (6) sistema fagocítico e de encapsulamento (IWANAGA, LEE, 2005). Várias proteínas envolvidas no reconhecimento de microrganismos já foram identificadas, como por exemplo, proteínas que reconhecem peptidoglicanas, proteínas ligantes a lipopolissacarídeos e proteínas similares a imunoglobulinas (SODERHALL, 1999). O segundo estágio compreende uma resposta celular e a síntese de efetores. As moléculas de reconhecimento interagem e ativam os hemócitos, os quais têm um papel importante e central na defesa contra microrganismos (BACHÈRE, 2000). Existem três tipos de hemócitos: células hialinas, semi-granulares e granulares (MARTIN, GRAVES, 1985; VAZQUEZ et al., 2009). Estas células estão envolvidas, principalmente, com a fagocitose, encapsulação, produção de lectinas, coagulação e ativação do sistema pró-fenoloxidase (GARGIONI, BARRACCO, 1998; JOHANSSON, SODERHALL, 1985).

### 5.1. Proteínas de reconhecimento de padrões em crustáceos (PRPs)

Microrganismos têm moléculas altamente conservadas em suas paredes celulares, como lipopolissacarídeos (LPs) ou peptidoglicanas (PGNs) nas paredes celulares bacterianas e  $\beta$ -1,3-glucanos em paredes celulares de fungos, as quais não são encontradas em outros organismos multicelulares (PADHI, VERGHESE, 2008).

O sistema imune inato no mecanismo de defesa do hospedeiro é evolutivamente conservado de plantas até humanos e está envolvido no reconhecimento e controle do estágio inicial da infecção por microrganismos. Esse reconhecimento e controle dependem de mecanismos efetores que permitem a eliminação de patógenos pela indução de modificações químicas oxidativas nas moléculas pelo sistema proPO, através de processos proteolíticos e de fagocitose, envolvendo a interação específica com receptores celulares ou pela opsonização, a qual facilita a fagocitose pelos hemócitos dos crustáceos. A cascata proPO é desencadeada na sua forma ativa por PGN e  $\beta$ -1,3-glucanos. Esse mecanismo é ativado por um grupo de receptores, conceitualmente chamados proteínas de reconhecimento padrão (PRPs), capazes de reconhecer determinadas superfícies microbianas como LPS, PGN e  $\beta$ -1,3-glucanos. No momento do reconhecimento, esses

receptores ativam cascatas de sinalização distintas que regulam proteínas imunes relacionadas, objetivando eliminar microrganismos patogênicos (SMITH, SODERHALL, 1983; LEE, SODERHALL, 2001).

Yoshida, Ochiai, Ashida (1986) mostraram que o sistema proPO pode ser desencadeado por  $\beta$ -1,3-glucano ou pela PGN; entretanto, os mecanismos que desencadeiam esse efeito foram identificados somente depois da identificação subsequente e clonagem de muitas proteínas de reconhecimento/ligação de peptidoglicanas (PGBPs). Isso permite postular que, ao se ligar a PGN, esse complexo induz a ativação da cascata de proPO; entretanto, tem sido demonstrado que PGBPs são conservadas de inseto e até mamíferos (KOIZUME et al., 1999). Para investigar a função biológica da proteína de reconhecimento padrão de  $\beta$ -1,3-glucano (BGBP) no sistema de cascata proPO, a BGBP de importantes espécies de invertebrados e, em particular, de crustáceos, tem sido purificada e caracterizada. Entretanto, as PRPs identificadas demonstraram dupla função biológica comum, como aumento da atividade de serino-protease ao se ligar a  $\beta$ -1,3-glucano, induzindo, subsequentemente, atividade da fenoloxidase na presença de  $\beta$ -1,3-glucano mais íon cálcio; interessantemente, não tendo atividade da fenoloxidase na presença de um peptidoglicano e íon cálcio, sugerindo que a BGBP é um receptor específico para  $\beta$ -1,3-glucano no sistema de ativação da proPO (LEE, WANG, SODERHALL, 2000).

Esses mecanismos efetores para a resposta imune de invertebrados como o sistema proPO, evitam perda de hemolinfa e estimulam a oxidação de metabólitos e a produção de melanina (VAZQUEZ et al., 2009). Além disso, os camarões, como a maioria dos artrópodes, produzem peptídeos antimicrobianos que são ativos contra um grande número de patógenos. Atualmente, em camarões peneídeos, dois tipos de peptídeos antimicrobianos foram bem caracterizados, as peneidinas de hemócitos (DESTOUMIEUX et al., 1997) e os peptídeos aniônicos derivados da hemocianina, isolados do plasma de camarões (DESTOUMIEUX-GARZON et al., 2001). Finalmente, o último estágio da resposta imune em artrópodes envolve uma recuperação celular e humoral do organismo.

## 5.2. Lectinas

Uma característica essencial no desenvolvimento da imunidade de invertebrados é a habilidade para distinguir entre as partículas próprias e não-próprias. Moléculas com a função de reconhecimento têm sido

descritas em organismos unicelulares. Essas proteínas, consideradas como precursoras funcionais de anticorpos, constituem um grupo de proteínas genericamente denominadas de lectinas (do latim *legere*, selecionar) (KILPATRIC, 2000).

As lectinas e outras proteínas de reconhecimento padrão são componentes importantes no mecanismo de imunidade inata em vertebrados e invertebrados. O desafio do sistema imune inato é lidar com a grande diversidade de micróbios potencialmente infecciosos. Embora o conceito de reconhecimento padrão proponha que apenas algumas moléculas conservadas precisam ser reconhecidas na superfície microbiana para o sucesso da defesa imune inata, as comunidades microbianas altamente diversificadas a que todos os organismos são expostos e as mudanças dinâmicas em componentes de expressão de sua superfície indicam que uma diversidade substancial de mecanismos de reconhecimento do não-próprio pode ser necessária para a proteção imunológica (VASTA et al., 2007).

Em crustáceos, as lectinas são responsáveis pelo reconhecimento imune do não-próprio e pela fagocitose de patógenos, através da opsonização (CERENIUS, SODERHALL, 2004). As lectinas são proteínas sem atividade catalítica, com capacidade de se ligar especificamente a carboidratos na superfície de diferentes células, incluindo microrganismos, causando sua aglutinação ou, ainda, conduzir para outros eventos diversos, como fagocitose, substituição ou opsonização (LEE, SODERHALL, 2002). Essa propriedade deriva do fato de estas moléculas serem pelo menos bivalentes, apresentando dois ou mais sítios de ligação. Devido a essa característica, acreditava-se inicialmente que as lectinas dos invertebrados fossem análogas funcionais das imunoglobulinas dos vertebrados, mas hoje se sabe que são estrutural e funcionalmente distintas (MARQUES, BARRACCO, 2000; SAHOO et al., 2007).

Devido ao fato das lectinas, tanto de vertebrados quanto de invertebrados, serem capazes de reconhecer e se ligar a açúcares específicos da superfície de patógenos, estas moléculas são também definidas como PRPs (BARRACCO, PERAZZOLO, ROSA, 2007). Algumas lectinas de invertebrados parecem estar ainda implicadas na ativação do sistema proPO de insetos (YU, GAN, KANOST, 1999) e possuir atividade antibacteriana em tunicados e limulídeos (SUZUKI et al., 1990; KAWABATA, IWANAGA, 1999). Em resposta a infecções microbianas, insetos desencadeiam diversas reações, incluindo a indução de cascatas proteolíticas que levam a uma coagulação e melanização localizada (ELEFATHERIANOS, REVENIS, 2010). As

lectinas de crustáceos são muito menos conhecidas e investigadas do que as de outros artrópodes, como insetos e limulídeos. Nestes dois últimos grupos zoológicos, já foi descrita a ocorrência de lectinas múltiplas na hemolinfa, com especificidade para diferentes tipos de microrganismos. Algumas destas lectinas apresentam um amplo espectro de reconhecimento, ligando-se tanto a bactérias Gram-positivas como Gram-negativas, enquanto outras são altamente específicas, reconhecendo configurações químicas de açúcares na superfície de um determinado microrganismo (MARQUES, BARRACCO, 2000). Em células livres na hemolinfa elas foram identificadas em quase todos os crustáceos; entretanto, lectinas com características estruturais e especificidade idêntica às lectinas de células livres na hemolinfa foram identificadas na membrana de hemócitos e em grânulos do citoplasma (VAZQUEZ et al., 1997).

## **6. Resposta celular**

Wang e Zhang (2008) propuseram que a resposta celular por apoptose e fagocitose desempenha um papel importante na resposta de camarões à infecção por WSSV, mais do que aquela desencadeada pela proPO do sistema humoral.

### **6.1. Apoptose**

Apoptose ou morte celular programada é um processo bem conhecido e geneticamente regulado. Inicia-se em resposta a uma variedade de estímulos, incluindo infecções virais, e envolve alterações morfológicas celulares, como a condensação da cromatina, a fragmentação do núcleo, o encolhimento celular e, finalmente, a fragmentação da célula em pequenas vesículas revestidas por membrana, denominadas de corpos apoptóticos, os quais são, em geral, rapidamente fagocitados pelas células vizinhas (ZHANG et al., 2004). As alterações bioquímicas subjacentes a estas alterações morfológicas incluem a ativação de enzimas nucleases e proteases, dentre as quais se destaca a família das caspases.

As caspases têm um papel crucial no processo apoptótico, pois catalisam muitos dos diferentes passos na morte celular, desempenhando papel efetor central em vários estágios do processo, incluindo a interação entre várias famílias de proteínas (O'BRIEN, 1998; WONGPRASERT et al., 2003; GRANJA et al., 2006; BARRACCO, PERAZZOLO, ROSA, 2007; WANG et al., 2008). O mecanismo de

suicídio celular desempenha papel importante no desenvolvimento e na homeostase pela eliminação de células velhas, desnecessárias e defeituosas. Durante a infecção viral em camarões, a apoptose é frequentemente observada, mas se o fenômeno ajuda o camarão a sobreviver à infecção ou o conduz à morte isso ainda é controverso. Um número de genes relacionados à apoptose tem sido associado à resposta frente à infecção viral de camarões, sendo alguns deles expressos e outros suprimidos (FLEGEL, SRITUNYALUCKSANA, 2011).

Viroses podem induzir apoptose pela ativação de sensores na célula hospedeira que desencadeiam a morte celular, a qual inicia um importante papel protetor na eliminação de células infectadas por vírus (EVERETT, MCFADDEN, 1999). Viruses têm desenvolvido estratégias distintas para escapar ou retardar a apoptose iniciada por vários caminhos apoptóticos na célula. Interferência com apoptose pela inibição da atividade proteolítica da caspase (cisteína, ácido aspártico proteases) prolongam a vida da célula infectada por vírus, resultando em um aumento da replicação viral e, desta forma, contribuindo para a persistência viral (TSCHOPP et al., 1998).

A apoptose celular no estágio final do ciclo de replicação viral oferece muitas vantagens ao vírus. Durante este processo, todo o conteúdo celular, incluindo a progênie viral, é empacotado nos corpos apoptóticos. Os vírus tornam-se assim indetectáveis pelo sistema imune, ficando protegidos dentro dos corpos apoptóticos e evitando desta forma as respostas inflamatórias e a sua inativação por anticorpos e proteases do hospedeiro. Estes corpos apoptóticos, alojando inúmeros vírus replicados, são, em seguida, rapidamente fagocitados pelas células vizinhas, e, ironicamente, garantem a propagação e a infecção viral. Ou seja, a indução da apoptose tardia parece ser uma estratégia de propagação viral ótima, ajudando nas defesas antiapoptóticas e nos mecanismos de evasão imunológica (ROULSTON, MARCELLOS, BRANTON, 1999).

## 6.2. Acomodação viral

Uma alternativa para se encarar os surtos virais e o controle de infecções em camarões refere-se ao conceito de acomodação viral, que propõe a adaptação dos crustáceos aos novos vírus patogênicos que surgem, desenvolvendo uma espécie de memória específica que impede o mecanismo de apoptose induzido pelo vírus (FLEGEL, PASHARAWIPAS, 1998; FLEGEL, 2007). Este conceito se baseia no fato de que, após surtos virais graves nos cultivos de camarões, a

severidade do problema regularmente se atenua de forma rápida, em termos temporais (cerca de 1 a 2 anos), apesar de haver ainda uma alta prevalência destes vírus em camarões de aparência saudável. Tudo indica que os camarões sobreviventes desenvolvem uma tolerância ao vírus e se tornam portadores de infecção persistente, sem nenhum efeito negativo aparente ou sintoma da doença (BARRACCO, PERAZZOLO, ROSA, 2007; FLEGEL, 2007).

De acordo com Flegel (2007), as infecções persistentes atuam como uma espécie de memória, que levaria a uma diminuição específica da severidade da doença, através de uma redução do processo de apoptose induzida pelo vírus. Esta hipótese baseia-se no fato, já mencionado, que os níveis de apoptose aumentam drasticamente em camarões moribundos durante os surtos virais, podendo atingir valores muito altos, até 40%, de morte celular, e a morte do camarão seria uma consequência deste excesso de apoptose (SAHTOUT, HASSAN, SHARIFF, 2001).

O conceito de acomodação viral propõe, assim, que o camarão coexista com os vírus sem haver efeitos negativos, devido a um processo combinado vírus-hospedeiro, que envolve a redução do processo apoptótico no hospedeiro induzido pelo agente viral (BARRACCO, PERAZZOLO, ROSA, 2007). Reforçando este conceito, foi ainda evidenciado que camarões sem sintomas de doença, mas com infecção viral persistente, não apresentavam apoptose nas células infectadas (WONGPRASERT et al., 2003). Porém, falta comprovar se esta aparente tolerância adquirida é efetivamente provocada por uma redução/supressão de apoptose, ou se é devida a outros processos celulares/moleculares de controle viral ainda desconhecidos (BARRACCO, PERAZZOLO, ROSA, 2007; FLEGEL, 2007).

Este conceito é apoiado no fato de que altos níveis de replicação viral de alguns vírus causam mortalidade para algumas espécies, mas não para outras, ou, ainda, causam mortalidade para uma dada espécie em algumas condições específicas, enquanto isto não é observado em outras. Propõe-se ainda que a acomodação viral represente um desenvolvimento alternativo evolutivo de resistência bem sucedido e que surgiu a partir da interação de crustáceos (e talvez outros artrópodes) hospedeiros com seus patógenos virais. A acomodação viral é caracterizada pela presença de um mecanismo ativo de tolerância a um patógeno e pela ausência de uma defesa ativa contra ele. Assim, contrasta com a resposta de crustáceos (ou seja, defesa ativa ou resistência) para bactérias e fungos patogênicos. A partir dessa visão, a resposta de crustáceos a patógenos pode ser vista com outro enfoque. A

acomodação ativa pode ter vantagens evolutivas, uma vez que a ausência da pressão de resistência do hospedeiro pode retardar o desenvolvimento da virulência e acelerar a progressão para a existência mútua hospedeiro/vírus (FLEGEL, PASHARAWIPAS, 1998; FLEGEL, 2001).

## **7. Imunoestimulantes**

Doenças epidêmicas têm causado custos econômicos elevados e perdas significativas na carcinicultura. O uso de vitaminas, imunoestimulantes e vacinas aumentam a imunidade de camarões e peixes e, conseqüentemente, sua eficiência no combate a agentes infecciosos (FIGUEIREDO, LOPES, LEAL, 2008). Para o controle da epidemia de doenças, uma abordagem muito eficiente é aumentar a imunidade do camarão através de imunoestimulantes. Na aquicultura, no entanto, as aplicações dos imunoestimulantes disponíveis são muito limitadas devido à falta de informações sobre as funções dos mesmos na imunidade dos animais (ZHI, TANG, ZHANG, 2011).

Estes compostos incluem os carboidratos simples derivados de algas ou fungos ou, ainda, componentes de polissacarídeos extraídos de algas e da parede externa de bactérias. Em crustáceos, principalmente camarão, acredita-se que estes compostos possam provocar reações imunológicas e, assim, proteger o hospedeiro, por mantê-lo em um estado responsivo de hiper-imunidade. Vários desses compostos são atualmente comercializados. Embora relatos positivos tenham sido feitos quanto a avaliação bem sucedida e o sucesso dessas biomoléculas por alguns pesquisadores, outros têm apontado inconsistência nos resultados, apresentado, ainda, argumentos de que seu benefício ao hospedeiro pode ser menor do que o custo acarretado pelo seu uso, especialmente em altas doses. Em particular, há, ainda, o risco de que o tratamento repetido pode ser prejudicial em longo prazo, através da indução persistente e inapropriada de respostas inflamatórias e do custo energético para regenerar repetidamente componentes do sistema imunológico (SMITH, HAUTON, 2009).

## **8. Proteômica no diagnóstico e no estudo de enfermidades de camarões**

O proteoma celular é composto de milhares de proteínas importantes. Estudar o proteoma de uma espécie requer um esforço analítico significativo em que pese, entre outros fatores, a

disponibilidade de equipamentos determinados e a padronização da metodologia, adaptada para cada tipo de amostra, em particular no que se refere à qualidade dos extratos protéicos.

O rápido sequenciamento do genoma humano foi possível somente pela aplicação de um esforço industrial. Exatamente o mesmo tem acontecido mais recentemente na análise proteômica (WESTERMEIER, NAVEN, 2002).

A análise de sistemas bioquímicos complexos compreende a interação de proteínas, peptídeos e outros componentes, envolvendo a elucidação da estrutura primária, ou seja, das sequências de seus aminoácidos. A eletroforese bidimensional (2-DE) é uma estratégia de separação de proteínas a qual pode prover uma excelente visualização da complexidade biológica de amostras, uma estimativa quantitativa de proteínas individuais presentes nas mesmas, sua massa molecular aproximada e a detecção de certos tipos de modificações pós-traducionais (MAHMOUD, RIGHETTI, 2005).

A grande expectativa e o grande impulso da proteômica surgiram na pesquisa farmacêutica para novas drogas rápidas, bem como na identificação de linhagens celulares alteradas ou tecidos doentes (WESTERMEIER, NAVEN, 2002). Nos últimos anos, a proteômica se desenvolveu para dar suporte aos métodos de análise de proteínas em larga escala (PANDEY, MANN, 2000).

## **9. Espectrometria de massa na análise de proteínas**

A espectrometria de massa é uma técnica analítica que mede a razão massa/carga dos íons baseada em seu deslocamento através de um campo elétrico ou magnético. É um método de determinação de massas molares. Há várias décadas esse método vem se consolidando como ferramenta insubstituível para a determinação de estruturas químicas. Amostras moleculares são convertidas em íons na fase gasosa e separadas de acordo com a razão massa/carga; uma vez que íons carregados positivamente ou negativamente podem ser formados (CUNHA, CASTRO, FONTE, 2006; WESTERMEIER, NAVEN, 2002).

O uso da espectrometria de massa abre caminho para estudos futuros visando a identificação e o uso de proteínas específicas como potenciais biomarcadores (ORTEA et al., 2010). Há várias décadas, esse método vem se consolidando como ferramenta indispensável para a determinação de estruturas químicas, principalmente de compostos orgânicos pequenos e voláteis. Durante a década de 1980, foram

desenvolvidos novos mecanismos de ionização em espectrômetros de massa para moléculas grandes e polares como peptídeos e proteínas, até então impossíveis de serem analisadas por essa técnica, o que permitiu que vários problemas bioquímicos pudessem ser abordados (CUNHA, CASTRO, FONTES, 2006).

A excelente acurácia da massa, alta resolução e sensibilidade permitem o uso da técnica para identificar proteínas, produzindo um mapa peptídico. Nessa abordagem, proteínas são identificadas por comparação com massas de peptídeos obtidas experimentalmente com massas de peptídeos obtidos a partir de uma base de dados. Esse tipo de análise requer uma amostra pura e isto é comumente utilizado em conjunção com proteínas separadas em gel de eletroforese bidimensional (MAHMOUD, RIGHETTI, 2005).

A espectrometria de massa consiste de três partes importantes: a fonte de íon, o analisador de massa e o detector. No MALDI-TOF o analisador de massa separa os íons de acordo com a diferença de tempo entre o tiro de laser e o pulso gerado quando o íon chega ao detector, isso é o tempo de vôo (WESTMAN-BRINKMALM, BRINKMALM, 2008).

Dentro deste contexto, o trabalho realizado teve como objetivo caracterizar o perfil diferencial de proteínas expressas em brânquias do camarão branco, *Litopenaeus vannamei*, infectado naturalmente com o vírus da síndrome da mancha branca (*White spot syndrome virus*, WSSV), utilizando espécimes de *L. vannamei* (sintomáticos e assintomáticos) coletados em cultivos na região norte e sul do estado de Santa Catarina, entre 2008 a 2009. A segunda parte do estudo envolveu a caracterização do perfil diferencial de proteínas expressas no mesmo tecido em camarões *L. vannamei* livres de patógeno específico (*specific pathogen free*, SPF), os quais foram inoculados em laboratório (inoculação intramuscular) com o WSSV. Os resultados do primeiro estudo, apresentados no Capítulo 2, serão submetidos para publicação no periódico *Aquaculture*. Os resultados referentes ao estudo realizado com os camarões SPF, apresentados no Capítulo 3, serão submetidos para publicação no periódico *Comparative Biochemistry and Physiology – Part B: Biochemistry and Molecular Biology*.

## CAPÍTULO 1

---

### **Padronização da metodologia de Eletroforese Bidimensional (2-DE) para a determinação do perfil diferencial de proteínas no camarão**

*Litopenaeus vannamei* infectado naturalmente com WSSV

#### **RESUMO**

A técnica de separação de proteínas por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida vem se desenvolvendo muito nos últimos anos. Devido à sua resolução e sensibilidade essa técnica tornou-se uma ferramenta importante para análise e detecção de proteínas. Estas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico na primeira dimensão por focalização isoelétrica e sua massa molecular na segunda dimensão em gel de poliacrilamida. Através da padronização desta técnica para o estudo proteômico em camarões obteve-se um protocolo adequado para extração e separação de proteínas de animais infectados por WSSV e não infectados. A partir daí foi traçado um perfil de proteínas diferencialmente expressas por estes animais. Para análise das proteínas extraídas das brânquias de *L.vannamei*, as amostras homogeneizadas e precipitadas com TCA 10% e DTT 0,1% em PBS, clarificadas com *Clean-up Kit*, dessalificadas em colunas *PD MiniTrap* e, posteriormente, submetidas a focalização isoelétrica de acordo com o protocolo 3, foram aquelas que apresentaram os melhores resultados na eletroforese bidimensional. Para os géis corados com nitrato de prata e CBB, a melhor concentração de proteínas totais foi igual a 150 µg e 250 µg, respectivamente. Estas condições e protocolos foram adotados como padrão para todos os procedimentos posteriores a fim de estabelecer o perfil de proteínas expressas diferencialmente em brânquias de *L.vannamei*, infectados pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), comparando animais infectados e não infectados.

Palavras-chave: vírus da mancha branca, camarão, proteína, 2-DE.

## INTRODUÇÃO

### 1. A proteômica e seus avanços

O genoma de um organismo é essencialmente estático e o DNA genômico, que pode ser extraído em princípio de uma única célula, contém toda a informação. Em contraste, o proteoma observável de uma dada célula, definido como a coleção de todas as proteínas existentes em seu fenótipo molecular específico, é altamente dinâmico e dependente do estado da célula, bem como das suas interações com o meio onde se encontra (GODOVAC-ZIMMERMANN, BROWN, 2001). Portanto, o proteoma não é estacionário, mas dinâmico e muda com o desenvolvimento do organismo e com alterações que ocorrem no ambiente (KAZMI, KRULL, 2001).

Pode-se considerar como o registro inicial da proteômica, os trabalhos iniciados em 1975 por O'Farrel, enfocando a separação de proteínas por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (PAGE). Devido à sua resolução e sensibilidade, a eletroforese bidimensional de proteínas é uma ferramenta poderosa para análise e detecção de proteínas de fontes biológicas complexas. Desta forma, as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico na primeira dimensão e, na segunda dimensão, com base na sua massa molecular, em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

Com o desenvolvimento da técnica, a química de proteínas tem passado por um período de grandes avanços tecnológicos e científicos. Com a conclusão do sequenciamento do genoma de vários organismos, a pesquisa envolvendo proteínas ganhou uma nova dinâmica e entrou numa fase conhecida como pós-genômica (CUNHA, CASTRO, FONTE, 2006).

Avanços nos métodos de detecção de proteínas têm caminhado em paralelo ao desenvolvimento de novas técnicas de separação nos últimos anos. A seleção dos procedimentos de visualização adequada de proteínas é tão importante quanto à técnica de separação empregada na análise a partir de misturas complexas (MERRIL, WASHART, 1998).

No caso do WSSV, a compreensão da enfermidade e a determinação do caminho celular afetado após a infecção podem ser investigados pela eletroforese bidimensional, a qual pode ser utilizada como ferramenta para se obter o perfil diferencial de proteínas expressas em camarões infectados com este vírus.

Por outro lado, com a conclusão do sequenciamento do genoma do WSSV, a atenção dos trabalhos mais recentes tem sido centrada na análise funcional das proteínas codificadas, especialmente das suas proteínas estruturais. Uma vez que estas proteínas são as primeiras moléculas a interagir com o hospedeiro, elas devem, portanto, desempenhar papéis críticos na célula alvo, bem como no desencadeamento de diferentes linhas de defesa celular (WANG et al., 2007; TAN, SHI, 2008).

A rápida evolução da proteômica tem continuado durante os últimos anos com uma série de inovações tecnológicas na eletroforese bidimensional, na espectrometria de massa e uma diversidade de estudos e pesquisas, envolvendo diferentes temas. O objetivo principal é estudar o proteoma inteiro de uma amostra em um determinado período ou situação (ANDERSON, MATHESON, STEINER, 2000; PETRIZ et al., 2012).

## **JUSTIFICATIVA**

As enfermidades de camarões cultivados representam um risco concreto para a carcinicultura brasileira, podendo impactar negativamente a produção ao ocasionar elevados índices de mortalidade, de forma análoga ao já registrado em nível mundial em diversos países produtores. Nos últimos anos, pesquisas relacionadas à patologia de crustáceos com ênfase, principalmente, em camarões peneídeos, têm sido realizadas de modo intensivo, procurando minimizar as perdas econômicas associadas às mesmas. Medidas sanitárias e estratégias de proteção para evitar a disseminação da doença foram adotadas, assim como um mecanismo de monitoramento e controle das áreas afetadas (PEREDES, 2005).

O cultivo de camarões peneídeos tem crescido muito rapidamente, desde os primeiros cultivos experimentais há cerca de quatro décadas (LIGHTNER, REDMAN, 1998). Para que este crescimento seja mantido, o estado sanitário dos animais é um fator importante para sua comercialização e para a competitividade no processo de produção globalizado.

Dentro deste contexto, o estudo dos mecanismos de defesa dos animais frente à infecção por agentes patogênicos pode contribuir para o delineamento de estratégias preventivas e sanitárias que possam minimizar o impacto causado pelas doenças na carcinicultura (BACHÈRE, 2000).

A caracterização e/ou identificação de proteínas envolvidas nestas respostas de defesa, bem como nas alterações metabólicas associadas com o estado patológico, constituem uma etapa fundamental deste estudo.

A determinação do perfil de proteínas associadas com uma determinada patologia, ou diferencialmente expressas frente à infecção, oferece uma oportunidade única para a compreensão dos mecanismos potenciais de infecção e de defesa, bem como para desenvolver técnicas com base em proteômica que possam ser aplicadas no diagnóstico precoce. Desta forma, a proteômica diferencial pode ser bastante útil para a comparação qualitativa e quantitativa das proteínas expressas em uma dada patologia e para a identificação de biomarcadores moleculares potenciais de susceptibilidade e de defesa frente à infecção por patógenos.

## **OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo Geral**

Testar e padronizar protocolos para a separação de proteínas de brânquias de camarões *L. vannamei* infectados com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), através de eletroforese bidimensional (2-DE), visando realizar a comparação qualitativa e quantitativa do perfil diferencial de proteínas expressas em camarões infectados e não infectados.

### **3.2. Objetivos Específicos**

a) Identificar camarões não infectados e camarões naturalmente infectados pelo WSSV a partir de espécimes coletados em fazendas de cultivo de Santa Catarina;

b) Testar e avaliar protocolos de homogeneização e preparo das amostras de proteínas de brânquias de camarões *L. vannamei* para eletroforese bidimensional (2-DE);

c) Padronizar a melhor concentração de proteínas totais de brânquias de camarões *L. vannamei*, a serem utilizadas na focalização isoelétrica, seguida de eletroforese (2-DE);

d) Avaliar e comparar os resultados obtidos a partir dos diferentes protocolos, através da coloração dos géis.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Coleta do material biológico

Os camarões da espécie *L. vannamei* foram coletados com aproximadamente 13 gramas em fazendas de carcinicultura no litoral norte e sul do estado de Santa Catarina, incluindo a região de Laguna afetada pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) no ano de 2005, segundo registros na Organização Internacional de Epizootias (OIE). As coletas foram realizadas entre os anos de 2008 e 2009. Brânquias e pleópodes, de camarões sobreviventes para o WSSV, foram dissecados utilizando-se material estéril, armazenados imediatamente em nitrogênio líquido e, em seguida, transportados para o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica da Universidade Federal de Santa Catarina. As amostras foram estocadas em freezer a -80 °C para posterior análise. O grupo controle foi formado pelos camarões negativos para o WSSV, enquanto os camarões positivos para o WSSV constituíram o grupo infectado, conforme determinado pelas análises realizadas através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

### 4.2. Identificação dos grupos positivos e negativos para o WSSV e o IHNV

#### 4.2.1. Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada conforme protocolo adaptado de Maciel e Marques (2003). Os pleópodes foram digeridos em tampão TE 1x estéril (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) com SDS 1% e 20 mg/mL de proteinase K por 1 hora a 65 °C. Uma segunda incubação foi realizada por 1 hora a 55 °C, após a adição de cloreto de sódio 5M e CTAB 10%. Subsequentemente à adição de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1, v/v), o material foi centrifugado a 14.000 x rpm por 8 minutos a 4 °C e ao sobrenadante foi adicionado igual volume de álcool isopropílico. O precipitado foi lavado com álcool etílico 70% e seco à temperatura ambiente. O material foi ressuscitado em tampão TE 1x, tratado com RNase (1mg/mL) e clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após centrifugação (14000 x rpm por 8 minutos a 4 °C), o sobrenadante foi coletado, adicionando-se ao mesmo acetato de sódio 3M e álcool etílico 95%. Após nova centrifugação o precipitado foi seco e eluído em água de biologia molecular. Uma alíquota do material foi utilizada para a determinação espectrofotométrica da concentração

de DNA da amostra, através da razão de absorbância a 260 e 280 nanômetros (nm) e posteriormente a integridade do material genômico foi visualizada em gel agarose 1%.

#### 4.2.2. PCR

Na PCR para seleção dos animais foram utilizados iniciadores para sequencias genômicas dos vírus WSSV e IHNV, por serem estes vírus aqueles cuja ocorrência já teve registro nos cultivos de camarões em Santa Catarina.

##### 4.2.2.1. PCR *nested* para detecção do WSSV

A PCR *nested* (ou PCR de dois passos) foi realizada conforme descrito por Lo et al. (1996), nas condições recomendadas pela OIE (2003). Para a primeira reação de amplificação da sequência específica do WSSV, foram utilizados iniciadores 146F1 (5'-ACT-ACT-AACTTC-AGC-CTA-TCT-AG-3') e 146R1 (5'-TAA-TGC-GGG-TGT-AAT-GTT-CTT-ACG-A-3'). Foi utilizado 1 µL de DNA para 25 µL de reação contendo tampão 1X, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, dNTP 1 mM cada, *primer* 140 nM cada e Taq 1U. Após uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos as amostras foram submetidas a 39 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 40 segundos. A extensão final foi realizada a 72 °C por 5 minutos. O tamanho do fragmento amplificado, utilizando-se os iniciadores descritos, corresponde a 1447 pb (pares de base). Para o segundo passo da reação (PCR *nested*), foi utilizado 1 µL do produto da primeira reação em 24 µL de uma nova mistura de reação, substituindo-se o primeiro par de iniciadores pelo segundo: 146F2 (5'-GTA-ACT-GCC-CCT-TCC-ATCTCC-A-3') e 146R2 (5'-TAC-GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG-T-3'). O protocolo de amplificação utilizado foi o mesmo descrito para o primeiro passo. O tamanho esperado do fragmento amplificado nessa segunda reação corresponde a 941 pb. Controles positivos e negativos foram incluídos em todos os ensaios. O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% para visualização dos resultados, após coloração com brometo de etídeo.

##### 4.2.2.2. PCR para detecção do IHNV

Para a reação de amplificação da sequência específica do IHNV, foram utilizados iniciadores F3 (5'-TCG-GAA-AAC-TGA-ACA-CTG-GCC-T-3') e R2 (5'-CGG-CGT-GTT-CTT-CGT-CTT-CAT-T-3'),

descritos por Moser, 2005. Foi utilizado 1  $\mu$ L de DNA para 25  $\mu$ L de reação contendo tampão 1X,  $MgCl_2$  2,5 mM, dNTP 0,2 mM cada, *primer* 1 $\mu$ M cada e Taq 1U. Após uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, as amostras foram submetidas a 29 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 56 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos. A reação foi mantida a 20 °C por 10 minutos. O tamanho do fragmento amplificado, utilizando-se os iniciadores descritos, corresponde a 512 pb. Controles positivos e negativos foram incluídos em todos os ensaios. Após a reação, a visualização dos produtos amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo.

### **4.3. Homogeneização do tecido branquial**

Após a análise dos resultados da PCR foram estabelecidos os grupos de camarões com e sem WSSV, ou seja, grupo infectado e grupo controle, respectivamente. Para cada um dos grupos (grupo infectado e grupo controle) foram utilizadas réplicas compostas de três animais cada. O tecido branquial do *pool* foi pesado (aproximadamente 800  $\mu$ g/amostra) e macerado com pistilo em nitrogênio líquido. A este homogeneizado foi acrescentado tampão PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $Na_2HPO_4$  10 mM,  $KH_2PO_4$  2 mM, pH 7,4) na proporção de uma parte de amostra para duas de tampão com PMSF (40  $\mu$ g/mL). A amostra foi centrifugada e o sobrenadante transferido para microtubo onde as proteínas foram precipitadas de acordo com item 4.4.

### **4.4. Precipitação de proteínas**

Foram testados e avaliados diferentes protocolos para precipitação de proteínas com o objetivo de se determinar o melhor procedimento de extração para as proteínas totais. Desta forma, foram obtidas amostras com vários níveis protéicos e o melhor deles foi adotado nas extrações seguintes.

#### **4.4.1. TCA 15% em PBS**

A amostra homogeneizada, conforme o item 4.3., foi centrifugada a 2.000 x g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante transferido para novo microtubo. Após obtenção das proteínas, foi adicionado o mesmo volume de PBS contendo TCA 30% (concentração final 15%). A mistura permaneceu por no mínimo 1 hora em freezer a -20 °C. Após este período as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 30

minutos a 4 °C com subsequente descarte do sobrenadante. O precipitado contendo as proteínas totais foi seco e solubilizado em 1 mL de solução de reidratação (uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 2%) com 20 µL de PMSF (4 mg/mL). Uma alíquota de 100 µL foi retirada para dosagem de proteínas e o restante da amostra armazenada a -80 °C para os procedimentos posteriores.

#### 4.4.2. TCA 8% em Acetona

A amostra homogeneizada, conforme o item 4.3. foi centrifugada a 2.000 x g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante transferido para novo microtubo. Após obtenção das proteínas, foram adicionados quatro volumes de acetona gelada contendo TCA 10% (concentração final 8%). A mistura foi deixada por no mínimo 1 hora a -20 °C. Após este período a amostra foi centrifugada a 20.000 x g por 20 min. a 4 °C com subsequente descarte do sobrenadante. O precipitado contendo as proteínas totais foi lavado com 1 mL de metanol gelado. Em seguida, o precipitado foi ressuspenso em metanol gelado e agitado até adquirir um aspecto de suspensão, sendo novamente centrifugado a 20.000 x g por 5 minutos e o sobrenadante descartado. A lavagem foi realizada no mínimo mais duas vezes. Após lavagem com metanol, o precipitado foi lavado da mesma forma com acetona gelada por duas vezes para livrar a amostra de qualquer traço de TCA e metanol. O precipitado final foi seco e solubilizado em 1mL de solução de reidratação (uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 2%) com 20 µL de PMSF (4 mg/mL). Uma alíquota de 100 µL foi retirada para dosagem de proteínas e o restante da amostra armazenada a -80 °C para os procedimentos posteriores.

##### 4.4.2.1. TCA 8% em Acetona com maior centrifugação

A amostra homogeneizada, conforme o item 4.3. foi centrifugada a 15.000 x g por 2 horas a 4 °C e o sobrenadante transferido para novo microtubo. Os demais procedimentos de precipitação foram realizados conforme o item 4.4.2. a partir da adição de 4 volumes de acetona gelada contendo TCA 10% (concentração final 8%).

#### 4.4.3. TCA 10% e DTT 0,1% em PBS

A amostra homogeneizada, conforme o item 4.3. foi centrifugada a 15.000 x g por 1 hora a 4 °C e o sobrenadante transferido para novo microtubo. Após obtenção das proteínas, foram adicionados quatro volumes de PBS contendo TCA 12,5% e DTT 0,125% (concentração

final 10% e 0,1% respectivamente). A mistura foi deixada por 1 hora no gelo. Após este período foi centrifugada a 10.000 x g por 30 minutos a 4 °C com subsequente descarte do sobrenadante. O precipitado contendo as proteínas totais foi lavado com 1 mL de metanol gelado. Em seguida, o precipitado foi ressuspenso em metanol gelado e agitado até adquirir um aspecto de suspensão, sendo novamente centrifugado a 20.000 x g por 5 minutos e o sobrenadante descartado. A lavagem foi realizada no mínimo mais duas vezes. Após lavagem com metanol, o precipitado foi lavado da mesma forma com acetona gelada por duas vezes para livrar a amostra de qualquer traço de TCA e metanol. O precipitado contendo as proteínas totais foi ressuspenso em acetona contendo 0,1% de DTT e novamente centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. O precipitado final foi seco e solubilizado em 1mL de solução de reidratação (uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 2%) com a adição de 20 µL de PMSF (4 mg/mL). Uma centrifugação final de 10.000 x g por 30 minutos a 15 °C o sobrenadante com a fração de proteínas solúveis foi coletado. Uma alíquota de 100 µL foi retirada para dosagem de proteínas e o restante da amostra armazenada a -80 °C para os procedimentos posteriores.

#### 4.4.4. TCA 10% e DTT 0,1% em Acetona

A amostra homogeneizada, conforme o item 4.3. foi centrifugada a 15.000 x g por 1 hora a 4 °C e o sobrenadante transferido para microtubo. Após obtenção das proteínas, foram adicionados quatro volumes de Acetona contendo TCA 12,5% e DTT 0,125% (concentração final 10% e 0,1% respectivamente). A mistura foi deixada por 1 hora no gelo. Após este período foi centrifugada a 20.000 x g por 20 minutos a 4 °C com subsequente descarte do sobrenadante. O precipitado contendo as proteínas totais foi lavado com 1 mL de metanol gelado. Em seguida, o precipitado foi ressuspenso em metanol gelado e agitado até adquirir um aspecto de suspensão, sendo novamente centrifugado a 20.000 x g por 5 minutos e o sobrenadante descartado. A lavagem foi realizada no mínimo mais duas vezes. Após lavagem com metanol, o precipitado foi lavado da mesma forma com acetona gelada por duas vezes para livrar as amostras de qualquer traço de TCA e metanol. O precipitado contendo as proteínas totais foi ressuspenso em acetona contendo 0,1% de DTT e novamente centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. O precipitado final foi seco e solubilizado em 1 mL de solução de reidratação (uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 2%) com a adição de 20 µL de PMSF

(4mg/mL). Uma centrifugação final de 10.000 x g por 30 min. a 15 °C o sobrenadante com a fração de proteínas solúveis foi coletado. Uma alíquota de 100 µL foi retirada para dosagem de proteínas e o restante da amostra armazenada a -80 °C para os procedimentos de posteriores.

## **4.5. Clarificação e dessalificação das amostras**

### *4.5.1. Clean-up Kit*

Algumas amostras foram tratadas com o *Clean-up Kit 2-D* (GE Healthcare®) visando melhorar a qualidade dos resultados da separação das proteínas na eletroforese bidimensional, reduzindo estrias, coloração de fundo, e outros artefatos, devido a contaminantes interferentes, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Os reagentes do *kit* precipitam proteínas, deixando as substâncias interferentes, tais como detergentes, sais, lipídios, fenóis e ácidos nucleicos, em solução. As proteínas foram precipitadas numa combinação de soluções precipitantes e co-precipitantes fornecidas pelo kit. As proteínas precipitadas foram centrifugadas a 8.000 x g por 10 minutos a 4 °C e o precipitado foi novamente lavado para remover os contaminantes não protéicos. Após uma segunda centrifugação de 8.000 x g por 10 minutos a 4 °C, o precipitado obtido foi solubilizado em 1mL de solução de reidratação (uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 2%) com 20 µL de PMSF (4 mg/mL).

### *4.5.2. PD MiniTrap G-10*

Algumas amostras foram tratadas com o PD MiniTrap G-10 (GE Healthcare®) para retirada de sal e de outras impurezas. A separação das moléculas de interesse com alta massa molecular foi realizada através de filtração de 300 µL de amostra na coluna de Sephadex, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. A amostra foi novamente solubilizada em 300 µL de solução de reidratação (uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 2%) com 6 µL de PMSF (4 mg/mL).

## **4.6. Dosagem de proteínas**

### *4.6.1. Método de Bradford*

A concentração de proteínas totais nas amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976) modificado. Como padrão foi utilizado de 0 a 5 µg/µL de Albumina Bovina Sérica (BSA). O ensaio foi

realizado em triplicata em microplaca com 5  $\mu\text{L}$  de amostra em 45  $\mu\text{L}$  de água e adição de 50  $\mu\text{L}$  de HCl (0,0011 M) e 100  $\mu\text{L}$  de CBB (0,194 mg/mL). A leitura da absorbância a 595 nm foi realizada após 5 minutos de incubação em temperatura ambiente, utilizando o software SoftMax PRO 5.2 em espectrofluorímetro. A comparação das absorbâncias das amostras com a curva padrão permitiu a determinação da concentração total de proteínas nas mesmas.

#### 4.7. Reidratação do strip para a primeira dimensão

O volume necessário de amostra (150 e 250  $\mu\text{g}$  de proteínas totais) após tratamento com 2-D *Clean-up* Kit (item 4.5.1.), *PD MiniTrap G-10* (item 4.5.2.), determinado após a dosagem de proteínas (item 4.6.1.), foi transferido para microtubo e acrescido de DTT (2,8 mg/mL), IPG (1%), PMSF (4 mg/mL), azul de bromofenol (0,002%) e solução de reidratação (uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 2%) para completar um volume final de 250  $\mu\text{L}$ . A amostra foi centrifugada a 10.000 g x por 20 minutos a 15 °C e o sobrenadante aplicado no centro de uma das canaletas da bandeja de reidratação, de forma a evitar a formação de bolhas. A tira desidratada de poliacrilamida (strip) com gradiente de pH imobilizado (IPG-Immobiline Dry Strip Gels, Amersham Biosciences<sup>®</sup>) de 13 cm, com gradiente de pH na faixa entre 3-10 linear, foi reidratada direta e passivamente sobre os 250  $\mu\text{L}$  da solução de reidratação com 150 ou 250  $\mu\text{g}$  de proteína por 12-14 horas.

#### 4.8. Focalização Isoelétrica – 1º Dimensão

Após a hidratação, os strips, com gradiente de pH na faixa linear entre 3-10, contendo as amostras, foram submetidos à focalização isoelétrica (primeira dimensão) em sistema *Ettan IPGphor 3* (GE Healthcare<sup>®</sup>). Os strips foram colocados no equipamento e cobertos com óleo mineral *DryStrip Cover Fluid* (GE Healthcare<sup>®</sup>). Sobre cada extremidade do strip foi colocando papel *pre-cut eletrode wick* (GE Healthcare<sup>®</sup>) hidratado em 150  $\mu\text{L}$  de água e sobre eles os eletrodos, de acordo com as recomendações do fabricante.

##### 4.8.1. Programa de Focalização Isoelétrica

Foram testadas e avaliadas diferentes programações para que as moléculas migrassem sob ação de um campo elétrico em gel de poliacrilamida, em um gradiente de pH. A migração das proteínas cessa

ao atingirem o seu ponto isoelétrico. As condições ou programação testadas para as focalizações isoelétricas (IEF) para strip de 13 cm com pH 3-10 linear, em V/hora, seguiram os protocolos 1, 2 ou 3, conforme descrito abaixo.

**Tabela 1.** Protocolo 1 IEF.

Intervalo de pH	Etapa	Modo	Voltagem (V)	Tempo (hora)
3-10	1	Step	500	1:00
	2	Gradiente	1000	1:00
	3	Gradiente	8000	2:30
	4	Step	8000	0:30

**Tabela 2.** Protocolo 2 IEF.

Intervalo de pH	Etapa	Modo	Voltagem (V)	Tempo (hora)
3-10	1	Step	50	0:30
	2	Step	500	1:00
	3	Gradiente	1000	1:00
	4	Gradiente	8000	2:30
	5	Step	8000	0:30

**Tabela 3.** Protocolo 3 IEF.

Intervalo de pH	Etapa	Modo	Voltagem (V)	Tempo (hora)
3-10	1	Step	50	0:30
	2	Step	500	1:00
	3	Gradiente	1000	1:00
	4	Gradiente	4000	1:00
	5	Gradiente	8000	2:30
	6	Step	8000	0:30

#### 4.8.2. Armazenamento do strip após Focalização Isoelétrica

Ao final da Focalização Isoelétrica (item 4.8.1.) os strips foram retirados do Ettan IPGphor 3 (GE healthcare<sup>®</sup>) e armazenados individualmente em microtubo de ensaio fechado. Desta forma os strips podem permanecer armazenados por até um mês a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , antes do equilíbrio com DTT e Iodoacetamida (item 4.9.).

#### 4.9. Equilíbrio do strip com DTT e Iodoacetamida

Imediatamente antes da segunda dimensão (item 4.10.), os strips contendo as proteínas inicialmente separadas de acordo com o seu pI, foram equilibradas, sob agitação constante, em tampão contendo uréia 6M, Tris-HCl 75 mM, pH 8,8, glicerol 29,3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002% e DTT (preserva o estado totalmente reduzido de proteínas não alquiladas) 1,25% por 20 minutos. Em seguida, foram mantidos, sob agitação constante, em tampão contendo uréia 6M, Tris-HCl 75 mM, pH 8,8, glicerol 29,3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002% e Iodoacetamida (alquila grupos tióis em proteínas, impedindo sua re-oxidação durante a eletroforese) 2,5% por 20 minutos.

#### 4.10. Eletroforese em SDS-PAGE – 2<sup>o</sup> Dimensão

A eletroforese bidimensional em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) foi realizada em sistema SE-600 Ruby (GE Healthcare<sup>®</sup>) com refrigeração. Os géis de poli(acrilamida) 12,5% contendo 0,27% N,N'-metilenebis(acrilamida), Tris-HCl 375 mM, SDS 0,1%, PSA 0,06% e Temed 0,06% foram preparados em placas de 14 x 16 cm, com espessura de 1,5 mm. Os géis foram polimerizados com uma etiqueta numerada na parte inferior esquerda para identificação e catalogação. Strips e marcadores de massa molecular foram aplicados sobre os géis previamente preparados e então, selados com solução de agarose (agarose 0,5%, Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1%) aquecida a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A eletroforese foi realizada em tampão de corrida 1X Laemmli SDS (Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1%) a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , inicialmente a 15 mA fixos por gel até que as proteínas migrassem para o gel de acrilamida. Em seguida, foi utilizada amperagem constante de 30 mA por gel e voltagem livre por aproximadamente 4 horas ou até que as amostras migrassem até o final do gel. Ao término da eletroforese, os géis foram retirados das placas de vidro e fixados de acordo com o método de coloração a ser utilizado (itens 4.11.).

#### 4.11. Métodos de coloração

Para a detecção de proteínas nos géis foram utilizados os métodos de coloração com Coomassie Brilliant Blue G-250 ou nitrato de prata.

##### 4.11.1. Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB)

A coloração com CBB foi realizada de acordo com o método descrito por Neuhoﬀ, Stamm, Eibl (1985) o qual consiste das seguintes etapas: fixação com solução contendo ácido fosfórico 1,3% e metanol 20% durante 1 hora. Coloração overnight com 400 mL de solução contendo ácido fosfórico 2% e sulfato de amônia 10% com 10 mL de solução CBB 5%. Neutralização em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 6,5) durante 3 minutos. Limpeza com metanol 25% por menos de 1 minuto. Estabilização com sulfato de amônia 20% overnight. Os procedimentos de coloração a estabilização devem ser repetidos por no mínimo duas vezes. Após coloração, os géis foram mantidos refrigerados a 4 °C ao abrigo da luz e suas imagens digitalizadas conforme descrito no item 4.12.

##### 4.11.2. Nitrato de Prata

A coloração com nitrato de prata foi realizada com *PlusOne Silver Staining Kit, Protein* (GE Healthcare®) de acordo com as recomendações do fabricante, com pequenas modificações nos tempos de incubação como segue: fixação com solução contendo etanol 30% e ácido acético glacial 10% por no mínimo 1 hora. Sensibilização com etanol 30%, tiosulfato de sódio 0,2%, acetato de sódio 6,8% e glutaraldeído 0,125% durante 1 hora. Limpeza com três lavagens de dez minutos cada com água destilada em seguida incubação com nitrato de prata 0,25% e formaldeído 0,0148% durante 1 hora. Limpeza com uma lavagem de dois minutos com água destilada. Revelação com carbonato de sódio 2,5% e formaldeído 0,0296% durante 3 minutos. Interrupção da reação de revelação com solução contendo EDTA 1,46% durante 1 hora e preservação com glicerol 8,7% por no mínimo 1 hora. Após coloração, os géis foram mantidos refrigerados a 4 °C ao abrigo da luz e suas imagens digitalizadas conforme descrito no item 4.12.

#### 4.12. Digitalização das imagens

Os géis de proteínas oriundos de amostras de animais infectados e não infectados com o Vírus da Síndrome da Mancha Branca tiveram suas imagens digitalizadas com o uso do *Image Scanner* (Amersham Bioscience®).

### 4.13. Análise dos géis

A análise dos géis e a identificação das proteínas diferencialmente expressas foram realizadas a partir da imagem digitalizada dos géis, obtida a partir das amostras de brânquias dos camarões infectados e dos camarões não infectados, utilizando-se o Image Scanner (Amersham Bioscience®). As imagens foram analisadas e o pI, a MW, a intensidade, a área e o volume dos *spots* foram comparados utilizando *software* Image Master Platinum, versão 7.0 (GE Healthcare®), com o objetivo de identificar o melhor protocolo para detecção dos *spots* de proteínas.

### 4.14. Análise estatística

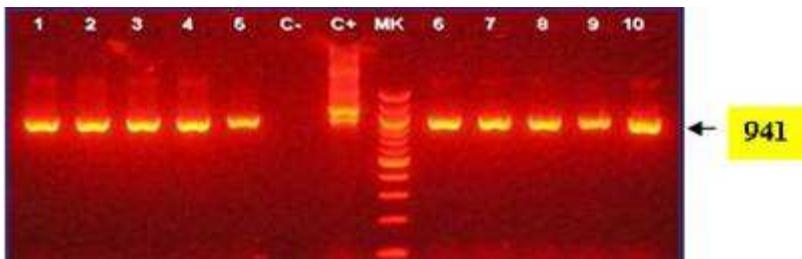
A análise estatística foi realizada com a utilização do método ANOVA para a comparação dos dados de densitometria entre os diferentes grupos experimentais, considerando  $p < 0,05$  como estatisticamente significativo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Identificação dos camarões positivos e negativos para o WSSV e o IHNV

#### 5.1.1. PCR *nested* para detecção do WSSV

A PCR *nested* foi realizada conforme descrito por Lo et al. (1996), nas condições recomendadas pela OIE (2003). O tamanho do fragmento amplificado, utilizando-se os iniciadores descritos, foi de 941 pb. Controles positivos e negativos foram incluídos em todos os ensaios.

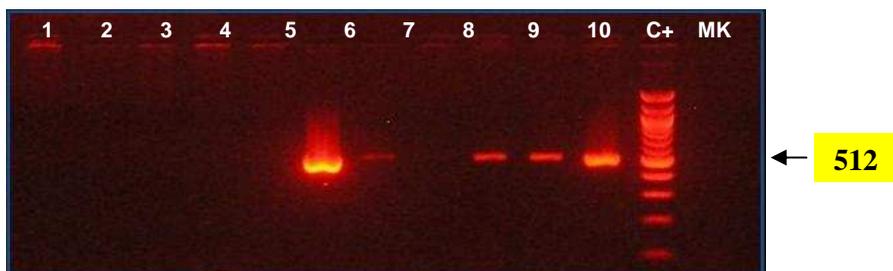


**Fig. 1.** Eletroforese representativa do resultado da *nested* PCR para detecção do WSSV em amostras de camarão. **1-10)** Animais positivos para o WSSV, **C-)** Controle negativo, **C+)** Controle positivo e **MK)** marcador de massa molecular.

Na figura 1, pode ser observado um gel representativo dos resultados obtidos no ensaio de PCR *nested* utilizado na detecção da amplificação de uma sequência genômica do WSSV.

### 5.1.2. PCR para detecção do IHHNV

Para a reação de amplificação da sequência específica do genoma do IHHNV, foram utilizados iniciadores descritos por Moser 2005, que amplificaram um fragmento correspondente a 512 pb. Controles positivos e negativos foram incluídos em todos os ensaios. A visualização das reações positivas para o IHHNV foi realizada após eletroforese em gel de agarose 2% (figura 2).



**Fig. 2.** Eletroforese representativa do resultado da PCR para detecção do IHHNV em amostras de camarão. **1–5 e 8)** Animais negativos para o IHHNV; **6, 7, 9 e 10)** animais positivos para o IHHNV; **C+)** Controle positivo; **C-)** Controle negativo e **MK)** marcador de massa molecular.

Na figura 2, pode ser observado um gel representativo dos resultados obtidos no ensaio de PCR utilizado na detecção da amplificação de uma sequência genômica do IHHNV.

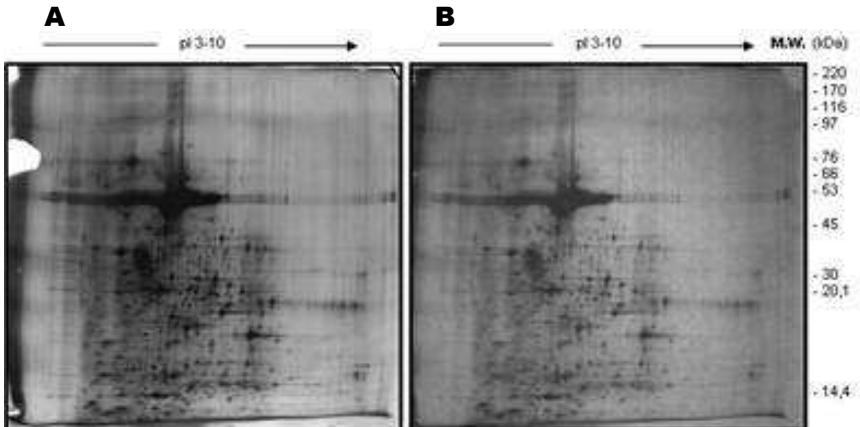
## 5.2. Precipitação de proteínas

As eletroforeses bidimensionais foram realizadas em gel de acrilamida 10%, com proteínas extraídas de brânquias de camarão, *L. vannamei*, obtidas de animais positivos para o WSSV e negativos para o IHHNV.

### 5.2.1. TCA 15% em PBS e TCA 8% em Acetona

As proteínas foram precipitadas com TCA 15% em PBS (Figura 3A) e TCA 8% em Acetona (Figura 3B). Após solubilização em solução

de reidratação e quantificação, 250  $\mu$ g de proteínas foram imobilizadas em strip de 13 cm, com pH 3-10 linear e isofocalizadas de acordo com o protocolo 1. A coloração em nitrato de prata revelou os spots protéicos como representado pela Figura 3.

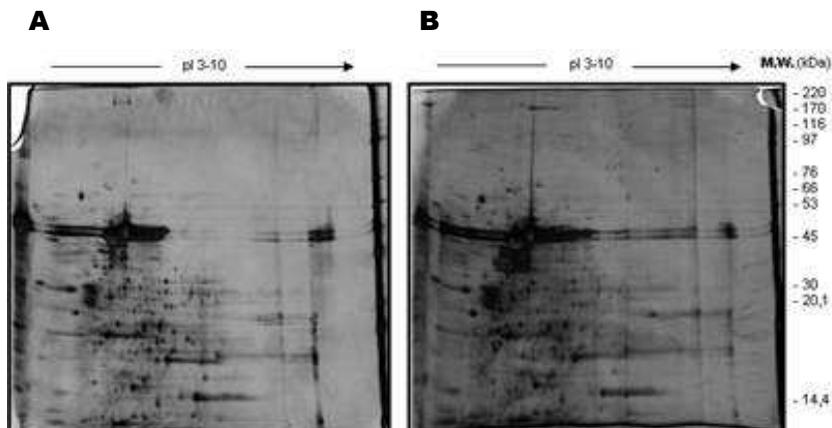


**Fig. 3:** 2-DE de proteínas precipitadas com TCA 15% em PBS e TCA 8% em Acetona. **(A)** Proteínas precipitadas com TCA 15% em PBS. **(B)** Proteínas precipitadas com TCA 8% em Acetona. **M.W.**) Marcador de massa molecular.

Quando comparados os resultados da eletroforese bidimensional das amostras precipitadas com TCA 15% em PBS (Figura 3A) e TCA 8% em acetona (Figura 3B) pode-se observar que a precipitação realizada com TCA 8% em acetona (Figura 3B) apresentou melhor qualidade e redução de estrias, embora ainda existam deficiências em relação à coloração de fundo e à presença de outros artefatos.

#### 5.2.2. TCA 8% em Acetona e TCA 8% em Acetona com maior centrifugação

As proteínas foram precipitadas com TCA 8% em acetona (Figura 4A) e TCA 8% em acetona com maior centrifugação (Figura 4B). Após solubilização em solução de reidratação e quantificação, 250  $\mu$ g de proteínas foram imobilizadas em strip de 13 cm, com pH 3-10 linear e isofocalizadas de acordo com o protocolo 2. A coloração em nitrato de prata foi utilizada para revelar os *spots* protéicos, como pode ser visto na Figura 4.

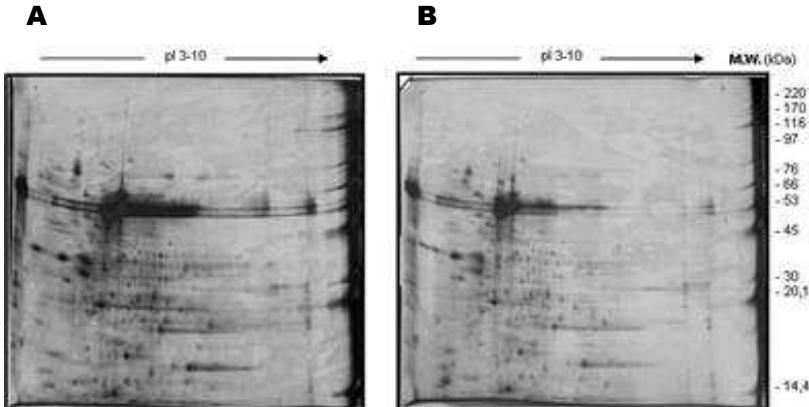


**Fig. 4:** 2-DE de proteínas precipitadas com TCA 8% em Acetona e TCA 8% em Acetona com maior centrifugação. **(A)** Proteínas precipitadas com TCA 8% em Acetona. **(B)** Proteínas precipitadas com TCA 8% em Acetona com maior centrifugação. **MK**) Marcador de massa molecular.

Quando comparados os resultados da eletroforese bidimensional das amostras precipitadas com TCA 8% em acetona (Figura 4A) e TCA 8% em acetona com maior centrifugação (Figura 4B) pode-se observar que aquelas com TCA 8% em acetona com menor centrifugação (Figura 4A) apresentam melhor qualidade e redução de estrias embora a resolução ainda apresente limitações, conforme pode ser observado após coloração dos géis. Aparentemente, a presença de alguns artefatos pode ser ainda observada. Por outro lado, com amostras precipitadas com TCA 8% em acetona com focalização isoeétrica de acordo com o protocolo 1 (Figura 3B) e protocolo 2 (Figura 4A), pode-se observar que no protocolo 2 de focalização isoeétrica foram obtidos melhores resultados.

### 5.2.3. TCA 8% em Acetona e TCA 10% com DTT 0,1% em Acetona

As proteínas foram precipitadas com TCA 8% em Acetona (Figura 5A) e TCA 10% com DTT 0,1% em Acetona (Figura 5B). Após solubilização em solução de reidratação e quantificação, 250 µg de proteínas foram imobilizados em strip de 13 cm, com pH 3-10 linear e isofocalizados de acordo com o protocolo 3. A coloração em nitrato de prata revelou os *spots* protéicos, como mostrado nos géis apresentados Figura 5.



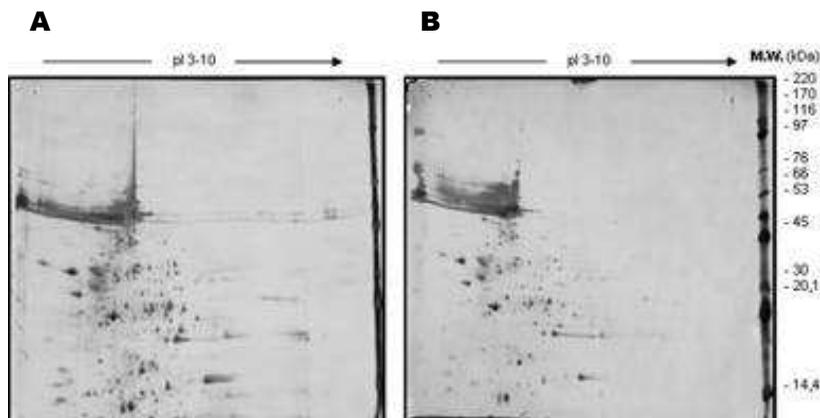
**Fig. 5:** 2-DE de proteínas precipitadas com TCA 8% em Acetona e TCA 10% e DTT 0,1% em Acetona. **(A)** Proteínas precipitadas com TCA 8% em Acetona. **(B)** Proteínas precipitadas com TCA 10% e DTT 0,1% em Acetona. **MK** Marcador de massa molecular.

Quando comparados os resultados da eletroforese bidimensional das amostras precipitadas com TCA 8% em acetona (Figura 5A) e TCA 10% e DTT 0,1% em acetona (Figura 5B), pode-se observar que a amostra precipitada com TCA 10% e DTT 0,1% em acetona (Figura 5B) apresentou melhor qualidade e redução de estrias, embora ainda exista a coloração de fundo com artefatos. Com TCA 8% em acetona, com focalização isoeétrica de acordo com o protocolo 2 (Figura 4A) e protocolo 3 (Figura 5A), observou-se que o protocolo 3 apresentou melhor resultado na focalização isoeétrica. Embora a recomendação do fabricante indique que a concentração de proteínas totais nos strips (GE) para imobilização seja de 250 µg esta parece uma concentração alta frente a coloração testada, principalmente devido à faixa de sensibilidade maior do nitrato de prata quando comparada com a coloração por Coomassie Blue.

#### 5.2.4. TCA 10% e DTT 0,1% em PBS e TCA 10% e DTT 0,1% em Acetona

As proteínas foram precipitadas com TCA 10% e DTT 0,1% em PBS (Figura 6A) e com TCA 10% e DTT 0,1% em Acetona (Figura 6B). Após solubilização em solução de reidratação e quantificação, 150 µg de proteínas foram imobilizadas em strip de 13 cm, com pH 3-10

linear e isofocalizadas de acordo com o protocolo 3. Os *spots* protéicos visualizados após coloração com nitrato de prata estão mostrados em um gel representativo na Figura 6.



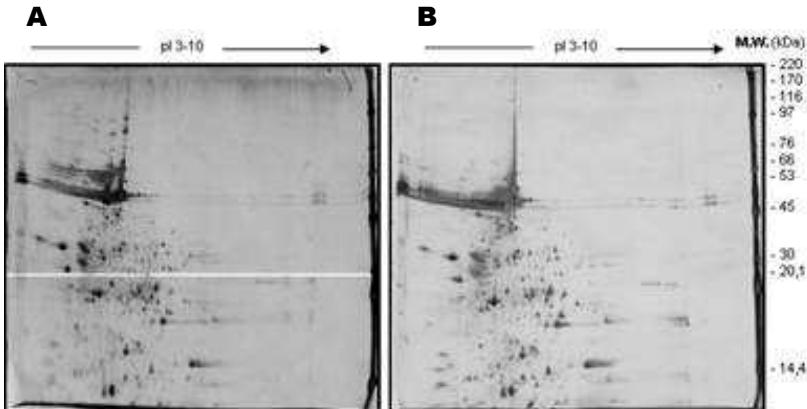
**Fig. 6:** 2-DE de proteínas precipitadas com TCA 10% e DTT 0,1% em PBS e TCA 10% e DTT 0,1% em Acetona. **(A)** Proteínas precipitadas com TCA 10% e DTT 0,1% em PBS. **(B)** Proteínas precipitadas com TCA 10% e DTT 0,1% em Acetona. **M.W.**) Marcador de massa molecular.

Nos resultados da eletroforese bidimensional das amostras precipitadas com TCA 10% e DTT 0,1% em PBS (Figura 6A) e TCA 10% e DTT 0,1% em acetona (Figura 6B, pode-se observar que a amostra precipitada com TCA 10% e DTT 0,1% em PBS (Figura 6A) apresentou melhor qualidade e redução de estrias, porém podem ser ainda observados linhas horizontais na parte superior do gel. Nas amostras precipitadas com TCA 10% e DTT 0,1% em acetona, com 250  $\mu$ g (Figura 5B) e 150  $\mu$ g (Figura 6B) de proteína total, pode-se observar que 150  $\mu$ g de proteínas totais parece ser uma concentração mais adequada para ser imobilizado nos strips, pois obteve-se melhores resultados para a análise do perfil diferencial, utilizando esta coloração.

#### 5.2.5. TCA 10% e DTT 0,1% em PBS com e sem *Clean-up*

As proteínas foram precipitadas com TCA 10% e DTT 0,1% em PBS e submetidas (Figura 7A) ou não (Figura 7B) a limpeza com *Clean-up* Kit. Após solubilização em solução de reidratação e

quantificação, 150  $\mu\text{g}$  de proteínas foram imobilizadas em strip de 13 cm, com pH 3-10 linear e, isofocalizadas de acordo com o protocolo 3. A coloração em nitrato de prata revelou os *spots* protéicos como representado pela Figura 7.

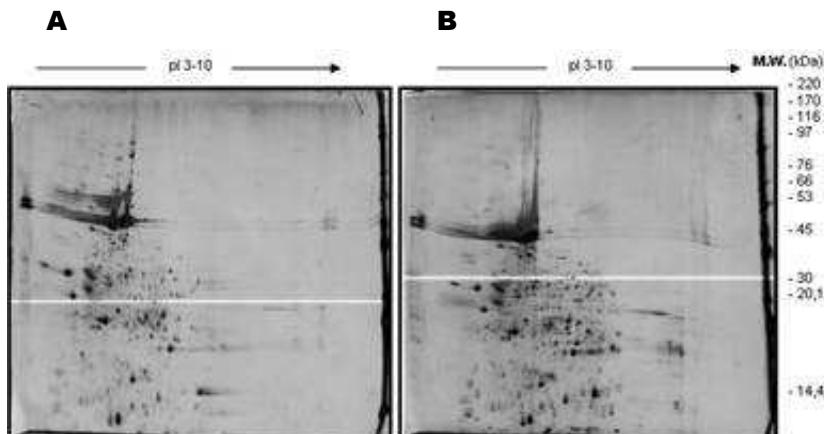


**Fig. 7:** 2-DE de proteínas precipitadas com TCA 10% e DTT 0,1% em PBS com ou sem limpeza com *Clean-up* kit. (A) Limpeza com *Clean-up* kit. (B) Sem limpeza com *Clean-up* kit. M.W.) Marcador de massa molecular.

Entre as amostras precipitadas com TCA 10% e DTT 0,1% em PBS com limpeza em *Clean-up* kit (Figura 7A) e sem a limpeza com o *Clean-up* kit (Figura 7B), pode-se observar que a amostra limpa com o *Clean-up* kit (Figura 7A) apresentou redução das linhas horizontais, melhora na resolução e aumento do número de *spots* detectáveis em comparação com a amostra não tratada (Figura 7B).

#### 5.2.6. TCA 10% e DTT 0,1% em PBS com *Clean-up* com e sem *PD Minitrap G-10*

As proteínas foram precipitadas com TCA 10% e DTT 0,1% em PBS, limpas com *Clean-up* Kit e submetidas (Figura 8A) ou não (Figura 8B) a limpeza com *PD MiniTrap G-10*. Após solubilização em solução de reidratação e quantificação, 150  $\mu\text{g}$  de proteínas foram imobilizadas em strip de 13 cm, com pH 3-10 linear e isofocalizadas de acordo com o protocolo 3. A coloração em nitrato de prata revelou os *spots* protéicos como mostrado nos géis representativos da Figura 8.



**Fig. 8:** 2-DE de proteínas limpas com *Clean-up Kit* e submetidas ou não a limpeza com *PD MiniTrap G-10*. (A) Limpeza com *PD MiniTrap G-10*. (B) sem limpeza com *PD MiniTrap G-10*. M.W.) Marcador de massa molecular.

Os resultados da eletroforese bidimensional das amostras precipitadas com TCA 10% e DTT 0,1% em PBS, com a limpeza no *Clean-up kit* e, submetidas (Figura 8A) ou não (Figura 8B) a limpeza posterior com *PD MiniTrap G-10*, mostraram que a amostra que passou pelos dois tratamentos, *Clean-up kit* e *PD MiniTrap G-10* (Figura 8A), apresentou melhor qualidade e redução de estrias de fundo.

### 5.3. Clarificação e dessalificação das amostras

#### 5.3.1. *Clean-up Kit*

Como pode ser verificado a partir da comparação das Figuras 7A e 7B, os resultados de eletroforese bidimensional de amostras tratadas com o Kit *Clean-up 2-D* (GE healthcare®) apresentaram melhor qualidade, redução de estrias e coloração de fundo, devido a redução de contaminantes interferentes.

#### 5.3.2. *PD MiniTrap G-10*

As eletroforeses bidimensionais de amostras que tiveram o sal retirado (dessalificadas) com o uso do *PD MiniTrap G-10* (GE

Healcare<sup>®</sup>) apresentaram resultados de qualidade superior, através da redução da presença de contaminantes interferentes, como pode ser observado nas Figuras 8A e 8B.

#### **5.4. Dosagem de proteínas**

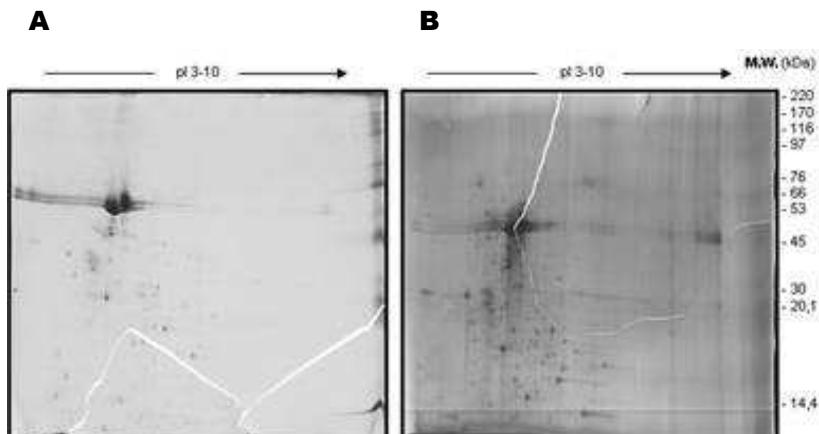
A comparação dos métodos de precipitação foi ainda avaliada através da quantificação da concentração de proteínas totais nas amostras em espectrofluorímetro. Esta avaliação revelou valores de rendimento distintos entre si. Nos extratos protéicos de brônquias obtidos com TCA 8% foram observados valores que variaram de 2,013 a 4,307  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , enquanto para as proteínas extraídas com TCA 10% e DTT 0,1% em PBS, os valores observados foram da ordem de 2,237 e 3,459  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Este segundo protocolo mostrou um melhor resultado dentre os demais protocolos utilizados e foi o método adotado como padrão para todos os procedimentos posteriores.

#### **5.5. Programação da Focalização Isoelétrica**

A comparação dos protocolos 1 (Figura 3), 2 (Figura 4) e 3 (Figuras 5, 6, 7 e 8) das programações para strip de 13 cm com pH 3-10 linear possibilitou a seguinte avaliação: o protocolo 3 de focalização isoeletrica (primeira dimensão) foi associado a uma melhor migração das proteínas sob ação do campo elétrico em gel de poliacrilamida, ou seja, uma maior eficiência na segunda etapa de separação (segunda dimensão). Desta forma, foi possível obter-se uma melhor resolução após a corrida dos géis na segunda dimensão.

#### **5.6. Concentração de proteínas e métodos de coloração**

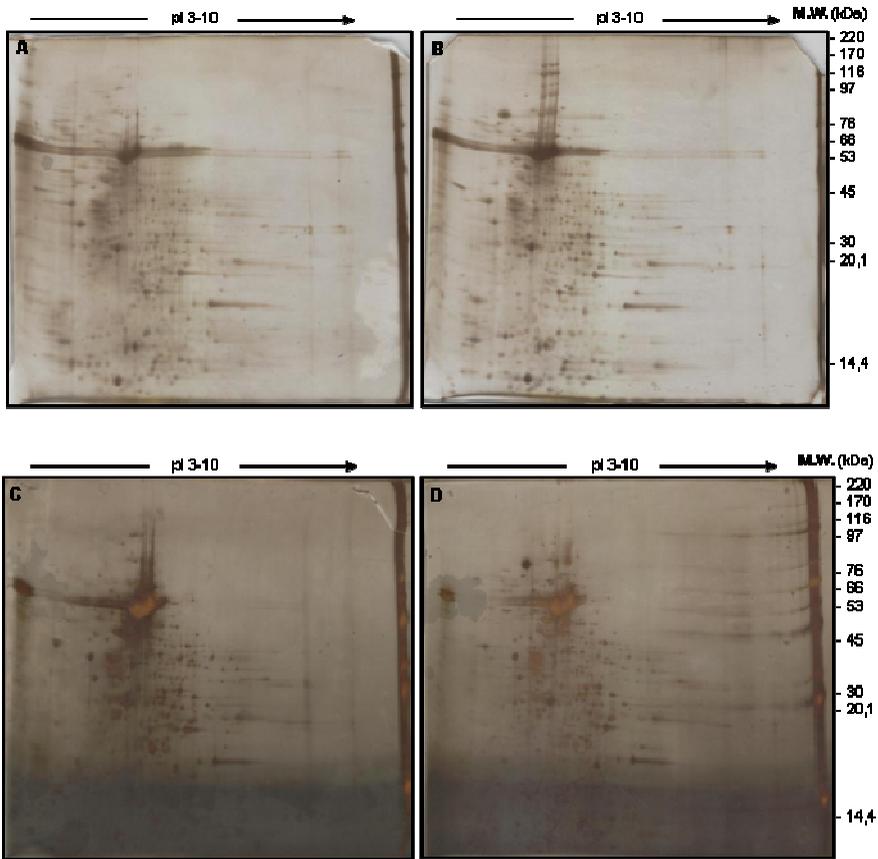
Foram avaliadas diferentes concentrações de proteínas aplicadas em géis, os quais foram corados com nitrato de prata, utilizando-se o *PlusOne Silver Staining Kit, Protein* e, sua replica, com *Coomassie Brilliant Blue (CBB)*. Como esperado, a coloração dos géis com nitrato de prata mostrou-se mais sensível quanto à detecção de *spots* protéicos quando comparado ao CBB. Os melhores resultados foram observados com 150  $\mu\text{g}$  de proteínas para géis corados com nitrato de prata e 250  $\mu\text{g}$  para géis corados com CBB (Figura 9).



**Fig. 9:** 2-DE de 150 ou 250 µg de proteínas coradas com nitrato de prata ou CBB. **(A)** 150 µg de proteínas coradas com nitrato de prata com PlusOne Silver Staining Kit, Protein. **(B)** 250 µg de proteínas coradas com CBB G-250. **M.W.**) Marcador de massa molecular.

### 5.7. Análise dos géis

As eletroforeses bidimensionais em SDS-PAGE com 150 µg de proteínas de brânquias de camarão, dos grupos com e sem WSSV, precipitadas com TCA 10% e DTT 0,1% em PBS e imobilizadas em strip de 13 cm com pH 3-10 linear, foram resultantes da focalização isoeétrica de acordo com o protocolo 3 e coloração em nitrato de prata com *PlusOne Silver Staining Kit, Protein*. Os perfis eletroforéticos obtidos mostraram que os extratos protéicos de brânquias apresentaram *spots* de proteínas com massa molecular inferior a 220 kDa, sendo mais abundantes os *spots* abaixo de 97 kDa e entre os valores de pIs de 3 a 8 (Figura 10).



**Fig. 10:** 2-DE de camarões com e sem WSSV. (A e C) Proteínas extraídas de animais negativos para WSSV e IHNV. (B e D) Proteínas extraídas de animais positivos para WSSV e negativos para IHNV. M.W.) Marcador de massa molecular.

## CONCLUSÕES

Para a análise das proteínas extraídas das brânquias de *L.vannamei*, as amostras homogeneizadas e precipitadas com TCA 10% e DTT 0,1% em PBS, clarificadas com *Clean-up Kit*, dessalicadas em colunas *PD MiniTrap* e, posteriormente, submetidas a focalização isoeletrica de acordo com o protocolo 3, foram aquelas que apresentaram os melhores

resultados na eletroforese bidimensional. Para os géis corados com nitrato de prata e CBB, a melhor concentração de proteínas totais foi igual a 150  $\mu\text{g}$  e 250  $\mu\text{g}$ , respectivamente.

Estas condições e protocolos foram adotados como padrão para todos os procedimentos posteriores a fim de estabelecer o perfil de proteínas expressas diferencialmente em brânquias de *L. vannamei*, infectados pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), comparando animais infectados e não infectados.

## CAPÍTULO 2

---

### **Perfil diferencial de proteínas em brânquias de *Litopenaeus vannamei* infectado naturalmente com o vírus da síndrome da mancha branca**

Pedro A. V. Neto <sup>a</sup>, Ana P. M. Fraga <sup>a</sup>, Gabrielle A. S. Müller <sup>b</sup>, Maria R. F. Marques <sup>a</sup>

<sup>a</sup> LABCAI, Dep. Bioquímica, CCB, NEPAq, Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis, SC. 88034-257.

<sup>b</sup> CEBIME, Dep. Bioquímica, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. 88040-970.

#### RESUMO

Para entender melhor a patogênese molecular do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) no camarão branco *Litopenaeus vannamei* foi comparado o perfil diferencial de proteínas expressas nas brânquias de camarões infectados e não infectados pelo vírus. A investigação da presença do WSSV nos camarões de cultivo foi realizada por PCR *nested*. A homogeneização das brânquias foi realizada em tampão PBS, contendo inibidor de protease, seguida de precipitação com TCA em acetona. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford modificado. A análise proteômica foi realizada utilizando eletroforese bidimensional (2-DE), com focalização isoeletrica em tiras de pH 3-10 linear, seguida pela separação por massa molecular através de eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% em condições desnaturantes (SDS-PAGE). A análise comparativa entre os dois grupos revelou um total de oito proteínas expressas diferencialmente: 07 proteínas com expressão apenas no grupo infectado pelo WSSV e 01 proteína com expressão apenas no grupo controle. Por outro lado, duas proteínas não foram associadas com nível de expressão distinto entre os dois grupos. A identificação das proteínas foi realizada com sucesso por análise em MALDI-TOF/PMF. As proteínas que apresentaram expressão apenas nos animais infectados foram as seguintes: peptidil-prolil isomerase, mortality factor 4-like, calreticulina, *recombination activating protein*, *failed axon connections* (FAX), 40S ribossomal S2 e N-deacetilase/N-sulfotransferase. A proteína que apresentou expressão apenas no grupo controle foi identificada como inibidora de apoptose. As enzimas arginina quinase (AK) e a anidrase

carbônica (AC) mostraram-se presentes nos dois grupos e não apresentaram diferença significativa nos seus respectivos níveis de expressão entre os dois grupos. As proteínas expressas diferencialmente nas brânquias dos camarões infectados naturalmente pelo WSSV podem ser agrupadas em termos de seu papel biológico, estando envolvidas em funções celulares importantes como, resposta de defesa do hospedeiro, metabolismo energético e apoptose. Essas informações podem ajudar na melhor compreensão das respostas moleculares do *L. vannamei* infectado com WSSV e na identificação de biomarcadores moleculares potenciais para a avaliação da susceptibilidade ao vírus e do estado sanitários dos camarões de cultivo.

Palavras-chave: 2-DE, *L. vannamei*, brânquias, WSSV, Análise proteômica

## 1. Introdução

A expansão global da indústria aquícola de crustáceos nas últimas duas décadas tem sido acompanhada pelo crescimento de problemas com doenças em animais confinados, culminando em grandes perdas financeiras experimentadas por muitos produtores, particularmente aqueles da Ásia e América do Sul. Fatores que contribuem para a dispersão de enfermidades pré-seleção de estoque de animais para crescimento ao invés de resistência a doenças, práticas de cultivo intensivas que favorecem a transmissão de patógenos e efeito imunossupressivo pelas altas densidades e estresse no transporte (Smith e Hauton, 2009).

Os crustáceos representam um grupo de relevância econômica por sua adaptação à aquicultura, entretanto, crustáceos são afetados por doenças causadas, principalmente, por patógenos oportunistas causando enfermidades severas. Efeitos adversos no sistema imune são comumente observados em algumas situações, por exemplo, práticas de manejo incorretas, cultivos com densidades de estoque acima da capacidade de suporte do sistema, nutrição pobre ou dieta desbalanceada, mudanças ambientais, como súbito aumento ou diminuição da temperatura da água, baixa qualidade, entre outros. A diminuição da resposta imune em crustáceos sob algumas condições está associada com fatores de estresse agudo e crônico. O estresse causa uma série de mudanças fisiológicas no corpo, além da, depressão do sistema imune (Figueiredo et al., 2008). Estudos da imunidade de invertebrados têm procurado identificar mecanismos de defesa, rotas bioquímicas ativadas durante a infecção, identificação de fatores celulares e livres na

hemolinfa envolvidos na destruição de patógenos, regulação e reparo de danos (Vazquez et al., 2009). Os camarões são uma das espécies mais importantes economicamente na aquicultura devido à sua grande demanda mundial. Com o aumento gradativo da experiência e esforço no desenvolvimento de tecnologias de produção, eles têm se tornado importante produto de exportação para muitos países. O consumo doméstico de camarões tem também aumentado proporcionalmente e resultado em um rápido crescimento na produção global pela aquicultura. Inevitavelmente, a produção na indústria aquícola em larga escala e em alta densidade tem desencadeado problemas severos no manejo das doenças de camarões incluindo patógenos (Somboonwivat et al., 2010). Desde 2002 a produção global de camarões *L. vannamei*, predominantemente reprodutores, tem aumentado rapidamente enquanto a produção de *Penaeus monodon*, predominantemente do ambiente, tem permanecido relativamente estável (Preston et al., 2009).

Um melhor entendimento dos mecanismos de defesa de camarões peneídeos poderá contribuir com o desenvolvimento de estratégias para o controle das doenças, bem como com a sustentabilidade dos cultivos de camarão (Pongsomboon et al., 2008). A necessidade de um melhor controle de doenças infecciosas na carcinicultura e a importância ecológica dos crustáceos nos ecossistemas marinhos têm despertado interesse no estudo do sistema imune de crustáceos, particularmente dos camarões. Como camarões e outros crustáceos são pouco entendidos do ponto de vista imunológico, pesquisas envolvendo a genômica funcional e a proteômica têm sido aplicadas como ferramentas rápidas na obtenção de informações moleculares consideráveis sobre o sistema imune desses organismos (Robalino et al., 2009). Como a indústria do camarão se desenvolveu de forma rápida e intensiva, doenças causadas por vírus, bactérias, protozoários e fungos foram encontradas e registradas nos cultivos em nível mundial, causando um impacto considerável na carcinicultura desde que o cultivo de camarão tornou-se uma entidade comercial significativa na década de 1970 (Lightner et al., 2009). Para minimizar o risco de doenças, biossegurança em todos os estágios de produção é muito importante, mas também as condições de produção devem ser otimizadas, vetores de doenças controlados, imunidade e resistência ao estresse do camarão devem ser mantidos em excelentes condições. Há uma indicação de efeito sinérgico do WSSV e espécies de Víbrios patogênicos (Moriarty e Decamp, 2009). Em anos recentes, a produção anual de camarão cultivado tem declinado devido às mortalidades massivas nos viveiros predominantemente causadas por viroses (Tan e Shi, 2008). A síndrome da mancha branca (WSS) é uma

doença letal que afeta as espécies de camarões cultivados e muitos outros crustáceos. Em camarões cultivados o vírus pode causar 100% de mortalidade cumulativa de 2–10 dias. O agente causador da síndrome da mancha branca (WSS) é considerado o vírus mais devastador no camarão cultivado, associado com grandes perdas econômicas registradas na carcinicultura mundial (Wang et al., 2007). Até agora, não se tem métodos efetivos para prevenir a infecção por WSSV em cultivo de crustáceos. O estudo da patogênese molecular do WSSV trará um grande benefício para o controle e prevenção da doença (Liu et al., 2011). Objetivando a identificação de biomarcadores moleculares associado com a susceptibilidade e/ou resposta de defesa ao WSSV, proteínas diferencialmente expressas em brânquias do camarão branco *L. vannamei* infectado com esse vírus foram determinadas.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Coleta de animais

Camarões *L. vannamei* sobreviventes com aproximadamente 10 g foram coletados durante os meses de maio a setembro de 2007, 2008 e 2009, que corresponde ao período de baixas temperaturas da água na região, época em que o WSSV se manifesta na região. Um total de 110 animais foi coletado dos viveiros nas regiões afetadas pelo vírus da mancha branca, localizadas no norte e sul do estado de Santa Catarina, de acordo com registros da Organização Internacional de Epizootias (OIE, 2005). Pleópodes e brânquias foram coletados utilizando material estéril, armazenados em nitrogênio líquido e transportados ao Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Universidade Federal de Santa Catarina para procedimentos posteriores. O grupo controle foi formado pelos animais coletados negativos para o vírus, como determinado pela análise de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

### 2.2. Detecção do WSSV

Pleópodes de camarão foram coletados para detecção do WSSV por PCR (Lo et al., 1996) de acordo com (OIE, 2003) usando WS146 F1(5'-ACT-ACT-AAC-TTC-AGC-CTA-TCT-AG-3') e WS146 R1(5'-TAA-TGC-GGG-TGT-AAT-GTT-CTT-ACG-3') os pares de primer internos: WS146 F2 (5'-GTA-ACT-GCC-CCT-TCC-ATCTCC-A-3') e WS146 R2 (5'-TAC-GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG-T-3'), gerando um produto de 941 bp. O DNA genômico total, extraído dos pleópodes

seguindo protocolo (Moser, 2005), foi utilizado para amplificação da PCR. Os resultados da amplificação foram visualizados em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio.

### 2.3. *Quantificação da carga viral do WSSV*

A quantificação da carga viral foi realizada por PCR real time (*qPCR*). Para a curva padrão na *qPCR* foram utilizadas concentrações de  $1,0 \times 10^{10}$  até  $1,0 \times 10^0$  cópias virais/ $\mu\text{L}$  para quantificar a carga viral das amostras. O número de cópias virais foi calculada pela interpolação do Cycle threshold (CT) através da curva padrão experimentalmente determinada. A partir deste número de cópias, o resultado final foi expresso como número médio de cópias WSSV por microlitro de amostra. A especificidade do produto amplificado foi verificada pela análise da curva melting da temperatura de dissociação de cada produto da *qPCR*, e as faixas de temperaturas utilizadas para construção do gráfico foram de 72 até 95 °C. A carga viral nas amostras foi de  $2,43 \times 10^7$  até  $4,89 \times 10^9/\mu\text{L}$ .

### 2.4. *Extração de proteínas das brânquias*

A amostra foi homogeneizada com pistilo e mantida resfriada em nitrogênio líquido para evitar degradação, logo após acrescida de tampão PBS com PMSF e centrifugada a  $15.000 \times g$  por 1 hora a 4 °C, o sobrenadante transferido para novo microtubo. Após a obtenção das proteínas, foram adicionados quatro volumes de Acetona contendo TCA 12,5% e DTT 0,125% (concentração final 10% e 0,1% respectivamente). A mistura foi colocada por 1 hora no gelo para precipitação. Após este período uma nova centrifugação  $20.000 \times g$  por 20 minutos a 4 °C com subsequente descarte do sobrenadante. O precipitado contendo as proteínas totais foi lavado com 1 mL de metanol gelado. Em seguida, o precipitado foi ressuspensionado em metanol gelado e agitado até adquirir um aspecto de suspensão, sendo novamente centrifugado a  $20.000 \times g$  por 5 minutos e o sobrenadante descartado. A lavagem foi realizada no mínimo mais duas vezes. Após lavagem com metanol, o precipitado foi lavado da mesma forma com acetona gelada por duas vezes para livrar as amostras de qualquer traço de TCA e metanol. O precipitado contendo as proteínas totais foi ressuspensionado em acetona contendo 0,1% de DTT e novamente centrifugado a  $10.000 \times g$  por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. O precipitado final foi seco e solubilizado em 1 mL de solução de reidratação (uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 2%) com a

adição de 20  $\mu\text{L}$  de PMSF (4mg/mL). Uma centrifugação final de 10.000 x g por 30 min. a 4 °C o sobrenadante com a fração de proteínas solúveis foi coletado. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  foi retirada para dosagem de proteínas de acordo com Bradford (1976) e o restante da amostra armazenada a -80 °C para os procedimentos de limpeza posteriores.

## 2.5. 2-DE

2-DE foi realizado com Ettan IPGphor 3 e SE 600 Ruby system (GE healthcare<sup>®</sup>) usando o protocolo de acordo com fabricante. Brevemente, as proteínas totais (250  $\mu\text{g}$ ) foram misturadas em 250  $\mu\text{L}$  de tampão de reidratação (7 M uréia, 2 M tiouréia, 2% w/v CHAPS, 0,28% w/v DTT, 1% v/v tampão IPG e 0,002% de azul de bromofenol) e focalização isoeletrica (IEF) usando tiras IPG 13 cm imobilizadas com pH 3–10 gradiente linear (GE healthcare<sup>®</sup>). IEF foi realizada utilizando os seguintes passos: 50 V por 30 min., 500 V por 1 h, 1000 V por 1 h, 4000 V por 1 h, 8000 V por 2:30 e 8000 V por 30 min. até que um total de 20 kVh tenha sido acumulado. As proteínas foram posteriormente reduzidas com DTT e alquiladas com iodoacetamida antes da segunda dimensão (SDS-PAGE). Depois do equilíbrio com a solução contendo 6 M uréia, 30% glicerol, 2% SDS, 75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,002% de azul de bromofenol e 1% w/v DTT por 15 min., em seguida os strips foram tratados com a mesma solução contendo 2,5% w/v iodoacetamida no lugar do DTT por mais 15 min. a tira de gel equilibrada foi então colocada no topo do gel SDS-PAGE 12,5% e selada com agarose 0,5% contendo azul de bromofenol. A corrida em gel SDS-PAGE foi realizada com 15 mA por gel durante 25 min. depois 25 mA por gel até a linha de frente da corrida chegar ao final do gel. Logo após, os géis foram fixados em solução contendo metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e corado com CBB contendo sulfato de amônio 10% (v/v), ácido fosfórico 10% (v/v), metanol 20% (v/v) e CBB-G250 0,12% (v/v) (Merck, Germany). Os géis foram produzidos em quadruplicatas para os grupos controle e infectado, cada gel da amostra era composto por proteínas do tecido branquial de três animais.

## 2.6. Análise das imagens

As imagens dos géis foram adquiridas no Image Scanner III (GE healthcare<sup>®</sup>) e analisadas usando programa Image Master 2D Platinum 7.0 (GE healthcare<sup>®</sup>). Os spots individuais de cada gel foram detectados pelo seu limite e o volume (abundância) do *spot* foi calculado

automaticamente. A porcentagem do volume (% vol), bem como, o valor normalizado da intensidade do volume de cada *spot* e a intensidade do volume de todos os *spots* detectados no gel foram estatisticamente analisados por ANOVA usando um nível de 0,05 de significância estatística. Para identificar *spots* diferencialmente expressos, a intensidade dos *spots* do grupo infectado foi comparado àquela do grupo controle e dividido em três grupos, de acordo com seu nível de expressão relativa; expressos (presentes apenas no grupo infectado), suprimidos (presentes apenas no grupo controle) e fracamente mas não significativamente diferentes “constantes” (presentes nos dois grupos). Os *spots* expressos diferencialmente foram selecionados com nível de significância estatística ( $p < 0,05$ ).

### 2.7. Digestão da proteína em gel

Os *spots* expressos diferencialmente foram excisados do gel e transferidos individualmente para tubos estéreis. Todos os fragmentos de gel foram lavados três vezes com água destilada, depois cobertos com 200  $\mu$ L de acetonitrila 40% (ACN) em 200 mM bicarbonato de amônio (pH 8,5) e mantidos a 37 °C por 30 min. Cada fragmento de gel desidratado com 100  $\mu$ L de ACN por 5 min. à temperatura ambiente, seco por 15 min. e reidratado com 5  $\mu$ L de solução de tripsina contendo 20  $\mu$ g/mL Tripsina (Proteomics Grade, Sigma, United States), 40 mM de bicarbonato de amônio e 9% de ACN no gelo por 45 min. O excesso da solução de tripsina foi removido, depois 5  $\mu$ L de bicarbonato de amônio 40 mM em ACN 9% foi adicionado a cada tubo a 37 °C e deixado overnight. Depois da incubação o líquido proveniente do fragmento de gel foi transferido para um tubo identificado. Um total de 5  $\mu$ L de ácido trifluoroacético 0,1% (TFA) em solução de ACN 50% foi adicionado a cada tubo, o qual ficou incubando por 30 min. a 37 °C. Finalmente, a solução foi combinada com bicarbonato de amônio 40 mM em ACN 9%. O sobrenadante foi coletado, seco a vácuo e dissolvido em TFA 0,1% depois submetido ao MALDI-TOF/PMF.

### 2.8. MALDI-TOF/PMF

Os peptídeos digeridos foram misturados 1:1 com matriz de MALDI digeridos com um  $\mu$ L de solução da matriz ácida saturada (5  $\mu$ g/mL  $\alpha$ -ciano-4-ácido hidroxicinâmico, ACN 50% e TFA 0,1%), colocados na placa e deixados cristalizar a temperatura ambiente. Os dados de MS foram adquiridos com laser 2000-3000 disparos foram

acumulados para cada espectro obtido do Autoflex III MALDI-TOF (Bruker Daltonics). O espectrômetro de massa foi ajustado no modo refletor para MALDI-TOF impressão digital do peptídeo (PMF) com modo automatico total usando o programa FlexControl™. Foi utilizada uma aceleração de 20 kV e frequência de laser com 50 Hz. A calibração externa foi realizada usando uma mistura de peptídeos com [M + H]<sup>+</sup> íons de angiotensina I, angiotensina II, substância P, bombesina e hormônios adrenocorticotropico. O espectro gerado foi analisado pelo programa FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). As proteínas foram identificadas por PMF e a lista de massa derivada dos peptídeos foram pesquisados no NCBIInr usando o programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com/cgi/protein-view>). As pesquisas no banco de dados foram realizadas utilizando os seguintes parâmetros: Base de dados, NCBIInr; taxonomia, Metazoa; enzima, tripsina. O limite de erro de massa do peptídeo foi fixado em  $\pm 100$  ppm; MS tolerância da massa do íon foi fixado em 0,6 Da. Carbamidometilação da Cisteína e oxidação da metionina foram selecionadas como modificações fixa e variável respectivamente. A identificação positiva da proteína ocorreu quando o escore foi significativo (>40), bem como os valores estimados de pI e MW. Só proteínas com escore (>40) foram reportadas.

### 3. Resultados

#### 3.1. Comparação do perfil de proteínas expressas entre camarões WSSV positivos e controle

Todas as brânquias WSSV positivas e controles de *L. vannamei* foram coletadas e identificadas por *nested* PCR. Um total de 38 animais WSSV positivo foi detectado com carga viral entre  $2,43 \times 10^7$  até  $4,89 \times 10^9/\mu\text{L}$ . Essa carga viral é considerada alta/severa de acordo com a classificação (Shekhar et al., 2006; Souza, 2008). Logo após, todo o conteúdo protéico foi extraído e submetido ao sistema 2-DE objetivando encontrar proteínas diferenciais entre animais infectados e não infectados. A seleção da faixa de pH foi feita de acordo com pIs mais abundantes de proteínas de camarão de acordo com a literatura e observou-se uma predominância na faixa de 3-10 (Bourchookarn et al., 2008; Robalino et al., 2009; Jiang et al., 2009; Chai et al., 2010; Zhang et al., 2010; Somboonwivat et al., 2010). Após a primeira e a segunda dimensões os géis foram corados com CBB G-250 e posteriormente foram detectados aproximadamente 1500 *spots* por gel nos dois grupos: brânquias WSSV positivas e controle. O mapa protéico é mostrado na

Fig. 11. Comparando a abundância dos *spots* entre os grupos foram encontradas oito proteínas com expressão diferencial  $p < 0,05$  e duas constantes escolhidas aleatoriamente e não alteradas.

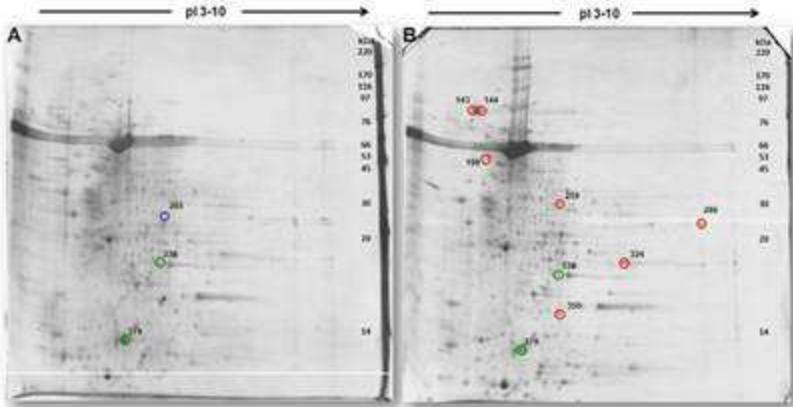


Fig.11. 2-DE perfil de proteínas das brânquias de *L. vannamei* controle (A) e WSSV infectadas (B). *Spots* numerados indicando oito proteínas expressas diferencialmente e duas controle entre os grupos.

- *Spots* expressos apenas no WSSV infectado
- *Spot* expresso apenas no controle
- *Spots* constantes nos dois grupos

### 3.2. Identificação das proteínas

Um total de 20 *spots* foi submetido ao PMF (figura 12) e as buscas no banco de dados para identificação dos peptídeos por combinação para identificação das proteínas. Finalmente, 10 proteínas (07 com nível de expressão aumentada, 01 com nível de expressão suprimida e 02 com nível de expressão constante entre os grupos) foram identificadas com sucesso e as informações relacionadas dessas proteínas mostradas na tabela 4. Proteínas com expressão apenas nos animais infectados incluem: peptidil-prolilisomerase (cyclophilin H) [*spot* 143], fator de mortalidade 4-like [*spot* 144], calreticulina [*spot* 198], recombination activating protein [*spot* 259], failed axon connections [*spot* 286], 40S ribossomal [*spot* 324], N-deactilase/N-sulfotransferase [*spot* 350]. Proteína com expressão suprimida: inibidora de apoptose [*spot* 265]. Arginina quinase [*spot* 336] e Anidrase carbônica [*spot* 379] são comuns nos dois grupos.

**Tabela 4.** Proteínas diferencialmente expressas em brânquias do camarão branco WSSV infectadas, identificadas por PMF. Continua

<i>Spot</i> no.	Proteína	Espécie	Acesso no.	Mascot escore/ SC (%)	pI/MW (kDa) observado
<b><i>Proteínas expressas</i></b>					
143	Peptidil-profil isomerase	[Clonorchis sinensis]	gi 349961375	78/39	6,29/20
144	Fator de mortalidade 4-like	[Danio rerio]	gi 300863130	72/42	9,28/37
198	Calreticulina	[Penaeus monodon]	gi 308052941	222/51	4,29/47
259	Recombination activating protein 1	[Dicamptodon tenebrosus]	gi 161704911	64/18	5,74/52
286	Failed axon connections protein	[Drosophila virilis]	gi 4128223	60/9	5,26/47
324	40S ribosomal protein S2, putative	[Ixodes scapularis]	gi 241624257	45/17	9,69/6,7
350	N-deacetylase/N-sulfotransferase	[Caenorhabditis elegans]	gi 14587788	72/13	9,28/96

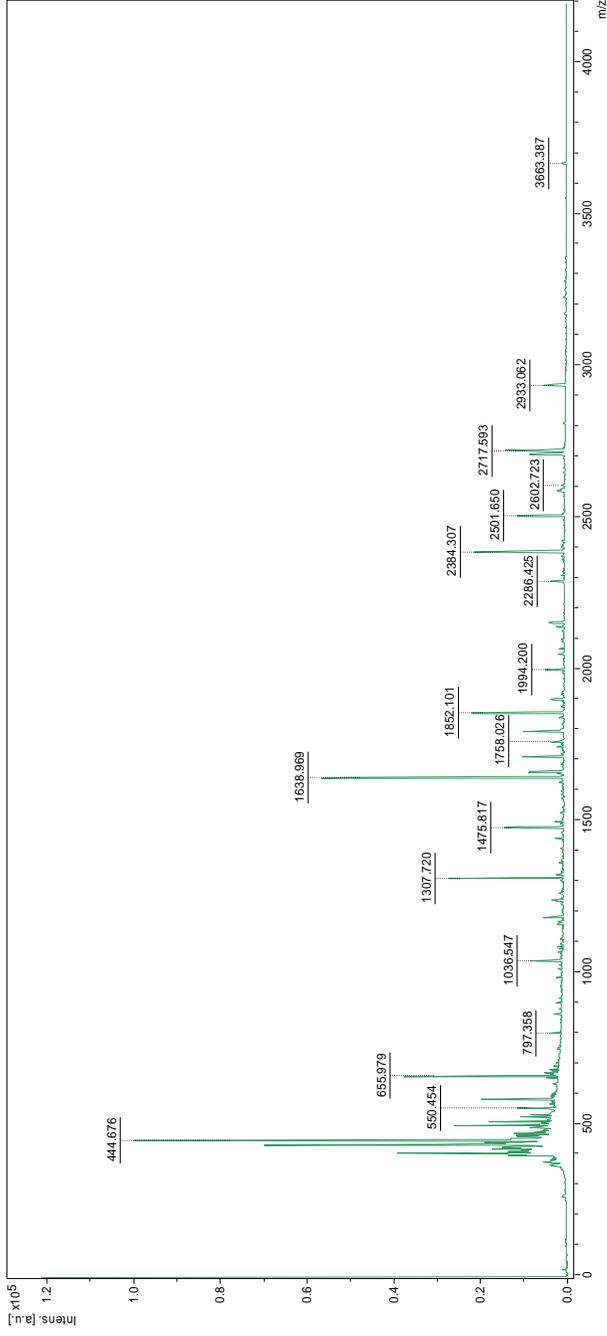
Mascot escores maiores que 40 são estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ).  
SC: cobertura da sequência de aminoácidos para proteínas identificadas.

**Tabela 4.** Proteínas diferencialmente expressas em brânquias do camarão branco WSSV infectadas, identificadas por PMF. Conclusão

<i>Spot no.</i>	Proteína	Espécie	Acesso no.	Mascot score/ SC (%)	pI/MW (kDa) observado
<b><i>Proteína suprimida</i></b>					
265	Inibidora de apoptose	[ <i>Aplysia californica</i> ]	gi 297186114	44/6	6,43/36
<b><i>Proteínas constantes</i></b>					
336	Arginina quinase	[ <i>Litopenaeus vannamei</i> ]	gi 307334072	135/42	6,84/36
379	Anidrase carbônica	[ <i>Litopenaeus vannamei</i> ]	gi 306441396	43/34	5,52/30

Mascot scores maiores que 40 são estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ).

SC: cobertura da sequência de aminoácidos para proteínas identificadas.



**Fig. 12.** Espectrograma representativo obtido a partir da digestão triptica do spot/proteína (198) da amostra de brânquias de *Litopenaeus vannamei* coletados no campo e infectados naturalmente pelo WSSV.

#### 4. Discussão

O WSSV pode infectar uma variedade de crustáceos aquáticos incluindo peneídeos marinhos, de água salobra e doce, caranguejos e lagostins (Maeda et al., 2000; Escobedo-Bonilla et al., 2008; Marques et al., 2011). A grande maioria de trabalhos publicados faz uso de animais infectados experimentalmente (Xie et al., 2006; Chongsatja et al., 2007; Wang et al., 2007; Wu et al., 2007; Rattanarojpong et al., 2007; Tan e Shi, 2008; Bourchookarn et al., 2008; Chai et al., 2010; Zhang et al., 2010; Somboonwiwat et al., 2010; Liu et al., 2011; Zhu e Zhang, 2011), o qual permite um bom controle do experimento e os dados gerados na pesquisa, mas não levam em conta a interação entre o animal e os vários fatores abióticos, os quais podem gerar resultados que não refletem a realidade dentro dos cultivos (Souza, 2008). Ainda não existem estudos com animais cultivados, infectados naturalmente pelo vírus. Sob condições naturais, a resposta ao vírus pode ser diferente daquela encontrada em camarões infectados experimentalmente, desde que as condições ambientais influenciem a resposta imune dos animais (Müller, 2009). No presente estudo, apresentamos o primeiro trabalho com brânquias de camarão *L. vannamei* em condições de cultivo infectado com WSSV analisado por proteômica. O mapa de referência da eletroforese bidimensional de brânquias WSSV positivas de *L. vannamei* foi estabelecido e oito proteínas diferencialmente expressas foram identificadas usando MALDI-TOF/PMF. As proteínas imunológicas com expressão maior em *L. vannamei* com WSSV em comparação com não infectados possivelmente estão envolvidas nas respostas de defesa contra a infecção viral e proteínas do sistema imune em animais negativos para o WSSV podem ser reponsáveis pela resistência contra a infecção viral. A caracterização dessas proteínas pela espectrometria de massa permite a identificação das mesmas e contribui na formulação de estratégias para o combate e controle da doença. Proteínas diferencialmente expressas identificadas por 2-DE participam de uma variedade de funções importantes como respostas de defesa e metabolismo energético do hospedeiro. Os dados fornecem uma fonte de informação rica sobre os mecanismos de resposta molecular do *L. vannamei* contra a infecção por WSSV (Liu et al., 2011). Invertebrados, os quais não possuem um sistema imune adaptativo, têm desenvolvido sistemas de defesa que respondem contra os antígenos na superfície de patógenos potenciais. Os mecanismos de defesa em crustáceos dependem completamente do sistema imune inato o qual é ativado quando padrões moleculares patógeno-associados são

reconhecidos por proteínas solúveis ou proteínas da superfície celular do hospedeiro, como as lectinas, peptídeos antimicrobianos, coagulação e proteínas de reconhecimento de padrões, as quais, por sua vez, ativam mecanismos efetores celulares ou humorais para destruir patógenos invasores (Marques e Barracco, 2000; Vazquez et al., 2009). Os mecanismos efetores para resposta imune em invertebrados inclui cascata de coagulação a qual evita perda de hemolinfa e produção de melanina pela ativação do sistema proPO (Kawabata et al., 1996; Sritunyalucksana e Soderhall, 2000; Vargas-Albores e Yepiz-Plascencia, 2000; Barracco et al., 2007). A melanina é um pigmento marrom escuro com propriedades biológicas diversas, por exemplo, inibição da atividade enzimática de fungos e bactérias (Smith e Soderhall, 1983). A melanização é uma resposta comum para parasitas que entram em animais invertebrados, especialmente artrópodes, é devido à atividade de uma oxidoreductase, fenoxidase. A melanina desempenha um papel importante na cicatrização de ferimentos e contra infecção por patógenos no sistema de defesa em invertebrados e isso é um mecanismo de defesa importante atualmente reconhecido em crustáceos, esse mecanismo é mediado pela tirosinase e representa especificamente um processo potente contra infecção (Soderhall e Cerenius, 1998; Iwanaga e Lee, 2005; Barracco et al., 2007). (*Spot* 143) Peptidil-prolil isomerase, essa proteína tem uma função importante como as chaperonas, proteínas de choque térmico HSP 70 (Chen et al., 2011) e está envolvida na atividade catalítica de inibição da tirosina quinase (Brazin et al., 2002). Tirosina quinase é uma enzima que pode transferir um grupo fosfato do ATP para uma proteína na célula. Quinase de adesão focal (FAK) é uma proteína-tirosina quinase citoplasmática envolvida na transdução do sinal integrina-mediada o qual regula múltiplas funções celulares nos mamíferos. Em contraste, apesar das propriedades bem definidas da FAK em células de mamíferos, em crustáceos ainda não estão reconhecidas e mesmo nenhuma sequência de gene ou proteína é conhecido. Os autores registraram pela primeira vez o clone da FAK de *Marsupenaeus japonicus* (designada como MjFAK) e a identificação do seu envolvimento na infecção viral e defesa do hospedeiro (Zhang et al., 2009). FAK é amplamente abordada com papel fundamental na adesão celular, antiapoptose e montagem da actina (Schlaepfer et al., 1999; Sonoda et al., 2000; McLean et al., 2005; Serrels et al., 2007). Entre os mecanismos de evasão viral em camarões atualmente o mais proeminente é o atraso/supressão do processo apoptótico em células infectadas (Barracco et al., 2007). (*Spot* 286) A “failed axon

connection” (FAX) é um gene que codifica uma nova proteína 47 kDa expressa em um padrão de desenvolvimento semelhante ao da tirosina quinase (Hill et al., 1995). (*Spot 144*) Fator de mortalidade 4-like é uma proteína nuclear ligante envolvida na indução de apoptose celular e reparo do DNA (Liang et al., 2010). Essa família compreende as MORF no cromossomo 4 (MORF4) e acredita-se que a mesma contribui com a senescência celular. MORF4 é uma proteína altamente instável e rapidamente degradada pela ubiquitina (Tominaga et al., 2010). Membros da família das MORF estão envolvidos na regulação da senescência celular e possuem motivos comuns para fatores de transcrição e localização no núcleo, o que sugere que eles provavelmente têm função na regulação da transcrição (Bertram et al., 1999). Provavelmente, mecanismos utilizados pelo vírus durante a infecção retardando o processo de divisão celular. (*Spot 198*) A calreticulina, é outra proteína importante relacionada com a homeostase do cálcio e teve sua expressão aumentada induzida pela infecção pelo vírus da necrose aguda em *Chlamys farreri* (AVNV) (Chen et al., 2011). A calreticulina foi alterada na resposta do camarão ao WSSV (Wang et al., 2007). É uma importante chaperona molecular envolvida no “controle de qualidade” dentro das vias secretoras. Essa proteína está envolvida na regulação intracelular da homeostase do  $Ca^{2+}$  e aumento da sua capacidade de armazenamento no retículo endoplasmático (RE) (Gelebart et al., 2005). Essa proteína reside no lúmen do RE e desempenha papel importante como chaperona molecular. A calreticulina na superfície celular pode modular a adesão, fagocitose e sinalização integrina-dependente do  $Ca^{+2}$  (Luana et al., 2007). Foi descrito que a calreticulina presente na superfície celular dos hemócitos de insetos está envolvida na sinalização para fagocitose de células apoptóticas (Asgari e Schmidt, 2003; Kuraishi et al., 2007). Isso possivelmente explicaria o aumento da calreticulina nos animais infectados, talvez uma forma de limpeza do organismo contra o vírus, como um meio para barrar a infecção. Camarões com infecção aguda por WSSV frequentemente mostram depósitos anormais de cálcio na cutícula e isso pode ser relacionado ao aumento da expressão na homeostase do  $Ca^{2+}$  pela proteína calreticulina nos estágios finais da doença em camarões desafiados (Wang et al. 2006; Luana et al. 2007; Flegel e Sritunyalucksana 2011). Os resultados mostram que as proteínas chaperonas são ativas na defesa contra a infecção por WSSV (Zhang et al., 2010). Recentes avanços na imunologia de invertebrados levaram a uma mudança de paradigma no nosso entendimento sobre os caminhos pelos quais os animais respondem aos desafios imunológicos.

Previamente, foi assumido que proteínas de resposta imune em invertebrados foram codificadas pela linhagem germinativa e selecionadas na escala do processo evolutivo para amplo reconhecimento de padrões moleculares patógeno-associado conservados (PAMPs) (Terwilliger et al., 2007). Em camarões, três classes de peneidinas mostram significativa diversidade populacional e possuem atividade antimicrobiana variada contra fungos e bactérias Gram-positiva baseadas na substituição e deleção dentro de regiões ricas em prolina e cisteína (Cuthbertson et al., 2002; Cuthbertson et al., 2004; Cuthbertson et al., 2005). (*Spot 259*) A proteína ativadora de recombinação é expressa pelo complexo RAG1 responsável pela recombinação genética no sistema imune, desenvolvimento do órgão linfóide em alguns organismos e produção de imunoglobulinas (Schatz et al., 1989; Corripio-Miyar et al., 2007). O órgão linfóide em camarões é responsável pela defesa, atuando no sistema imune, desempenhando papel na eliminação de partículas virais e outros agentes infecciosos (Hasson et al. 1999; Duangsuwan et al. 2008; Pongsomboon et al., 2008; Danwattananusorn et al., 2011). (*Spot 336*) Arginina quinase (AK) está envolvida no metabolismo relacionado à produção de ATP em organismos no sistema tampão/resistência ao estresse ambiental. O aumento no consumo de oxigênio pode ser essencial na produção de ATP, bem como na respiração oxidativa (Wang et al., 2007). Os mesmos resultados foram encontrados por Somboonwiwat et al. (2010), eles observaram que AK é uma enzima importante relacionada à produção de energia no metabolismo celular de invertebrados e teve sua expressão aumentada na resposta de camarões ao vírus da mancha branca (Wang et al., 2007). Todos esses resultados estão em conformidade com as reações imunológicas e as respostas celulares via fagocitose ou resposta humoral através da produção de componentes antimicrobianos, o que implica crescente demanda de energia (Adema et al., 1991; Roch, 1999). De acordo com Robalino et al. (2009) algumas dessas proteínas estão implicadas na resposta imune inata e em alguns casos, como a AK que é vírus-regulada, foi observada em estudos semelhantes já realizados (Rattanarojpong et al., 2007; Wu et al., 2007). No caso da AK é importante salientar que seu mRNA teve indução aumentada por expressão diferencial com WSSV em *P. stylirostris* (Astrofsky et al., 2002), mas também teve sua expressão suprimida em resposta à infecção pelo mesmo vírus em *Feneropenaeus chinensis* usando análise de microarray (Wang et al., 2006). Jiang et al., 2009 mostraram que AK foi suprimida em condições de estresse por hipoxia no hepatopâncreas da mesma espécie de camarão. Por outro lado, o

presente trabalho mostrou que AK é constante nos dois grupos infectado e controle, talvez devido ao fato da infecção viral persistente nos viveiros analisados, de acordo com teorias propostas por Flegel (2007); Flegel e Sritunyalucksana (2011) onde em animais cultivados não se tem idéia do tempo de infecção ao qual os mesmos estão expostos e ainda porque existem isoformas desta proteína com funções diferentes (Wang et al., 2007; Robalino et al., 2009). (*Spot 324*) Proteína 40S ribossomal S2 está relacionada com a síntese protéica (Zhang et al., 2010) e teve sua expressão aumentada no grupo infectado talvez por responder à infecção viral com maior produção de proteínas. (*Spot 350*) N-deacetilase/N-sulfotransferase está envolvida na biosíntese de quitina e controle de uma grande variedade de processos biológicos, incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose (Berninsone e Hirschberg, 1998; Shi et al., 2011), isso explicaria sua expressão maior no grupo infectado com o vírus da mancha branca. (*Spot 265*) A proteína inibidora de apoptose (IAP) desempenha papel importante no sistema imune inato e apoptose. Ela faz parte de um grupo conservado de proteínas que regulam o processo de apoptose tanto em vertebrados quanto invertebrados (Crook et al., 1993; Leu et al., 2008). Viroses têm desenvolvido estratégias distintas para escapar ou retardar a apoptose desencadeada por diversas vias apoptóticas. Interferência na apoptose com inibição da atividade proteolítica das caspases (cisteína aspártico ácido proteases) prolongam a vida de células vírus-infectadas, resultando em aumento da replicação viral e contribuição para persistência do vírus (Tschopp et al., 1998; Barracco et al., 2007). Apoptose é um processo de suicídio celular programado geneticamente que elimina células indesejadas ou doentes e isso desempenha papel fundamental na embriogênese, homeostase, metamorfose de insetos e imunidade (Leu et al., 2008). Apoptose ou morte celular programada é um processo evolutivamente conservado em uma grande variedade de diferentes sistemas biológicos, desempenhando papel vital na manutenção das funções normais de vários tecidos e órgãos em organismos multicelulares pela remoção de células danificadas, mal posicionadas ou que se tornaram ineficientes (Zhang et al., 2004). O mecanismo de apoptose desempenha papel importante no processo antiviral de muitos organismos incluindo camarões pela eliminação de células infectadas por viroses como WSSV e YHV (Kanobdee et al., 2002; Barracco et al., 2007; Molthathong et al., 2008). Como o camarão necessita de uma resposta imune humoral, a apoptose pode ser uma resposta primitiva de defesa antiviral e propicia um mecanismo para prevenir a replicação do vírus nas células do hospedeiro quando ocorre

precocemente (Wongprasert et al., 2003). Baixa salinidade e temperatura no ambiente com altos níveis de chuvas são típicos no sul do Brasil durante o inverno e isso ocasiona modificações na osmorregulação do camarão. Mudanças na osmolaridade da hemolinfa, concentração de íons e atividade enzimática da (*Spot 379*) anidrase carbônica (AC) nas brânquias, tecido epidermal e Na/K-ATPase em brânquias durante o ciclo de muda foram estudados no camarão branco *L. vannamei*, bem como mudanças na concentração de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  e osmolaridade na hemolinfa (Morris, 2001; Khodabandeh et al., 2006; Roy et al., 2007; Santos et al., 2007; Tsai e Lin, 2007; Jasmani et al., 2010). AC são metaloenzimas generalizadas por toda a árvore filogenética, com quatro famílias de genes distintos que as codificam, e estas desempenham papel fisiológico crucial (Supuran, 2008). Elas são enzimas ubíquas envolvidas em processos importantes como fotossíntese, respiração, homeostase em relação ao pH e transporte de íons. O mecanismo de captação de íons tem sido amplamente estudado em caranguejos, lagostas, lagostins e camarões, mas o grau de conservação ao nível do mecanismo molecular envolvido ainda não é claro, porém em camarões acredita-se que a AC é uma das proteínas centrais neste processo. Em *L. vannamei*, o nível de atividade enzimática da AC nas brânquias parece ser sensível à salinidade, sendo aumentada depois da exposição a altas ou baixas salinidades (Roy et al., 2007). Em conclusão, infecção por WSSV em brânquias de *L. vannamei* foi associada com a replicação viral de partículas. As proteínas virais que surgem podem exigir proteínas do hospedeiro para sua conformação e modificação. De outra forma, mecanismos de defesa e balanço fisiológico das células do hospedeiro foram desenvolvidos para erradicação viral. Neste trabalho, foram identificadas com sucesso mudanças proteômicas nas brânquias infectadas com WSSV. As proteínas com aumento no nível de expressão durante a infecção com este vírus foram relacionadas a importantes papéis nos mecanismos de defesa, enquanto as proteínas com declínio na expressão devem estar envolvidas no arranjo e montagem do citoesqueleto, metabolismo e vias de tráfego. Esses achados fornecem inúmeras hipóteses possíveis, as quais merecem novas investigações e podem levar a novas idéias na interação vírus-hospedeiro, particularmente os mecanismos de defesa nas brânquias do *L. vannamei* durante a infecção por WSSV. Esta infecção induz diferentes respostas na expressão de várias proteínas. Mudanças na expressão padrão de proteínas refletem não só respostas do camarão em relação ao vírus, mas também sugere como o WSSV subverte funções celulares para a sua multiplicação. Além disso, as

proteínas alteradas reportadas neste estudo fornecem uma rica fonte de informação para a identificação de novas proteínas na resposta antiviral do camarão.

## Agradecimentos

À FINEP pelo apoio financeiro e fomento à linha de pesquisa, vinculadas ao projeto (no. 01070625-00), à CAPES Amazônia Azul (04/2006) pela bolsa de doutorado a P.A.V.N., ao CNPq pela bolsa DTI para A.P.M.F. e bolsa de pesquisador a M.R.F.M. Agradecemos ainda ao CEBIME, sob a coordenação do Professor Dr. Hernán Terenzi, pela assistência e apoio técnico na espectrometria de massa.

## Referências

- Adema, C.M., Van der Knaap, W.P.W., Sminia, T., 1991. Molluscan hemocytemediated cytotoxicity: the role of reactive oxygen intermediates. *Rev. Aquat.Sci.* 4, 201–223.
- Astrofsky, K.M., Roux, M.M., Klimpel, K.R., Fox, G.J., Dhar, A.K., 2002. Isolation of differentially expressed genes from white spot virus (WSV) infected Pacific blue shrimp (*Penaeus stylirostris*). *Arch. Virol.*, 147: 1799–1812.
- Barracco, M.A., Perazzolo, L.M., Rosa, R.D., 2007. Imunologia de crustáceos: com ênfase em camarões. Florianópolis, SC, 80 p.
- Berninsone, P., Hirschberg, C. B., 1998. The *n*-sulfotransferase activity domain is at the carboxyl half of the holoenzyme the journal of biological chemistry. 273, 40: 25556–25559.
- Bertram, M.J., Bérubé, N.G., Hang-Swanson, X., Ran, Q., Leung, J.K., Bryce, S., Spurgers, K., Bick, R.J., Baldini, A., Ning, Y., Clark, L.J., Parkinson, E.K., Barrett, J.C., Smith, J.R., Pereira-Smith, O.M., 1999. Identification of a gene that reverses the immortal phenotype of a subset of cells and is a member of a novel family of transcription factor-like genes. *Mol. Cell. Biol.* 19: 1479–1485.
- Bourchookarn, A., Havanapan, P., Thongboonkerd, V., Krittanai, C., 2008. Proteomic analysis of altered proteins in lymphoid organ of yellow head virus infected *Penaeus monodon*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1784, 504-511.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Chem.* 72, 248–254.
- Brazin, K.N., Mallis, R.J., Fulton, D.B., Andreotti, A.H., 2002. Regulation of the kinase by the peptidyl-prolyl isomerase cyclophilin A. *PNAS* 99, 4, 1899-1904.
- Chai, Y., Yu, S., Zhao, X., Zhu, Q., Wang, J., 2010. Comparative proteomic profiles of the hepatopancreas in *Fenneropenaeus chinensis* to white spot syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology* 29, 480-486.
- Chen, G., Zhang, C., Li, C., Wang, C., Xu, Z., Yan, P., 2011. Haemocyte protein expression profiling of scallop *Chlamys farreri* response to acute viral necrosis virus (AVNV) infection. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 11, 1135-45.
- Chongsatja, P., Bouchookarn, A., Lo, C.F., Thongboonkerd, V., Krittanai, C., 2007. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus vannamei* hemocytes upon taura syndrome virus infection. *Proteomics* 7, 3592-3601.
- Corripio-Miyar, Y., Bird, S., Trasurer, J.W., Secombres, C.J., 2007. RAG-1 and IgM genes, markers for early development of the immune system in the gadoid haddock, *Melanogrammus aeglefinus*, L. *Fish & Shellfish Immunology* 23: 71-85.
- Crook, N.E., Clem, R.J., Miller, L.K., 1993. An apoptosis inhibiting baculovirus gene with a zinc finger like motif. *Journal of Virology* 67, 2168-2174.
- Cuthbertson, B.J., Bullesbach, E.E., Fievet, J., Bachere, E., Gross, P.S., 2004. A new class (penaeidin class 4) of antimicrobial peptides from the Atlantic white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) exhibits target specificity and an independent proline-rich-domain function. *Biochem J.* 381, 1, 79-86.
- Cuthbertson, B.J., Shepard, E.F., Chapman, R.W., Gross, P.S., 2002. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. *Immunogenetics* 54, 6, 442-445.
- Cuthbertson, B.J., Yang, Y., Bachere, E., Bullesbach, E.E., Gross, P.S., Aumelas, A., 2005. Solution structure of synthetic penaeidin-4 with

- structural and functional comparisons with penaeidin-3. *J Biol Chem* 280, 16, 16009-16018.
- Danwattanasorn, T., Fagutao, F.F., Shitara, A., Kondo, H., Aoki, T., Nozaki, R., Hirono, I., 2011. Molecular characterization and expression analysis of heat shock proteins 40, 70 and 90 from kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Sci.* 77, 929-937.
- Duangsuwan, P., Phoungpetchara, I., Tinikul, Y., Poljaroen, J., Wanichanon, C., Sobhon, P., 2008. Histological and three dimensional organizations of lymphoid tubules in normal lymphoid organ of *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunol.* 24, 426-435
- Escobedo-Bonilla, C.M., Alday-Sanz, V., Wille, M., Sorgelos, P., Pensaert, M.B., Nauwynck, H.J., 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of Fish Diseases* 31, 1-18.
- Figueiredo, H.C.P., Lopes, C.O., Leal, C.A.G., 2008. Imunidade de animais aquáticos. *Revista Panorama da Aquicultura* março/abril, 14-19.
- Flegel, T. W., Sritunialucksana, K. Shrimp molecular responses to viral pathogens. 2011. *Marine Biotechnology*, 13(4): 587-607.
- Flegel, T.W., 2007. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. *Developmental and Comparative Immunology* 31: 217-231.
- Gelebart, P., Opas, M., Michalak, M., 2005. Calreticulin, a Ca<sup>2+</sup>-binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 37, 260-266.
- Hasson, K.W., Lightner, D.V., Mohney, L.L., Redman, R.M., White, B.M., 1999. Role of lymphoid organ spheroids in chronic Taura syndrome virus (TSV) infections in *Penaeus vannamei*. *Dis Aquat Organ* 38:93-105
- Hill, K.K., Bedian, V., Juang, J.L., Hoffmann, F.M., 1995. Genetic interactions between the *Drosophila* Abelson (Abl) tyrosine kinase and failed axon connections (fax), a novel protein in axon bundles. *Genetics*, 141 (2): 595-606.
- Iwanaga, S., Lee, B.L., 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Biochemistry and Molecular Biology* 38, 128-150.

- Jasmani, S., Jayasankar, V., Shinji, J., Wilder, M.N., 2010. Carbonic anhydrase and Na/K-ATPase activities during the molt cycle of low salinity-reared white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fisheries Science* 76, 219-225.
- Jiang, H., Fuhua, L., Xie, Y., Huang, B., Zhang, J., Zhang, J., Zhang, C., Li, S., Xiang, J., 2009. Comparative proteomic profiles of the hepatopancreas in *Fenneropenaeus chinensis* response to hypoxic stress. *Proteomics*, 9: 3353-3367.
- Kawabata, S., Mutua, T., Iwanaga, S., 1996. The clotting cascade and defense molecules found in the hemolymph of the horseshoe crab. New direction, in: Soderhall, K., Iwanaga, S., Vasta, G.R. (eds.), *Invertebrate Immunology*. Fair Haven, CT: SOS, pp. 255–283.
- Khanobdee, K., Soowannayan, C., Flegel, T.W., Ubol, S., Withyachumnarnkul, B., 2002. Evidence for apoptosis correlated with mortality in the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with yellow head virus. *Disease of Aquatic Organisms* 2, 79-90.
- Khodabandeh, S., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., 2006. Immunolocalization of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in osmoregulatory organs during the embryonic and postembryonic development of the lobster *Homarus gammarus*. *Journal of Crustacean Biology* 2, 515-523.
- Kuraishi, T., Manaka, J., Kono, M., Ishii, H., Yamamoto, N., Koizume, K., Shiratsuchi, A., Lee, B. L., Higashida, H., Nakanishi, Y. 2007. Identification of calreticulin as a marker for phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Exp. Cell Res.* 313, 500-510.
- Leu, J., Kuo, Y., Kou, G., Lo, C., 2008. Molecular cloning and characterization of an inhibitor of apoptosis protein (IAP) from the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology* 32, 121-133.
- Liang, Y., Lin, J. C., Wang, K., Chen, Y. J., Liu, H. H., Luan, R., Jiang, S., Che, T., Zhao, Y., Li, D. F., Wang, D. C., Guo, L., Sun, H. 2010. A nuclear ligand MRG15 involved in the proapoptotic activity of medicinal fungal galectin AAL (*Agrocybe aegerita* lectin). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1800: 474–480.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., Pantoja, C.R., Navarro, S.A., Tang-Nelson, K.F.J., Noble, B.L., Nunan, L.M., 2009. Emerging non-viral infectious and noninfectious diseases of farmed penaeid shrimp and other decapods, in: BROWDY, C.L., JORY, D.E. (eds.), *The Rising*

- Tide: Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, pp. 46-52.
- Liu, W., Qian, D., Yan, X., 2011. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in hemolymph of *Scylla serrata* response to white spot syndrome virus infection. *Aquaculture* 314, 53-57.
- Lo, C.F., Leu, J.H., Ho, C.H., Chen, C.H., Peng, S.E., Chen, Y.T., Chou, C.M., Yeh, P.Y., Huang, C.J., Chou, H.Y., Wang, C.H., Kou, G.H., 1996. Detection of baculovirus associated with White spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* 25, 133-141.
- Luana, W., Li, F., Wang, B., Zhang, X., Liu, Y., Xiang, J., 2007. Molecular characteristics and expression analysis of calreticulin in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Comp Biochem Physiol-B Biochem Mol Biol* 147:482-491.
- Maeda, M., Itami, T., Mizuki, E., Tanaka, R., Yoshizu, Y., Doi, K., Yasunaga-Aoki, C., Takahashi, Y., Kawarabata, T., 2000. Red swamp crawfish (*Procambarus clarkii*): an alternative experimental host in the study of white spot syndrome virus, *Acta Virol.* 44, 371-374.
- Marques, J.S., Müller, I.C., Moser, J.R., Sincero, T.C., Marques, M.R.F., 2011. Wild captured crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851), a new host for white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture* 318, 20-24.
- Marques, M.R.F., Barracco, M.A., 2000. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture* 191, 23-44.
- McLean, G.W., Carragher, N.O., Avizienyte, E., Evans, J., Brunton, V.G., Frame, M.C., 2005. The role of focal adhesion kinase in cancer—a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer*, 5: 505-15.
- Molthathong, S., Senapin, S., Klinbunga, S., Puanglard, N., Rojtinnakorn, J., Flegel, T.W., Down-regulation of defender against apoptotic death (DAD1) after yellow head virus (YHV) challenge in Black Tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology* 2: 173-179.
- Moriarty, D.J.W., Decamp, O., 2009. Strategies for disease prevention on shrimp farms, in: Browdy, C.L., Jory, D.E. (eds.), *The Rising*

- Tide: Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, pp. 53-70.
- Morris, S., 2001. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air breathing in decapod crustaceans. *The Journal of Experimental Biology* 204, 979-989.
- Moser, J.R., 2005. Respostas bioquímicas do camarão branco, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), exposto ao inseticida carbofuran e determinação da prevalência natural do vírus da necrose hipodermal e hematopoiética – IHNNV. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Florianópolis, SC, 78 p.
- Müller, I.C., 2009. Genes diferencialmente expressos em camarões de cultivo *Litopenaeus vannamei* infectados pelo vírus da Síndrome da Mancha Branca e genotipagem de isolados geográficos brasileiros do vírus. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Florianópolis, SC, 150 p.
- OIE. World Organization for Animal Health. 2003. Diagnostic Manual for Aquatic Animals. Available at: <<http://www.oie.int>>. (accessed May 2010).
- OIE. World Organization for Animal Health., 2005. Information Database (WAHID) Interface. Summary of Immediate notifications and Follow-ups. Outbreak report of White spot disease in Brazil. Available at: <<http://www.oie.int>>. (accessed May 2010).
- Pongsomboon, S., Wongpanya, R., Tang, S., Chalorsrikul, A., Tassanakajon, A., 2008. Abundantly expressed transcripts in the lymphoid organ of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and their implication in immune function. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 485-493.
- Preston, N.P., Coman, G.J., Sellars, M.J., Cowley, J.A., Dixon, T.J., Li, Y., Murphy, B.S., 2009. Advances in *Penaeus monodon* breeding and genetics, in: BROWDY, C.L., JORY, D.E. (eds.), *The Rising Tide: Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Farming*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, pp. 1-11.

- Rattanarojpong, T., Wang, H., Lo, C.F., Flegel, T.W., 2007. Analysis of differently expressed proteins and transcripts in gills of *Penaeus vannamei* after yellow head virus infection. *Proteomics* 7, 3809-3814
- Robalino, J., Carnegie, R.B., O'leary, N., Ouvry-Patat, S.A., de la Vega, E., Prior, S., Gross, P.S., Browdy C.L., Chapman, R.W., Schey, K.L., Warr, G., 2009. Contributions of functional genomics and proteomics to the study of immune responses in the pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128, 110-118.
- Roch, P., 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrate. *Aquaculture* 172, 125-145.
- Roy, L.A., Davis, D.A., Saoud, I.P., Henry, R.P., 2007. Branchial carbonic anhydrase activity and ninhydrin positive substances in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, acclimated to low and high salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology* 147, 404-411.
- Santos, L.C.F., Belli, N.M., Augusto, A., Masui, D.C., Leone, F.A., McNamara, J.C., Furriel, R.P.M., 2007. Gill (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase in diadromous, freshwater palaemonid shrimps: espécies specific kinetic characteristics and  $\alpha$ -subunit expression. *Comparative Biochemistry and Physiology* 148, 178-188.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A., Baltimore, D., 1989. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell*, 59, 6: 1035-1048.
- Schlaepfer, D.D., Hauck, C. R., Sieg, D.J., 1999. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 71: 435–78.
- Serrels, B., Serrels, A., Brunton, V.G., Holt, M., McLean, G.W., Gray, C.H., 2007. Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex. *Nat. Cell Biol.*, 9: 1046–56.
- Shekhar, M.S., Azad, I.S., Ravichandran, P., 2006. Comparison of dot blot and PCR diagnostic techniques for detection of white spot syndrome virus in different tissues of *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 261, 1122-1127.
- Shi, X., Su, S., Long, J., Mei, B., Chen, Y., 2011. MicroRNA-191 targets N-deacetylase/N-sulfotransferase 1 and promotes cell growth

- in human gastric carcinoma cell line MGC803. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 43, 11: 849-56.
- Smith, V.J., Hauton, C., 2009. Immunoestimulation in crustacean aquaculture: does it really promote defense against pathogens? *Journal of the World Aquaculture Society* 40, 60-64.
- Smith, V.J., Soderhall, K., 1983.  $\beta$ -1,3 Glucan activation of crustacean hemocytes in vitro and in vivo. *The Biological Bulletin* 164, 299-314.
- Soderhall, K., Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* 10, 23-28.
- Somboonwiwat, K., Chaikeratisak, V., Wang, H., Lo, C.F., Tassanakajon, A., 2010. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus monodon* hemocytes after *Vibrio harvey* infection. *Proteome Science* 8, 1-11.
- Sonoda, Y., Matsumoto, Y., Funakoshi, M., Yamamoto, D., Hanks, S.K., Kasahara, T., 2000. Antiapoptosis role of focal adhesion kinase (FAK): induction of inhibitor-ofapoptosis proteins and apoptosis suppression by the overexpression of FAK in a human leukemic cell line HL-60. *J Biol Chem.*, 275: 16309–15.
- Souza, T.M., 2008. Detecção do vírus da mancha branca (WSV) em *Litopenaeus vannamei* por métodos de diagnóstico moleculares: Hibridização *in situ* e PCR em Tempo Real. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, SC, Brazil, 46 p.
- Sritunyalucksana, K., Soderhall, K., 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 191, 53–69.
- Supuran, C.T., 2008. Carbonic anhydrases - an overview. *Current Pharmaceutical Design* 14, 603-614.
- Tan, Y., Shi, Z., 2008. Proteomic Analyses of the Shrimp White Spot Syndrome Virus. *Virologica Sinica* 23, 157-166.
- Terwilliger, D.P., Buckley, K.M., Brockton, V., Ritter, N.J., Smith, L. C., 2007. Distinctive expression patterns of 185/333 genes in the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*: an unexpectedly diverse family of transcripts in response to LPS,  $\beta$ -1,3-glucan, and dsRNA. *BMC Molecular Biology*, 8: 1-16.

- Tominaga, K., Tominaga, E., Ausserlechner, M.J., Pereira-Smith, O.M., 2010. The cell senescence inducing gene product MORF4 is regulated by degradation via the ubiquitin/proteasome pathway. *Experimental Cell Research*, 316: 92-102.
- Tsai, J.R., Lin, H.C., 2007. V-type H<sup>+</sup>-ATPase and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimation. *The Journal of Experimental Biology* 210, 620–627.
- Tschopp, J., Thome, M., Hofmann, K., Meinel, E., 1998. The fight of viruses against apoptosis. *Current Opinion in Genetics & Development* 8, 82-7.
- Vargas-Albores, F., Yepiz-Plascencia, G. 2000. Beta glucan binding protein (BGBP) and its role in immune response. *Aquaculture* 191, 13–21.
- Vazquez, L., Alpuche, J., Maldonado, G., Agundis, C., Pereyra-Morales, A., Zenteno, E., 2009. Review: Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immunity* 15, 179.
- Wang, B., Li, F., Dong, B., Zhang, X., Zhang, C., Xiang, J., 2006. Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray. *Mar Biotechnol* 8:491–500.
- Wang, H., Wang, H., Leuc, J., Kouc, G., Wang, A.H.J., Lo, C.F., 2007. Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection. *Developmental & Comparative Immunology* 31, 672-686.
- Wongprasert, K., Khanobdee, K., Glunukarn, S.S., Meeratana, P., Withyachumnarnkul, B., 2003. Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white-spot syndrome virus. *Disease of Aquatic Organisms* 55, 3-10.
- Wu, J., Lin, Q., Lim, T.K., Liu, T., Hew, C., 2007. White spot syndrome virus proteins and differentially expressed host proteins identified in shrimp epithelium by shotgun proteomics and cleavable isotope-coded affinity tag. *Journal of Virology* 81, 11681-11689.
- Xie, X., Xu, L., Yang, F., 2006. Proteomic analysis of the major envelop and nucleocapsid proteins of white spot syndrome virus. *Journal of Virology* 80, 10615-10623.

- Zhang, A., Wu, Y., Lai, H.W.L., Yew, D.T., 2004. Apoptosis—a brief review. *Neuroembryology* 3, 47-59.
- Zhang, J., Li, F., Jiang, H., Yu, Y., Liu, C., Li, S., Wang, B., Xiang, J., 2010. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in lymphoid organ of *Fenneropenaeus chinensis* response to *Vibrio anguillarum* stimulation. *Fish and Shellfish Immunology* 29, 186-194.
- Zhang, M., Wang, H., Dengfeng, L., Xu, X. 2009. A novel adhesion from *Marsupenaeus japonicas* and its response to WSSV infection. *Dev. Comp. Immunol.* 33: 533-539.
- Zhu, F., Zhang, X., 2011. Protection of shrimp against White spot syndrome virus (WSSV) with  $\beta$ -1,3-D-glucan-encapsulated vp28-siRNA particles. *Journal of Marine Biotechnology, Journal of Marine Biotechnology* 1-6.

## CAPÍTULO 3

---

### **Expressão diferencial de proteínas em brânquias de *Litopenaeus vannamei* infectado com o vírus da síndrome da mancha branca.**

#### **RESUMO**

A proteômica é uma ferramenta muito útil no diagnóstico de enfermidades virais e sua aplicação é muito ampla. Sua utilização permite a determinação do perfil das proteínas expressas diferencialmente no hospedeiro em resposta à infecção viral, podendo ser aplicada como ferramenta na investigação das respostas moleculares do camarão branco *Litopenaeus vannamei* frente à infecção pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), possibilitando, assim, traçar estratégias eficazes para minimizar seu impacto nos cultivos. No presente trabalho, camarões livres de patógeno específico (*Specific Pathogen Free*, SPF), de aproximadamente 10 g, cujo estado sanitário foi confirmado por PCR, foram aclimatados durante três dias em laboratório em caixas plásticas de 50 litros com aeração constante, oxigênio dissolvido 4,0 mg/ml, amônia (NH<sub>3</sub>) 0,5-1,5 mg/L, pH 8,5, temperatura 23 °C e salinidade de 25‰. Ao término do período de aclimação, um grupo de camarões (n=45) foi infectado experimentalmente com o WSSV, através da inoculação intramuscular de um inóculo viral, preparado a partir do tecido muscular de camarões positivos para o WSSV. A quantificação do inóculo foi realizada através de PCR em tempo real (*q*PRC), contendo uma carga viral de 5,5 x 10<sup>6</sup> cópias virais em 100 µL/camarão. O período de acompanhamento da infecção e a coleta dos tecidos (brânquias e pleópodes) foram realizados nos intervalos de 6, 12, 24, 48 e 72 horas após infecção. Os tecidos coletados foram congelados a -80 °C. Em laboratório, a homogeneização das brânquias foi realizada em tampão PBS, contendo inibidor de protease, seguida de precipitação com TCA em acetona. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford modificado. A análise proteômica foi realizada utilizando eletroforese bidimensional (2-DE), com focalização isoelétrica em tiras de pH 3-10 linear, seguido pela separação por massa molecular usando eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE). Proteínas diferencialmente expressas nas brânquias dos animais infectados com WSSV foram determinadas após a coloração e a análise densitométrica dos géis. Um total de 48 proteínas foi selecionado, sendo 27 proteínas expressas nos animais infectados, 20 nos animais não infectados e uma proteína constante, ou seja, presente nos dois grupos. A identificação foi realizada

com sucesso por análise em espectrômetro de massa MALDI-TOF/PMF e a linha de corte na identificação das proteínas foi com escore >40. O perfil diferencial de proteínas cria um novo paradigma na análise da resposta do camarão *L.vannamei* à infecção pelo WSSV e da relação vírus-hospedeiro. Desta forma, fornece subsídios para compreender melhor as repostas moleculares de defesa do animal contra a infecção e para propor biomarcadores potenciais que permitam traçar estratégias, tanto de seleção de indivíduos menos susceptíveis, como para minimizar o impacto do vírus sobre os cultivos.

Palavras-chave: proteômica, WSSV, camarão, infecção, biomarcadores

## INTRODUÇÃO

Os crustáceos pertencem a um grupo zoológico antigo e bem sucedido, constituído por mais de 40 mil espécies, muitas apreciadas para o consumo humano, como camarões lagostas, lagostins, caranguejos e siris (BARRACCO, PERAZZOLO, ROSA, 2007).

O cultivo de camarão cresceu muito nos últimos anos e as doenças ocasionaram um impacto significativo principalmente nos países da América e Ásia, onde se concentram grande parte dos produtores mundiais. Só nas Américas a indústria do camarão produz aproximadamente 20% de todo camarão cultivado no mundo. Os principais produtores são Equador, Brasil, Honduras e México. Em termos de produção significativa na aquicultura o camarão *L. vannamei* é o mais cultivado respondendo por mais de 95% do total, o segundo mais cultivado é o *Litopenaeus stylirostris* (LIGHTNER, 2011).

Mas, o principal fator limitante para o sucesso da carcinicultura mundial consiste atualmente no controle das infecções, principalmente as de origem viral. As altas densidades populacionais, usualmente requeridas nos cultivos, propiciam a rápida propagação dos agentes infecciosos, resultando geralmente em mortalidades maciças e levando, por consequência, a prejuízos econômicos incalculáveis (BARRACCO, PERAZZOLO, ROSA, 2007). As doenças virais de camarões têm causado efeitos negativos na economia de muitos países na Ásia, América do Sul e América (LIU, SODERHALL, JIRAVANICHPAISAL, 2009).

Os vírus são os patógenos mais comuns no mar, estão presentes em até dez bilhões por litro e podem infectar diversos organismos (FUHRMAN, 1999). As infecções virais são doenças comuns em crustáceos como os camarões peneídeos, que podem ser infectados por

mais de vinte diferentes viroses (LOH et al., 1997). Viroses de crustáceos pertencem ou estão relacionadas a várias famílias como a Baculoviridae, Bunyaviridae, Herpesviridae, Picornaviridae, Parvoviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae, Togaviridae, Iridoviridae ou uma nova família Nimaviridae (JIRAVANICHPAISAL, 2005).

Dentro da família Nimaviridae está o WSSV que possui uma vasta gama de hospedeiros dentro dos crustáceos decápodes (LO et al., 1996; FLEGEL, 1997; FLEGEL, ALDAY-SANZ, 1998; NADALA, LOH, 1998) e potencialmente letal para a maioria das espécies de camarões peneídeos cultivados (OIE, 2006). A doença da mancha branca (WSD) surgiu na Ásia entre 1992-1993 e foi rapidamente dispersada pelo continente até a Índia onde causou a maior pandemia e perdas significativas na região. A primeira quebra de produção foi registrada no Japão em 1993 (INOUE et al., 1994, 1996; NAKANO et al., 1994).

Com isso, para o melhor controle de qualquer enfermidade, necessitamos de uma compreensão maior sobre o sistema imune dos camarões. Os mecanismos de defesa dos crustáceos dependem completamente do sistema imune inato que é ativado por padrões moleculares de reconhecimento. Estes quando associados a patógenos são reconhecidos por proteínas solúveis ou presentes na superfície das células do hospedeiro, como as lectinas, antimicrobiais, coagulantes e proteínas de reconhecimento padrão, as quais, em parte, ativam mecanismos efetores humorais e celulares para destruir patógenos invasores (KAWABATA, IWANAGA, 1999; MARQUES, BARRACCO, 2000; VAZQUEZ et al., 2009).

Neste contexto, o estudo do sistema imunológico de crustáceos desponta como uma estratégia recente e promissora, visto que permite conhecer as bases da susceptibilidade e resistência destes animais a microrganismos patogênicos e parasitas, além de fornecer subsídios valiosos para o estabelecimento de parâmetros de saúde e imunomarcadores para seleção genética de animais mais resistentes a infecções (BARRACCO, PERAZZOLO, ROSA, 2007; ROBALINO et al., 2009).

Do ponto de vista imunológico camarões e outros crustáceos são pouco compreendidos, abordagens genômica e proteômica funcionais têm sido aplicadas como um meio de obtenção de informações moleculares de forma rápida sobre as respostas imunes nestes organismos (ROBALINO et al., 2009).

Assim sendo, com o avanço de técnicas analíticas, abordagens bioquímicas complementares e biologia molecular a análise proteômica tem se tornado uma nova ferramenta no estudo dos padrões de expressão

de proteínas dos órgãos, células ou compartimentos subcelulares. Desta maneira, novos caminhos estão se abrindo para importantes efetores na resposta imune de crustáceos, incluindo o sistema profenoloxidase e peptídeos antimicrobianos que podem ser rapidamente elucidados com um nível razoável de cobertura. Em circunstâncias diversas, tais estudos, podem fornecer uma compreensão da resposta celular aos vários fatores externos (BACHÈRE et al., 2004; CERENIUS, SODERHALL, 2004; SOMBOONWIWAT et al., 2010).

## OBJETIVOS

a) Caracterizar o perfil diferencial de proteínas expressas pelo hospedeiro *Litopenaeus vannamei* em resposta à infecção viral da mancha branca, utilizando brânquias de camarões SPF (*Specific Pathogen Free*), infectados experimentalmente com o vírus, ao longo de um período de 72 horas, após a infecção.

b) Propor alvos protéicos potenciais como biomarcadores moleculares para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e de novas ferramentas para o monitoramento preventivo dos cultivos, bem como para a seleção de animais menos susceptíveis ao WSSV e para estudos visando compreender melhor a etiologia desta infecção em camarões cultivados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Material biológico

Camarões *L. vannamei*, livres de patógeno específico (SPF) com aproximadamente 10 g foram colocados em caixas plásticas de 50 litros, divididos em dois grupos (controle e infectado) em triplicatas, no total de 15 animais por caixa, de forma a compor um *pool* com tecido branquial de três animais por caixa para cada intervalo de tempo do experimento. Os camarões foram mantidos em aeração constante, oxigênio dissolvido 4,0 mg/mL, amônia (NH<sup>3</sup>) 0,5-1,5 mg/L, pH 8,5, temperatura 23 °C e salinidade de 25‰. Os animais foram aclimatados por um período de três dias. Após este período, foi realizada a infecção experimental com um inóculo preparado a partir de animais positivos, advindos de cultivos da região de Santa Catarina, com histórico de mancha branca e nos quais a presença do vírus foi confirmada por PCR *nested*. O inóculo foi de 5,5 x 10<sup>6</sup> cópias virais em 100 µL/camarão quantificado através de *qPCR*. O período de acompanhamento da

infecção e a coleta dos tecidos (brânquias e pleópodes) foram realizados nos intervalos de 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação. A cada um destes intervalos de tempo, foi realizada a quantificação da carga viral nos animais coletados por *qPCR* (Tabela 5).

**Tabela 5.** Quantificação da carga viral em diferentes intervalos após infecção com WSSV no camarão *L. vannamei*

<b>PCR <i>real time</i></b>	<b>Carga viral</b>
Tempo após infecção	Cópias virais/uL
6 horas	$3,00 \times 10^1$
12 horas	$7,37 \times 10^2$
24 horas	$8,38 \times 10^1$
48 horas	$2,57 \times 10^6$
72 horas	$7,79 \times 10^5$

Os pleópodes e as brânquias foram coletados utilizando material estéril, armazenados em nitrogênio líquido, transportados para o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica da Universidade Federal de Santa Catarina e armazenados em freezer -80 °C para os procedimentos posteriores.

### 3.2. Detecção do WSSV

Pleópodes de camarões foram coletados para a detecção de WSSV por PCR *nested* (LO et al., 1996) de acordo (OIE, 2003) usando WS146 F1 (5'-ACT-ACT-AAC-TTC-AGC-CTA-TCT-AG-3 ') e WS146 R1 (5'-TAA-TGC-GGG-TGT-AAT-GTT-CTT-ACG-3 ') pares de primers interior: WS146 F2 (5'-GTA-ACT-GCC-CCT-TCC-ATCTCC-A-3 ') e WS146 R2 (5'-TAC-GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG-T-3'), gerando um produto de 941 bp de comprimento. DNA genômico total extraído seguindo protocolo (MOSER, 2005), foi utilizado para amplificação por PCR. Os resultados da amplificação foram visualizados em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio.

### 3.3. Extração de proteínas das brânquias

A amostra foi macerada com pistilo e mantida resfriada em nitrogênio líquido para evitar degradação, logo após acrescida de tampão PBS com PMSF e centrifugada a 15.000 x g por 1 hora a 4 °C, o

sobrenadante transferido para novo microtubo. Após a obtenção das proteínas, foram adicionados quatro volumes de acetona contendo TCA 12,5% e DTT 0,125% (concentração final 10% e 0,1% respectivamente). A mistura foi colocada por 1 hora no gelo para precipitação. Após este período uma nova centrifugação 20.000 x g por 20 minutos a 4 °C com subsequente descarte do sobrenadante. O precipitado contendo as proteínas totais foi lavado com 1 mL de metanol gelado. Em seguida, o precipitado foi ressuspensionado em metanol gelado e agitado até adquirir um aspecto de suspensão, sendo novamente centrifugado a 20.000 x g por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. A lavagem foi realizada no mínimo mais duas vezes. Após lavagem com metanol, o precipitado foi lavado da mesma forma com acetona gelada por duas vezes para retirada de qualquer traço de TCA e metanol. O precipitado contendo as proteínas totais foi ressuspensionado em acetona contendo 0,1% de DTT e novamente centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. O precipitado final foi seco e solubilizado em 1 mL de solução de reidratação (uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 2%) com a adição de 20 µL de PMSF (4mg/mL). Uma centrifugação final de 10.000 x g por 30 min. a 4 °C o sobrenadante com a fração de proteínas solúveis foi coletado. Uma alíquota de 100 µL foi retirada para dosagem de proteínas e o restante da amostra armazenada a -80 °C para os procedimentos de limpeza posteriores.

### 3.4. 2-DE

2-DE foi realizado com Ettan IPGphor 3 e SE 600 Ruby system (GE healthcare®) usando o protocolo de acordo com fabricante. Brevemente, as proteínas totais (250 µg) foram misturadas em 250 µL de tampão de reidratação (7 M uréia, 2 M tiouréia, 2% w/v CHAPS, 0,28% w/v DTT, 1% v/v tampão IPG e 0,002% de azul de bromofenol) e focalização isoeletrica (IEF) usando tiras IPG 13 cm imobilizadas com pH 3–10 gradiente linear (GE healthcare®). IEF foi realizada utilizando os seguintes passos: 50 V por 30 min., 500 V por 1 h, 1000 V por 1 h, 4000 V por 1 h, 8000 V por 2:30 e 8000 V por 30 min. até que um total de 20 kVh tenha sido acumulado. As proteínas foram posteriormente reduzidas com DTT e alquiladas com iodoacetamida antes da segunda dimensão (SDS-PAGE). Depois do equilíbrio com a solução contendo 6 M ureia, 30% glicerol, 2% SDS, 75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,002% de azul de bromofenol e 1% w/v DTT por 15 min., em seguida as proteínas foram tratadas com a mesma solução contendo 2,5% w/v iodoacetamida

no lugar do DTT por mais 15 min. a tira de gel equilibrada foi então colocada no topo do gel SDS-PAGE 12,5% e selada com agarose 0,5% contendo azul de bromofenol. A corrida em gel SDS-PAGE foi realizada com 15 mA por gel durante 25 min. depois 25 mA por gel até a linha de frente da corrida chegar no final do gel. Logo após, os géis foram fixados em solução contendo metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e corado com CBB contendo sulfato de amônio 10% (w/v), ácido fosfórico 10% (v/v), metanol 20% (v/v) e CBB-G250 0,12% (w/v) (Merck, Germany). As amostras foram produzidas em triplicatas para o grupo controle e infectado, cada gel da amostra era composto por proteínas do tecido branquial de três animais.

### 3.5. Análise das imagens

As imagens dos géis foram adquiridas no Image Scanner III (GE healthcare<sup>®</sup>) e analisadas usando programa Image Master 2D Platinum 7.0 (GE healthcare<sup>®</sup>). Os spots individuais de cada gel foram detectados pelo seu limite e o volume (abundância) do *spot* foi calculado automaticamente. A porcentagem do volume (% vol), bem como, o valor normalizado da intensidade do volume de cada *spot* e a intensidade do volume de todos os *spots* detectados no gel foram estatisticamente analisados por ANOVA usando um nível de 0,05 de significância estatística. Para identificar *spots* diferencialmente expressos, a intensidade dos *spots* do grupo infectado foi comparado àquela do grupo controle e dividido em três grupos, de acordo com seu nível de expressão relativa; expressão maior ou exclusiva no grupo infectado, suprimidos ou expressão maior no grupo controle e fracamente mas não significativamente diferentes “constantes” (presentes nos dois grupos). Os *spots* expressos diferencialmente foram selecionados quando apresentavam nível de significância estatística ( $p < 0,05$ ).

### 3.6. Digestão da proteína em gel

Os *spots* de proteína diferencialmente expressos foram excisados do gel, transferidos individualmente e colocados em tubos estéreis. Segundo protocolo de Chai et al. (2010), cada *spot* foi lavado três vezes com água destilada, após o qual 200 mL de acetonitrila 40% (ACN) em 200 mM de bicarbonato de amônio (pH 8,5) foi adicionado a 37 ° C por 30 min. Cada *spot* foi então desidratado com 100 mL ACN por 5 min à temperatura ambiente, seco por 15 min, e reidratado com 5 mL de uma

solução de tripsina contendo 20 mg/mL de Tripsina (Proteomics Grade, Sigma, United States), 40 mM de bicarbonato de amônio e ACN 9% no gelo por 45 min. A solução de tripsina em excesso foi removida, em seguida, 5 mL de bicarbonato de amônio 40 mM em ACN 9% foi adicionado a cada tubo a 37 °C, e mantidos overnight. Após a incubação, o líquido foi transferido para um novo tubo rotulado. Um total de 5 mL de ácido trifluoroacético 0,1% (TFA) em solução de ACN 50% foi adicionado a cada tubo que permeeneceu com o *spot*, foi então, deixado para incubar por 30 min a 37 °C. Finalmente, a solução foi combinada com o líquido de 40 mM de bicarbonato de amônio em ACN 9%. A mistura líquida foi seca a vácuo, dissolvida em TFA 0,1% e, em seguida, submetida ao MALDI-TOF.

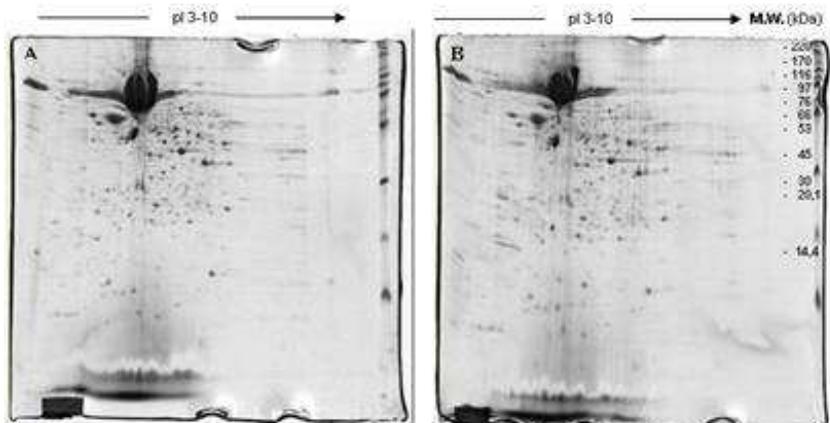
### 3.7. MALDI-TOF/PMF

Os peptídeos após sua tripsinização foram misturados 1:1 com matriz de MALDI digeridos com 1 $\mu$ L de solução da matriz ácida saturada (5  $\mu$ g/mL  $\alpha$ -ciano-4-ácido hidroxicinamico, ACN 50% e TFA 0,1%), colocados na placa e deixados cristalizar a temperatura ambiente. Os dados de MS foram adquiridos com laser onde 2000-3000 disparos foram acumulados para cada espectro obtido do Autoflex III MALDI-TOF espectrômetro de massa (Bruker Daltonics). O espectrômetro de massa foi ajustado no modo MALDI-TOF impressão digital da massa do peptídeo (PMF) com modo automatico total usando o programa FlexControl™. Foi utilizada uma aceleração de 20 kV e frequência de laser com 50 Hz. A calibração externa foi realizada usando uma mistura de peptídeos com [M + H]<sup>+</sup> íons de angiotensina I, angiotensina II, substância P, bombesina e hormônios adrenocorticotropico. O espectro gerado foi analisado pelo programa FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). As proteínas foram identificadas por PMF e a lista de massas derivada dos peptídeos foram pesquisados no NCBIInr usando o programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com/cgi/proteinview>). As pesquisas no banco de dados foram realizadas utilizando os seguintes parâmetros: Base de dados, NCBIInr; taxonomia, Metazoa; enzima, tripsina. O limite de erro de massa do peptídeo foi fixado em  $\pm$  100 ppm; MS tolerância da massa do íon foi fixado em 0,6 Da. Carbamidometilação da Cisteína e oxidação da metionina foram selecionadas como modificações fixa e variável respectivamente. A identificação da proteína ocorreu quando o escore foi significativo, bem como comparados também os valores de pI e MW. Só proteínas com escore (>40) foram reportadas.

## RESULTADOS

### 4.1. Comparação do perfil de proteínas expressas entre camarões WSSV-infectados e controle.

As brânquias de *L. vannamei* do grupo controle e infectado foram coletadas, homogeneizadas e submetidas à 2-DE. Após a coloração com nitrato de prata, cerca de 1500 *spots* em cada gel foram detectados por software *Image Master Platinum 7.0*, mas apenas aqueles com  $p < 0,05$  foram considerados significativamente diferentes pela análise de variância de uma via (ANOVA). A análise dos géis (Figura 13) revelou o perfil de proteínas expressas nas brânquias de camarões WSSV infectado e controle. A comparação destes perfis permitiu identificar oito proteínas que foram suprimidas e 20 expressas apenas nos animais infectados. Dentre as proteínas constantes apenas uma foi selecionada aleatoriamente como comum aos dois grupos. Outras sete proteínas foram observadas com expressão maior nos animais com vírus e 12 com expressão menor, embora estivessem presentes em ambos os grupos. No total 22 *spots* foram identificados.



**Fig.13.** Géis 2-DE representativos do perfil de proteínas das brânquias de *Litopenaeus vannamei* 72 horas após a infecção por WSSV. (A) animais do grupo controle, (B) animais do grupo infectado.

## 4.2. Identificação de Proteínas

Um total de 48 proteínas foi submetido ao PMF (figura 14) e posteriormente ao MASCOT para identificação. As buscas foram realizadas no banco de dados para homologia e identificação das proteínas no NCBI. Ficaram então os grupos divididos da seguinte forma 6 horas: 09 proteínas (2 expressas, 2 suprimidas e 5 com expressão diminuída no grupo infectado); 12 horas: 07 proteínas (5 expressas e 2 suprimidas no grupo infectado); 24 horas: 06 proteínas (4 expressas e 2 com expressão aumentada no grupo infectado); 48 horas: 11 proteínas (3 suprimidas, 7 com expressão diminuída no grupo infectado e 1 constante nos dois grupos) e 72 horas: 15 proteínas (9 expressas, 1 suprimida e 5 com expressão aumentada no grupo infectado). Com exceção da proteína constante todas as demais citadas acima apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) na sua expressão para mais ou para menos entre os grupos controle e infectado. As proteínas identificadas e as informações relacionadas a estas estão apresentadas na Tabela 6.

**Tabela 6.** Proteínas alteradas pela infecção por WSSV em brânquias de *L. vannamei* identificadas por PMF. Continua

Spot no.	Proteína	Espécie	Acesso no.	Mascot score/ SC (%)	Mudança de intensidade	pI/MW (kDa) observado
<b>Protein spots 6 h.p.i.</b>						
399	PREDICTED: kelch domain- containing protein 8A-like hypothetical protein SINV_05700	[Oreochromis niloticus]	gi 348518042	79/7	D	9,27/39
403	Hypothetical protein CBG21133	[Solenopsis invicta]	gi 322796548	78/5	D	5,20/19
439	Proteína kinase âncora (PRKA)	[Caenorhabditis briggsae]	gi 268575544	75/6	- 1,43	5,45/15
446	Calcitonina	[Homo sapiens]	gi 119610330	67/10	- 2,46	8,48/76
566		-	gi 356170	61/3	- 2,50	8,04/3,4

**Tabela 6.** Proteínas alteradas pela infecção por WSSV em brânquias de *L. vannamei* identificadas por PMF. Continuação

<i>Spot</i> no.	Proteína	Espécie	Acesso no.	Mascot score/ SC (%)	Mudança de intensidade	pI/MW (kDa) observado
<b><i>Protein spots 6 h.p.i.</i></b>						
605	CBR-LJG-4 proteína	[ <i>Caenorhabditis briggsae</i> ]	gi 351700892	60/6	D	6,94/82
612	AGAP003687- PA	[ <i>Anopheles gambiae</i> str. PEST]	gi 158291944	70/8	- 2,32	6,07/102
613	IP20448p	[ <i>Drosophila melanogaster</i> ]	gi 189181950	61/5	- 13,33	6,75/34
2067	unnamed protein	[ <i>Homo sapiens</i> ]	gi 189054178	80/9	U	7,62/66

**Tabela 6.** Proteínas alteradas pela infecção por WSSV em brânquias de *L. vannamei* identificadas por PMF. Continuação

<i>Spot</i> no.	Proteína	Espécie	Acesso no.	Mascot score/ SC (%)	Mudança de intensidade	pI/MW (kDa) observado
<b>Protein spots 12 h.p.i.</b>						
234	PREDICTED: uncharacterized protein KIAA1462-like hypothetical protein CLF_015359, partial	[ <i>Anolis carolinensis</i> ]	gi 327274528	58/4	U	8,48/19
327	unnamed protein product	[ <i>Clonorchis sinensis</i> ]	gi 350033705	78/9	U	10,01/38
366	unnamed protein product	[ <i>Tetraodon nigroviridis</i> ]	gi 47212035	65/8	U	6,61/59
398	PREDICTED: nudix-type motif 9-like	[ <i>Saccoglossus kowalevskii</i> ]	gi 291234261	58/6	U	7,15/35
466	metionina sintase	[ <i>Danio rerio</i> ]	gi 37620202	63/9	U	5,26/140
787	Arginina quinase	[ <i>Litopenaeus vannameti</i> ]	gi 307334072	132/15	D	6,84/36765
848	unnamed protein product	[ <i>Tetraodon nigroviridis</i> ]	gi 47224481	61/5	D	9,45/20373

**Tabela 6.** Proteínas alteradas pela infecção por WSSV em brânquias de *L. vannamei* identificadas por PMF. Continuação

<i>Spot</i> no.	Proteína	Espécie	Acesso no.	Mascot score/ SC (%)	Mudança de intensidade	pI/MW (kDa) observado
<b><i>Protein spots 24 h.p.i.</i></b>						
162	putative ribosomal protein L11	[Trypanosoma vivax]	gi 340052452	81/7	U	9,75/39
258	Beta-actina	[Litopenaeus vannamei]	gi 10304437	100/9	U	5,30/42
275	protein phosphatase-1 regulatory subunit 7 beta1	[Homo sapiens]	gi 4633068	77/5	U	4,66/32
285	Ubiquitina	[Glossina morsitans morsitans]	gi 289741017	40/5	+ 0,21	5,23/26
343	Mef2 myocyte enhancer factor 2	[Podocoryna carnea]	gi 18676385	68/7	+ 0,08	9,17/48
426	Caspase-2	[Heliothis virescens]	gi 339830904	64/5	U	5,92/32

**Tabela 6.** Proteínas alteradas pela infecção por WSSV em brânquias de *L. vannamei* identificadas por PMF. Continuação

Spot no.	Proteína	Espécie	Acesso no.	Mascot score/ SC (%)	Mudança de intensidade	pI/MW (kDa) observado
<b>Protein spots 48 h.p.i.</b>						
443	Vacuolar ATP sintase	[ <i>Carcinus maenas</i> ]	gi 6425061	101/13	D	5,31/54
477	F1-ATP sintase beta subunit	[ <i>Litopenaeus vannamei</i> ]	gi 170779040	192/24	- 1,44	5,03/55
494	Arginina quinase	[ <i>Litopenaeus vannamei</i> ]	gi 307334072	136/13	- 1,36	6,84/36
521	Amilase precursor	[ <i>Mus musculus</i> ]	gi 553866	67/5	- 2,92	9,43/20
528	Lamina receptor	[ <i>Litopenaeus vannamei</i> ]	gi 111572543	75/8	D	4,79/34
530	hypothetical protein SINV_06746	[ <i>Solenopsis invicta</i> ]	gi 322782939	77/6	C	6,32/27

**Tabela 6.** Proteínas alteradas pela infecção por WSSV em brânquias de *L. vannamei* identificadas por PMF. Continuação

<i>Spot</i> no.	Proteína	Espécie	Acesso no.	Mascot score/		pI/MW (kDa)
				SC (%)	Mudança de intensidade	
<b><i>Protein spots 48 h.p.i.</i></b>						
544	PREDICTED: hypothetical protein LOC480064 isoform7	[Canis lupus familiaris]	gi 345803227	79/10	- 1,76	5,29/93
551	60S ribossomal	[Salmo salar]	gi 209735198	78/6	- 2,32	10,42/11
552	triosefosfato isomerase	[Procamburus clarkii]	gi 328900101	79/8	- 2,03	5,68/27
577	hypothetical protein BRAFLDRAFT_68898	[Branchiostoma floridae]	gi 260795164	86/17	- 1,90	6,49/190
659	proteasome subunit $\beta$ -3	[Sus scrofa]	gi 42600873	86/5	D	9,62/4,4

**Tabela 6.** Proteínas alteradas pela infecção por WSSV em brânquias de *L. vannamei* identificadas por PMF. Continuação

<i>Spot</i> no.	Proteína	Espécie	Acesso no.	Mascot score/ SC (%)	Mudança de intensidade	pI/MW (kDa) observado
<b><i>Protein spots 72 h.p.i.</i></b>						
158	DNA topoisomerase 3-beta-1	[Rattus norvegicus]	gi 157786738	58/11	U	8,37/98
162	hypothetical protein EAG_13577	[Camponotus floridanus]	gi 307175491	60/3	U	8,96/4,9
266	PREDICTED: apolipoprotein A-I-like	[Oreochromis niloticus]	gi 348523730	67/9	+ 6,34	5,60/29
275	GE14732	[Drosophila yakuba]	gi 195497248	53/4	U	8,80/15
288	Receptor célula T	pig (fragment)	gi 2136620	73/6	U	8,87/16

**Tabela 6.** Proteínas alteradas pela infecção por WSSV em brânquias de *L. vannamei* identificadas por PMF. Continuação

Spot no.	Proteína	Espécie	Acesso no.	Mascot score/ SC (%)	Mudança de intensidade	pI/MW (kDa) observado
<b>Protein spots 72 h.p.i.</b>						
300	mCG147328	[Mus musculus]	gi 148677657	53/4	+ 0,57	8,69/11
314	Imunoglobulina cadeia pesada	[Homo sapiens]	gi 122892232	56/4	+ 2,40	9,26/12
350	28S ribossomal	[Schistosoma mansoni]	gi 256083308	48/5	U	9,35/28
356	colesterol ester transfer	[Oryctolagus cuniculus]	gi 291190970	61/5	U	6,04/54
357	GK15763	[Drosophila willistoni]	gi 195431373	51/4	+ 3,24	5,93/12

**Tabela 6.** Proteínas alteradas pela infecção por WSSV em brânquias de *L. vannamei* identificadas por PMF. Conclusão

Spot no.	Proteína	Espécie	Acesso no.	Mascoat		pI/MW (kDa)
				escore/SC (%)	Mudança de intensidade observado	
<b>Protein spots 72 h.p.i.</b>						
360	Zinc finger	[ <i>Drosophila erecta</i> ]	gi 194876300	54/4	U	8,52/31
368	glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-β-galactosyltransferase	[ <i>Schistosoma mansoni</i> ]	gi 256068995	65/5	+ 0,71	9,64/6,9
399	Ubiquitina	[ <i>Glossina morsitans</i> ]	gi 289741017	53/5	U	5,23/26
404	hypothetical protein CRE_01080	[ <i>Caenorhabditis remanei</i> ]	gi 308483758	49/4	U	9,41/18
457	PREDICTED: similar to aldehyde dehydrogenase 9 family, member A1a	[ <i>Ciona intestinalis</i> ]	gi 198413878	52/5	D	5,86/57

- Indica a diminuição da intensidade local em um spot determinado após a infecção com WSSV comparado com o de camarão normal.

+ Indica o aumento da intensidade local em um spot determinado após a infecção com WSSV comparado com o de camarão normal.

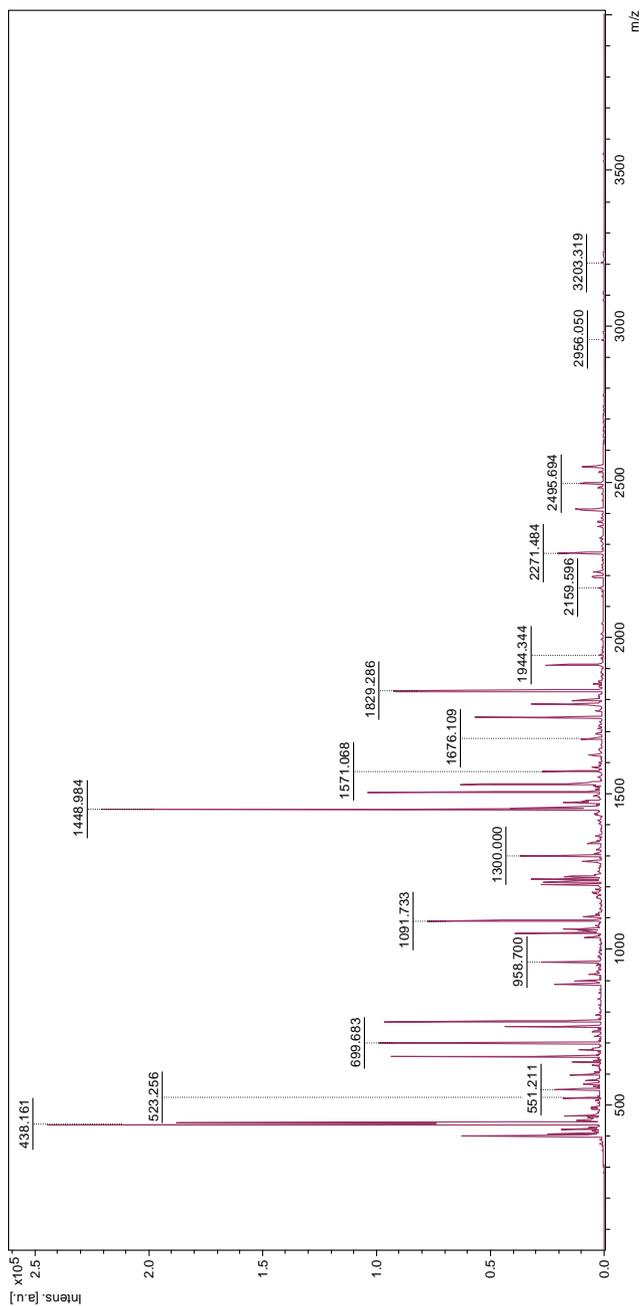
U Indica proteína expressa detectada apenas nos extratos de proteínas de animais infectados.

D Indica proteína suprimida detectada apenas no extrato de proteínas de animais normais.

C Indica proteína constante detectada nos dois extratos de proteínas com a mesma intensidade de expressão.

Mascoat escores maiores que 40 são de proteínas com nível de significância estatística ( $p < 0,05$ ).

SC: cobertura da sequência de aminoácidos para proteínas identificadas.



**Fig. 14.** Espectrograma representativo obtido a partir da digestão tripéptica do spot/proteína (494) da amostra de brânquias de *Litopenaeus vannamei* infectados pelo WSSV.

## DISCUSSÃO

O diagnóstico de enfermidades por PCR ajuda na detecção de animais positivos e negativos tanto para o WSSV como para outros vírus, desta forma permitindo a separação dos grupos para estudos posteriores, visto que alguns animais têm a capacidade de apresentar infecções virais simples ou múltiplas sem sinais clínicos aparentes da doença. Além disso, um modelo teórico de acomodação viral por alguns animais tem sido proposto (FLEGEL, PASHARAWIPAS, 1998; FLEGEL, 2007; FLEGEL, SRITUNIALUCKSANA, 2011), onde estes podem apresentar o vírus, porém sem necessariamente desenvolver a doença.

Este modelo propõe que camarões e outros artrópodes têm um mecanismo ativo (adaptativo) para acomodação a patógenos virais onde o mecanismo de apoptose é bloqueado e provê alguma proteção contra mortalidade pelo vírus da mancha branca ou outras possíveis viroses. Um elemento essencial para o modelo de acomodação viral era um mecanismo de memória desconhecida (FLEGEL, PASHARAWIPAS, 1998), posteriormente proposta como sendo devido a infecções virais contínuas gerando uma memória temporária no animal (FLEGEL, 2007).

A interação permite a fagocitose ou encapsulação do agente patogênico e ainda ação de lectinas pelo reconhecimento de padrões moleculares do invasor (MARQUES, BARRACO 2000; VAZQUEZ et al., 2009). Outro mecanismo de ação são os peptídeos antimicrobianos os quais atuam diretamente na membrana de células bacterianas ocasionando abertura de poros na parede celular (SINHA, NOROUZITALLAB, BARUAH, 2009). Eles são componentes essenciais no sistema imune inato e possuem atividade microbicida rápida e potente contra um amplo espectro de microrganismos (BARRACCO, PERAZZOLO, ROSA, 2007). Os crustáceos possuem um mecanismo de defesa eficiente, porém sem memória imunológica e anticorpos como os vertebrados. Desta forma, os peptídeos antimicrobianos ajudam na defesa contra bactérias tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, fungos e vírus envelopados, bem como, um efeito na imuno-modulação que deve ser usado como agente promissor antimicrobiano na aquicultura (SINHA, NOROUZITALLAB, BARUAH, 2009).

Certos fatores fisiológicos são importantes na imunidade destes animais. Tudo depende do estágio de ecdise, sua adaptação ao ambiente aquático e condições de estresse aos quais o animal é submetido em

cultivo de maneira extensiva. Respostas contra o patógeno parecem ser diferentes para cada espécie de crustáceo (VAZQUEZ et al., 2009).

Para isso utilizou-se a eletroforese bidimensional como ferramenta no estudo viral, desta forma, as proteínas foram separadas em primeira dimensão pelo seu ponto isoelétrico, pois cada proteína possui uma carga relativa positiva ou negativa dependendo do seu caráter constitucional. Logo após, corrida em gel de poliacrilamida para separação em segunda dimensão de acordo com o massa molecular de cada uma delas. Desta forma obteve-se o perfil diferencial pela análise dos *spots* comparando-se os géis dos grupos de animais infectados e não-infectados. Foram selecionados 48 *spots* nos grupos 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a infecção. Onde, do total, 34 foram diferencialmente expressos, sendo estes tanto de animais positivos como negativos para o WSSV. Os demais *spots* apresentaram intensidades diferentes de expressão, possivelmente devido a uma resposta diferencial ao vírus. As proteínas diferentes, provavelmente, são enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos, bem como, proteínas que atuam em outras funções celulares de acordo com resultados encontrados por Rattanarojpong et al. (2007), Wang et al. (2007) e Chongsatja et al. (2007). Muitas destas enzimas, como por exemplo, enolase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) estão envolvidas no papel de regulação transcricional da apoptose (KIM, DANG, 2005; LIU, QIAN, YAN, 2011), bem como, aumento na produção de hemocianina que pode estar ligada à maior obtenção de oxigênio durante a replicação viral (RATTANAROJPONG et al., 2007; CHONGSATJA et al., 2007) e estava presente em todos os géis dos animais infectados com o WSSV, com massa molecular de aproximadamente 66 kDa. Algumas destas proteínas podem funcionar como biomarcadores para infecções virais de acordo com sua intensidade de expressão.

Trabalhos sobre os aspectos moleculares na interação vírus-hospedeiro em camarões parecem estar no início de um crescimento significativo que irá indubitavelmente prover novas idéias na diferença entre vertebrados e artrópodes (FLEGEL, 2007).

Esses trabalhos consistem na caracterização de efetores imunes propostos pela análise dos níveis de expressão em vários tecidos sob condições normais ou após desafio viral (FLEGEL, SRITUNIALUCKSANA, 2011). Progressos têm ocorrido no entendimento do sistema imune de invertebrados. Esses estudos têm levado ao descobrimento de novas reações de defesa e moléculas protéicas, propiciando novos achados no papel de defesa e regulação de processos. Análise proteômica pode ser de particular relevância na

identificação de estruturas e seqüências de fatores da hemolinfa e determinar sua participação na resposta imune de crustáceos (SIRIPAVEE et al., 2005). Esses estudos são de relevância para o entendimento dos mecanismos de defesa envolvidos no sistema imune e suas modificações evitando perdas na produção aquícola.

A observação das proteínas pode ser feita pela expressão ou supressão das mesmas em resposta ao vírus. Uma melhor compreensão da resposta do hospedeiro ao WSSV ajudará a elucidar seu mecanismo de infecção e patogenicidade. Muitas destas proteínas têm importante papel biológico na célula e podem ser utilizadas como potenciais biomarcadores, bem como, no desenvolvimento de medidas antivirais. Nos últimos anos estudos da defesa de camarões em nível molecular têm aumentado rapidamente tanto para respostas celulares como humorais com o intuito de elucidar os mecanismos de ataque viral e resposta imune do hospedeiro (BOURCHOOKARN et al., 2008; ROBALINO et al., 2009; CHAI et al., 2010; ZHANG et al., 2010; SOMBOONWIWAT et al., 2010).

(Spot 258) Beta-actina, uma proteína ubíqua envolvida na formação de filamentos que são importantes componentes do citoesqueleto. A interação com miosina fornece a base da contração muscular e muitos aspectos de motilidade celular. Cada protômero de actina liga uma molécula de ATP e íons de cálcio ou magnésio. Actina existe como um monômero em baixas concentrações de sal, mas filamentos se formam rapidamente quando se eleva a concentração de sal, com a conseqüente hidrólise de ATP. A polimerização é regulada por proteínas chamadas de nivelamento. Actina é membro de uma superfamília a qual inclui HSP 70. O domínio ATPase da actina tem partes semelhantes com domínios de proteínas HSP 70 (VAN DEN ENT, AMOS, LÖWE, 2001). Teve sua expressão aumentada neste trabalho 24 após infecção provavelmente devido a um recrutamento maior de fibras no processo de contração muscular, motilidade celular e provável envolvimento no processo de fagocitose (MAY, MACHESKY, 2001).

(Spot 544) Fator de transcrição mitocondrial importante durante a biogênese no processo de desenvolvimento e diferenciação do DNA mitocondrial (LARSSON et al., 1998) e sua regulação parece estar ligada à proteína FAK (TORNATORE, 2011).

(Spots 494, 787) Arginina quinase (AK) tampão celular do nível de ATP, a qual catalisa reversivelmente a transfosforilação entre fosfoarginina e ADP. AK teve expressão aumentada em *Jasus edwardsii* e *P. stylirostris* ambos infectados com WSSV (SPEED et al., 2001;

ASTROFSKY et al., 2002). Similar aumento de expressão da AK foi observada também em *S. serrata* infectado com o mesmo vírus, indicando que AK regula a resposta fisiológica durante a infecção viral e está ligada ao mecanismo de imunidade inata (ROBALINO et al., 2009), isso explicaria o baixo metabolismo em algumas espécies infectadas com WSSV. Interessantemente, entre proteínas identificadas, duas AKs possuem diferentes pIs e massa molecular, sugerindo que diferentes AKs existem na hemolinfa do *S. serrata* e devem desempenhar diferentes funções na resposta celular frente à infecção viral (LIU, QIAN, YAN, 2011). Em nosso trabalho encontramos uma diminuição na produção de AK 12 e 48 horas após a infecção viral, porém no resultado encontrado nos animais de campo verificou-se que o nível de AK se manteve constante nos dois grupos (controle e infectado), provavelmente devido à infecção viral persistente e possível processo de acomodação no animal infectado em campo em resposta ao vírus da mancha branca, já que se tratava da mesma proteína (FLEGEL, PASHARAWIPAS, 1998; FLEGEL, 2007; FLEGEL, SRITUNIALUCKSANA, 2011).

(Spot 426) As caspases são efetores centrais na apoptose desempenhando um papel importante no processo antiviral de muitos organismos incluindo os camarões pela eliminação de células infectadas por viroses (O'BRIEN, 1998; GRANJA et al., 2006; WANG et al., 2008). Foi demonstrado que 24 horas após a infecção por WSSV o núcleo da célula já está preenchido com vírions envelopados e não envelopados (WONGPRASERT et al., 2003). Neste estágio, o mecanismo pode não ser tão eficaz para evitar a morte do animal. Em nosso trabalho a caspase-2 teve sua expressão aumentada 24 horas após a infecção o que demonstra uma resposta do animal ao WSSV como forma de contrar a infecção viral através da apoptose, porém nesta fase este mecanismo irá favorecer ao vírus, visto que o mesmo já estará apto para infectar outras células (WONGPRASERT et al., 2003; BARRACCO, PERAZZOLO, ROSA, 2007). (Spot 528) Receptor de laminina é necessário para a montagem e/ou estabilidade da subunidade ribossômica 40S. Importante para o processamento da subunidade ribossômica 20S precursora para 18S rRNA maduro em uma etapa final da maturação das subunidades ribossômicas 40S e vital para o camarão *L. vannamei* na síntese protéica (PHIWSAIYA et al., 2010). Isso explicaria o fato pelo qual esta proteína teve sua expressão suprimida no grupo infectado 48 horas, provavelmente um mecanismo de ação viral para impedir a indução de apoptose nas células infectadas do hospedeiro. Desta forma, favorecendo uma maior atividade de síntese no

processo de infecção viral. (*Spot 551*) Proteína ribossomal 60S em estudos recentes foi demonstrado que quando ligada à subunidade 40S pela proteína QM é responsável pela indução de apoptose celular (PEREIRA, 2009). Estudos mostraram que a depleção de unidades da proteína ribossomal 60S está associada com a inibição da proliferação celular e apoptose, onde a p53 desempenha papel central neste processo como na *Drosophila melanogaster* (YAN, XIA, MIAN, 2010). Aparentemente, a proteína QM participa de processos diferentes na defesa antiviral, indicando um papel importante desta proteína na defesa contra patógenos. De acordo com trabalho de Müller (2009) camarões infectados aumentaram a transcrição para o gene da QM provavelmente como forma de defesa contra o WSSV. No presente trabalho verificamos uma diminuição da proteína ribossomal 60S nos animais infectados após 48 horas o que de acordo com os autores citados anteriormente poderia induzir apoptose provavelmente como resposta à infecção por este vírus.

(*Spot 566*) A calcitonina está envolvida no processo de metabolismo do cálcio durante o ciclo de muda em crustáceos (ARLOT-BONNEMAINS et al., 1986; LUQUET, MARIN, 2004). Teve sua expressão diminuída nos animais com vírus 6 horas após a infecção, possivelmente porque os animais estavam no período intermuda. (*Spot 466*) Metionina sintase é uma enzima envolvida na regeneração da metionina um aminoácido importante no metabolismo de camarões necessário na síntese protéica (RICHARD et al., 2011) teve sua expressão aumentada no grupo infectado após 12 horas, talvez pelo fato de estar em uma maior atividade de síntese. (*Spot 399*) kelch domain-containing (KD) é uma proteína ligada a regulação da p53 que desempenha papel central na integridade celular em resposta a fatores de estresse. A regulação fina da p53 é essencial para manutenção da integridade do genoma e proliferação celular normal. Significativamente, KD inibe transcrição da p53 e diminuição no seu nível estabiliza a atividade da p53, promove apoptose celular e mantém a célula na fase G1. Esse dado indica que a KD é uma reguladora crítica negativa da p53 e representa uma via para sua manutenção estável em células não estressadas (SUN et al., 2009). Nos resultados encontrados esta proteína teve seu nível de expressão diminuído nos animais infectados após 6 horas, o que possivelmente já indicaria o início de uma resposta do animal ao vírus nas primeiras horas de infecção.

(*Spot 446*) Proteína Kinase Âncora (PRKA) responsável por uma diversidade de respostas fisiológicas e componente da Tirosina Kinase. PRKA está ligada a células do citoesqueleto e ancoragem do cálcio

(MOCHLY-ROSEN, 1995). (*Spot 566*) Calcitonina, em insetos, uma família de peptídeos com homologia de sequência para calcitonina de vertebrados e tem sido implicada no controle da diurese, um processo que inclui mistura da hemolinfa. Foi descrita também em crustáceos como a lagosta *Homarus americanus* e o camarão *Palaemon serratus* durante o ciclo de muda mostrando diminuição do cálcio circulante na hemolinfa com o aumento da calcitonina (LAMHARZI, 1992; CHRISTIE et al., 2010).

(*Spot 343*) Myocyte enhancer factor (MEF) é uma proteína cálcio/calmodulina dependente e está envolvida no processo de diferenciação celular do músculo esquelético (MCKINSEY, ZHANG, OLSON, 2000), teve sua expressão aumentada no grupo infetado 24 horas, o que sugere uma regulação maior no mecanismo cálcio/calmodulina, onde alguns estudos especulam que a mesma medeia o processo de apoptose (YU et al., 2002). (*Spot 443*) Vacuolar ATP sintase, motor molecular ligado à membrana e converte a energia livre armazenada na molécula de ATP e do gradiente eletroquímico de cátions,  $H^+$  ou  $Na^+$ , através da membrana (LOLKEMA, BOEKEMA, 2003; NAKANO et al., 2006). (*Spot 477*) F1-ATP sintase beta similar a BP53 no camarão *L. vannamei* está envolvida no processo de infecção viral por WSSV. Desempenha papel central na síntese do ATP em vários organismos que foi originalmente descrito a partir da membrana interna da mitocôndria. A BP53 foi encontrada na superfície celular tanto de brânquias como de hemócitos, confirmando que F1-ATP sintase beta existe no camarão, servindo como receptor em invertebrados. Acredita-se, que a F1-ATP sintase beta pode estar relacionada com o processo de infecção do hospedeiro pelo WSSV (LIANG et al., 2010), o que justificaria a diminuição desta proteína nos animais infectados após 48h possivelmente um mecanismo de defesa do animal em resposta ao vírus. (*Spot 552*) Triosefosfato isomerase (TIM), esta enzima desempenha papel importante na glicólise, sendo essencial para uma produção eficiente de energia e atividade enzimática em todos os tecidos (SCHNEIDER, 2000; OLÁH et al., 2002). A sua expressão estava diminuída no grupo 48 horas após infecção com WSSV possivelmente, devido à diminuição na alimentação e metabolismo, causando letargia, frente ao avanço da infecção viral.

(*Spot 288*) Receptor de célula T cadeia delta, esta proteína atua no reconhecimento de antígenos através de fragmentos de peptídeos, relacionada à função de defesa nos vertebrados. Similar às proteínas de reconhecimento padrão em crustáceos (PRPs) as quais atuam no sistema de defesa imune inata (BARRACCO, PERAZZOLO, ROSA, 2007;

VAZQUEZ et al., 2009) já que os camarões não possuem anticorpos nem células T. Teve sua expressão apenas nos animais infectados e apareceu 72 horas após a infecção. (*Spot* 314) Imunoglobulina cadeia pesada (Ig), proteína encontrada em anticorpos ligada a função de defesa imunológica. Interesse tem sido focado nessas moléculas de defesa para reduzir doenças em camarões na aquicultura. Em invertebrados, várias moléculas superfamílias de imunoglobulinas (IgSF) foram caracterizadas e desempenham papel significativo na defesa inata. Além disso regiões conservadas foram encontradas entre hemocianina e Ig de cadeia pesada humana. Esses resultados mostram que, além do cobre vinculado na hemocianina tem também um domínio Ig-like conservado, o que confere novas funções para o pigmento respiratório multifuncional de crustáceos de acordo com trabalho de Zhang, Wang, Peng (2004) em *L. vannamei*. Estudos recentes mostraram que a hemocianina é responsável pelo transporte de oxigênio, atividade antiviral e profenoloxidase (DECKER, JAENICKE, 2004; ZHANG et al., 2004; TERWILLIGER, RYAN, 2006; LEI et al., 2008). Possivelmente a expressão desta proteína foi aumentada nos animais com vírus 72 horas após a infecção viral porque a mesma de acordo com Liu, Qian, Yan (2011) está envolvida na resposta imune contra o vírus do WSS. (*Spot* 350) Proteína ribossomal 28S, também encontrada na hemolifa do caranguejo *Scylla serrata* e teve uma indução maior após infecção com WSSV como neste trabalho.

(*Spot* 266) Apolipoproteína atua no transporte e aumento do colesterol e lipídeo com diferentes receptores (WILSON et al., 1991) sabe-se que esse mecanismo atua em humanos, entretanto, nada foi descrito ainda para crustáceos. (*Spot* 356) Proteína de transferência do colesterol ester, liga-se e neutraliza lipopolissacarídeos na membrana externa de bactérias Gram-negativas função semelhante à LGBP em crustáceos descrita por Lee, Wang, Soderhall (2000), são proteínas de reconhecimento padrão que se ligam a lipolissacarídeos tanto em bactérias Gram-negativas quanto a fungos e estão presente nos hemócitos levando a ativação do sistema proPO. Em camarões infectados por WSSV a LGBP foi aumentada na fase aguda da infecção demonstrando uma resposta também ao vírus (ROUX et al., 2002) o mesmo encontrado neste trabalho 72 horas após infecção, provavelmente como mecanismo de resposta à ação viral.

(*Spot* 285, 399) Ubiquitina desempenha papel importante no processo de proteólise e é uma proteína evolutivamente conservada. Atua em vários processos, degradação de proteínas na célula, progressão celular, biogênese de organelas, regulação transcricional, processamento

de antígenos e está envolvida no processo antiapoptose (CHEN et al., 2008; SHEN et al., 2009). Após infecção viral por WSSV no camarão funciona como proteína supressora. Desta forma, proporciona ao vírus chance de maior replicação viral e disseminação (FLEGEL, 2007; HE et al., 2009; SUDHAKARAN et al., 2011). De acordo com trabalho de Müller (2009) o gene da ubiquitina teve sua transcrição aumentada durante a infecção por WSSV. Neste trabalho nos grupos 24 e 72 horas após infecção a proteína ubiquitina teve maior expressão corroborando com resultados encontrados pelos autores citados anteriormente. Provavelmente, o vírus está utilizando este mecanismo para poder se propagar durante o processo infeccioso, bloqueando e degradando proteínas pró-apoptóticas. (*Spot 360*) Zinc finger são proteínas ligases relacionadas a inibição de proteínas pró-apoptose em camarão *L. vannamei* infectado com WSSV. Elas iniciam o processo de atividade da autoubiquitinação desencadeada por baculovirose. Desta forma, proteínas pró-apoptose do camarão são ubiquitinadas e posteriormente degradadas impedindo o processo de defesa (CROOK, CLEM, MILLER, 1993; HOYT, COFFINO, 2008). O que explica o aumento da expressão desta proteína nos animais infectados pelo WS 72 horas após infecção. Fato importante, pois durante este período os animais ficam moribundos, letárgicos, diminuem o consumo de alimento o que debilita muito o camarão, na maioria das vezes levando-o à morte.

## CONCLUSÕES

Em conclusão, o mapa proteômico de referência da 2-DE de brânquias infectadas com WSSV em *L. vannamei* foi estabelecido até 72 horas após infecção. As proteínas expressas diferencialmente foram identificadas por espectrometria de massa e mostraram ser proteínas que participam de várias funções celulares importantes, como por exemplo, respostas de defesa do hospedeiro, relação vírus-hospedeiro no processo de infecção, metabolismo energético e respiração celular. Esses dados aumentam nosso conhecimento das respostas moleculares do camarão contra o agente patogênico WSSV, o que possibilitará uma melhor compreensão na interação vírus-camarão e os processos antivirais envolvidos.

A partir destas informações, podem ser traçadas novas metas de estudo com base nas proteínas identificadas e assim aprimorar o conhecimento sobre as respostas moleculares do hospedeiro. A carcinicultura ainda busca ferramentas para lidar com este agente

patogênico e todos os mecanismos de infecção viral e proteínas envolvidas na resposta imune ainda não foram elucidados.

Esses resultados são importantes, pois podem contribuir para a seleção de reprodutores, para a sanidade dos animais cultivados e para a manutenção e a melhoria da produção. A presença do vírus da mancha branca é algo inevitável. A busca por metodologias novas de cultivo e maneiras adequadas de produção, aliadas ao monitoramento dos cultivos, dentro da perspectiva da presença do WSSV são os novos desafios concretos do setor.

## PERSPECTIVAS

- Conhecer melhor os mecanismos de respostas moleculares do animal frente à infecção por WSSV;
- Sequenciamento das proteínas identificadas de forma a aprimorar as informações já existentes sobre as defesas imunológicas do animal;
- Utilização destas proteínas do início da infecção como biomarcadores moleculares no combate ao vírus da mancha branca e no monitoramento do estado de saúde e sanitário dos camarões;
- Desenvolvimento de novas biotecnologias para o uso destas proteínas de maneira aplicada, por exemplo, microencapsulada ou nanoparticulada na ração ou nos viveiros, ajudando a melhorar a resposta imune do camarão;
- Seleção genética de animais com melhor resposta imunológica e tolerância ao vírus da mancha branca para compôr o plantel de reprodutores.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON, N. L.; MATHESON, A. D.; STEINER, S. 2000. Proteomics: applications in basic and applied biology. **Current Opinion in Biotechnology**, 11: 408-412.
- ARLOT-BONNEMAINS, Y.; VAN-WORMHOUDT, A.; FAVREL, P.; FOUCHEREAU-PÉRON, M.; MILHAUD, G.; MOUKHTAR, M. S. 1986. Calcitonin-like peptide in the shrimp *Palaemon serratus* (Crustacea, Decapoda) during the intermolt cycle. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 42: 419-420.

- ASTROFSKY, K. M.; ROUX, M. M.; KLIMPEL, K. R.; FOX, G. J.; DHAR, A. K. 2002. Isolation of differentially expressed genes from white spot virus (WSV) infected Pacific blue shrimp (*Penaeus stylirostris*). **Arch. Virol.**, 147: 1799–1812.
- BACHÈRE, E. 2000. Shrimp immunity and disease control. **Aquaculture**, 191: 3-11.
- BACHÈRE, E.; GUEGUEN, Y.; GONZALEZ, M.; DE LORGERIL, J.; ROMESTAND, B. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunol. Rev.** 198: 149-168.
- BAINY, A. C. D. 2000. Biomarker responses in penaeids caused by contaminants. **Aquaculture**, 191: 163-168
- BARBER, G. N. 2001. Host defense, viruses and apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, 8: 113-126.
- BARBIERI-JÚNIOR, R. C.; OSTRENSKY, A. 2002. Camarões marinhos: engorda. **Editora Aprenda Fácil**, Viçosa – MG, 370 p.
- BARRACCO, M. A. 2004. Mecanismos de resistência a doenças em crustáceos. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. A. P. (eds.), **Sanidade de organismos aquáticos**, Ed. Varela, pp. 49-72.
- BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. 2007. *Imunologia de crustáceos: com ênfase em camarões*. Florianópolis, SC, 80 p.
- BONAMI, J. R.; BERHELIMN, M.; MARI, J.; TRUMPER, B.; LIGHTNER, D. V. 1990. Purification and characterization of IHNV virus of penaeid shrimp. **J. Gen. Virol.**, 71: 2657-2664.
- BOONYARATPALIN, S.; SUPAMATTAYA, K.; KASORNCHANDRA, J.; DIREKBUSARACOM, S.; AEKPANITHANPONG, C.; CHANTANACHOOKLIN, C. 1993. Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of yellow head disease in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Fish Pathol.**, 28: 103–109.
- BOURCHOOKARN, A.; HAVANAPAN, P.; THONGBOONKERD, V.; KRITTANAI, C. 2008. Proteomic analysis of altered proteins in lymphoid organ of yellow head virus infected *Penaeus monodon*. **Biochimica et Biophysica Acta** 1784: 504-511.

- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254.
- BUENO, S. L. S. 1991. Doenças em camarões marinhos no Brasil. **Panorama da Aquicultura**, 8: 1-18.
- CERENIUS, L.; LIANG, Z.; DUVIC, B.; KEYSER, P.; HELLMAN, U.; PALVA, E. T.; IWANAGA, S.; SODERHALL, K. 1994. Structure and biological activity of a 1,3-b-D-glucan-binding protein in crustacean blood. **J. Biol. Chem.**, 269: 29462–29467.
- CERENIUS, L.; SODERHALL, K. 2004. The prophenoloxiase-activating system in invertebrates. **Immunol. Rev.**, 198: 116-126.
- CHAI, Y.; YU, S.; ZHAO, X.; ZHU, Q.; WANG, J. 2010. Comparative proteomic profiles of the hepatopancreas in *Fenneropenaeus chinensis* to white spot syndrome virus. **Fish & Shellfish Immunology**, 29: 480-486.
- CHANG, P. S.; CHEN, H. C.; WANG, Y. C. 1998. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobster by *in situ* hybridization. **Aquaculture**, 164: 233-242.
- CHANTANACHOOKIN, C.; BOONYARATPALIN, S.; KASORNCHANDRA, J.; DIREKBUSARAKOM, S.; EKPANITHANPONG, U.; SUPAMATAYA, K.; SRIURAIRATANA, S.; FLEGEL, T. W. 1993. Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-loke virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. **Dis. Aquat. Org.**, 2: 145-157.
- CHEN, L. L.; WANG, H. C.; HUANG, C. J.; PENG, S. E.; CHEN, Y. G.; LIN, S. J.; CHEN, W. Y.; DAI, C. F.; YU, H. T.; WANG, C. H.; LO, C. F.; KOU, G. H. 2002. Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. **Virology**, 301: 136-147.
- CHEN, Y. T.; LIN, C. H.; JI, W. T.; LI, S. K.; LIU, H. J. 2008. Proteasome inhibition reduces avian reovirus replication and apoptosis induction in cultured cells **Journal of Virological Methods**, 151: 95-100.

- CHONGSATJA, P.; BOUCHOOKARN, A.; LO, C.F.; THONGBOONKERD, V.; KRITTANAI, C. 2007. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus vannamei* hemocytes upon taura syndrome virus infection. **Proteomics**, 7: 3592-3601.
- CHONGSATJA, P.; BOURCHOOKARN, A.; LO, C. F.; THONGBOONKERD, V.; KRITTANAI, C. 2007. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus vannamei* hemocytes upon taura syndrome virus infection. **Proteomics**, 7: 3592-3601.
- CHOU, H. Y.; HUANG, C.Y.; WANG, C. H.; CHIANG, H. C.; LO, C. F. 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultures penaeid shrimp in Taiwan. **Disease of Aquatic Organisms**, 23: 165-173.
- CHRISTIE, A. E.; STEVENS, J. S.; BOWERS, M. R.; CHAPLINE, M. C.; JENSEN, D. A.; SCHEGG, K. M.; GOLDWASER, J.; KWIATKOWSKI, M. A.; PLEASANT, T. K. 2010. Identification of a calcitonin-like diuretic hormone that functions as an intrinsic modulator of the American lobster, *Homarus americanus*, cardiac neuromuscular system. **The Journal of Experimental Biology**, 213: 118-127.
- COSTA, S. W. D. 2010. Prospecção de fatores associados à manifestação e dispersão da enfermidade do vírus da síndrome da mancha branca em Santa Catarina. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, SC, 145 p.
- CROOK, N.E., CLEM, R.J., MILLER, L.K., 1993. An apoptosis inhibiting baculovirus gene with a zinc finger like motif. **Journal of Virology**, 67: 2168-2174.
- CUNHA, R. B; CASTRO, M. S.; FONTES, W. 2006. Espectrometria de massa de proteínas. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 36: 40-46.
- DECKER, H.; JAENICKE, E. 2004. Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. **Dev. Comp. Immunol.**, 28: 673-687.
- DESTOUMIEU-GARZON, D.; SAULNIER, D.; GARNIER, J.; JOUFFREY, C.; BULET, P.; BACHÈRE, E. 2001. Antifungal

peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. **Crustacean Immunity**, 14: 47070-47077.

DESTOUMIEUX, D.; BULET, P.; LOEW, D.; VAN DORSSELAER, A.; RODRIGUEZ, J.; BACHÈRE, E. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **Journal of Biological Chemistry**, 272: 28398–28406.

DU PASQUIER, L. 2001. The immune system of invertebrates and vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. 129: 1-15.

ELEFThERIANOS, I.; REVENIS, C. 2010. Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis. **Journal of Innate Immunity**, 3: 28-33.

EVERETT, H.; MCFADDEN, G. 1999. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. **Trends Microbiol.** 7: 160-165.

FAO, 2008. El estado mundial de la pesca y la acuicultura: Fisheries Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. 218 p. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. (acesso em: 10 de julho de 2009).

FEGAN, D. F.; CLIFFORD, H. 2001. Health management for viral diseases in shrimp farms. In: proceedings of the special session on sustainable shrimp farming. **The World Aquaculture Society**, Baton Rouge, Louisiana, USA, p. 168-198.

FIGUEIREDO, H.C.P., LOPES, C.O., LEAL, C. A. G. 2008. Imunidade de animais aquáticos. **Revista Panorama da Aquicultura** março/abril, 14-19.

FLEGEL, T. W. 1997. Major viral diseases of the Black Tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 13: 433-442.

FLEGEL, T. W. 2001. The shrimp response to viral pathogens. In: proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture. **The World Aquaculture Society**, Baton Rouge, LA, USA, p. 254-278.

- FLEGEL, T. W. 2007. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. **Developmental and Comparative Immunology**, 31: 217-231.
- FLEGEL, T. W.; ALDAY-SANZ, V. 1998. The crisis in Asian shrimp aquaculture: current status and future needs. **J. Appl. Ichtyol.**, 14: 269-273.
- FLEGEL, T. W.; LIGHTNER, D. V.; LO, C. F.; OWENS, L. 2008. Shrimp disease control: past, present and future, pp. 355-378. In: BONDAD-REANTASO, M. G.; MOHAN, C. V.; CRUMLISH, M.; SUBASINGHE, R. P. (eds.). **Disease in Asia Aquaculture VI**. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Phillipines. 2008, 505 p.
- FLEGEL, T. W.; PASHARAWIPAS, T. 1998. Active viral accommodation: a new concept for crustacean response to viral pathogens. In: Flegel, T. W. (eds.) **Advances in shrimp biotechnology**. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, p. 245-250.
- FLEGEL, T. W.; SRITUNIALUCKSANA, K. 2011. Shrimp molecular responses to viral pathogens. **Marine Biotechnology**, 13(4): 587-607.
- FUHRMAN, J. A. 1999. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. **Nature**, 399: 541-548.
- GAA. Aliança Global de Aquicultura. 2001. Disponível em: <<http://www.gaalliance.org>>. (acesso em: 30 de março de 2010).
- GALINDO-REYES, J. G.; VENEZIA, L. D.; LAZEANO-ALVAREZ, G.; RIVAS-MENDONZA, H. 2000. Enzymatic and osmorregulative alterations in white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to pesticides. **Chemosphere**, 40: 233-237.
- GARGIONI, R.; BARRACCO, M. A. 1998. Hemocytes of the Palemonids *Macrobrachium rosebergii* and *M. acanthurus*, and of the Penaeid *Penaeus paulensis*. **J. Morphology**, 236: 209-221.
- GESTEIRA, T. C. V. 2006. Enfermidades infecciosas registradas na carcinicultura brasileira. In: **Saúde de Organismos Aquáticos no Brasil**. cap. 7, 137-158 pp.
- GESTEIRA, T. C. V.; ANDRADE, T. P. 2002. Registro da ocorrência de algumas enfermidades em um cultivo do camarão *Litopenaeus*

- vannamei* (Boone, 1931) no Estado do Ceará. In: **Congresso Brasileiro sobre Crustáceos**, 2., São Pedro, 2002. Resumos...São Pedro, Sociedade Brasileira de Carcinologia, p.51.
- GRAF, C.; GERVAIS, N.; FERNANDES, M. P. C.; AYALA, J. A. 2003. Transmissão da síndrome da necrose idiopática muscular (NIM) em *Litopenaeus vannamei* **Revista da ABCC**, 4: 45-47.
- GRANJA, C. B.; VIDAL, O. M.; PARRA, G.; SALAZAR, M. Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. **Dis. Aquat. Organ.**, 2006, 68: 175-180.
- HE, F.; SYED, S. M.; HAMEED, A. S. S.; KWANG, J. 2009. Viral ubiquitin ligase WSSV222 is required for efficient white spot syndrome virus replication in shrimp. **Journal of General Virology**, 90: 1483-1490.
- HOFFMAN, J. A.; KAFATOS, F. C.; JANEWAY, C. A.; EZEKOWITZ R. A. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, 284: 1313-1318.
- HOYT, M. A.; COFFINO, P. 2008. Ubiquitin-independent mechanisms of substrate recognition and degradation by the proteasome. In: **Protein degradation: the ubiquitin-proteasome system and diseases**. Edited by MAYER, R. J.; CIECHANOVER, A.; RECHSTEINER, M. (eds.) WILEY-VCH chapter 5, p. 107-109.
- INOUE, K.; MIWA, S.; OSEKO, N.; NAKANO, H.; KIMURA, T.; MOMOYAMA, K.; HIRAOKA, M. 1994. Mass mortality of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicas* in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. **Fish Patol.**, 29: 149-158.
- INOUE, K.; YAMANO, K.; IKEDA, N.; KIMURA, T.; NAKANO, H.; MOMOYAMA, K.; KOBAYASHI, J.; MIYAJIMA, S. 1996. The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) which causes penaeid acute viremia (PAV). **Fish Pathol.**, 31: 39-45.
- IWANAGA, S.; LEE, B. L. 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. **Biochemistry and Molecular Biology**, 38: 128-150.
- JANEWAY-JUNIOR, C. A.; MEDZHITOV, R. 2002. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, 20: 197-216.

- JIMENEZ, R. 1992. Síndrome de Taura (resumen). Acuicultura del Ecuador. **Revista Especializada de la Cámara Nacional de Acuicultura**, 1: 1-16.
- JIRAVANICHPAISAL, P. 2005. White spot syndrome virus interaction with a freshwater crayfish. **Digital comprehensive summaries of Uppsala dissertations**. Uppsala University.
- JOHANSSON, M. W.; SODERHALL, K. 1985. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. **Journal of Comparative Physiology**, 156: 175–181.
- KASORNCHANDRA, J.; BOONYARATPALIN, B.; KHONGPRADIT, R.; AKPANITHANPONG, U. 1995. Mass mortality caused by systemic bacilliform virus in cultured penaeid shrimp, *Penaeus monodon*, in Thailand. **Asian Shrimp News**, 5: 2–3.
- KAWABATA, S. I.; IWANAGA, S. 1999. Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab. **Developmental and Comparative Immunology**, 23: 391–400.
- KILPATRICK, D. C. 2000. Handbook of Animal Lectins, New York: John Wiley.
- KIM, J. W.; DANG, C. V. 2005. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. **Trends Biochem. Sci.**, 30: 142–150.
- KOIZUME, N.; IMAMURA, M.; KADOTANI, T.; YAOI, K.; IWAHANA, H.; SATO, R. 1999. The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silkworm *Bombyx mori* is a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate-recognition domains. **FEBS Lett.**, 443: 139–143.
- LAMHARZI, N.; ARLOT-BONNEMAINS, Y.; MILHAUD, G.; FOUCHEREAU-PERON, M. 1992. Calcitonin and calcitonin gene-related peptide in the shrimp, *Palaemon serratus*: Variations during the molt cycle. **Comp. Bioch. Physiology**, 4: 679–682.
- LARSSON, N. G.; WANG, J.; WILHELMSSON, H.; OLDFORS, A.; RUSTIN, P.; LEWANDOSKI, M.; BARSH, G. S.; CLAYTON, D. A. 1998. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. **Nat. Genet.**, 3: 231–236.

- LEE, S. Y.; SODERHALL, K. 2001. Characterization of a pattern recognition protein, a masquerade-like protein, in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **J. Immunol.**, 166: 7319–7326.
- LEE, S. Y.; SODERHALL, K. 2002. Early events in crustacean innate immunity. **Fish & Shellfish immunology**, 12: 421-437.
- LEE, S. Y.; WANG, R.; SÖDERHÄLL, K. 2000. A lipopolysaccharide- and beta-1, 3-glucanbinding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Purification, characterization, and cDNA cloning. **J. Biol. Chem.**, 275: 1337–1343.
- LEI, K. Y.; FANG, L.; ZHANG, M. C.; YANG, H. J.; LUO, T.; XU, X. 2008. Difference between hemocyanin subunits from shrimp *Penaeus japonicus* in anti-WSSV defense. **Dev. Comp. Immunol.**, 32: 808–813.
- LI, D. F.; ZHANG, M. C.; YANG, H. J.; ZHU, Y. B.; XU, X. 2007.  $\alpha$ -integrin mediates WSSV infection. **Virology**, 368: 122-132.
- LIANG, Y.; CHENG, J.; YANG, B.; HUANG, J. 2010. The role of F1 ATP synthase beta subunit in WSSV infection in the shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Virology Journal**, 7: 144-153.
- LIGHTNER, D. V. 1996. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. **The World Aquaculture Society**, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 p.
- LIGHTNER, D. V. 1999. The penaeid shrimp TSV, IHNV, WSSV, and YHV: Current status in the Americas, available diagnostic methods, and management strategies. **Journal of Applied Aquaculture**, 2: 1-27.
- LIGHTNER, D. V. 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. **Journal of Invertebrate Pathology**, 106: 110-130.
- LIGHTNER, D. V.; BELL, T. A.; REDMAN, R. M. 1990. A review of the know hosts, geographical ranger and current diagnostic procedures for the virus diseases of cultured penaeid shrimp. p. 113-126. In: Advances in tropical aquaculture, **Actes de Colloques**, n.9, IFREMER, Thaiti.
- LIGHTNER, D. V.; REDMAN, R. M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods, **Aquaculture**, 164: 201–220.

- LIU, H.; SODERHALL, K.; GIRAVANICHPAISAL, P. 2009. Antiviral immunity in crustaceans. **Fish & Shellfish Immunology**, 27: 79-88.
- LIU, W.; QIAN, D.; YAN, X. 2011. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in hemolymph of *Scylla serrata* response to white spot syndrome virus infection. **Aquaculture** 314, 53-57.
- LO, C. F.; HO, C. H.; CHEN, C. H.; LIU, K. F.; CHIU, Y. L.; YEH, P. Y.; PENG, S. E.; HSU, H. C.; LIU, H. C.; CHANG, C. F.; SU, M. S.; WANG, C.H.; KOU, G. H. 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with special emphasis on reproduction organs. **Dis. Aquat. Org.**, 30: 33-72.
- LO, C. F.; LEU, J. H.; HO, C. H.; CHEN, C. H.; PENG, S. E.; CHEN, Y. T.; CHOU, C. M.; YEH, P. Y.; HUANG, C. J.; CHOU, H. Y.; WANG, C. H.; KOU, G. H., 1996. Detection of baculovirus associated with White spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms**, 25, 256: 133-141.
- LOH, P. C.; TAPAY, L. M.; LU, Y.; NADALA-JUNIOR, E. C. 1997. Viral pathogens of the penaeid shrimp. **Adv. Virus Res.**, 48: 263-312.
- LOLKEMA, J. S.; BOEKEMA, E. J. 2003. The A-type ATP synthase subunit K of *Methanopyrus kandleri* is deduced from its sequence to form a monomeric rotor comprising 13 hairpin domains. **FEBS**, 543: 47-50.
- LORGERIL, J.; GUEGUEN, Y.; GOARANT, C.; GOYARD, E.; MUGNIER, C.; FIEVET, J.; PIQUEMAL, D.; BACHÈRE, E. 2008. A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. **Molecular Immunology**, 45: 3438-3445.
- LUQUET, G.; MARIN, F. 2004. Biomineralisations in crustaceans: storage strategies. *C. R. Palevol* 3: 515–534.
- MACIEL, M. L. T.; MARQUES, M. R. F. 2003. Avaliação da ocorrência do vírus da síndrome da mancha branca (White Spot Syndrome Virus - WSSV) em cultivos do camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) através da Reação em Cadeia de Polimerase: investigação preliminar. Disponível em:

- <<http://www.civa2003.org>>. (acesso em: 30 de agosto de 2006), p. 231-236.
- MADHAVI, R.; JANAKIRAM, P.; JAYASREE, L.; MURTHY, P. S. N. 2002. Occurrence of concurrent infections with multiple viruses in *Penaeus monodon* from culture ponds of North coastal Andhra Pradesh. **Current Science**, 82, 11: 1397-1400.
- MAHMOUD, H.; RIGHETTI, P. G. 2005. **Proteomic today**: protein assessment and biomarkers using spectrometry, 2D electrophoresis, and microarray technology. 1. ed. Verona: Wiley Interscience, 426 p.
- MARQUES, M. R. F.; BARRACCO, M. A. 2000. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. **Aquaculture** 191: 23–44.
- MARQUES, M. R. F.; MOSER, J. R.; MÜLLER, I. C. 2006. Virologia de crustáceos e métodos moleculares de diagnóstico. **In: Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**. Org.: Ângela Teresa Silva-Souza. Maringá, PR: Abrapoa. p. 159-185.
- MARTIN, G. G.; GRAVES, L. 1985. Fine structure and classification of shrimp haemocytes. **Journal of Morphology** 185: 339–348.
- MARTINS, P. C. C. 2003. Influência das condições ambientais e das técnicas de manejo de produção sobre a ocorrência de enfermidades na criação de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, no Estado do Ceará. Tese (doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências, São Carlos, SP, 117 p.
- MAY, R.C.; MACHESKY, L. M. 2001. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. **Journal of Cell Science** 6: 1061-1077.
- MAYO, M. 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. **Arch. Virol.**, 147: 1655-1656.
- MAYO, M. A. 2002. Virus taxonomy. **Arch. Virol.**, 147, 5: 1071-1076.
- MCKINSEY, T. A.; ZHANG, C. L.; OLSON, E. N. 2000. Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium calmodulin dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5. **PNAS**, 26: 14400-14405.
- MERRIL, C. R.; WASHART, K. M. Protein detection methods. **In: Gel electrophoresis of proteins**. A practical approach, 3rd edition (ed. B.D. Hames), 1998, p. 53–92. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.

- MOCHLY-ROSEN, D. 1995. Localization of Protein Kinases by Anchoring Proteins: A Theme in Signal Transduction. **Science**, 268: 247-251.
- MOSER, J. R. 2005. Respostas bioquímicas do camarão branco, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), exposto ao inseticida carbofuran e determinação da prevalência natural do vírus da necrose hipodermal e hematopoiética – IHNNV. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Florianópolis, SC, 78 p.
- MOULLAC, G.; HAFFNER, P. 2000. Environmental factors affecting immune responses in crustacea. **Aquaculture**, 191: 121-131.
- MÜLLER, I. C. 2009. Genes diferencialmente expressos em camarões de cultivo *Litopenaeus vannamei* infectados pelo vírus da Síndrome da Mancha Branca e genotipagem de isolados geográficos brasileiros do vírus. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Florianópolis, SC, 150 p.
- MÜLLER, I. C.; ANDRADE, T. P. D.; TANG-NELSON, K. F. J.; MARQUES, M. R. F.; LIGHTNER, D.V. 2010. Genotyping of White spot syndrome virus (WSSV) geographical isolates from Brazil and comparison to other isolates from the Americas. **Disease of Aquatic Organisms**, 88: 91-98.
- NAKANO, H.; KOUBE, H.; UMEZAWA, S.; MOMOYAMA, K.; HIRAOKA, M.; INOUE, K.; OSEKO, N. 1994. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Epizootiological survey and infection trails. **Fish Pathol.**, 29: 135-139.
- NAKANO, T.; IKEGAMI, T.; SUZUKI, T.; YOSHIDA, M.; AKUTSU, H. 2006. A New Solution Structure of ATP Synthase Subunit c from *Thermophilic Bacillus* PS3, Suggesting a Local Conformational Change for HC-Translocation. **J. Mol. Biol.**, 358: 132-144
- NEUHOFF, V.; STAMM, R.; EIBL, H. 1985. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. **Electrophoresis**, 6: 427-448.

- NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. C.; GESTEIRA, T. C. V. 2004. Carcinicultura Ameaçada. **Panorama da Aquicultura**, v. 14, n. 83, p.37-51.
- O`BRIEN, V. 1998. Viruses and apoptosis. *J. Gen Virol.* 1998, 79: 1833-1845.
- O`FARREL, P. H. 1975. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, 10, 4007-4021.
- OIE. World Organization for Animal Health. 2003. Diagnostic Manual for Aquatic Animals. Available at: <<http://www.oie.int>>. (accessed May 2010).
- OIE. World Organization for Animal Health. 2005. Information Database (WAHID) Interface. Summary of Immediate notifications and Follow-ups. Outbreak report of White spot disease in Brazil. Available at: <<http://www.oie.int>>. (accessed May 2010).
- OIE. World Organization for Animal Health. 2006. Aquatic Animal Health Code, ninth ed. Office International des Epizooties, Paris, France. 202p.
- OLÁH, J.; OROSZ, F.; KESERÜ, G. M.; KOVÁRI, Z.; KOVÁCS, J.; HOLLÁN, S.; OVÁDI, J. 2002. Triosephosphate isomerase deficiency: a neurodegenerative misfolding disease. **Biochem. Soc. Trans.**, 2: 30-38.
- ORTEGA, I.; CAÑAS, B.; CALO-MATA, P.; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; GALLARDO, J. M. 2010. Identification of commercial prawn and shrimp species of food interest by native isoelectric focusing. **Food Chemistry**, 2: 569-574.
- PANDEY, A.; MANN, M. 2000. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, 405: 837-846.
- PADHI, A.; VERGHESE, B. 2008. Detecting molecular adaptation at individual codons in the pattern recognition protein, lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-glucan-binding protein of decapods. **Fish & Shellfish Immunol.**, 24: 638-648.
- PAREDES, L. E. 2005. O vírus da mancha branca no Brasil. Que fazer? **Revista ABCC**, 7, nº 1, p. 30.

- PERAZZOLO, L. M.; GARGIONI, R.; OGLIARI, P.; BARRACCO, M. A. A. 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfatepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. **Aquaculture**, 214: 19-33.
- PEREIRA, L. M. 2009. Clonagem, expressão, purificação estrutural da proteína ribossomal L10 humana recombinante. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear, São Paulo, SP, 87 p.
- PETRIZ, B. A.; GOMES, C.P.; ROCHA, L. A. O.; REZENDE, T. M. B.; FRANCO, O. L. 2012. Proteomics applied to exercise physiology: A cutting-edge technology. **Journal of Cellular Physiology**, 227: 885-898.
- PHIWSAIYA, K.; SAENAPI, S.; ANANTASOMBOON, G.; SRIPHAJIT, T.; BROWDY, C. L.; FLEGEL, T. W. 2010. Knocking down a Taura syndrome virus (TSV) binding protein *Lamr* is lethal for the whiteleg shrimp *Penaeus vannamei*. **Proceedings of The 7<sup>th</sup> Annual Conference of Marine Shrimp Culture of Thailand**. Oral presentation, Set. 7-8, 4p.
- POULOS, B. T.; TANG, K. F. J.; PANTOJA, C. R.; BONAMI, J. R.; LIGHTNER, D. V. 2006. Purification and characterization of myonecrosis virus of penaeid shrimp. **Journal of General Virology**. 87: 987-996.
- RAIDAL, S.; CROSS, G.; FENWICK, S.; NICHOLLS, P.; NOWAK, B.; ELLARD, K.; STEPHENS, F. 2004. **Aquatic Animal Health: Exotic Disease Training Manual**, 164 p.
- RATCLIFFE, N. A.; ROWLEY, A. F.; FITZGERALD, S. W.; RHODES, C. P. 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **Int. Rev. Cytol.**, 97: 183–350.
- RATTANAROJPONG, T.; WANG, H.; LO, C. F.; FLEGEL, T. W. 2007. Analysis of differently expressed proteins and transcripts in gills of *Penaeus vannamei* after yellow head virus infection. **Proteomics**, 7: 3809-3814.
- RICHARD, L.; VACHOT, C.; SURGER, A.; RIGOLET, V.; KAUSHIK, S. J.; GEURDEN, I. 2011. The effect of choline and cystine on the utilisation of methionine for protein

- accretion, remethylation and trans-sulfuration in juvenile shrimp *Penaeus monodon*. **British Journal of Nutrition**, 106: 825-835.
- ROBALINO, J.; CARNEGIE, R. B.; O'LEARY, N.; OUVRY-PATAT, S. A.; DE LA VEGA, E.; PRIOR, S.; GROSS, P. S.; BROWDY C. L.; CHAPMAN, R. W.; SCHEY, K. L.; WARR, G. 2009. Contributions of functional genomics and proteomics to the study of immune responses in the pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 128: 110-118.
- ROCH, P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. **Aquaculture**, 172: 125-145.
- ROCHA, I. P. 2007. Carcinicultura brasileira: desenvolvimento tecnológico, sustentabilidade ambiental e compromisso social. **Revista ABCC**. Rio Grande do Norte, 9, 1: 16 – 22.
- ROCHA, I. P.; ROCHA, M. M. R.; FREITAS, C. M. C. 1998. Panorama da Aquicultura Brasileira: Situação da Região Nordeste. In: **Contribuições ao desenvolvimento da aquicultura, em especial, da carcinicultura marinha do Brasil**. MCR. Aquicultura, 88p.
- RODRÍGUEZ, J.; MOULLAC, G. L. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. **Aquaculture**, 191:109-119.
- ROULSTON, A.; MARCELLUS, R. C. BRANTON, P. E. 1999. Viruses and apoptosis. **Annual Review of Microbiology**, 53: 577-628.
- ROUX, M. M.; PAIN, A.; KLIMPER, K. R.; DHAR, A. Y. 2002. The lipopolysaccharide and b-1,3-glucan binding protein gene is up-regulated in white spot virus-infected shrimp *Penaeus stylirostris*. **Journal of Virology**, 76: 7140-7149.
- SAHOO, P.; PILLAI, B. R.; MOHANTY, J.; KUMARI, J.; MOHANTY, S.; MISHRA, B. K. 2007. Differential affinity of the natural haemagglutinin of *Macrobrachium rosenbergii* towards of sex, size and moult stage on haemagglutination titre. **Indian J. Exp. Biol.**, 45: 1-5.
- SAHTOUT, A. H.; HASSAN, M. D.; SHARIFF, M. 2001. DNA fragmentation, an indicator of apoptosis in cultures black tiger

- shrimp *Penaeus monodon* infected with white spot syndrome virus (WSSV). **Disease of Aquatic Organisms**, 44: 155-159.
- SCHNEIDER, A. S. 2000. Triosephosphate isomerase deficiency: historical perspectives and molecular aspects. **Baillière's Clinical Haematology**, 1: 119-140.
- SEIFFERT, W. Q.; WINCKLER, S.; MAGGIONI, D. 2005. A mancha branca em Santa Catarina. **Revista Panorama da Aquicultura**, 15, 87: 51-53.
- SHEN, B.; ZHANG, Z.; WANG, Y.; WANG, G.; CHEN, Y.; LIN, P.; WANG, S.; ZOU, Z. 2009. Differential expression of ubiquitin-conjugating enzyme E2r in the developing ovary and testis of penaeid shrimp *Marsupenaeus japonicas*. **Molecular Biology Reports**, 36: 1149-1157.
- SINHA, A. K.; NOROUZITALLAB, P.; BARUAH, K. 2009. Antimicrobial peptides: possible therapeutics in aquaculture. **World Aquaculture Society**, 40, 04: 50-53.
- SIRIPAVEE, S.; JEONG, J. K.; SURIYANG, T.; SODERHALL, K. 2005. Exocytosis and proteomic analysis of the vesicle content of granular hemocytes from a crayfish. **Dev. Comp. Immunol.**, 29: 1017-1031.
- SMITH, V. J.; CHISHOLM, J. R. 2001. Antimicrobial proteins in crustaceans. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 484: 95-112.
- SMITH, V. J.; HAUTON, C. 2009. Immunoestimulation in crustacean aquaculture: Does it really promote defense against pathogens? **Journal of the World Aquaculture Society**, 40: 60-64.
- SODERHALL, K. 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization. A recognition mechanism of arthropods? A review. **Developmental and Comparative Immunology**, 4: 601-611.
- SODERHALL, K. 1999. Editorial. Invertebrate Immunity. **Dev. Comp. Immunol.**, 23: 263-266.
- SODERHALL, K.; ASPÁN, A.; DUVIC, B. 1990. The proPO system and associated proteins. Role in cellular communication in arthropods. **Res. Immunol.**, 141: 896-907.

- SODERHALL, K.; CERENIUS, L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Current Opinion in Immunology**, 10: 23-28.
- SOMBOONWIWAT, K.; CHAIKEERATISAK, V.; WANG, H.; LO, C. F.; TASSANAKAJON, A. 2010. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus monodon* hemocytes after *Vibrio harvey* infection. **Proteome Science**, 8: 1-11.
- SPEED, S. R.; BALDWIN, J.; WONG, R. J.; WELLS, R. M. G., 2001. Metabolic characteristics of muscles in the Spiny lobster *Jasus edwardsii*, and response to emersion during simulated live transport. *Comp. Biochem. Phys.* 128: 435-444.
- SRITUNYALUCKSANA, K.; SODERHALL, K. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. **Aquaculture**, 191: 53-69.
- SUDHAKARAN, R.; OKUGAWA, S.; MEKATA, T.; INADA, M.; YOSHIMINE, M.; NISHI, J.; OZONO, C.; KONO, T.; SAKAI, M.; ITAMI, T. 2011. Deciphering the DNA repair protein, Rad23 from kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*: full-length cDNA cloning and characterization. **Applied Microbiology**, 53: 63-72.
- SUN, L.; SHI, L.; LI, W.; YU, W.; LIANG, J.; ZHANG, H.; YANG, X.; WANG, Y.; LI, R.; YAO, X.; YI, X.; SHANG, Y. JFK, a Kelch domain-containing F-box protein, links the SCF complex to p53 regulation. **PNAS**, 25: 10195-10200.
- SUZUKI, T.; TAKAGI, T.; FURUKOHRI, T.; KAWAMURA, K.; NAKAUCHI, M. 1990. A calcium-dependent galactose-binding lectin from the tunicate *Polyandrocarpa misakiensis*. **The Journal of Biological Chemistry**, 265: 1274-1281.
- TAN, Y.; SHI, Z. 2008. Proteomic analyses of the shrimp white spot syndrome virus. **Virologica Sinica**, 23, 3: 157-166.
- TANG, K. F. J.; PANTOJA, C. R.; POULOS, B.T.; REDMAN, R. M.; LIGHTNER, D. V. 2005. *In situ* hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infectious with infectious myonecrosis virus (IMNV). **Dis. Aquat. Org.**, 63: 261-265.
- TERWILLIGER, N. B.; RYAN, M. C. 2006. Functional and phylogenetic analyses of phenoloxidases from brachyuran (Cancer

- magister) and branchiopod (*Artemia franciscana*, *Triops longicaudatus*) crustaceans. **Biol. Bull.**, 210: 38–50.
- TORNATORE, T. F. 2011. O papel da FAK (Focal Adhesion Kinase) na biogênese mitocondrial cardíaca induzida por estresse mecânico. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, Campinas, SP, 120 p.
- TSCHOPP, J.; THOME, M.; HOFMANNT, K.; MEINL, E. 1998. The fight of viruses against apoptosis. **Current Opinion in Genetics & Development** 8, 82-7.
- VARGAS-ALBORES, F., YEPIZ-PLASCENCIA, G., 2000. Beta glucan binding protein (BGBP) and its role in immune response. **Aquaculture**, 191: 13–21.
- VARGAS-ALBORES, F.; BARRACCO, M. A. 2001. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalves, con énfasis en pectínidos. In: **Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciência y Acuicultura** Maeda-Martínez, A. N. (ed.) cap. 7: 127-146.
- VAN DEN ENT, F.; AMOS, L. A.; LÖWE, J. 2001. Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. **Nature**, 413: 39-44.
- VASTA, G. R.; AHMED, H.; TASUMI, S.; ODOM, E. W.; SAITO, K. 2007. Biological roles of lectins in innate immunity: molecular and structural basis for diversity in self/non-self recognition. In: **Current Topics in Innate Immunity. Advances in Experimental Medicine and Biology**, 598: 389-406.
- VASTA, G. R.; QUESENBERRY, M.; AHMED, H.; O'LEARY, N. 1999. C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. **Dev. Comp. Immunol.**, 23: 401–420.
- VAZQUEZ, L.; MALDONADO, G.; AGUNDIS, C. 1997. Participation of a sialic acid specific serum lectin from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes in the recognition of non-self cells. **J. Exp. Zool.**, 279: 265-272.
- VAZQUEZ, L.; ALPUCHE, J.; MALDONADO, G.; AGUNDIS, C.; PEREYRA-MORALES, A. 2009. Immunity mechanisms in crustaceans. **Innate immunity**, 15, 3: 178-188.

- WANG, C. H.; LO, C. F.; LEU, J. H.; CHOU, C. M.; YEH, P. Y.; CHOU, H. Y.; TUNG, M. C.; CHANG, C. F.; SU, M. S.; KOU, G. H. 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat. Org.**, 23: 239-242.
- WANG, H.; WANG, H.; LEU, J. KOU, G.; WANG, A. LO, C. 2007. Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection. **Developmental and Comparative Immunology**, 31: 672-686.
- WANG, L.; ZHI, B.; WU, W.; ZHANG, X. 2008. Requirement for shrimp caspase in apoptosis against virus infection. **Developmental and Comparative Immunology**, 32: 706-715.
- WANG, W.; ZHANG, X. 2008. Comparison of antiviral efficiency of immune responses in shrimp. **Fish & Shellfish Immunol.**, 25: 522-527.
- WANG, X.; TAKAHASHI, N.; URAMOTO, H.; OKADA, Y. 2005. Chloride Channel Inhibition Prevents ROS-dependent Apoptosis Induced by Ischemia-Reperfusion in Mouse Cardiomyocytes. **Cellular Physiology and Biochemistry**, 16: 147-154.
- WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. 2002. **Proteomics in Practice: a laboratory manual of proteome analysis**. 1. ed. Weinheim, 316 p.
- WESTMAN-BRINKMALM, A.; BRINKMALM, G. 2008. A mass spectrometer's building blocks. In: **Mass spectrometry: instrumentation, interpretation, and applications**. (eds.) WILEY. USA, Rolf Ekman. 370 p.
- WILSON, C.; WARDELL, M. R.; WEISGRABER, K. H.; MAHLEY, R. W.; AGARD, D. A. 1991. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. **Science**, 5014: 1817-22.
- WONGPRASERT, K.; KHANOBDEE, K.; GLUNUKARN, S. S.; MEERATANA, P.; WITHYACHUMNARNKUL, B. 2003. Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white-spot syndrome virus. **Disease of Aquatic Organisms**, 55: 3-10.
- WONGTEERASUPAYA, C.; VICKERS, J. E.; SRIURAIRATANA, S.; NASH, G. L.; AKARAJAMON, A.; BOONSAENG, V.; PANYM,

- S.; TASSANAKAJON, A.; WHITHYACHUMNARNKUL, B.; FLEGEL, T. W. 1995. A non-occluded systemic baculovirus that occurs in the cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in black tiger prawn *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat. Org.**, 21: 69-77.
- YAN, L. H.; XIA, P. L.; MIAN, G. K. 2010. Depletion of ribosomal protein L8 impairs *Drosophila* development and is associated with apoptosis. **Science China**, 9: 1092-1097.
- YEATON, R. W. 1981. Invertebrate lectins: II Diversity of specificity, biological synthesis and function in recognition. **Dev. Comp. Immunol.**, 5: 535-545
- YOSHIDA, H.; OCHIAI, M.; ASHIDA, M. 1986.  $\beta$ -1,3-Glucan receptor and peptidoglycan receptor are present as separate entities within insect prophenoloxidase activating system. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 141: 1177-1184.
- YU, X. Q.; GAN, H.; KANOST, M. R. 1999. Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenoloxidase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 29: 585-597.
- YU, W.; NIWA, T.; MIURA, Y.; HORIO, F.; TERADAIRA, S.; RIBAR, T. J.; MEANS, A. R.; HASEGAWA, Y.; SENDA, T.; NIKI, I. 2002. Calmodulin Overexpression Causes  $Ca^{2+}$ -Dependent Apoptosis of Pancreatic  $\beta$  Cells, Which Can Be Prevented by Inhibition of Nitric Oxide Synthase. **Lab. Invest.**, 82: 1229-1239.
- ZHANG, A.; WU, Y.; LAI, H. W. L.; YEW, D. T. 2004. Apoptosis—a brief review. **Neuroembryology**, 3: 47-59.
- ZHANG, J.; LI, F.; JIANG, H.; YU, Y.; LIU, C.; LI, S.; WANG, B.; XIANG, J. 2010. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in lymphoid organ of *Fenneropenaeus chinensis* response to *Vibrio anguillarum* stimulation. **Fish & Shellfish Immunology**, 29: 186-194.
- ZHANG, X. B.; HUANG, C. H.; QIN, Q. W. 2004. Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*. **Antivir. Res.** 61: 93-99.
- ZHANG, X.; HUANG, C.; TANG, X.; ZHUANG, Y.; HEW, C. L. 2004. Identification of structural proteins from shrimp white spot

syndrome virus (WSSV) by 2DE-MS. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, 55: 229-235.

ZHI, B.; TANG, W.; ZHANG, X. 2011. Enhancement of Shrimp Antiviral Immune Response Through Caspase-Dependent Apoptosis by Small Molecules. **Mar. Biotechnol.**, 3: 575-583.