

Amanda da Silva Silveira

**AVALIAÇÃO DO PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES
POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA IMUNIDADE
INTESTINAL DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Diego Rosa

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

Florianópolis
2016

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

Silveira, Amanda

Avaliação do perfil transcricional de genes potencialmente envolvidos na imunidade intestinal do camarão *Litopenaeus vannamei* / Amanda Silveira ; orientador, Rafael Rosa ; coorientadora, Luciane Perazzolo. - Florianópolis, SC, 2016.
100 p.

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

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. imunidade intestinal. 3. *litopenaeus vannamei*. 4. biologia molecular. 5. imunologia de invertebrados. I. Rosa, Rafael. II. Perazzolo, Luciane. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

“Avaliação do perfil transcricional de genes potencialmente envolvidos na
imunidade intestinal do camarão *Litopenaeus vannamei*”

Por

Amanda da Silva Silveira

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da
Banca Examinadora (07/PPGBCD/2016) do Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.



Prof(a), Dr(a), Yara Maria Rauh Müller
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento

Banca examinadora:



Dr(a) Rafael Diego da Rosa (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Patrícia Hermes Stoco (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Carlos Rodrigo Zárate Bládes (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Evelise Maria Nazari (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 28 de Abril de 2016.

Este trabalho é dedicado aos meus
colegas e aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, professor Dr. Rafael Diego Rosa e professora Dra. Luciane Maria Perazzolo, pela oportunidade e por todos os ensinamentos.

Aos meus colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura, que me auxiliaram quando foi preciso, me apoiaram em todos os momentos e me ensinaram, principalmente, a importância do coletivo no ambiente de trabalho.

À CAPES pela bolsa e financiamento do projeto (Edital Ciências do Mar 2 nº 43/2013; Projeto CAPES/CIMAR 1974/2014).

À UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, pela estrutura fornecida e pelas oportunidades criadas, resultando em um ótimo ambiente de aprendizado.

Ao Laboratório de Protozoologia da UFSC, alunos e professores, que disponibilizaram equipamentos e ajudaram sempre que foi solicitado.

Aos membros da banca: professora Dra. Patrícia Hermes Stoco, professor Dr. Carlos Rodrigo Zárate Baldés, professora Dra. Evelise Maria Nazari, professora Dra. Margherita Anna Barracco e Dra. Carmen Simioni, pela disponibilidade e entusiasmo em participar desta defesa.

À toda a minha família, namorado e amigas, por acreditarem em mim, me apoiarem e darem todo o suporte necessário para que esse trabalho fosse concretizado.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original”.
(Albert Einstein)

RESUMO

Organismos aquáticos estão em constante contato, em seu ambiente natural, com uma grande quantidade de microrganismos. Em camarões, o sistema gastrointestinal funciona como uma importante barreira para a entrada de agentes infecciosos e na seleção da microbiota intestinal. No entanto, muito do que conhecemos sobre o sistema imune de camarões está restrito às reações de defesa que ocorrem hemolinfa e pouco ainda se conhece a respeito da sua imunidade intestinal. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil transcricional de genes associados ao sistema imune de crustáceos nas diferentes regiões do trato gastrointestinal do camarão *Litopenaeus vannamei*. Primeiramente, foi realizada uma análise semi-quantitativa da expressão de genes de diferentes categorias funcionais em quatro regiões do trato gastrointestinal (estômago, intestino médio, intestino posterior e hepatopâncreas) de animais estimulados ou não com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126 (inativada por calor). Dos 54 genes avaliados, 37 deles mostraram-se expressos no estômago, 16 no hepatopâncreas, 35 no intestino médio e 35 no intestino posterior. As categorias funcionais mais representadas foram os peptídeos antimicrobianos ou AMPs (estômago e intestinos), vias de sinalização celular (estômago e intestinos), proteínas de reconhecimento de padrões moleculares (hepatopâncreas) e sistema de RNA de interferência ou RNAi (intestino médio). Os níveis de expressão de 19 genes candidatos foram posteriormente quantificados por PCR quantitativa em tempo rela (RT-qPCR) no intestino médio de animais experimentalmente infectados com *V. harveyi* ATCC 14126 ou com o vírus da Síndrome da Macha Branca (WSSV). De maneira interessante, enquanto os genes *Litvan* ALF-A (AMPs), *Litvan* ALF-C (AMPs) e *LvDcr 2* (RNAi) foram induzidos em resposta à infecção bacteriana, a expressão do gene *Litvan* ALF-A (AMPs) foi reprimida frente à infecção pelo WSSV. A ocorrência da expressão de genes associados ao sistema imune no trato gastrointestinal evidencia a importância desses órgãos nos mecanismos de defesa de camarões, podendo estar envolvidos na manutenção da microbiota intestinal e/ou no controle de agentes infecciosos.

Palavras-chave: crustáceos; trato gastrointestinal; imunidade intestinal; sistema imune inato; expressão gênica.

ABSTRACT

Aquatic organisms are in constant contact, in their natural environment, with a large number of microorganisms. In shrimp, the gastrointestinal system acts as an important barrier to the entry of infectious agents and in the selection of the intestinal microbiota. However, much of our knowledge about shrimp immune system is restricted to the defense reactions occurring in the hemolymph and little is known about the intestinal immunity of these animals. Thus, the objective of this work was to characterize the transcriptional profile of crustacean immune-related genes in different regions of the gastrointestinal tract of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. Firstly, a semi-quantitative RT-PCR analysis was performed to evaluate the expression of genes from different functional categories in four regions of the gastrointestinal tract (foregut, midgut, hindgut and hepatopancreas) from animals stimulated or not with heat-killed *Vibrio harveyi* ATCC 14126. From the 54 analyzed genes, 37 showed to be expressed in foregut, 16 in the hepatopancreas, 35 in midgut and 35 in hindgut. The most representative functional categories were the antimicrobial peptides or AMPs (foregut, midgut and hindgut), the cell signaling (foregut, midgut and hindgut), the pattern recognition proteins (hepatopancreas) and the RNA interference system or RNAi (midgut). Then, the expression levels of 19 candidate genes was quantified by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) in the midgut of animals experimentally infected with the bacterium *V. harveyi* ATCC 14126 or the White Spot Syndrome Virus (WSSV). Interestingly, while the genes *Litvan* ALF-A (AMPs), *Litvan* ALF-C (AMP) and *LvDcr 2* (RNAi) showed to be induced in response to the bacterial infection, the expression of *Litvan* ALF-A (AMPs) was down-regulated upon the WSSV infection. The occurrence of the expression of immune-related genes in the gastrointestinal tract highlights the importance of these organs in the shrimp immune defense, whose may be involved in the maintenance of the intestinal microbiota and/or in the control of infectious agents.

Keywords: crustaceans; gastrointestinal tract; intestinal immunity; innate immune system; gene expression.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Exemplar adulto do camarão do Pacífico *Litopenaeus vannamei*. Arquivo do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (UFSC/CCB/LIAA).26
- Figura 2** – Órgãos do trato gastrointestinal do camarão *Litopenaeus vannamei*. Os diferentes órgãos do trato gastrointestinal estão indicados no dorso de um espécime juvenil (figura superior) e numa representação ilustrativa longitudinal (figura inferior): estômago (vermelho), hepatopâncreas (amarelo), intestino médio (verde) e intestino posterior (azul).29
- Figura 3** – Respostas imunológicas induzidas nos hemócitos de crustáceos. Vias de sinalização celular associadas às respostas de defesa de camarões peneídeos. Fonte: BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2014.35
- Figura 4** – Figura esquemática dos processos celulares dependentes do mecanismo de RNA de interferência (RNAi). dsRNA precursor gerado por RNA viral (esquerda) ou DNA viral (direita) durante a replicação (A). Durante a indução da resposta antiviral, o dsRNA é processado pela Dicer-2 em siRNAs, que se ligam ao complexo RISC contendo Ago2. Quando essa sequência encontra complementariedade no RNA viral, haverá a degradação desse material genético. O reconhecimento do dsRNA citoplasmático inicia uma cascata de sinalização, que resulta na ativação de efetores antivirais e a modulação positiva da maquinaria de RNAi (B). Fonte: SABIN; CHERRY, 2013.39
- Figura 5** – Esquema ilustrativo do ensaio de estímulo microbiano e das infecções experimentais. **-7 dias:** período de aclimatação dos animais. **Dia 0:** estímulo microbiano/infecções experimentais. **Dia 2:** coleta dos tecidos.45
- Figura 6** – Exemplo de classificação da intensidade das bandas no gel de agarose.49
- Figura 7** – Eletroforese em gel de agarose (1,5%), corado com Blue Green Loading Dye I, mostrando a amplificação de um fragmento de 846 pb correspondente ao gene β -actina. ES: estômago, HP: hepatopâncreas, IM: intestino médio, IP: intestino posterior e HE:

hemócitos; NE: animais não estimulados; E: animais estimulados com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126 inativada por calor.56

Figura 8 – Diagrama de Venn e esquema ilustrativo (fora de escala) indicando o número de genes associados ao sistema imune de crustáceos expressos nos hemócitos e nas diferentes regiões do trato gastrointestinal do camarão *Litopenaeus vannamei*. Estômago (vermelho), hepatopâncreas (amarelo), intestino médio (verde) e intestino posterior (azul).58

Figura 9 – Análise semi-quantitativa da expressão de 54 genes associados ao sistema imune de crustáceos no estômago de camarões após 48 h de um estímulo bacteriano em comparação a animais não estimulados (grupo *naïve*). Cada retângulo da figura acima corresponde ao nível de expressão gênica em cada condição (**NE**: não estimulados; **E**: animais estimulados com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126 inativada por calor), onde a intensidade da cor indica a magnitude de expressão, segundo a escala de cor presente na parte superior da figura. A cor branca corresponde à ausência de expressão enquanto que as diferentes tonalidades de vermelho correspondem aos diferentes níveis de expressão gênica. Os diferentes genes (representados à direita) estão classificados conforme as categorias funcionais as quais pertencem. ..60

Figura 10 – Análise semi-quantitativa da expressão de 54 genes associados ao sistema imune de crustáceos no hepatopâncreas de camarões após 48 h de um estímulo bacteriano em comparação a animais não estimulados (grupo *naïve*). Cada retângulo da figura acima corresponde ao nível de expressão gênica em cada condição (**NE**: não estimulados; **E**: animais estimulados com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126 inativada por calor), onde a intensidade da cor indica a magnitude de expressão, segundo a escala de cor presente na parte superior da figura. A cor branca corresponde à ausência de expressão enquanto que as diferentes tonalidades de vermelho correspondem aos diferentes níveis de expressão gênica (de baixa a alta expressão). Os diferentes genes (representados à direita) estão classificados conforme as categorias funcionais as quais pertencem.62

Figura 11 – Análise semi-quantitativa da expressão de 54 genes associados ao sistema imune de crustáceos no intestino médio de camarões após 48 h de um estímulo bacteriano em comparação a

animais não estimulados (grupo *naïve*). Cada retângulo da figura acima corresponde ao nível de expressão gênica em cada condição (**NE**: não estimulados; **E**: animais estimulados com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126 inativada por calor), onde a intensidade da cor indica a magnitude de expressão, segundo a escala de cor presente na parte superior da figura. A cor branca corresponde à ausência de expressão enquanto que as diferentes tonalidades de vermelho correspondem aos diferentes níveis de expressão gênica (de baixa a alta expressão). Os diferentes genes (representados à direita) estão classificados conforme as categorias funcionais as quais pertencem.64

Figura 12 – Análise semi-quantitativa da expressão de 54 genes associados ao sistema imune de crustáceos no intestino posterior de camarões após 48 h de um estímulo bacteriano em comparação a animais não estimulados (grupo *naïve*). Cada retângulo da figura acima corresponde ao nível de expressão gênica em cada condição (**NE**: não estimulados; **E**: animais estimulados com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126 inativada por calor), onde a intensidade da cor indica a magnitude de expressão, segundo a escala de cor presente na parte superior da figura. A cor branca corresponde à ausência de expressão enquanto que as diferentes tonalidades de vermelho correspondem aos diferentes níveis de expressão gênica (de baixa a alta expressão). Os diferentes genes (representados à direita) estão classificados conforme as categorias funcionais as quais pertencem.66

Figura 13 – Diagrama de Venn indicando o número de genes associados ao sistema imune expressos nas diferentes regiões do trato gastrointestinal de *Litopenaeus vannamei* estimulados ou não (grupo *naïve*) com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126 inativada por calor. **ES**: estômago, **HP**: hepatopâncreas, **IM**: intestino médio, **IP**: intestino posterior.68

Figura 14 – Estabilidade dos genes de referência. Coeficiente de estabilidade dos valores de Cq dos genes e da média geométrica de suas diferentes combinações: (A) *LvEF-1 α* , *LvActin* e *LvL40*; (B) *LvEF-1 α* , *LvActin*, *LvL40* e *LvRpS3A*; (C) *LvEF-1 α* , *LvActin* e *LvRpS3A*; (D) *LvActin*, *LvL40* e *LvRpS3A*; (E) *LvL40* e *LvRpS3A*; (F) *LvEF-1 α* e *LvActin*; (H) *LvEF-1 α* , *LvL40* e *LvRpS3A*; (J) *LvEF-1 α* e *LvRpS3A*; (K) *LvActin* e *LvL40*; (L) *LvActin* e *LvRpS3A*; (M) *LvEF-1 α* e *LvL40*; (N) *LvEF-1 α* e (O) *LvActin*. Coeficiente de estabilidade dos valores de Cq dos genes: (G) *LvL40*; (I) *LvRpS3A*; (N) *LvEF-1 α* ; (O) *LvActin*.69

Figura 15 – Perfil de expressão de genes expressos no intestino médio de camarões após 48 h de uma infecção experimental com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126. Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão. *Diferenças estatísticas entre as condições experimentais ($P < 0,05$) obtidas pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo Teste de Tukey. N: grupo *naïve* (não manipulados); S: grupo salina (água do mar estéril); V: grupo infectado com *V. harveyi* (6×10^7 CFU/animal). 71

Figura 16 – Perfil de expressão de genes expressos no intestino médio de camarões após 48 h de uma infecção experimental com o vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV). Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão. *Diferenças estatísticas entre as condições experimentais ($P < 0,05$) obtidas pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo Teste de Tukey. N: grupo *naïve* (não manipulados); W-: grupo injetado com inóculo livre de WSSV; W+: grupo infectado com WSSV (3×10^2 cópias genômicas/animal). 74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sequência dos iniciadores utilizados neste estudo.50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHPNS Síndrome da necrose hepatopancreática aguda

AMPs Peptídeos antimicrobianos

CFU Unidade formadora de colônia

Cq Ciclo de quantificação

dsRNA RNA de dupla-fita

MAMPs Padrões moleculares associados a microrganismos

MP Membrana peritrófica

MAS Solução de Alsever modificada

PCR Reação em cadeia da polimerase

proPO Pró-fenoloxidase

PRPs Proteínas de reconhecimento de padrões moleculares

qPCR PCR quantitativa em tempo real

RISC Complexo de silenciamento induzido por RNA

RNAi RNA de interferência

RT-PCR Transcrição reversa seguida de PCR convencional

RT-qPCR Transcrição reversa seguida de qPCR

siRNA RNA pequeno de interferência

WSSV Vírus da Síndrome da Mancha Branca

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
1.1. SISTEMA GASTROINTESTINAL DE CAMARÕES	29
1.1.1. Revestimento do intestino médio: membrana peritrófica	31
1.1.2. Microbiota intestinal	31
1.2. SISTEMA IMUNE DE CAMARÕES	33
1.2.1. Imunidade celular e humoral	33
1.2.2. Imunidade antiviral	37
1.2.3. Imunidade local e intestinal	40
2. HIPÓTESE	42
3. OBJETIVOS	43
3.1. OBJETIVO GERAL	43
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1. ANIMAIS	44
4.2. ESTÍMULO MICROBIANO E INFECÇÕES EXPERIMENTAIS ..	44
4.2.1. Estímulo microbiano	44
4.2.2. Infecção experimental bacteriana	45
4.2.3. Infecção experimental viral	45
4.3. COLETA DOS TECIDOS	46
4.4. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA	46
4.5. ESCOLHA DOS INICIADORES	47
4.6. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE PCR CONVENCIONAL (RT-PCR)	48
4.7. ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DE EXPRESSÃO GÊNICA ..	48
4.8. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)	54
4.9. ANÁLISE DOS RESULTADOS DE RT-qPCR	54
4.9.1. Seleção dos genes de referência	54
4.9.2. Cálculo de expressão relativa	54
4.9.3. Análises estatísticas	55
5. RESULTADOS	56
5.1. DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS AO SISTEMA IMUNE NO TRATO GASTROINTESTINAL	56
5.2. MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA NAS DIFERENTES REGIÕES DO TRATO GASTROINTESTINAL FRENTE A UM DESAFIO MICROBIANO	59
5.2.1. Estômago	59
5.2.2. Hepatopâncreas	61
5.2.3. Intestino médio	63
5.2.4. Intestino posterior	65

5.3. PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES EXPRESSOS NO INTESTINO MÉDIO FRENTE A INFECÇÕES BACTERIANAS E VIRAIS	68
6. DISCUSSÃO	77
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	86
7.1. CONCLUSÕES	86
7.2. PERSPECTIVAS	86
REFERÊNCIAS	87

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura apresentou uma grande expansão mundial nas últimas décadas, representando um importante papel no suprimento da demanda por proteína de origem animal para a alimentação humana, bem como para o crescimento econômico de diversos países (FAO, 2014). Além disso, a atividade contribui para a conservação de peixes, crustáceos e moluscos, ameaçados pela pesca industrial. O cultivo de crustáceos representa 9,7% (6,4 milhões de toneladas) do total produzido pela aquicultura e gera cerca de US\$30,9 bilhões (FAO, 2014). A carcinicultura se consolidou entre os anos de 1975 e 1985 devido à produção de pós-larvas criadas em laboratórios ou extraídas de águas costeiras. Em 2012, foi registrado um volume global de produção de camarões de 3,4 milhões de toneladas (FAO, 2014). As espécies de camarão mais cultivadas no mundo são o camarão-tigre-gigante *Penaeus monodon* (FABRICIUS, 1798) e o camarão do Pacífico *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) (**Figura 1**). No ano de 2013, *L. vannamei* representou 74,4% da produção mundial de peneídeos (FAO, 2014).

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



Arquivo do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (UFSC/CCB/LIAA).

O camarão branco representa um importante pilar na economia de países como China, Índia, Tailândia, Vietnã e Indonésia (LIU et al., 2014). Na América Latina, os maiores produtores são Equador, México e Brasil (FAO, 2012). No Brasil, a espécie foi introduzida na década de

80, inicialmente na região Nordeste, onde se adaptou bem às condições climáticas e ambientais encontradas. Em 2012, o Brasil produziu aproximadamente 70 mil toneladas de camarão para atender o mercado interno, sendo os estados do Ceará e Rio Grande do Norte os principais produtores nacionais (MPA, 2013). Em 1998, a espécie *L. vannamei* foi introduzida em Santa Catarina pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Estado de Santa Catarina (EPAGRI), com o intuito de viabilizar a carcinicultura no Estado.

A intensificação dos sistemas de produção e a utilização das práticas convencionais de cultivo, aliada à nutrição inadequada e a perturbações ambientais, são fatores que tem ocasionado intenso estresse no estado geral de saúde dos camarões, deixando-os mais propensos a doenças causadas por vírus, bactérias, fungos e parasitas. Surto de doenças têm se tornado um problema no desenvolvimento socioeconômico no panorama da aquicultura mundial e estima-se que nos últimos 15 anos as perdas globais tenham sido em torno de US\$ 15 bilhões (BOSTOCK et al., 2010; FLEGEL, 2012).

Entre as principais doenças de camarões cultivados, em termos de impacto econômico, estão aquelas causadas por vírus, que se destacam entre as mais severas (LIGHTNER et al., 2012). Além disso, sob condições de estresse, alguns microrganismos oportunistas podem se tornar patogênicos, como por exemplo, fungos filamentosos do gênero *Fusarium* spp. e bactérias do gênero *Vibrio* spp. (BACHERE et al., 2004; LIGHTNER, 2012).

Até o momento, alguns dos vírus que foram relatados como infecciosos para camarões peneídeos foram o parvovírus hepatopancreático (HPV), o vírus da infecção hipodermal e hematopoiética (IHHNV), o vírus da cabeça amarela (YHV), o vírus da síndrome de Taura (TSV), o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) e o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) (FLEGEL, 2006; LIGHTNER et al., 2012). Entre eles, o WSSV se mostrou como um dos mais devastadores por causar mortalidades que podem chegar a 100% de 2 a 7 dias após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos (CHOU HSIN-YIU et al., 1995). Esse vírus envelopado pertence à família Nimaviridae e possui um genoma de DNA dupla fita circular com replicação nuclear (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008). Ele é capaz de infectar todos os crustáceos da ordem Decapoda, infectando células de diversos tecidos dos animais (KOU et al., 1998). Uma vez que o WSSV infecta as células imunocompetentes dos crustáceos (hemócitos), o

sistema imunológico desses animais fica seriamente comprometido desde o início do processo infeccioso (WANG et al., 2002).

O primeiro relato do WSSV em cultivos ocorreu em Taiwan em 1992 e, desde então, tem sido considerado um dos mais devastadores patógenos para a carcinicultura (FLEGEL, 2012; LIGHTNER, 2012). No estado de Santa Catarina, o WSSV foi o principal responsável pelo declínio da carcinicultura cuja produção era de 4.189 toneladas em 2004, passando para 180 toneladas em 2014 (EPAGRI, 2015). Até o presente momento, a atividade não se restabeleceu no Estado. Somado a isto, a partir de 2005, a presença do WSSV foi constatada em cultivos de vários estados do Nordeste brasileiro (CAVALLI et al., 2010).

Entre as bactérias causadoras de doenças, as que pertencem ao gênero *Vibrio* spp. são consideradas as mais comuns na carcinicultura. Elas fazem parte da microbiota natural de camarões (RUNGRASSAMEE et al., 2013), mas podem se tornar patógenos primários quando a população bacteriana aumenta. Em infecções secundárias, espécies de *Vibrio* spp. estão comumente associadas a perdas nos estágios larvais ou em juvenis (SAULNIER et al., 2000). As espécies mais frequentemente associadas a mortalidades em camarões são *V. harveyi*, *V. alginolyticus* e *V. penaeicida* (SUNG et al., 2001).

Uma vibriose emergente em camarões peneídeos que vem causando grandes perdas econômicas nas fazendas de cultivo é a doença da necrose hepatopancreática aguda (AHPNS), anteriormente conhecida por síndrome da mortalidade precoce (EMS). O agente etiológico da EMS foi identificado como sendo cepas de *V. parahaemolyticus* portadoras de um gene específico que não é encontrado em outras cepas (ZORRIEHZAHRA; BANAEDERAKHSHAN, 2015). A AHPNS afeta pós-larvas de 20 a 30 dias e, frequentemente, causa 100% de mortalidade. Essa enfermidade foi inicialmente descrita na China em 2010 (FAO, 2012). Em 2011 foi confirmada no Vietnã e na Malásia (LIGHTNER et al., 2012), no ano seguinte alcançou a Tailândia (FLEGEL, 2012) e, em seguida, o México (NUNAN et al., 2014). Até o momento, não há relatos dessa vibriose no Brasil.

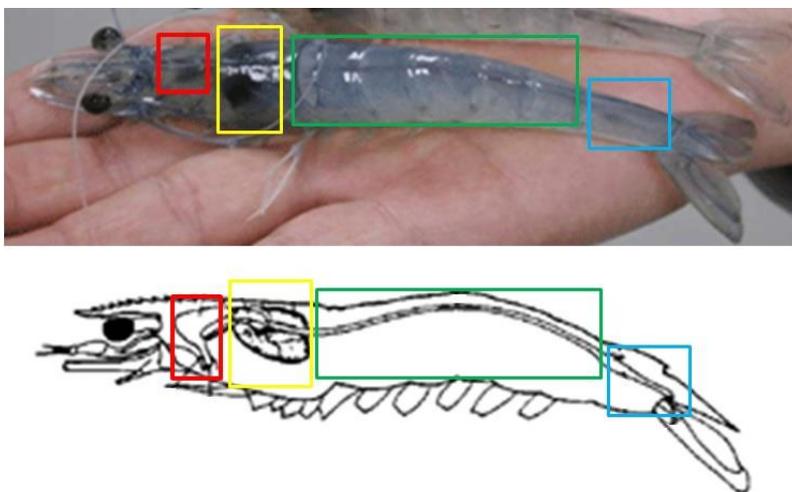
Frente a esses microrganismos causadores de doenças, os camarões possuem mecanismos de defesa. A carapaça e cutícula externa desses animais oferecem uma eficiente barreira contra a entrada de microrganismos patógenos (MARTIN et al., 2006), porém alguns epitélios desprovidos de proteção física como o intestino médio constituem um local de vulnerabilidade para a entrada de agentes invasores (LOVETT; FELDER, 1990). Em muitos casos, os

mecanismos de defesa do trato gastrointestinal são suficientes para proteger o hospedeiro de patógenos, mas alguns deles conseguem ultrapassar essas barreiras e entrar no corpo do animal, podendo causar doenças (SOONTHORNCHAI et al., 2010).

1.1. SISTEMA GASTROINTESTINAL DE CAMARÕES

O trato gastrointestinal dos peneídeos é tubular, apresenta uma abertura anterior (boca) e outra posterior (ânus), sendo dividido em intestino anterior (esôfago e estômago), intestino médio e intestino posterior (reto e ânus), e inclui ainda a glândula digestiva hepatopâncreas (**Figura 2**). Os intestinos anterior e posterior são revestidos por uma camada quitino-proteica que é renovada a cada muda (GUILLAUME; CECCALDI, 1999) e o intestino médio é revestido por uma membrana peritrófica acelular e porosa, que permite a absorção seletiva de nutrientes e é composta por fibrilas quitinosas associadas a glicoproteínas e proteoglicanas (MCGAW; CURTIS, 2013; WANG et al., 2012a).

Figura 2. Órgãos do trato gastrointestinal do camarão *Litopenaeus vannamei*.



Os diferentes órgãos do trato gastrointestinal estão indicados no dorso de um espécime juvenil (figura superior) e numa representação ilustrativa longitudinal (figura inferior): estômago (vermelho), hepatopâncreas (amarelo), intestino médio (verde) e intestino posterior (azul).

A boca é formada por um labro rígido e circundada por apêndices (maxilas, maxílulas, mandíbulas e maxilípedes) especializados na quimiorrecepção e apreensão dos alimentos. O esôfago possui função básica de conduzir o alimento ao estômago. O estômago ou proventrículo é dividido em porção anterior (câmara cardíaca) e posterior (câmara pilórica), separadas por uma válvula cardio-pilórica. As duas câmaras são compostas por peças calcáreas articuladas movidas por músculos específicos localizados na parede externa. Na câmara cardíaca, estão algumas peças mais fortes e mais calcificadas (ossículos, discos e dentes), formando o moinho gástrico, cuja função é triturar os alimentos. Na câmara pilórica, encontram-se peças menores e menos calcificadas que participam do processo de filtração. A ação combinada dessas peças possibilita a maceração do alimento e impede a passagem de grandes partículas para o intestino médio. A câmara pilórica é dividida em porção dorsal e ventral. A porção dorsal possui sulcos laterais que levam o alimento ao intestino médio, em contrapartida, a porção ventral possui um sistema de inúmeras microcerdas que filtram as partículas que passam para a glândula digestiva (filtro-prensa). Apenas partículas menores que 1 μm e fluido gástrico passam por essa rede de cerdas (LIN, 2000).

A glândula do intestino médio dos peneídeos, como também é chamado o hepatopâncreas, está localizada na região cefalotorácica e é constituída por dois lóbulos simétricos, que podem representar até 6% da massa corporal dos animais. Ele é formado por uma centena de túbulos cegos que desembocam em câmaras que se abrem na porção pilórica do estômago. No interior dos túbulos se distinguem zonas de diferenciação celular e zonas responsáveis pela secreção de enzimas e absorção de nutrientes. Essas enzimas são secretadas para o estômago, onde são distribuídas ao longo do lúmen do intestino médio em um gradiente de concentração (ALEXANDRE et al., 2014). O hepatopâncreas possui funções fundamentais no metabolismo (armazenamento de substâncias de reservas, digestão e absorção de nutrientes, manutenção de reservas minerais e substâncias orgânicas, metabolismo de lipídeos e carboidratos, distribuição das reservas estocadas durante o período de intermuda, catabolismo de compostos orgânicos, síntese e secreção de enzimas digestivas) (CECCALDI, 1997), mas também no sistema imunológico por ser um importante sítio de produção e secreção de imunofetores para a hemolinfa (GROSS et al., 2001; LUO et al., 2006).

O intestino médio se estende dorsalmente desde o final da câmara pilórica do estômago, ao longo dos segmentos abdominais, até o reto.

Suas paredes apresentam cecos ou divertículos volumosos, onde se distinguem células nervosas, hemócitos e células endócrinas. Nessa região, são secretados o muco e a película de quitina que envolve as fezes, película essa que não impede a absorção dos nutrientes residuais. É no intestino médio que ocorre parte da digestão e absorção de nutrientes (DALL; MORIARTY, 1983). Finalmente, o intestino posterior, formado pelo reto e ânus, é tubular e serve para comprimir as fezes antes de serem eliminadas através do ânus, localizado na parte distal do tórax no abdômen inferior.

1.1.1. Revestimento do intestino médio: membrana peritrófica

A membrana peritrófica (MP) é uma estrutura acelular e porosa que reveste o intestino médio, a qual serve como barreira entre o lúmen e o epitélio intestinal (WANG et al., 2012b) e protege o intestino de abrasões mecânicas. Além disso, a MP estabelece subdivisões funcionais no lúmen do intestino para facilitar a digestão, prevenindo a ligação de patógenos e materiais não específicos às células epiteliais, servindo assim como um ultrafiltro para regular as trocas de nutrientes e enzimas digestivas (PETERS, 1992). A MP é composta por fibrilas de quitina associadas com glicoproteínas e proteoglicanos (HEGEDUS et al., 2009).

O processo digestivo é auxiliado pela compartimentalização do lúmen do intestino em espaço endoperitrófico (entre o epitélio e a membrana peritrófica) e espaço ectoperitrófico (entre a membrana peritrófica e o lúmen), e também pela imobilização de enzimas digestivas, permitindo a aquisição eficiente de nutrientes e reutilização de enzimas hidrolíticas. A MP envolve as fezes e permanece intacta durante várias horas. Entre as enzimas presentes na membrana peritrófica, está a quitinase, responsável por romper ligações glicosídicas de quitina. Ela controla a porosidade da membrana, influenciando no processo digestivo (SHEN; JACOBS-LORENA, 1998).

1.1.2. Microbiota intestinal

O ambiente marinho possui uma alta concentração de bactérias (até 10^7 células por mililitro) (MAEDA, 2002) que podem se associar a diferentes órgãos e tecidos dos organismos ali presentes. As populações bacterianas podem estabelecer relações transitórias ou residentes, e muitos fatores como a estrutura interna, a MP, dieta, condições do

hospedeiro e estação do ano, podem afetar as populações bacterianas intestinais (HARRIS, 1993).

A microbiota intestinal de *L. vannamei* é dominada por bactérias do filo Proteobacteria, com baixa abundância dos filos Firmicutes e Bacteroidetes (XIONG et al., 2015). Entre os grupos de Proteobacteria foram identificadas as bactérias dos gêneros *Vibrio* spp. e *Pseudoalteromonas* spp. associadas à microbiota natural do trato gastrointestinal, sendo o primeiro o mais abundante (GOMEZ-GIL et al., 1998; LIU et al., 2011; TZUC et al., 2014). Ambos os gêneros são amplamente distribuídos no ambiente marinho e possuem associação com uma grande variedade de organismos, o que se deve a capacidade de sobreviver e se reproduzir sob as condições do trato gastrointestinal (HOFFMAN; DECHO, 2000). Em *P. monodon*, bactérias do filo Proteobacteria também são as mais abundantes do intestino (CHAIYAPECHARA et al., 2012), mas outros filos como Actinobacteria, Fusobacteria, Bacteroides e Firmicutes podem ser ainda encontrados (RUNGRASSAMEE et al., 2013).

As comunidades bacterianas podem se diferenciar substancialmente entre os diferentes habitats, as quais dependem do estado de saúde do hospedeiro. A variação da microbiota entre os diferentes estados de saúde não é um processo aleatório, onde a mudança pode ocorrer gradualmente (WANG; WANG, 2015). Além do trato gastrointestinal, outros órgãos internos de camarões também podem ser colonizados por microrganismos comensais (FAGUTAO et al., 2009; PONPRATEEP et al., 2012). Segundo alguns autores, a hemolinfa também pode conter bactérias, as quais se proliferam significativamente em situações de estresse ou quando a expressão de efetores imunológicos são temporariamente reprimidos através de silenciamento pós-transcricional (WANG; WANG, 2015).

Assim como ocorre no trato digestório de humanos e insetos, acredita-se que a microbiota natural de camarões seja importante não só nos processos de digestão e absorção de nutrientes, mas também na prevenção e no combate a infecções (BROWN; SADARANGANI; FINLAY, 2013; RAMIREZ et al., 2013). A microbiota natural pode formar uma proteção que dificulta o estabelecimento dos patógenos através da competição por recursos e/ou produção de componentes antimicrobianos e/ou estimulação do sistema imune do hospedeiro (OELSCHLAEGGER, 2010). Apesar de as bactérias intestinais de animais aquáticos terem um papel singular no desenvolvimento do trato gastrointestinal, nutrição, respostas imunes e resistência a doenças, as funções e os fatores que afetam esses microrganismos não são ainda

bem compreendidos (TANG; TURK; GROSSART, 2010). No entanto, sabe-se que, sob situações de estresse, o equilíbrio das populações de microrganismos que constituem a microbiota pode ser rompido, abrindo uma frente para que patógenos oportunistas se disseminem, podendo causar infecções (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014).

1.2. SISTEMA IMUNE DE CAMARÕES

Para se proteger dos patógenos, os camarões contam com eficientes mecanismos de defesa. No entanto, eles não contam com o arsenal do sistema imune adaptativo presente nos vertebrados mandibulados, assim, eles não possuem anticorpos e células de memória (linhagem linfocítica) que lhes conferem uma proteção altamente específica e a longo prazo (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014).

A primeira linha de defesa é proporcionada por uma carapaça externa rígida ou exoesqueleto. Além disso, grande parte do trato gastrointestinal é revestida por quitina e consiste em um ambiente ácido e cheio de enzimas digestivas e efetores antimicrobianos (SOONTHORNCHAI et al., 2010). De maneira geral, as respostas de defesa mais conhecidas em crustáceos são aquelas ligadas à hemolinfa, tecido fluido responsável por transportar nutrientes, excretas, hormônios, oxigênio e componentes do sistema imune. A hemolinfa é composta por uma fração celular, que contém as células imunocompetentes ou hemócitos, e uma fração líquida (plasma), onde se encontram dissolvidos os fatores humorais.

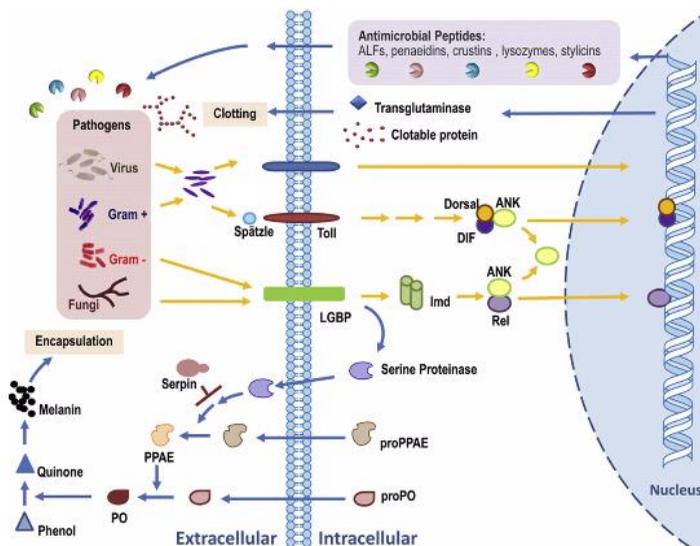
1.2.1. Imunidade celular e humoral

As respostas imunológicas celulares e humorais atuam de forma integrada, porém são os hemócitos os responsáveis pela grande maioria das reações de defesa conhecidas em crustáceos. Essas respostas de defesa estão baseadas no reconhecimento de padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs) por proteínas de reconhecimento de padrões moleculares (PRPs) presentes na superfície ou na membrana endossomal dos hemócitos ou em solução no plasma (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). Os MAMPs podem ser polissacarídeos e glicoproteínas, como os lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas, peptidoglicanas e ácido lipoteicoico de bactérias Gram-positivas, glicanas de fungos e ácidos nucleicos de vírus, como DNA simples-fita e RNA dupla-fita (dsRNA) (CHRISTOPHIDES; VLACHOU; KAFATOS, 2004; JENSEN; THOMSEN, 2012) e ativam diferentes respostas celulares e humorais de

defesa, que atuam em sinergismo na proteção contra os patógenos (**Figura 3**).

As reações celulares de defesa dos crustáceos compreendem a fagocitose de agentes invasores, infiltração hemocitária, formação de cápsulas e nódulos e armadilhas extracelulares de ácidos nucleicos (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). A ativação dessas respostas podem acionar diferentes vias de sinalização celular (Toll, IMD e JAK/STAT) que levam à indução de diferentes efetores imunológicos (**Figura 3**). O envolvimento das vias Toll, IMD e JAK/STAT na regulação das respostas imunológicas de invertebrados foi intensivamente estudado na mosca da fruta *Drosophila melanogaster*. O receptor responsável pela transdução de sinal (Toll) reconhece a citocina spätzle que se encontra no plasma na forma inativa e é processada via uma cascata proteolítica, na sua forma ativa após o reconhecimento de bactérias Gram-positivas e/ou fungos. A via IMD, comparativamente, é ativada através do reconhecimento de bactérias Gram-negativas por proteínas que reconhecem peptidoglicanas (PGRP) (CIRIMOTICH et al., 2012). Em camarões, muitos homólogos das vias Toll e IMD de *Drosophila* têm sido identificados, e suas funções na resposta imune contra bactérias e vírus têm sido verificadas (LI; XIANG, 2013).

Figura 3. Respostas imunológicas induzidas nos hemócitos de crustáceos.



Vias de sinalização celular associadas às respostas de defesa de camarões peneídeos. Fonte: BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014.

A via JAK/STAT (*Janus Kinase-Signal Transducers and Activators of Transcription*), que inclui o receptor *Domeless*, a JAK tirosina quinase Hopsotch (Hop) e o fator de transcrição STAT, está envolvida na regulação de diferentes respostas de defesa (AGAISSE; PERRIMON, 2004). Homólogos da proteína STAT foram identificados em diferentes espécies de camarões, como *L. vannamei*, *Fennepenaeus chinensis*, *P. monodon* e *Marsupenaeus japonicus* (SUN et al., 2011; WEN et al., 2013). Em *L. vannamei*, essa via parece estar diretamente implicada nas defesas antivirais contra o WSSV (CHEN et al., 2011; WEN et al., 2013). No entanto, estudos muito recentes demonstraram que durante a replicação do WSSV, miRNAs (microRNAs) codificados pelo seu genoma promovem o silenciamento de componentes-chave da via JAK/STAT de *L. vannamei*, favorecendo assim a infecção viral (REN et al., 2015).

No caso dos insetos, as vias de sinalização além de participar da regulação da expressão de peptídeos antimicrobianos (AMPs) no corpo gorduroso, elas atuam ainda na manutenção da microbiota natural presente no lúmen do intestino (CIRIMOTICH et al., 2010).

Em camarões, por sua vez, pouco se conhece ainda a respeito do envolvimento das vias imunológicas de sinalização celular no controle da microbiota endobionte e na regulação da expressão de AMPs. Em peneídeos, quatro principais famílias de AMPs foram descritas e caracterizadas: as peneíginas (sub-grupos PEN1/2 a PEN5), os fatores anti-lipopolissacarídeos (Grupos ALF-A a ALF-E), as crustinas (Tipos I a Tipo IV) e as stylicinas (I e II) (ROSA; BARRACCO, 2010). Essas famílias são compostas por diferentes membros e podem apresentar uma atividade antimicrobiana contra diferentes grupos de microrganismos, como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos (TASSANAKAJON et al., 2010). Além de atuarem nas respostas de defesa, alguns AMPs estão envolvidos na manutenção da microbiota endobionte naturalmente presente na hemolinfa de animais saudáveis (WANG; WANG, 2015).

Outras respostas humorais de defesa também podem ser ativadas após o reconhecimento dos agentes invasores, como a ativação do sistema da pró-fenoloxidase (proPO), a coagulação da hemolinfa e a aglutinação mediada por lectinas (**Figura 3**). O sistema proPO é uma das principais respostas imunoefetoras, desencadeada por bactérias Gram-negativas e fungos (AMPARYUP; CHAROENSAPSRI; TASSANAKAJON, 2013; JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006). Os componentes desse sistema são liberados dos hemócitos durante as infecções, decorrentes da degranulação e/ou lise celular. O processo envolve uma série de reações químicas em cascata que liberam moléculas altamente tóxicas, como as quinonas, hemiquinonas e radicais livres, liberando a melanina como produto final (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014).

Outro mecanismo imunológico importante é o processo de coagulação, essencial para impedir a perda da hemolinfa e a disseminação de patógenos em caso de injúria no animal. Em crustáceos, a proteína chave neste processo é a proteína de coagulação, que forma coágulos por meio de reações mediadas pela proteína transglutaminase (MARTIN et al., 1991; MUTA; IWANAGA, 1996). Há também o processo imunológico de aglutinação mediada pelas lectinas, que são proteínas com capacidade de se ligar a carboidratos específicos da superfície de diferentes células. Além de atuarem como PRPs em invertebrados, as lectinas participam da adesão celular,

opsonização e formação de nódulos (LEE; SÖDERHÄLL, 2002). A maioria das lectinas envolvidas no sistema imune pertence à superfamília das lectinas do tipo-C (DRICKAMER; TAYLOR, 1993) e são proteínas plasmáticas sintetizadas, em sua grande maioria, pelo hepatopâncreas (LUO et al., 2006).

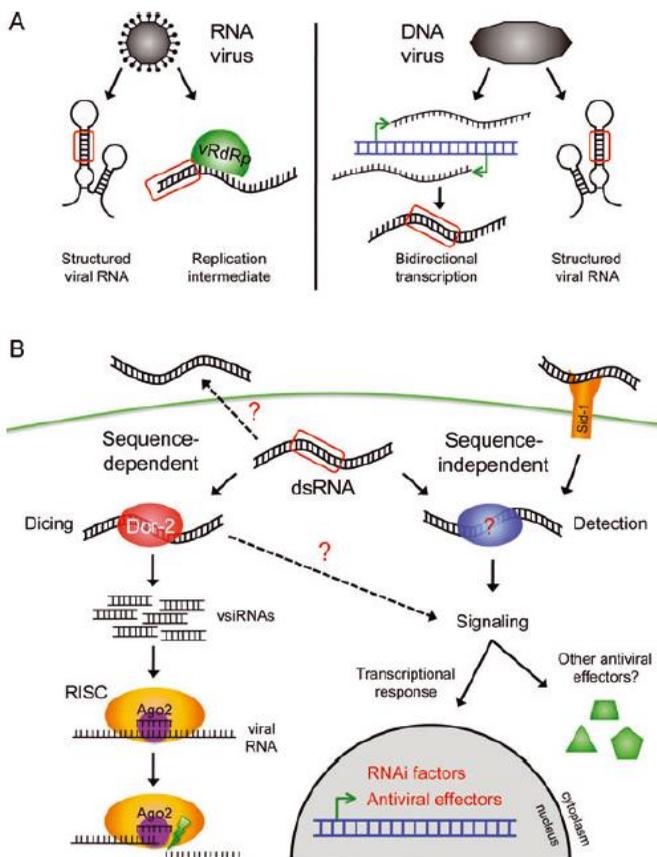
1.2.2. Imunidade antiviral

As respostas antivirais de crustáceos baseiam-se principalmente na fagocitose, apoptose celular e autofagia (WANG et al., 2011), no sistema de RNA de interferência (RNAi) e na produção de citocinas do tipo interferon (*interferon-like*). A apoptose e a autofagia são processos fisiológicos de reciclagem e morte celular e que têm sido associados a mecanismos de proteção celular contra vírus. A infecção por WSSV pode induzir sinais característicos de apoptose (fragmentação nuclear, fragmentação do DNA cromossomal e aumento da atividade de caspases) em diferentes tecidos. A apoptose também é conhecida como um mecanismo de defesa contra os vírus TSV e YAV. A ocorrência de uma difusão rápida e progressiva de apoptose em *P. monodon* infectado com YHV é a principal causa de disfunção e morte do hospedeiro (FLEGEL; SRITUNYALUCKSANA, 2011). Visto isso, a indução da apoptose só se torna efetiva como resposta antiviral se for acionada num estágio precoce da infecção, podendo limitar a produção de partículas virais e reduzir ou eliminar a propagação da progênie viral para outros tecidos (XU et al., 2014).

O RNA de interferência (RNAi) demonstrou ter um papel fundamental nas respostas antivirais de artrópodes (WANG et al., 2006). A administração *in vivo* de dsRNA de sequência longa (>100 pb) em *L. vannamei* é capaz de induzir uma imunidade antiviral em resposta a essa estrutura molecular característica de vírus (ROBALINO et al., 2009). Os dsRNAs são reconhecidos e clivados pela endoribonuclease do tipo III citosólica, denominada Dicer, em RNAs menores (21-25 pb) ou *small interference RNAs* (siRNAs). Os siRNAs resultantes são incorporados a um complexo multiproteico citosólico ou RISC (*RNA-induced silencing complex*) que irá degradar a fita senso, correspondente ao mRNA viral, e utilizar a fita antissenso como molde para hibridizar e degradar mRNA virais cognatos, pela ação da slicer Argonauta (LABREUCHE; WARR, 2013). Uma vez ligado ao RNAm, as sequências complementares serão degradadas, impedindo a formação da proteína (BARTHOLOMAY et al., 2012) (**Figura 4**).

Enquanto o RNAi provoca uma resposta antiviral sequência-específica, sequências inespecíficas de dsRNA podem causar, de forma menos eficiente, um aumento da resistência à infecção por vírus não-relacionados (ROBALINO et al., 2004). Foi demonstrado que essas sequências interferem na replicação viral e causam um estado antiviral inespecífico e muito semelhante ao que é produzido por interferons (IFNs) de mamíferos (*interferon-like*) (LI et al., 2013). Em mamíferos, essas citocinas desencadeiam a ativação de múltiplas vias intracelulares que interferem no ciclo de vida viral, limitando a amplificação e o espalhamento dos vírus no hospedeiro e atenuando assim o processo infeccioso (GUIDOTTI; CHISARI, 1999). Recentemente, foi identificada uma proteína denominada *interferon regulatory factor* (IRF) no camarão *L. vannamei*, que contém um domínio conservado homólogo aos IFN de mamíferos. Essa proteína é expressa principalmente no ceco pilórico, hepatopâncreas e intestino, sugerindo que a sinalização da via IRF pode ocorrer em células específicas desses tecidos. A infecção com WSSV mostrou que a IRF é um fator transcricional induzido por vírus (LI et al., 2013).

Figura 4. Figura esquemática dos processos celulares dependentes do mecanismo de RNA de interferência (RNAi).



dsRNA precursor gerado por RNA viral (esquerda) ou DNA viral (direita) durante a replicação (A). Durante a indução da resposta antiviral, o dsRNA é processado pela Dicer-2 em siRNAs, que se ligam ao complexo RISC contendo Ago2. Quando essa sequência encontra complementariedade no RNA viral, haverá a degradação desse material genético. O reconhecimento do dsRNA citoplasmático inicia uma cascata de sinalização, que resulta na ativação de efetores antivirais e a modulação positiva da maquinaria de RNAi (B).
 Fonte: SABIN; CHERRY, 2013.

1.2.3. Imunidade local e intestinal

Além das respostas celulares e humorais que ocorrem na hemolinfa, os crustáceos contam ainda com respostas locais de defesa. Sabe-se que, em artrópodes, o exoesqueleto e o trato gastrointestinal formam uma barreira protetora para infecções. Porém, quando a integridade desses tecidos é reduzida, seja por injúria ou infecção, as células e moléculas imunológicas montam uma resposta imune inata imediata contra os microrganismos. O reconhecimento do patógeno e os danos teciduais iniciam processos que envolvem inflamação, formação de um novo tecido e reorganização tecidual.

Os primeiros estudos acerca de imunidade local e intestinal de camarões datam do início dos anos 2000. Esses primeiros trabalhos identificaram, por meio de técnicas transcriptômicas, o primeiro painel de genes associados ao sistema imune em órgãos como brânquias e hepatopâncreas (GROSS et al., 2001; ROBALINO et al., 2007). De maneira interessante, o perfil de expressão gênica nas brânquias é muito similar àquele encontrado nos hemócitos e diferente daquele encontrado nos hepatopâncreas (ROBALINO et al., 2007). Um trabalho pioneiro de Soonthornchai e colaboradores (2010) mostrou que a ingestão oral de *V. harveyi* em pós-larvas de *P. monodon* causa uma destruição massiva do sistema digestório, especialmente do hepatopâncreas e do intestino médio, além de induzir a expressão de alguns genes associados ao sistema imune, como uma lectina do tipo-C e diferentes AMPs. Entre os AMPs identificados, a família dos ALFs parece desempenhar um papel essencial nessas respostas de defesa. Foi demonstrado que o silenciamento pós-transcricional (via RNA de interferência) de *ALFPm3* (Grupo ALF-B) pode levar a uma mortalidade de 86% de camarões da espécie *P. monodon* em 7 dias, devido ao aumento descontrolado da comunidade microbiana presente naturalmente na hemolinfa e no hepatopâncreas desses animais (PONPRATEEP et al., 2012).

Assim como acontece em insetos vetores (mosquitos, flebotomíneos, barbeiros), o trato gastrointestinal de camarões (em especial a região medial do intestino) é considerada uma importante via de acesso para agentes infecciosos. No entanto, apesar dos recentes avanços na caracterização do sistema imune de crustáceos, a grande maioria dos estudos está essencialmente voltada para as respostas de defesa clássicas, que ocorrem na hemolinfa. O conhecimento sobre a imunidade intestinal de crustáceos ainda é muito limitado e um maior entendimento sobre a fisiologia e a capacidade imunológica do intestino é necessário devido ao fato de ser um dos principais sítios da entrada de patógenos.

Tendo em vista que os camarões são animais bentônicos, omnívoros e que praticam canibalismo, o trato intestinal desses animais se apresenta como uma potencial via de contaminação/infecção, esperando-se assim, em contrapartida, que seja um local de intensa atividade imunitária. Além disso, o trato gastrointestinal pode exercer um importante papel na administração oral de profiláticos, na aplicação de probióticos para promover a saúde de espécies cultivadas (VERSCHUERE et al., 2000) e no que diz respeito à nutrição e às doenças dessas espécies (FORTUN-LAMOTHE; BOULLIER, 2007; FUKATSU; KUDSK, 2011).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de técnicas genômicas e transcriptômicas em larga escala permitiu a identificação de importantes efetores do sistema imune de camarões, os quais têm sido visados para um potencial uso em Aquicultura (ROBALINO et al., 2009). Em especial, a recente descoberta de assinaturas moleculares associadas à resistência de camarões a infecções bacterianas têm aberto novas possibilidades para o desenvolvimento de ferramentas para o controle de enfermidades nos cultivos (DE LORGERIL et al., 2008). Além disso, o conhecimento da microbiota natural presente nesses organismos e a sua interação com o sistema imune tem o potencial de fornecer subsídios valiosos para o estabelecimento de parâmetros de saúde e o desenvolvimento de imunomarcadores, importantes para a sanidade animal e para programas de seleção genética de reprodutores mais resistentes a infecções.

2. HIPÓTESE

Genes associados ao sistema imune de crustáceos são expressos nas diferentes regiões do trato gastrointestinal do camarão *Litopenaeus vannamei* e modulados no intestino médio frente infecções bacterianas e virais.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil transcricional de genes associados ao sistema imune no trato gastrointestinal de camarões juvenis da espécie *Litopenaeus vannamei*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar se genes relacionados ao sistema imune de crustáceos são expressos no trato gastrointestinal do camarão *L. vannamei*;

- Verificar a distribuição da expressão desses genes nas diferentes regiões do trato gastrointestinal (estômago, hepatopâncreas, intestino médio e intestino posterior) em comparação aos hemócitos;

- Analisar a modulação desses genes nas diferentes regiões do trato gastrointestinal frente a um estímulo microbiano;

- Comparar o perfil transcricional de genes expressos no intestino médio de camarões experimentalmente infectados com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126 ou com o vírus da Síndrome da Macha Branca (WSSV).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados camarões juvenis da espécie *Litopenaeus vannamei* (10 ± 1 g), de ambos os sexos, cedidos pelo Laboratório de Camarões Marinhos do Departamento de Aquicultura (UFSC/CCA/LCM). Os animais foram mantidos no Setor de Aquários do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (UFSC/CCB/LIAA) e aclimatados por sete dias em tanques contendo aproximadamente 100 L de água salgada, com aeração constante e renovação diária da água de 50%. Os animais foram alimentados uma vez ao dia com ração comercial da marca Guabi (POTIMAR 35 EXT) a uma biomassa de 2% do peso corporal. A temperatura do ar foi mantida a 26°C, sendo que a temperatura da água permaneceu a 23°C durante todo o período do experimento.

4.2. ESTÍMULO MICROBIANO E INFECÇÕES EXPERIMENTAIS

4.2.1. Estímulo microbiano

Para preparar o estímulo bacteriano, foi utilizada a bactéria marinha Gram-negativa *Vibrio harveyi* (ATCC 14126). A cultura de *V. harveyi* foi realizada em meio LB-NaCl (1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 3% NaCl, pH 7,2) a 20°C por um período de 12-16 h sob agitação (150 rpm). Em seguida, a cultura bacteriana foi centrifugada ($1.000 \times g$ por 10 min) e suspendida em água do mar filtrada ($0,45 \mu\text{m}$). A concentração bacteriana foi então ajustada espectrofotometricamente (Biowave II WPA®) para a densidade óptica $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,52$, correspondente a 5×10^8 CFU/mL. As bactérias foram inativadas a 70°C por 20 min e plaqueadas em meio LB-NaCl ágar (LB-NaCl acrescido de 1,5% de ágar) para confirmação da eficiência do tratamento.

Após sete dias de aclimação, os animais foram acondicionados em tanques contendo 16 L de água salgada (5 animais/tanque), os quais seguiram por mais 48 h sem alimentação. Em seguida, foi injetado intramuscularmente ($n=5$), entre o primeiro e o segundo segmento da região dorsal, 100 μL da solução contendo as bactérias inativas (5×10^7 CFU/animal). Após 48 h, foi realizada a coleta da hemolinfa e a dissecação dos seguintes órgãos: estômago, hepatopâncreas, intestino médio e intestino posterior (vide item 4.3). Como controle, foram

utilizados animais não estimulados/infectados (grupo *naïve*) (n=5) (**Figura 5**).

Figura 5. Esquema ilustrativo do ensaio de estímulo microbiano e das infecções experimentais.



-7 dias: período de aclimação dos animais. **Dia 0:** estímulo microbiano/infecções experimentais. **Dia 2:** coleta dos tecidos.

4.2.2. Infecção experimental bacteriana

Para os ensaios de infecção bacteriana, foi utilizada a bactéria *V. harveyi* (ATCC 14126). Após o período de aclimação de sete dias, os camarões foram injetados intramuscularmente (n=30), entre o primeiro e o segundo segmentos abdominais da região dorsal, com 100 µL de um inóculo bacteriano vivo (6×10^7 CFU/animal). Essa dose bacteriana foi anteriormente padronizada no nosso laboratório, a qual é capaz de matar 50% dos animais (DL_{50}). Após a injeção, os camarões foram dispostos em caixas contendo 16 L de água salgada (5 animais/caixa) com renovação diária de 50%. Animais *naïve* (n=15) e injetados com água do mar estéril (n=15) foram utilizados como controle (**Figura 5**). Os camarões ficaram sem alimentação nas 48 h seguintes, quando foi realizada a coleta do intestino médio (3 grupos de 5 animais/condição), conforme descrito no item 4.3.

4.2.3. Infecção experimental viral

Para os ensaios de infecção viral, foi utilizado o vírus causador da Síndrome da Macha Branca (WSSV). Para o preparo do inóculo viral, 10 g de tecido muscular (abdome) de camarões diagnosticados positivos para o WSSV, foram homogeneizados em tampão Tris-NaCl estéril e gelado (330 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,4) (1:10; p:v) e centrifugados ($3.000 \times g$ por 30 min a $4^\circ C$). O sobrenadante foi recuperado e centrifugado ($12.000 \times g$ por 40 min a $4^\circ C$), filtrado ($0,45 \mu m$) e armazenado em nitrogênio líquido. Seguindo a mesma metodologia, foi preparado um inóculo livre de WSSV, utilizando tecido muscular de animais diagnosticados como negativos para o vírus.

De maneira semelhante ao desafio bacteriano, após o período de aclimação, os animais foram injetados intramuscularmente (n=15), entre o primeiro e o segundo segmentos abdominais da região dorsal, com 100 µL do inóculo viral (3×10^2 cópias genômicas/animal). Essa dose viral foi previamente padronizada em nosso laboratório, a qual é capaz de matar 50% dos animais (DL_{50}). Após a injeção, os camarões foram dispostos em caixas contendo 16 L de água salgada (5 animais/caixa) com renovação diária de 50%. Como controle, foram utilizados animais *naïve* (n=15) e animais injetados com 100 µL do inóculo livre de WSSV (n=15) (**Figura 5**). Após 48 h sem alimentação, foi realizada a coleta da porção medial do intestino de todos os animais (3 grupos de 5 animais/condição), conforme descrito no item 4.3.

4.3. COLETA DOS TECIDOS

A extração da hemolinfa se deu pela região ventral do abdômen, entre o último esternito cefalotorácico e o primeiro abdominal, por inserção de uma agulha (13×0,4 mm) acoplada a uma seringa estéril de 1 mL. A hemolinfa foi coletada na presença de solução anticoagulante (Solução de Alsever Modificada ou MAS: 336 mM NaCl, 115 mM glicose, 27 mM citrato de sódio, 9 mM EDTA, pH 7,2) (1:2; hemolinfa:MAS), centrifugada (1.500 ×g por 10 min a 4 °C) e o precipitado celular suspenso em 1 mL de TRIzol® (Thermo Scientific®). Após a extração da hemolinfa, os camarões foram sacrificados por hipotermia (-20°C por 20 min) para a dissecação das seguintes regiões do trato gastrointestinal: estômago, hepatopâncreas, intestino médio e intestino posterior (**Figura 2**). Após a coleta, os tecidos foram lavados em solução Tris-NaCl gelado (10 mM Tris, 330 mM NaCl, pH 7,4). Em seguida, as amostras foram maceradas em TRIzol® (Thermo Scientific®) com o auxílio de pistilos estéreis acoplados ao homogeneizador VWR® *Disposable Pellet Mixers and Cordless Motor* e centrifugadas a 12.000 ×g por 10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e conservados a -20°C para a posterior extração de RNA total.

4.4. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA

Para extração do RNA total, os hemócitos e tecidos conservados em TRIzol® (Thermo Scientific®) foram homogeneizados e submetidos à extração com clorofórmio (5 TRIzol®:1 clorofórmio). Após centrifugação (12.000 ×g por 15 min a 4°C), o RNA obtido foi precipitado com isopropanol e lavado com etanol 75% gelado por duas

vezes. O precipitado de RNA foi suspenso em água livre de DNA/RNA/DNases/RNases a 65°C. Em seguida, as amostras foram tratadas com 1 U de DNase I (Thermo Scientific®) por 15 min a 37°C. Após a inativação da DNase I (65°C, 15 min), as amostras foram precipitadas com 0,3 M acetato de sódio (pH 5,2) e isopropanol (1:1; v:v). Finalmente, o RNA foi lavado com etanol 75% gelado e suspenso em água livre de DNA/RNA/DNases/RNases a 65°C.

Para a avaliação da distribuição gênica, o RNA total foi extraído individualmente das 5 amostras dos diferentes tecidos coletados das 2 condições experimentais (animais estimulados e não estimulados). A concentração das amostras foi determinada pela leitura de absorbância em 260 nm ($A_{260\text{nm}} = 1$, equivalente a 40 µg RNA/mL) no espectrofotômetro NanoVue Plus™. A razão entre as leituras em 260 nm e 280 nm foi utilizada como um indicativo da pureza do RNA obtido, sendo a integridade das amostras avaliada em gel de agarose (0,8%). A partir dos resultados de pureza ($A_{260/280}$: $1,8 \geq 2,1$) e integridade (sem sinais visíveis de degradação em gel de agarose), as 3 melhores amostras de cada tecido/órgão (de cada condição) foram agrupadas em um único *pool*, utilizando a mesma quantidade de RNA total extraído (5 µg de cada amostra). Em seguida, as amostras dos *pools* de RNA foram re-quantificadas espectrofotometricamente e a integridade avaliada em gel de agarose 0,8%. As amostras de RNA total dos intestinos médios das infecções experimentais virais e bacterianas (coletadas em *pools* de 5 animais por condição) foram diretamente processadas e a concentração, pureza e integridade avaliadas conforme anteriormente descrito.

Para a síntese de cDNA, 2 µg de RNA total foi reversamente transcrito na presença de 200 U da enzima RevertAid® Reverse Transcriptase (Thermo Scientific®), 0,5 mM de dNTP Mix (Sinapse Inc®), 20 U da enzima RiboLock™ RNase Inhibitor (Thermo Scientific®) e 0,5 µg de oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Sinapse Inc®). As amostras foram incubadas a 42°C por 60 min e a enzima inativada por calor a 65°C por 15 min.

4.5. ESCOLHA DOS INICIADORES

Para as análises de expressão gênica, foram escolhidos 58 genes, 4 genes de referência e 54 genes de diferentes categorias funcionais associadas ao sistema imune de crustáceos, sendo elas: (I) *Peptídeos antimicrobianos* (AMPs) (13 genes); (II) *Vias imunológicas de sinalização celular* (13 genes); (III) *Proteínas de reconhecimento de padrões moleculares* (PRPs) (8 genes); (IV) *Sistema de RNAi* (6 genes);

(V) *Sistema de ativação da proPO* (3 genes); (VI) *Citocinas* (5 genes); (VII) *Inibidor de proteases* (2 genes) e (VIII) *Sistema redox* (4 genes). As sequências dos iniciadores utilizados neste trabalho estão apresentadas no **Quadro 1**. Desses, 48 iniciadores foram sintetizados a partir de sequências descritas na literatura, sendo as demais escolhidas manualmente, segundo os seguintes parâmetros: (1) temperatura de hibridização entre 58°C-62°C, (2) tamanho dos iniciadores de 20-21 nucleotídeos, (3) conteúdo de C/G entre 45-55% e (4) tamanho do produto de amplificação entre 100-200 pb. O potencial de auto complementariedade e formação de dímeros foram verificados pelo programa *FastPCR* (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>).

4.6. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE PCR CONVENCIONAL (RT-PCR)

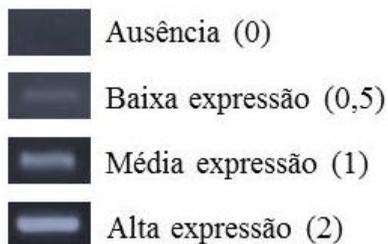
As reações de RT-PCR foram realizadas em um volume final de 15 µL contendo 2 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTP Mix, 0,4 µM dos iniciadores senso e antissenso, 1 U da enzima *Taq* DNA polymerase (Sinapse Inc[®]) e 1 µL de cDNA (diluído 10 vezes). As reações foram realizadas de acordo com as seguintes condições: desnaturação a 95°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, hibridização a 57°C por 30 s, extensão a 72°C por 30 s e extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose (1,5%) corados com Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia[®]) e os tamanhos moleculares comparados com padrão molecular de 100 pb (Sinapse Inc[®]).

4.7. ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DE EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão dos 54 genes de interesse foi avaliada de forma semi-quantitativa por RT-PCR nas diferentes regiões do trato gastrointestinal de camarões após 48 h do estímulo microbiano. Como controle de expressão e de qualidade das amostras, foi avaliada a expressão do gene β -actina (AV1-Fw: 5'-TAA TCC ACA TCT GCT GGA AGG TGG-3' e AV2-Rv: 5'-TCA CCA ACT GGG ATG ACA TGG-3'; produto de amplificação: 846 pb) nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 10 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 s, hibridização a 50°C por 45 s, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 5 min. Para essas análises, foram atribuídos valores numéricos a cada produto de amplificação conforme a intensidade das bandas obtidas nos géis de agarose (1,5%). Os valores de expressão em cada condição foram classificados de acordo com a

intensidade dos produtos de amplificação de cada gene resolvidos nos géis de agarose, os quais variaram de 0 (ausência de expressão) a 2 (alta expressão) (**Figura 6**). Após essa classificação, os valores foram submetidos ao programa *MultiExperiment Viewer* (MeV) (<http://www.tm4.org/>) para a construção de *heat maps*, onde a intensidade da cor (segundo uma escala de branco a vermelho) indica a magnitude de expressão gênica.

Figura 6. Exemplo de classificação da intensidade das bandas no gel de agarose.



Quadro 1 Sequência dos iniciadores utilizados neste estudo.

Gene de Referência	Gene	Nº GenBank	Iniciador senso (5'-3')	Iniciador anti-senso (5'-3')	Produto de amplificação (pb)	Referência
<i>LvEFla</i>	Elongation factor 1-alpha	GU136229	TGGCTGTGAACAAGATGGACA	TTGTAGCCCACTCTTGTAGCG	103	De la Vega et al., 2008
<i>LvL40</i>	Ubiquitin ribosomal L40 fusion protein	KJ831563	GAGAATGTGAAGGCCAAGATC	TCAGAGAGAGTGGCAACCATC	104	Presente estudo
<i>LvRps3A</i>	S3A ribosomal protein	BF023924	GGCTTGCTATGTGTGCTCC	TCATGCTCTTGGCTGGCTG	101	De la Vega et al., 2008
<i>LvAxein</i>	Paxein	AF300705	CCACGAGACCACTTACAAC	AGCGAGGGCAAGTATTTC	142	Wang et al., 2007
Peptídeos antimicrobianos						
<i>Linnon</i> PEN2	Penaeidin 2	Y14925	GTCTGGCTGGTCTTCTTGG	GCAGCCATTGGGAGCATCTG	168	Goncalves et al., 2014
<i>Linnon</i> PEN3	Penaeidin 3	AF390144	GTCTGGCTGGTCTTCTTGG	GGCGCTTGTGAGAAAGGAAATTC	178	Goncalves et al., 2014
<i>Linnon</i> PEN4	Penaeidin 4	DQ211701	GTCTGCCCTGGTCTTCTTGG	TTGGGGAGGGGAATTCCTAG	321	Goncalves et al., 2014
<i>Linnon</i> ALF-A	ALF Group A	EW713395	CTGATTTGCTCTTGTGCCACG	TGACCCCATGAACCTCCACCCTC	113	Rosa et al., 2013
<i>Linnon</i> ALF-B	ALF Group B	GQ227486	GTGTCTCCGHTTGCACAAGC	ACAGCCCCAAGCATTTTGTCTG	123	Rosa et al., 2013
<i>Linnon</i> ALF-C	ALF Group C	FE058235	ATGCGAAGTGTCTGTCCCTCAG	TGAGTTTGTTCGGCATGGCC	115	Rosa et al., 2013
<i>Linnon</i> ALF-D	ALF Group D	FE151634	TGTGTTGGTTGTGGCACTGG	CAACGAGGTCAATGTCACCAG	131	Rosa et al., 2013
<i>Linnon</i> ALF-E	ALF Group E	FE060658	TGCTACGTGAATCGCAGTCC	CGCTTCTCTTCCGACAATG	100	Presente estudo
<i>nLvALF1</i>	New ALF-1	KJ000049	AAAGCTTCATTTCTGGTGG	GGGTGTAAAGAAAGTACGTGC	180	Presente estudo
<i>Linnon</i> STY-I	Stylicin I	BE188497	CACAAAGAGTGCCACCCTGTG	ACATTTGCCAGTTATGTAGCC	125	Goncalves et al., 2014
<i>Linnon</i> STY-II	Stylicin II	CK591498	CACAAGAGTGCCACCCTGTG	CACACAGGCTGCCACATAA	151	Goncalves et al., 2014
<i>Linnon</i> dLYZ	C-type Lysozyme	AY170126	CTTGGAGCTCTATGTTCTAGA	TCAACCATTTACAACGTGTGCA	217	Goncalves et al., 2014
<i>Linnon</i> iLYZ	I-type Lysozyme (desidribase)	DQ298564	CGGTTGCGGAATTAGAGAAGAC	TCCACACACTTCTGACCAATG	113	Presente estudo

Quadro 1. Sequência dos iniciadores utilizados neste estudo (continuação).

Vias imunológicas de sinalização celular						
L _v Toll1	Toll receptor 1	DQ923424	TCGACCCATCCCTTTTACACC	TTGCCTGGAAAGGTCTGATTC	88	Wang et al., 2012
L _v Toll2	Toll receptor 2	JN180637	CATGCCCTGCAGGACTGTTTA	GGCCTGAGGGTAAAGGTCTTC	158	Wang et al., 2012
L _v Toll3	Toll receptor 3	JN180638	TCGTACAACCGACTGACGAG	ATACTTCAGGTGGGCCACAG	195	Wang et al., 2012
L _v Pelle	Pelle (IRAK4)	JN180645	TGACAGATTCCAGTGGATCATGC	CTTCCAAGATGTGGCCTAACTGTG	128	Li et al., 2014
L _v TRAF6	Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6	HMS18180	GTCCGTTCTTAAGTCACTG	CTCATTTCCGTTAGCTGAGC	178	Goncalves et al., 2014
L _v Caerns	Caerns (IRB)	JX014314	AGTGAACCTGAGAACCCTTAC	CACACACTGACACTATCTCC	151	Presente estudo
L _v Dorsal	Dorsal (Rel/NF- κ B)	F1998202	TCACTGTTGACCCACCTTAC	GAGGGCAITCTCAACATCAC	164	Goncalves et al., 2014
L _v IMD	Immune deficiency	F1592176	AAAGTTCGAGGTCAGCGAAC	GATCATCTGGGTGAGTCTGG	192	Goncalves et al., 2014
L _v Relish	Relish (Rel/NF- κ B)	EF432734	CTACATTCGTGCCCTTGGACTCTGG	GGCTGGCAAGTGTCTCTCG	124	Hou et al., 2014
L _v STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription	HQ228176	CATGGCTCTGGCAGATAAGC	GCATCTGCTGGTCTCTCTTC	107	Goncalves et al., 2014
L _v GLT	Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase	HQ317497	TCCACCTGTACTACGAGTCC	CGAAATGGGAACATCTCCACC	114	Goncalves et al., 2014
L _v HMGBA	High-mobility group a	HQ228174	GGATGAGGAAGGTCAAGTACG	TCCTGCTGCTCTCTCTCTC	186	Goncalves et al., 2014
L _v DNME	Domless receptor	KC346866	CTCAGGCTATGTTTCTCAGGATTTCA	CACGGCAGTTCCTTATGGTCT	130	Yan et al., 2015

Quadro 1. Sequência dos iniciadores utilizados neste estudo (continuação).

Proteínas de reconhecimento de padrões moleculares (PRPs)						
LvlGBP	LPS and β G binding protein	EU102286	ACCGCAGCATCAGTTATACC	GTCATCGCCCTTCCAGTTG	77	Wang et al., 2007
LvlGBP	High density lipoprotein/L3-bean-D-galactan-binding protein	AY249858	ACGAGAACCGGACAAAGAAATG	TTGACGATAGAAAGCCATCAGG	137	Presente estudo
LvlQM	QM protein	IX880087	TCGTGTGCTGGTGTGATAGAT	GCCTCAATGACCCTGCTCCTTGT	143	Lin et al., 2014
LvlLectin-1	C-type lectin 1	HQ153047	CTTTCGGATTCGGAGGACTGA	TCGTCTTAGATTTGGCAGATAGCA	214	Wei et al., 2012
LvlCTL3	C-type lectin 3	KF156943	ATGTTCTTCGTGCTCCTGCTGT	GCAGTGGTCTGTAANAATGTTGTG	120	Lin et al., 2014
LvlLT	C-type lectin	D0871245	TCTGTTCCGAGGGAAAAGTAG	GAACAAGAGGCATTTGTGCC	151	Presente estudo
LvlAV	Antiviral Protein	IX983205	AACGATCATGAGGACAGGTTG	AATGAATCCCAGCCCATGAC	108	Presente estudo
LvlGal	Galectin	KF179103	AATGCTTTCACACAGGACGC	GTCCTCAATCCAGACACAGG	237	Presente estudo
Sistema de RNAi						
Lvl-Sid-1	Sid-1	HMZ34688	GAAAGCGATTGGCAGTCTATGAAC	TGGAAGCCTAATCTCTGCAACTTG	63	Labreuche et al., 2010
LvlDcr2	Dicer-2	HQ241163	AGGAAATGCAATGTCCGTGGTT	ACGAGCCCTCCCCCTAGATT	78	Chen et al., 2011
Lvl-Ago 2	Argonaute 2	HMZ34690	GATGGCATGAAGTCTGCAAGTTG	TGGCAGCAGACCATCACTAAG	62	Labreuche et al., 2010
LvlTRBP1	Transactivating response RNA-binding protein isoform 1	HQ241157	CAAGAGTTGTGTATATGCGCAG	AGCACCCACCCTGGATGATG	195	Presente estudo
LvlDcr1	Dicer-1	EU676241	CCGGAGATAGAAACGGTTCAAGTG	CGATAATTCCTCCCAACACCTG	176	Yao et al., 2010
Lvl-Ago 1	Argonaute 1	HMZ34689	TGCGTCAATTTGGCCATCCAT	GCCATCTGGAGCGGAGAAG	65	Labreuche et al., 2010

Quadro 1. Sequência dos iniciadores utilizados neste estudo (continuação).

Sistema de ativação da proPO							
L ₁ proPO-1	Prophenoloxidase 1	EU284136	CGGTGACCAAAAGTTCCTCTTC	GCAGGTGCGCCGTAGTAAG	122	Lai et al., 2005	
L ₁ proPO-2	Prophenoloxidase 2	EU373096	GCGGAATGACTTTGGTCTCG	AAAGTACGTCATCCGAGAGG	137	Lai et al., 2009	
L ₁ PPAE2	proPO-activating enzyme 2	FE090793	TCAGCAGGATTTGTGTTGCC	GTCTCAGTGAAGCCCAATC	107	Pang et al., FSIJ 2014	
Chitocinas							
L ₁ SVCI	Single von Willebrand factor type C domain protein 1	HQ541158	TGCCAACCTAGCTGAGCTTCA	CCATCAGGGGCACACGTATTG	81	Chen et al., 2011	
L ₁ AST	Astakine	HM473285	GACTGGGGGACTGTTCTTC	GGTACCGCAAGATTCAAGTCC	156	Goncalves et al., 2014	
L ₁ Tetrasp	Tetraspamin D107	FE084500	GCTTGGCATCCTGAGAGAG	GCTGATTTGGAALTTGCCTTTCG	196	Goncalves et al., 2014	
L ₁ Pxi	Peroxinectin	AY486425	CTGAAAGAAAAGAGACCATTAC	TGGAAGGCGCTTGATGTTATC	137	Goncalves et al., 2014	
L ₁ Clq	Clq-binding protein	KC776604	TGAAGGAGAGCTCAAGAATC	CCTCATACATGGTGAAGTTCCG	161	Presente estudo	
Inibidor de protease							
L ₁ αM-1	Alpha2-macroglobulin	EF073268	GGAGAGGGAACGAGACCATC	TCAGCTTGGCGTCGGAAGTG	113	Goncalves et al., 2014	
L ₁ αM-2	Alpha2-macroglobulin	DQ988330	TGCAGGTTCTAGTGTGGTAC	CACCCAGGTAGTCGATGAC	261	Goncalves et al., 2014	
Sistema redox							
L ₁ veMnSOD	Cytosolic manganese superoxide dismutase	AY486424	TCATGCTTTGGCCACCTCTC	CCGGTTCAACCAACTTCTTC	143	Wang et al., 2007	
L ₁ GST	Glutathione S-transferase	AY573381	CACCTACCGAAACACTACGAAC	GGTCTTGAAGCCGFTCGAG	194	Goncalves et al., 2014	
L ₁ GPx	Glutathione peroxidase	AY973252	AGAGTTTCGGCGACCAAGCTG	TGGGTAGTGTCTCCCTGGGTG	72	Goncalves et al., 2014	
L ₁ NOS	Nitric oxide synthase	GQ429217	GAGCAAGTTATTCTCGCAAGGC	TCTCTCCCAAGTTCTTGGCGGT	104	Yao et al., 2010	

4.8. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

As reações de RT-qPCR foram realizadas com amostras de cada tecido em duplicata, utilizando o equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* (Thermo Scientific®). As reações foram realizadas na presença de 1 µL de cDNA de amostras de intestino médio (diluído 50 vezes), 0,3 µM dos iniciadores e 7,5 µL de *Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2×* (Thermo Scientific®) (volume final de 15 µL). As reações foram realizadas de acordo com as seguintes condições: desnaturação a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s e hibridização/extensão a 60°C por 1 min. Ao término dos ciclos, as amostras foram submetidas a uma curva de dissociação (60-95°C; 0,3°C/s) para verificar a especificidade dos iniciadores.

4.9. ANÁLISE DOS RESULTADOS DE RT-qPCR

4.9.1. Seleção dos genes de referência

Para a escolha do gene de referência mais adequado, foi avaliada a estabilidade da expressão de quatro genes candidatos: *LvEF1α* (fator de alongação 1-alpha), *LvActin* e das proteínas ribossomais *LvL40* e *LvRpS3A*. O programa NormFinder foi utilizado para o cálculo do coeficiente de estabilidade dos genes candidatos, que leva em consideração a variação dos valores de Cq (ciclo de quantificação) entre as diferentes condições. Assim, quanto menor o valor do coeficiente, menor a variação de expressão do gene de referência entre as condições experimentais. Para uma análise mais apurada, foi considerada ainda a média geométrica dos valores de Cq das diferentes combinações dos genes candidatos (VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

4.9.2. Cálculo de expressão relativa

Para o cálculo de expressão relativa, foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ conforme descrito por Livak e Schmittgen (2001). A primeira normalização foi realizada com base nos valores de Cq dos genes de interesse em relação aos valores obtidos do gene de referência que apresentou o melhor coeficiente de estabilidade ($\Delta Cq = Cq$ gene de interesse subtraído do Cq da referência). Para a segunda normalização ($\Delta\Delta Cq = \Delta Cq$ alvo subtraído do ΔCq da condição calibradora), foi utilizada como condição calibradora a média aritmética dos valores de ΔCq do grupo de camarões não estimulados. As análises e a nomenclatura utilizadas neste trabalho foram baseadas nas

recomendações do MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN *et al.*, 2009).

4.9.3. Análises estatísticas

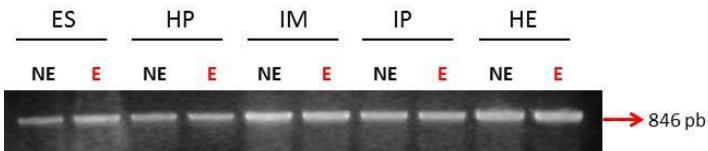
Os dados de RT-qPCR foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e analisados utilizando o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo Teste de Tukey para comparação de médias. Para a construção dos gráficos de expressão, foi utilizado o programa *GraphPad Prism 3* (*GraphPad Software, Inc.*). As diferenças entre os grupos experimentais foram consideradas significativas quando as variações de expressão gênica mostraram-se superiores a 1,5 vezes e o $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS AO SISTEMA IMUNE NO TRATO GASTROINTESTINAL

A distribuição da expressão de genes associados ao sistema imune de crustáceos foi avaliada nas quatro principais regiões do trato gastrointestinal (estômago, hepatopâncreas, intestino médio e intestino posterior) de camarões *L. vannamei* estimulados ou não (grupo *naïve*) com um inóculo inativado de *V. harveyi* (ATCC 14126). O perfil de expressão gênica no trato gastrointestinal foi comparado ao encontrado nos hemócitos, uma vez que essas células representam o mais importante sítio de expressão de genes associados ao sistema imune em crustáceos (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). Inicialmente, o perfil de migração do RNA total das diferentes amostras foi avaliado em gel de agarose. Além disso, a amplificação de transcritos de β -actina mostrou-se estável em todas as amostras, validando assim as comparações de expressão das *stylicinas* entre os grupos experimentais (**Figura 7**).

Figura 7. Eletroforese em gel de agarose (1,5%), corado com Blue Green Loading Dye I, mostrando a amplificação de um fragmento de 846 pb correspondente ao gene β -actina.

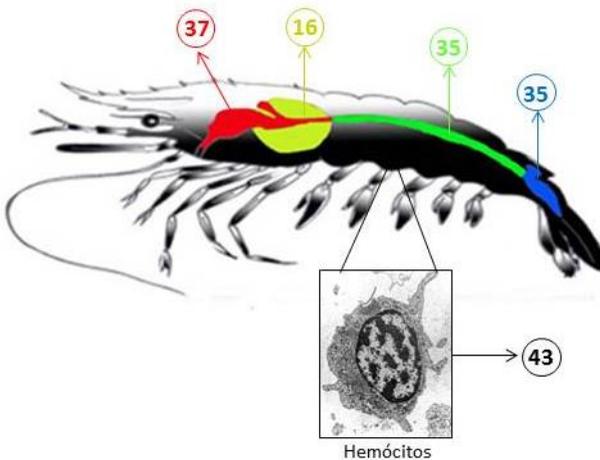
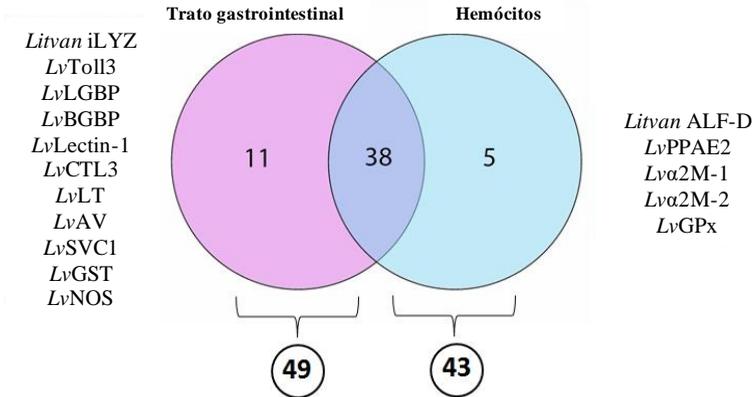


ES: estômago, HP: hepatopâncreas, IM: intestino médio, IP: intestino posterior e HE: hemócitos; NE: animais não estimulados; E: animais estimulados com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126 inativada por calor.

A distribuição da expressão de genes de diferentes categorias funcionais associadas ao sistema imune de crustáceos foi então avaliada nas diferentes regiões do trato gastrointestinal e nos hemócitos do grupo *naïve*. Em relação ao trato gastrointestinal, dos 54 genes analisados, a expressão de 49 genes foi observada em pelo menos uma das quatro regiões avaliadas, sendo: 37 genes expressos no estômago, 16 no hepatopâncreas, 35 no intestino médio e 35 no intestino posterior

(Figura 8). Comparativamente, nos hemócitos foi detectada a expressão de 43 dos 54 genes avaliados (**Figura 8**). De maneira interessante, a expressão de alguns genes foi detectada especificamente em um ou outro tecido, sendo que os genes *Litvan* ALF-D, *LvPPAE2*, *Lv α 2M-1*, *Lv α 2M-2* e *LvGPx* mostraram-se expressos apenas nos hemócitos, enquanto que a expressão dos genes *Litvan* iLYZ, *LvToll3*, *LvLGBP*, *LvBGBP*, *LvLectin-1*, *LvCTL3*, *LvLT*, *LvAV*, *LvSVC1*, *LvGST* e *LvNOS* foi observada apenas no trato gastrointestinal.

Figura 8. Diagrama de Venn e esquema ilustrativo (fora de escala) indicando o número de genes associados ao sistema imune de crustáceos expressos nos hemócitos e nas diferentes regiões do trato gastrointestinal do camarão *Litopenaeus vannamei*.



Estômago (vermelho), hepatopâncreas (amarelo), intestino médio (verde) e intestino posterior (azul).

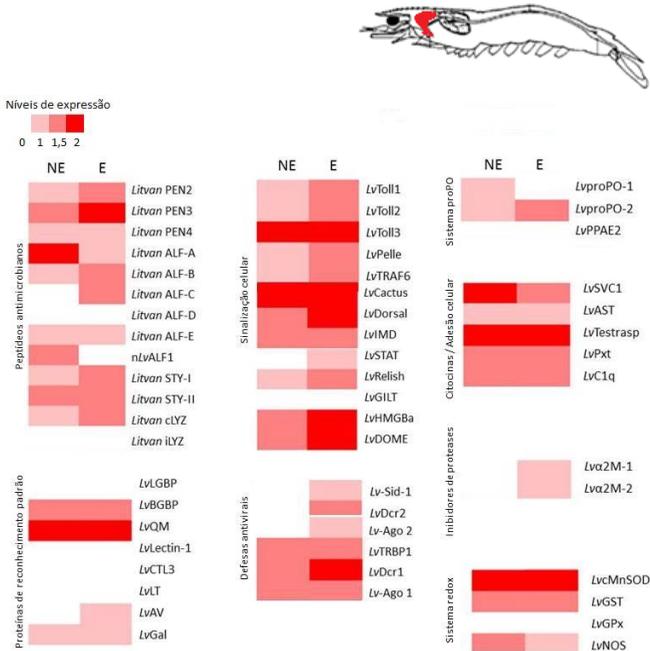
5.2. MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA NAS DIFERENTES REGIÕES DO TRATO GASTROINTESTINAL FRENTE A UM DESAFIO MICROBIANO

Uma vez identificado o sítio de expressão dos 54 genes de interesse, a modulação da expressão foi avaliada nas diferentes regiões do trato gastrointestinal de camarões 48 h após um desafio microbiano em comparação ao grupo *naïve*. As análises de expressão foram realizadas de forma semi-quantitativa por RT-PCR utilizando-se como controle a expressão do gene actina.

5.2.1. Estômago

Dos 54 genes analisados, 37 deles mostraram-se expressos no estômago do grupo *naïve*. As categorias funcionais mais representativas nesse órgão foram os AMPs (10 dos 13 genes avaliados), as vias imunológicas de sinalização celular (11 de 13 genes), citocinas (5 de 5 genes) e o sistema redox (3 de 4 genes) (**Figura 9**). Após o estímulo bacteriano, enquanto que 23 genes foram modulados positivamente (*Litvan* PEN2, *Litvan* PEN3, *Litvan* ALF-B, *Litvan* ALF-C, *Litvan* STY-I, *Litvan* cLYZ, *Lv*Toll1, *Lv*Toll2, *Lv*Pelle, *Lv*TRAF6, *Lv*Dorsal, *Lv*STAT, *Lv*Relish, *Lv*HMGBa, *Lv*DOME, *Lv*AV, *Lv*-Sid-1, *Lv*Dcr1, *Lv*Dcr 2, *Lv*-Ago 2, *Lv*proPO-2, *Lv* α 2M-1 e *Lv* α 2M-2), a expressão de cinco genes foi modulada negativamente (*Litvan* ALF-A, *nLv*ALF1, *Lv*proPO-1, *Lv*SVC1 e *Lv*NOS). A expressão dos genes *Litvan* ALF-C, *Lv*STAT, *Lv*AV, *Lv*-Sid-1, *Lv*Dcr2, *Lv*-Ago 2, *Lv* α 2M-1 e *Lv* α 2M-2 foi detectada no estômago apenas em animais estimulados com *V harveyi*. Por outro lado, nestes mesmos animais não foi observada a expressão dos genes *nLv*ALF1 e *Lv*proPO-1, os quais foram encontrados sendo expressos em camarões não estimulados. Os genes que não se mostraram expressos no estômago, mesmo após o estímulo microbiano, foram: *Litvan* ALF-D, *Litvan* iLYZ, *Lv*GILT, *Lv*LGBP, *Lv*Lectin-1, *Lv*CTL3, *Lv*LT, *Lv*PPAE2 e *Lv*GPx (**Figura 9**).

Figura 9. Análise semi-quantitativa da expressão de 54 genes associados ao sistema imune de crustáceos no estômago de camarões após 48h de um estímulo bacteriano em comparação a animais não estimulados (grupo *naïve*).

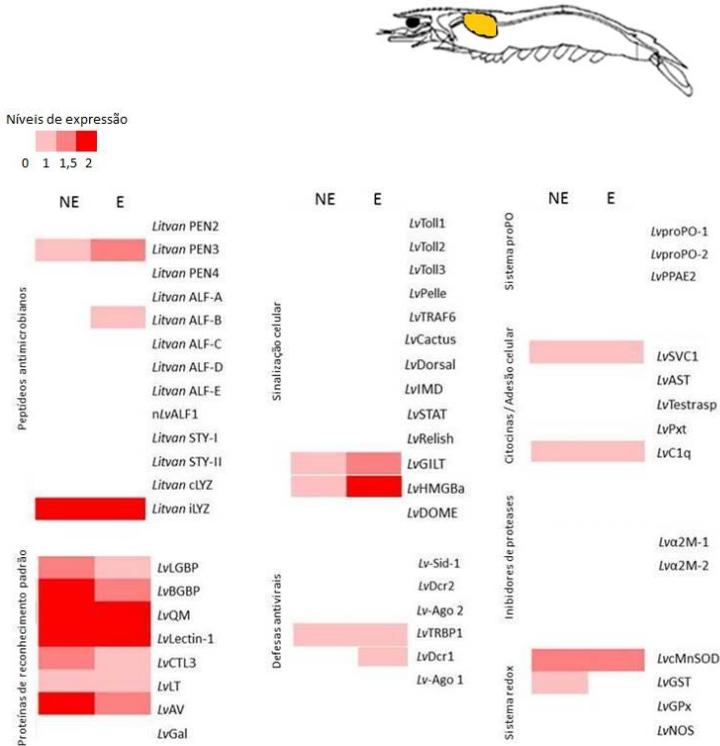


Cada retângulo da figura acima corresponde ao nível de expressão gênica em cada condição (**NE**: não estimulados; **E**: animais estimulados com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126 inativada por calor), onde a intensidade da cor indica a magnitude de expressão, segundo a escala de cor presente na parte superior da figura. A cor branca corresponde à ausência de expressão enquanto que as diferentes tonalidades de vermelho correspondem aos diferentes níveis de expressão gênica. Os diferentes genes (representados à direita) estão classificados conforme as categorias funcionais as quais pertencem.

5.2.2. Hepatopâncreas

No hepatopâncreas de camarões não estimulados, foi observada a expressão de 16 genes relacionados ao sistema imunológico de crustáceos. A categoria funcional mais representativa nesse órgão foram os proteínas de reconhecimento de padrões moleculares (PRPs) (7 de 8 genes) (**Figura 10**). Em camarões estimulados, cinco genes foram modulados positivamente (*Litvan* PEN3, *Litvan* ALF-B, *Lv*GILT, *Lv*HMGBa e *Lv*Dcr1) e cinco modulados negativamente (*Lv*LGBP, *Lv*BGBP, *Lv*CTL3, *Lv*AV e *Lv*GST). Não foi observada a expressão de genes pertencentes às categorias sistema proPO e inibidores de proteases. Grande parte dos genes codificantes para AMPs e vias imunológicas de sinalização celular também não mostraram-se expressos nesse órgão (**Figura 10**). Os genes que foram expressos somente após o estímulo foram *Litvan* ALF-B e *Lv*Dcr1, enquanto que apenas o gene *Lv*GST deixou de ser expresso em animais estimulados. De maneira interessante, os genes codificantes para a lisozima *Litvan* iLYZ e para as lectinas *Lv*Lectin-1, *Lv*CTL3 e *Lv*LT mostraram-se expressos exclusivamente no hepatopâncreas e não em outras regiões do trato gastrointestinal ou nos hemócitos. Em contrapartida, a expressão de 36 outros genes não foi detectada no hepatopâncreas de animais das duas condições experimentais (estimulados e *naïve*) (**Figura 10**).

Figura 10. Análise semi-quantitativa da expressão de 54 genes associados ao sistema imune de crustáceos no hepatopâncreas de camarões após 48 h de um estímulo bacteriano em comparação a animais não estimulados (grupo *naïve*).

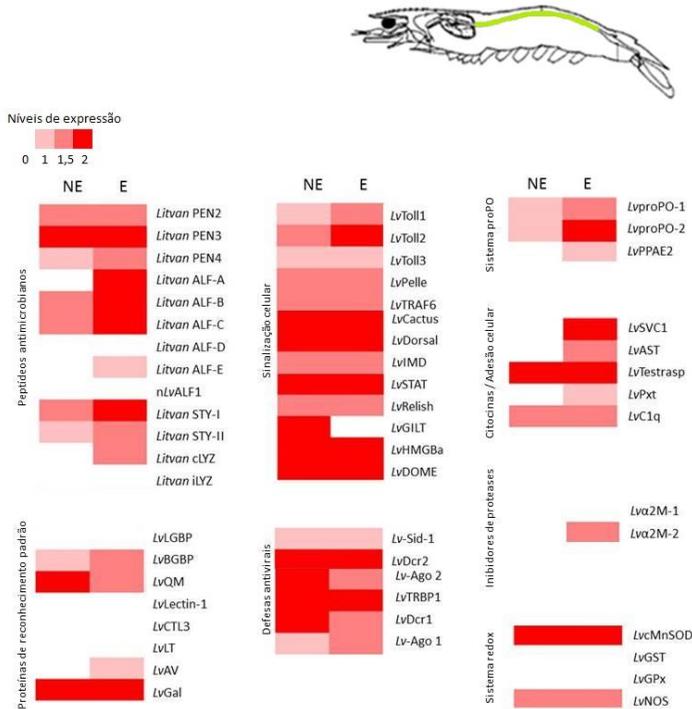


Cada retângulo da figura acima corresponde ao nível de expressão gênica em cada condição (NE: não estimulados; E: animais estimulados com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126 inativada por calor), onde a intensidade da cor indica a magnitude de expressão, segundo a escala de cor presente na parte superior da figura. A cor branca corresponde à ausência de expressão enquanto que as diferentes tonalidades de vermelho correspondem aos diferentes níveis de expressão gênica. Os diferentes genes (representados à direita) estão classificados conforme as categorias funcionais as quais pertencem.

5.2.3. Intestino médio

Dos 54 genes avaliados, 35 mostraram-se expressos no intestino médio de camarões não estimulados. Entre as categorias funcionais mais representativas nesse órgão foram os AMPs (7 de 13 genes), as vias imunológicas de sinalização celular (13 de 13 genes) e o sistema de RNAi (6 de 6 genes) (**Figura 11**). Após o estímulo bacteriano, 20 genes foram modulados positivamente (*Litvan* PEN4, *Litvan* ALF-A, *Litvan* ALF-B, *Litvan* ALF-C, *Litvan* ALF-E, *Litvan* STY-I, *Litvan* STY-II, *Litvan* cLYZ, *Lv*Toll1, *Lv*Toll2, *Lv*BGBP, *Lv*AV, *Lv*-Ago 1, *Lv*proPO-1, *Lv*proPO-2, *Lv*PPAE2, *Lv*SVC1, *Lv*AST, *Lv*Pxt e *Lv* α 2M-2), enquanto que apenas quatro genes foram modulados negativamente (*Lv*GILT, *Lv*QM, *Lv*-Ago 2 e *Lv*Dcr1). A expressão dos genes *Litvan* ALF-A, *Litvan* ALF-E, *Litvan* cLYZ, *Lv*AV, *Lv*PPAE2, *Lv*SVC1, *Lv*AST, *Lv*Pxt e *Lv* α 2M-2 foi detectada no intestino médio apenas após o estímulo microbiano. Em contrapartida, o gene *Lv*GILT foi expresso apenas em camarões do grupo *naïve*. Os genes que não se mostraram expressos no intestino médio, mesmo após estímulo microbiano, foram: *Litvan* ALF-D, *nLv*ALF1, *Litvan* iLYZ, *Lv*LGBP, *Lv*Lectin-1, *Lv*CTL3, *Lv*LT, *Lv* α 2M-1, *Lv*GST e *Lv*GPx (**Figura 11**).

Figura 11. Análise semi-quantitativa da expressão de 54 genes associados ao sistema imune de crustáceos no intestino médio de camarões após 48 h de um estímulo bacteriano em comparação a não estimulados (grupo *naïve*).

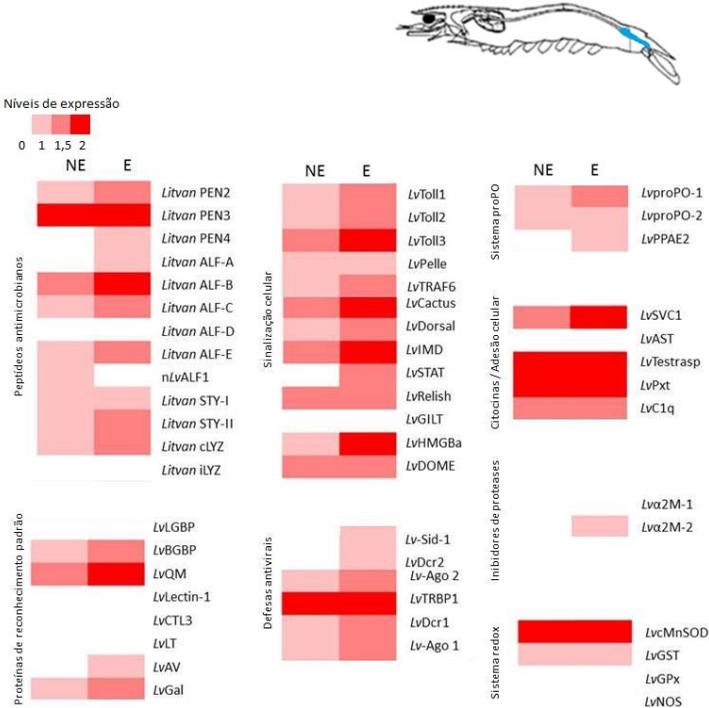


Cada retângulo da figura acima corresponde ao nível de expressão gênica em cada condição (**NE**: não estimulados; **E**: animais estimulados com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126 inativada por calor), onde a intensidade da cor indica a magnitude de expressão, segundo a escala de cor presente na parte superior da figura. A cor branca corresponde à ausência de expressão enquanto que as diferentes tonalidades de vermelho correspondem aos diferentes níveis de expressão gênica. Os diferentes genes (representados à direita) estão classificados conforme as categorias funcionais as quais pertencem.

5.2.4. Intestino posterior

No intestino posterior de camarões não estimulados, foi observada a expressão de 35 dos 54 genes avaliados. As categorias funcionais mais representativas nesse órgão foram os AMPs (9 de 13 genes), as vias imunológicas de sinalização celular (11 de 13 genes), as defesas antivirais (4 de 6 genes) e as citocinas (4 de 5 genes) (**Figura 12**). Após o estímulo bacteriano, 30 genes foram modulados positivamente (*Litvan* PEN2, *Litvan* PEN4, *Litvan* ALF-A, *Litvan* ALF-B, *Litvan* ALF-C, *Litvan* ALF-E, *Litvan* STY-II, *Litvan* cLYZ, *Lv*Toll1, *Lv*Toll2, *Lv*Toll3, *Lv*TRAF6, *Lv*Cactus, *Lv*Dorsal, *Lv*STAT, *Lv*IMD, *Lv*HMGBa, *Lv*BGBP, *Lv*QM, *Lv*AV, *Lv*Gal, *Lv*-Sid-1, *Lv*-Ago 1, *Lv*-Ago 2, *Lv*Dcr1, *Lv*Dcr2, *Lv*proPO-1, *Lv*PPAE2, *Lv*SVC1 e *Lv* α 2M-2), e apenas o gene *nLv*ALF1 foi modulado negativamente. Enquanto que a expressão dos genes *Litvan* PEN4, *Litvan* ALF-A, *Lv*STAT, *Lv*AV, *Lv*-Sid-1, *Lv*Dcr2, *Lv*PPAE2 e *Lv* α 2M-2 foi detectada apenas no intestino posterior de camarões estimulados, o gene *nLv*ALF1 foi expresso apenas em animais não estimulados. Os genes *Litvan* ALF-D, *Litvan* iLYZ, *Lv*GILT, *Lv*LGBP, *Lv*Lectin-1, *Lv*CTL3, *Lv*LT, *Lv*AST, *Lv* α 2M-1, *Lv*GPx e *Lv*NOS não apresentaram expressão nesse órgão, mesmo após estímulo microbiano (**Figura 12**).

Figura 12. Análise semi-quantitativa da expressão de 54 genes associados ao sistema imune de crustáceos no intestino posterior de camarões após 48 h de um estímulo bacteriano em comparação a animais não estimulados (grupo *naïve*).



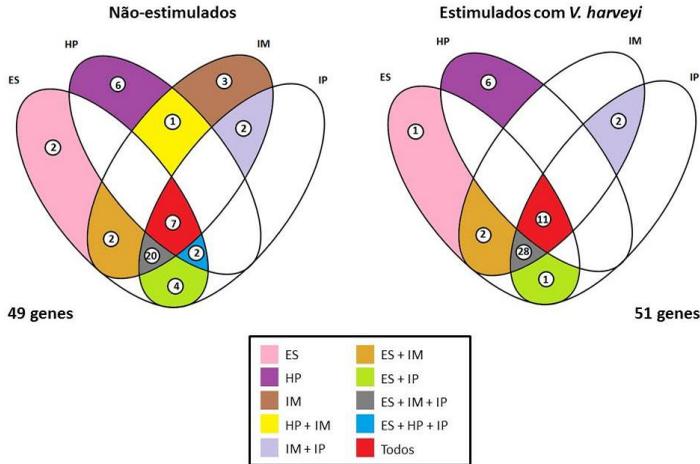
Cada retângulo da figura acima corresponde ao nível de expressão gênica em cada condição (**NE**: animais não estimulados; **E**: animais estimulados com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126 inativada por calor), onde a intensidade da cor indica a magnitude de expressão, segundo a escala de cor presente na parte superior da figura. A cor branca corresponde à ausência de expressão enquanto que as diferentes tonalidades de vermelho correspondem aos diferentes níveis de expressão gênica. Os diferentes genes (representados à direita) estão classificados conforme as categorias funcionais as quais pertencem.

Ao analisar o trato gastrointestinal como um todo, cinco genes não foram expressos em nenhuma das quatro regiões de camarões não estimulados (*Litvan* ALF-D, *Lv*PPAE2, *Lva*2M-1, *Lva*2M-2 e *Lv*GPx), enquanto que apenas três não apresentaram expressão após estímulo microbiano em nenhum dos órgãos analisados (*Litvan* ALF-D,

nLvALF1 e LvGPx). Genes que se mostraram expressos em todas as regiões do trato gastrointestinal de camarões não estimulados (*Litvan* PEN3, *Lv*HMGBa, *Lv*BGBP, *Lv*QM, *Lv*TRBP1, *Lv*C1q e *Lv*cMnSOD) mantiveram a sua expressão após o estímulo microbiano e outros quatro genes foram expressos apenas após o desafio bacteriano (*Litvan* ALF-B, *Lv*AV, *Lv*Dcr1 e *Lv*SVC1) (**Figura 13**).

De maneira interessante, 20 genes foram expressos no estômago, intestino médio e intestino posterior do grupo (*Litvan* PEN2, *Litvan* ALF-B, *Litvan* STY-I, *Litvan* STY-II, *Lv*Toll1, *Lv*Toll2, *Lv*Toll3, *Lv*Pelle, *Lv*TRAF6, *Lv*Cactus, *Lv*Dorsal, *Lv*IMD, *Lv*Relish, *Lv*DOME, *Lv*Gal, *Lv*Dcr1, *Lv*-Ago 1, *Lv*proPO-1, *Lv*proPO-2 e *Lv*Tetrasp). Após o estímulo microbiano, *Litvan* ALF-B e *Lv*Dcr1 passaram a se expressar em todas as regiões do trato gastrointestinal e *Lv*proPO-1 deixou de ser expresso no estômago. Dos genes analisados, 11 desses passaram a ser expressos no estômago, intestino médio e intestino posterior de camarões estimulados (*Litvan* PEN4, *Litvan* ALF-A, *Litvan* ALF-C, *Litvan* ALF-E, *Litvan* cLYZ, *Lv*STAT, *Lv*-Sid-1, *Lv*Dcr2, *Lv*-Ago 2, *Lv*Pxt e *Lv* α 2M-2) (**Figura 13**).

Figura 13. Diagrama de Venn indicando o número de genes associados ao sistema imune expressos nas diferentes regiões do trato gastrointestinal de *Litopenaeus vannamei* estimulados ou não (grupo naïve) com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126 inativada por calor.



ES: estômago, **HP:** hepatopâncreas, **IM:** intestino médio, **IP:** intestino posterior.

5.3. PERFIL TRANSCRICIONAL DE GENES EXPRESSOS NO INTESTINO MÉDIO FRENTE A INFECÇÕES BACTERIANAS E VIRAIS

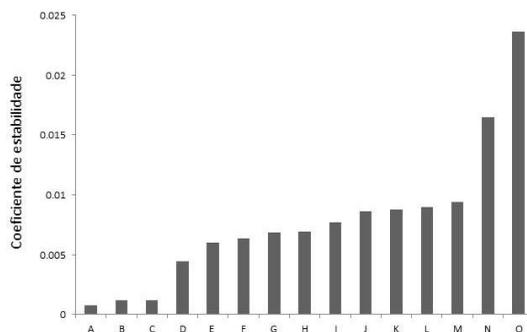
Com base em suas funções imunológicas, foram escolhidos 19 genes para as análises de expressão gênica quantitativa frente a infecções bacterianas e virais. Diferente das análises semi-quantitativas, nesse experimento, as bactérias foram injetadas vivas para a avaliação da resposta frente a uma infecção bacteriana (interação *Vibrio*-hospedeiro).

A expressão desses 19 genes foi avaliada no intestino médio, uma vez que essa região representa uma potencial via de entrada de microrganismos invasores para a hemocele dos camarões. As análises quantitativas de expressão gênica foram realizadas por RT-qPCR em animais experimentalmente infectados ou com a bactéria Gram-negativa marinha *V. harveyi* (ATCC 14126) ou com o WSSV.

A primeira análise realizada foi a escolha da melhor referência para a realização dos cálculos de expressão relativa. Para essa análise, foram avaliados quatro genes candidatos: o fator de alongação 1α (*LvEF-1 α*), as proteínas ribossomais L40 (*LvL40*) e RpS3A (*LvRpS3A*)

e a actina (*LvActin*). A análise para a escolha do melhor gene de referência levou em consideração o coeficiente de estabilidade dos valores de Cq, calculado pelo programa Normfinder (ANDERSEN et al., 2004). Nesse programa, um valor numérico foi atribuído para a expressão cada gene candidato (assim como para os valores das médias geométricas calculadas entre os diferentes candidatos) em cada condição experimental, levando a uma classificação final. Segundo esse critério, quanto menor o coeficiente de estabilidade do gene, menor a variação da sua expressão entre as condições experimentais. A condição que apresentou a menor variação de expressão foi a média geométrica dos genes *LvEF-1 α* , *LvActin* e *LvL40* (coeficiente de estabilidade 0,0007), sendo utilizada então como referência para as análises quantitativas de expressão gênica por RT-qPCR (**Figura 14**).

Figura 14. Estabilidade dos genes de referência.



Coeficiente de estabilidade dos valores de Cq dos genes e da média geométrica de suas diferentes combinações: (A) *LvEF-1 α* , *LvActin* e *LvL40*; (B) *LvEF-1 α* , *LvActin*, *LvL40* e *LvRpS3A*; (C) *LvEF-1 α* , *LvActin* e *LvRpS3A*; (D) *LvActin*, *LvL40* e *LvRpS3A*; (E) *LvL40* e *LvRpS3A*; (F) *LvEF-1 α* e *LvActin*; (H) *LvEF-1 α* , *LvL40* e *LvRpS3A*; (J) *LvEF-1 α* e *LvRpS3A*; (K) *LvActin* e *LvL40*; (L) *LvActin* e *LvRpS3A*; (M) *LvEF-1 α* e *LvL40*; (N) *LvEF-1 α* e (O) *LvActin*. Coeficiente de estabilidade dos valores de Cq dos genes: (G) *LvL40*; (I) *LvRpS3A*; (N) *LvEF-1 α* ; (O) *LvActin*.

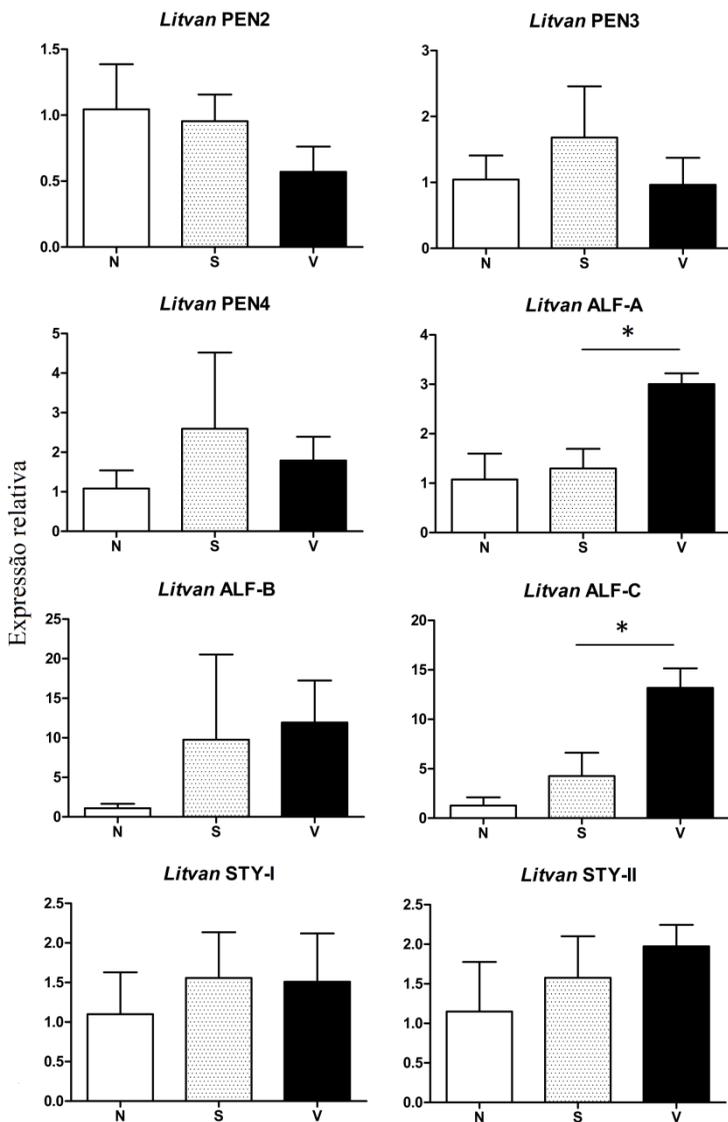
Para as análises de expressão gênica frente à infecção bacteriana e viral, foram selecionados 19 genes das seguintes categorias funcionais: **AMPs** (*Litvan* PEN2, *Litvan* PEN 3, *Litvan* PEN4, *Litvan* ALF-A, *Litvan* ALF-B, *Litvan* ALF-C, *Litvan* STY-I, *Litvan* STY-II e *Litvan* cLYZ), **Sistema de RNAi** (*Lv-Sid-1*, *LvDcr 1*, *LvDcr 2*, *LvTRBP1*, *Lv-Ago 1* e *Lv-Ago 2*), **PRPs** (*LvAV*), **Citocinas** (*LvSVC1*), **Inibidores de**

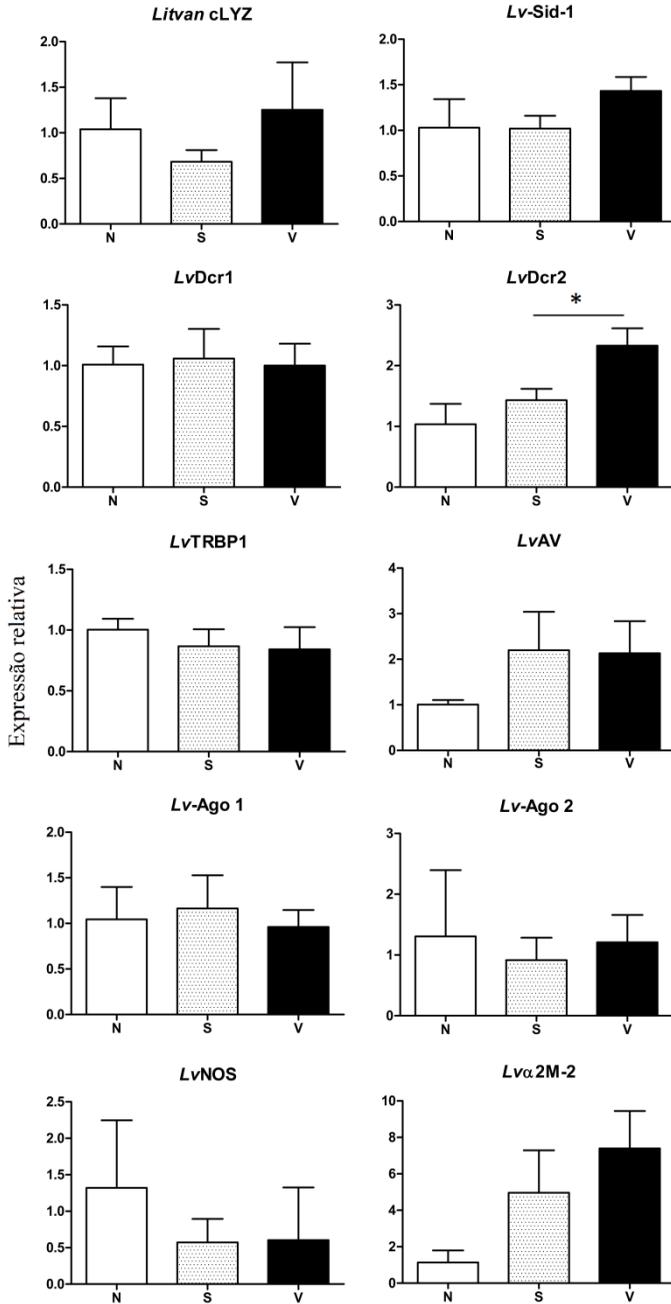
proteases (*Lv* α 2M-2) e **Sistema redox** (*Lv*NOS). Para a infecção bacteriana, foram utilizados dois grupos controle: animais *naïve* e animais injetados com água do mar estéril (salina). Dos genes analisados, três foram induzidos frente à infecção com a bactéria *V. harveyi* (ATCC 14126): *Litvan* ALF-A (2,3 vezes; $P=0,007$), *Litvan* ALF-C (3,1 vezes; $P=0,007$) e *LvDcr* 2 (1,6 vezes; $P=0,02$) (**Figura 15**).

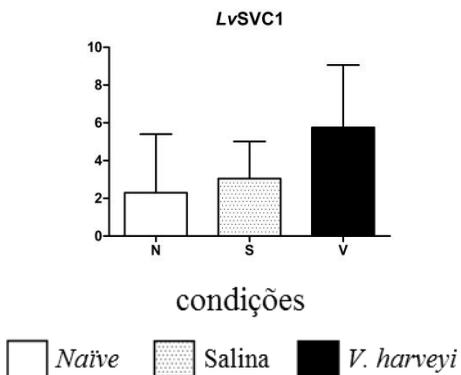
Na infecção viral, os grupos controle foram compostos por animais *naïve* e por animais injetados com um inóculo livre de WSSV (W-). Dos genes analisados, apenas o gene *Litvan* ALF-A apresentou modulação após a infecção com WSSV, o qual foi reprimido 2,3 vezes ($P=0,03$), em relação ao grupo W- (**Figura 15**).

Comparativamente às análises semi-quantitativas (RT-PCR convencional), os genes *Litvan* ALF-A e *Litvan* ALF-C também foram induzidos apenas com o estímulo microbiano, ao contrário de *LvDcr*2 que manteve sua expressão constante entre animais *naïve* e estimulados. Alguns genes (*Litvan* PEN2, *Litvan* PEN3, *Litvan* PEN4, *Litvan* ALF-B, *Litvan* ALF-C, *Lv* α 2M-2 e *Lv*SVC1) apresentaram uma grande variabilidade na expressão (**Figura 15**).

Figura 15. Perfil de expressão de genes expressos no intestino médio de camarões após 48 h de uma infecção experimental com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126.

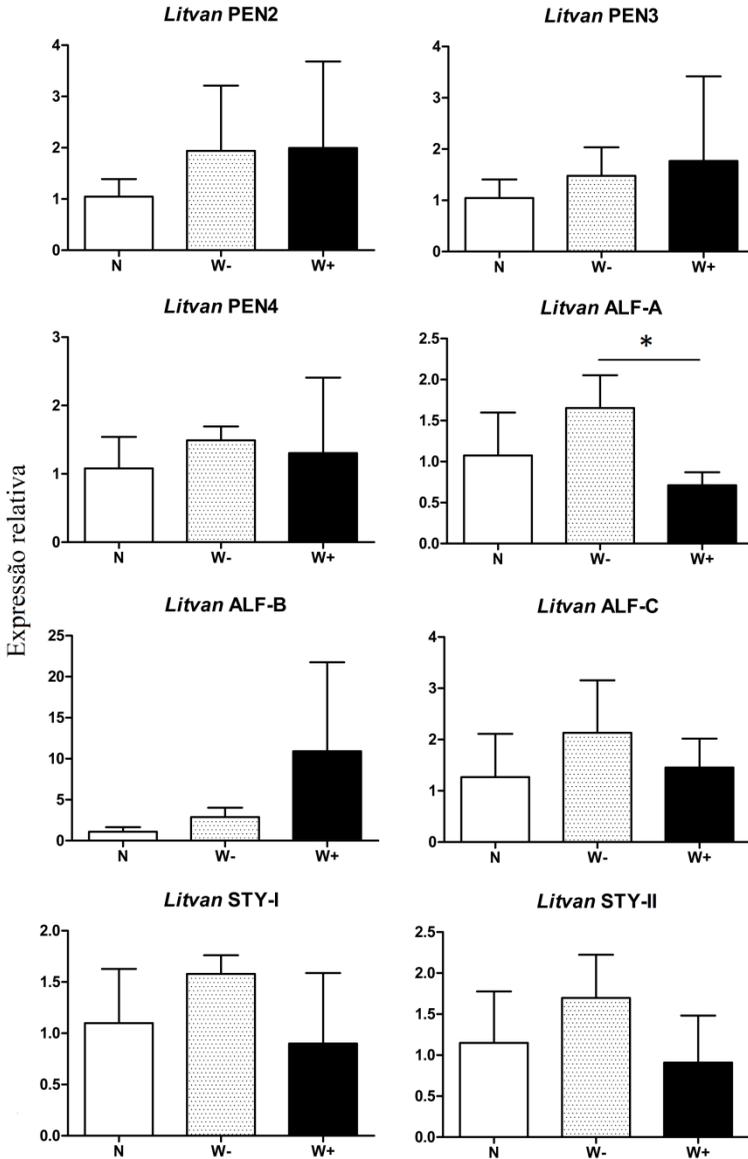


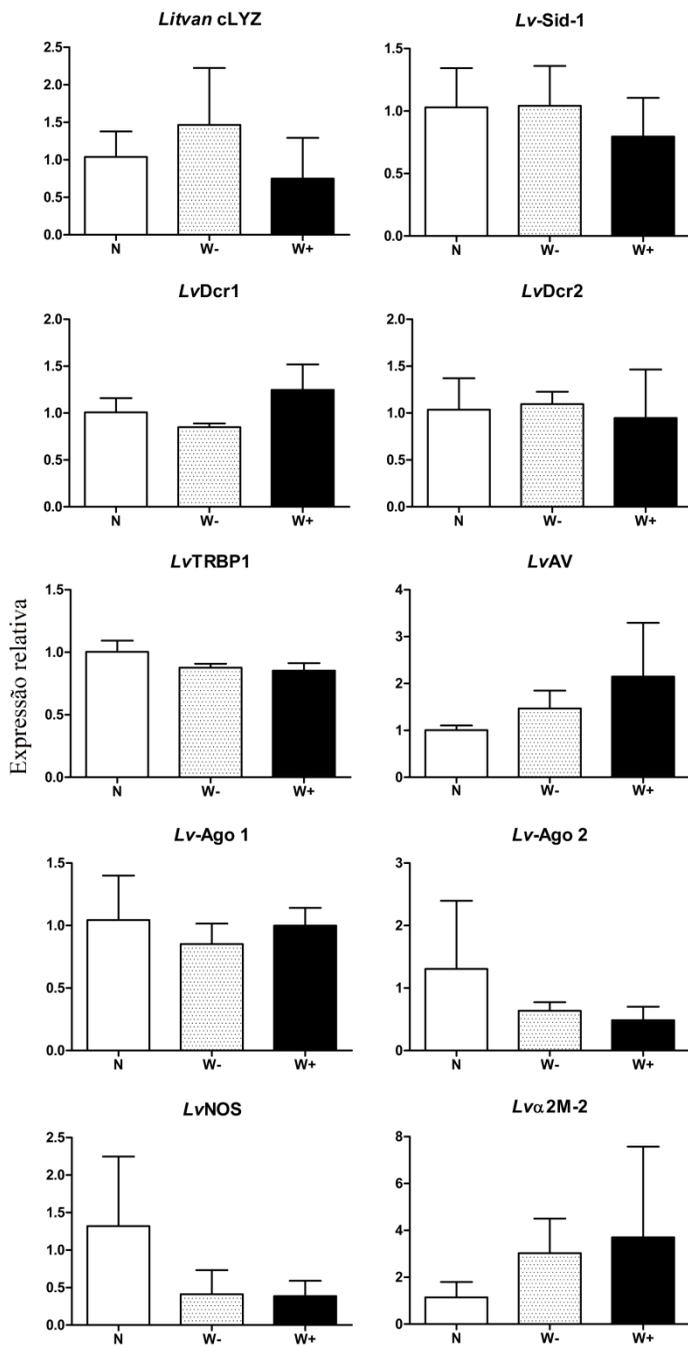


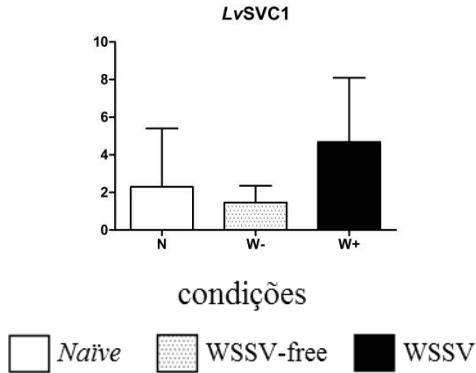


Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão. *Diferenças estatísticas entre as condições experimentais ($P < 0,05$) obtidas pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo Teste de Tukey. N: grupo *naïve* (não manipulados); S: grupo salina (água do mar estéril); V: grupo infectado com *V. harveyi* (6×10^7 CFU/animal).

Figura 16. Perfil de expressão de genes expressos no intestino médio de camarões após 48 h de uma infecção experimental com o vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV).







Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão. *Diferenças estatísticas entre as condições experimentais ($P < 0,05$) obtidas pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo Teste de Tukey. N: grupo *naïve* (não manipulados); W-: grupo injetado com inóculo livre de WSSV; W+: grupo infectado com WSSV (3×10^2 cópias genômicas/animal).

6. DISCUSSÃO

Para se proteger contra agentes patogênicos, os crustáceos contam com eficientes mecanismos de defesa, os quais incluem tanto respostas antimicrobianas (produção de espécies ativas de oxigênio, peptídeos antimicrobianos, sistema de ativação da proPO, entre outros) quanto antivirais (produção de citocinas do tipo interferon, sistema RNAi e indução de apoptose e autofagia). No entanto, muito do nosso conhecimento a respeito do sistema imune de crustáceos está concentrado nas respostas de defesa que ocorrem na hemolinfa (imunidade celular e humoral) e pouco ainda se sabe sobre a imunidade local e epitelial desses animais. O sistema digestório de crustáceos, composto pelos intestinos anterior (estômago), médio e posterior (além do hepatopâncreas), constitui uma grande superfície de contato com o meio exterior e uma potencial via de acesso para agentes patogênicos. Nesse contexto, o presente estudo vem contribuir para um maior conhecimento da imunidade intestinal da espécie de camarão mais cultivada no mundo (*L. vannamei*) através da análise de expressão de genes associados ao sistema imune nas diferentes regiões do trato gastrointestinal.

Uma das categorias gênicas mais representativas nos órgãos avaliados neste trabalho foi a dos peptídeos antimicrobianos (AMPs). Em *L. vannamei*, somente no hepatopâncreas não foi detectada a expressão de AMPs, assim como observado no camarão *P. monodon* (SUPUNGUL et al., 2004). Da mesma maneira, altos níveis de expressão também foram relatados no intestino médio dos camarões *P. monodon* (SOONTHORNCHAI et al., 2010; SUPUNGUL et al., 2004) e *M. japonicus* (NAGOSHI et al., 2006). *Litvan* ALF-A foi o AMP que apresentou os mais altos níveis de expressão no estômago, não sendo detectado nos outros órgãos. O gene *Litvan* ALF-B, por sua vez, foi detectado no estômago, intestino médio e intestino posterior. Ao encontro do que foi observado neste trabalho, esse gene também foi expresso no estômago de camarões dessa mesma espécie (WANG; CHANG; CHEN, 2007). Enquanto que o gene ALF do grupo C foi expresso apenas no intestino médio e posterior de *L. vannamei*, ele foi detectado em baixos níveis no estômago do camarão *M. japonicus* (NAGOSHI et al., 2006). Em *F. chinensis*, o gene ALF1 mostrou baixa expressão no hepatopâncreas e alta expressão no intestino médio (LIU et al., 2005a), porém não foi detectado no hepatopâncreas e no intestino médio de *L. vannamei*. As peneidinas foram todas expressas no estômago e intestino médio de *L. vannamei* e detectadas em alta

expressão no intestino médio e em baixa expressão no intestino posterior de *P. monodon* (SOONTHORNCHAI et al., 2010). Sendo efetores do sistema imune inato e agindo como a primeira linha de defesa (HANCOCK; DIAMOND, 2000), os AMPs são moléculas essenciais no combate aos microrganismos invasores e também são conhecidos pelas suas propriedades imunomodulatórias (BOWDISH; DAVIDSON; HANCOCK, 2005). Assim como ocorre nos hemócitos, que produzem e armazenam AMPs (SOMBOONWIWAT et al., 2005), as células intestinais podem estar exercendo a mesma função, produzindo e liberando AMPs no lúmen do intestino para controlar tanto os microrganismos comensais, como os patogênicos. O controle de bactérias da microbiota da hemolinfa foi anteriormente observado em *M. japonicus*, onde uma lectina do tipo C é responsável por regular a expressão de AMPs que selecionam as comunidades microbianas ali presentes (WANG et al., 2014).

Assim como observado para os AMPs, os genes de sinalização celular foram mais representativos no estômago, intestino médio e intestino posterior. O gene *LvPelle* apresentou baixos níveis de expressão no estômago, enquanto que mostrou-se constitutivamente expresso no trabalho de Wang e colaboradores (2011). A expressão do gene *Pelle* foi anteriormente reportada no intestino médio de *L. vannamei*, o qual é constitutivamente expresso no intestino posterior de camarões saudáveis, bem como o gene *TRAF6* (WANG et al., 2011). No presente trabalho, *LvIMD* apresentou expressão moderada no estômago, intestino médio e intestino posterior, porém sua expressão não foi detectada no hepatopâncreas. Comparativamente, em *L. vannamei*, esse gene foi altamente expresso no intestino médio e posterior, e apresentou expressão moderada no hepatopâncreas (WANG et al., 2009). O gene *Toll3*, altamente expresso no estômago, ausente no hepatopâncreas e detectado no intestino médio e posterior, apresentou expressão em diferentes órgãos, inclusive nos hemócitos, sendo mais expresso no coração e intestino (WANG et al., 2012b). O gene *LvHMGBa* foi expresso em níveis baixos no hepatopâncreas de *L. vannamei*, enquanto que no trabalho de Chen e colaboradores (2011), se mostrou altamente expresso nesse órgão.

A co-expressão de AMPs e efetores das vias de sinalização celular nas mesmas regiões do trato gastrointestinal (estômago, intestino médio e posterior) sugere que essas vias estejam controlando a expressão de AMPs nesses órgãos. Em insetos, por exemplo, a via *IMD* está implicada nas defesas locais (epitélios) e sistêmicas, mas também na manutenção das comunidades microbianas comensais no intestino

(CLAYTON; DONG; DIMOPOULOS, 2013) através da transcrição de diferentes efetores do sistema imune, em especial os AMPs (MEISTER et al., 2005). Estudos mostraram que o silenciamento de Cad (um antagonista do fator de transcrição Relish/Rel2 e um regulador negativo da via IMD no mosquito *Anopheles gambiae*) levou ao aumento da expressão de certos AMPs e à modulação da microbiota do intestino, enfatizando que o equilíbrio da relação antagonica de Cad e Rel garante um balanço entre as defesas imunológicas e a homeostase da microbiota intestinal (CLAYTON; DONG; DIMOPOULOS, 2013; ROYET; CHARROUX, 2013). Em mosquitos, foi demonstrado que a via de sinalização celular IMD é responsável pela manutenção da sua microbiota intestinal e pelo controle de *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária (CLAYTON; DONG; DIMOPOULOS, 2013).

Em relação à categoria das proteínas de reconhecimento padrão, o hepatopâncreas mostrou expressar a maior quantidade de genes. Em *M. japonicus*, o gene *MjGal* foi detectado em baixos níveis no estômago e apresentou alta expressão no hepatopâncreas e no intestino médio (SHI et al., 2014), porém, em *L. vannamei*, o gene *LvGal* não foi detectado no hepatopâncreas, mas foi altamente expresso no intestino médio e apresentou baixa expressão no estômago e intestino posterior. Em *P. monodon*, a proteína antiviral *LvAV* (uma lectina do tipo-C), que está presente no estômago (LUO et al., 2003), apresentou alta expressão no hepatopâncreas e foi detectada no intestino (LUO et al., 2006). No entanto, em *L. vannamei*, esse gene apresentou altos níveis de expressão no hepatopâncreas, não sendo detectado nos outros órgãos. O hepatopâncreas é um importante sítio de síntese de PRPs em diferentes espécies de crustáceos (CHENG et al., 2005; LE ROUX et al., 2002; LEE; SÖDERHÄLL, 2002), em especial os genes *LvLGBP* e *LvβGBP* (WANG; CHANG; CHEN, 2007), assim como as lectinas *LvLT* (MA et al., 2007) e *LvLectin-1* (LUO et al., 2011). A alta abundância de transcritos provavelmente reflete o órgão como a principal glândula de síntese e armazenamento de proteínas da hemolinfa (WANG; CHANG; CHEN, 2007). Estudos transcriptômicos (bibliotecas de EST) evidenciaram que o hepatopâncreas de peneídeos é um importante sítio de expressão de genes relacionados ao sistema imune, sugerindo a participação dessa glândula digestiva nas respostas de defesa de camarões (GROSS et al., 2001). Além da importância na imunidade humoral, o hepatopâncreas possui diversas funções vitais e está envolvido em diversas atividades metabólicas (GIBSON; BARKER, 1979). Ele participa do processo digestivo através da completa quebra do bolo alimentar recebido do intestino anterior, produção de enzimas

digestivas e absorção dos produtos da digestão, e também a remoção do material residual na forma de fezes (ICELY; NOTT, 1992). A diferença de expressão gênica entre o hepatopâncreas e as outras partes do trato gastrointestinal reflete a compartimentalização do intestino. Por ser uma glândula anexa e não ter contato direto com os intestinos anterior, médio e posterior, o hepatopâncreas não compartilha o epitélio para a imunidade intestinal.

Em relação ao sistema redox, o gene *LvcMnSOD* mostrou altos níveis de expressão no estômago, intestino médio e intestino posterior, e baixa expressão no hepatopâncreas. Em um trabalho anterior, *cMnSOD* também mostrou ser altamente expresso no estômago e pouco expresso no hepatopâncreas, enquanto que no intestino médio, ele foi detectado em baixos níveis de expressão no *L. vannamei* (WANG; CHANG; CHEN, 2007). Em outro trabalho, o gene *cMnSOD* de *P. monodon* apresentou alta expressão no intestino médio (SOONTHORNCHAI et al., 2010). O gene *LvNOS* foi encontrado em níveis moderados de expressão no estômago e intestino médio. Segundo um trabalho de Yao e colaboradores (2010), o gene *LvNOS* apresentou expressão no estômago, mas também no hepatopâncreas. Por outro lado, em *P. monodon*, esse gene apresentou ausência de expressão no hepatopâncreas e foi detectado no intestino médio (WU; SIVA; SONG, 2013). Os genes do sistema redox parecem ser tão importantes para a imunidade intestinal de camarões como para outras espécies de artrópodos. Em mosquitos, as condições redox são um dos fatores responsáveis pela diversidade da microbiota no tubo digestivo, aliados a efeitos de pH, enzimas digestivas e tipo de alimentação (DILLON; DILLON, 2004). Além disso, evidências sugerem que o estresse oxidativo induzido pela bactéria *Wolbachia* sp. no mosquito hospedeiro, ativa a via Toll (PAN et al., 2005). Um estudo revelou que em estágios tardios da infecção por WSSV, os hemócitos do camarão mostram diversas mudanças como a indução da permeabilização mitocondrial e o aumento do estresse oxidativo (CHEN et al., 2011). Por outro lado, alguns genes envolvidos com a proteção do estresse oxidativo de *L. vannamei* parecem ser modulados negativamente pelo WSSV (ROBALINO et al., 2007).

Alguns genes foram expressos exclusivamente no trato gastrointestinal, o que sugere que os transcritos estão sendo produzidos pelas células epiteliais desses órgãos, como a lisozima *Litvan* iLYZ e as lectinas *LvLectin-1*, *LvCTL3* e *LvLT*. No entanto, como o sistema circulatório dos camarões é do tipo aberto/semiaberto, pode ocorrer infiltração dos hemócitos para os diferentes tecidos e a fraca detecção de

transcritos após o estímulo pode ser originada desses hemócitos infiltrantes (WANG et al., 2014). Hemócitos infiltrados podem contribuir com a expressão de genes como proPO, PEN3 e lisozima do tipo C. Além dos fracos sinais de detecção nos órgãos do trato gastrointestinal, o perfil semelhante de expressão desses genes nos diferentes tecidos também pode indicar infiltração hemocitária. Outra razão possível para expressões diferenciadas entre os tecidos seria de que hemócitos em circulação expressam genes diferentes daqueles infiltrados porque são mais diferenciados (WANG; CHANG; CHEN, 2007). O gene da proPO, que é essencialmente expresso em hemócitos, foi encontrado em baixos níveis de expressão em outros tecidos de camarões não estimulados e estimulados. Em um trabalho de Wang e colaboradores (2006), sinais de expressão da proPO foram detectados em células não-hemocitárias pela técnica de hibridização *in situ* e confirmadas por RT-PCR. Em *P. monodon*, a proPO foi detectada no hepatopâncreas e no intestino médio (SOONTHORNCHAI et al., 2010). Foi observada a expressão do gene da proPO no estômago, intestino médio e intestino posterior. Esse resultado vai de encontro ao observado em *F. chinensis*, onde o nível de expressão da proPO é alto no hepatopâncreas (GAO et al., 2009). A fim de confirmar a expressão de genes relacionados ao sistema imune nos órgãos do trato gastrointestinal, são necessárias técnicas complementares como a de hibridização *in situ*, responsável por elucidar o local de expressão gênica, visto que a expressão encontrada pode ser proveniente de hemócitos infiltrados. A imunolocalização de alguns efetores do sistema imune no trato gastrointestinal de *L. vannamei* (*Litvan* PEN3, *Litvan* STY-I, *Litvan* ALF-B e *Lv*NOS) está sendo atualmente realizada no nosso laboratório e complementarará os resultados encontrados neste trabalho.

Para avaliar a expressão gênica frente a infecções bacterianas e virais, foram selecionados alguns genes a partir do perfil de expressão observado no intestino médio de camarões após estímulo microbiano e pela função que desempenham nas respostas de defesa antibacterianas e antivirais de camarões. Visto que o intestino médio é desprovido de cutícula, diferentemente das outras partes do trato gastrointestinal (LOVETT; FELDER, 1990), essa região representa um possível sítio para a entrada de patógenos. A membrana peritrófica (MP) é um importante mecanismo de defesa contra microrganismos invasores no intestino médio, assim como mostra o trabalho de Soonthornchai e colaboradores (2010), onde a expressão de uma proteína mucina-like da MP é aumentada após exposição ao *V. harveyi*, mostrando que a bactéria

perturba o epitélio do intestino médio e pode ocasionar aumento de proteínas responsáveis pela síntese da MP.

Segundo o trabalho de Gonçalves e colaboradores (2014), grande parte dos genes relacionados ao sistema imune apresentam as maiores diferenças nos níveis de transcritos nos hemócitos 48 h após uma infecção com WSSV, como o *Lv-Ago 2*, *LvDcr2* e *LvSid-1*. Porém, alguns genes como *Lv-Ago 1*, *Lva2M-2* e *LvDorsal*, modulam positivamente em 24 h e voltam aos níveis basais em 48 h. Sendo assim, os níveis de expressão gênica podem variar conforme o tempo de exposição ao patógeno. Em *M. japonicus*, o gene NOS teve seu pico de expressão em 12 h após a infecção por *V. penaeicida* e começou a diminuir no tempo de 24 h (INADA et al., 2010). Após infecção com WSSV, os genes *LvHMGBa* e *LvHMGBb* foram modulados positivamente e apresentaram um pico de expressão no tempo de 24 h (CHEN et al., 2011), enquanto que o gene Lectin de *F. chinensis* começa a aumentar a expressão em 3 h após a infecção e volta aos níveis basais entre 6 e 48 h (LIU et al., 2007). No presente estudo, os genes *Litvan PEN2*, *Litvan PEN3* e *Litvan PEN4* não apresentaram diferenças nos níveis de transcritos 48 h após infecção com *V. harveyi* e WSSV. Nos hemócitos, por outro lado, o pico de expressão gênica desses genes foi anteriormente observado 3 h após a infecção com WSSV e em 48h o gene apresenta modulação negativa no nível de transcritos (WANG et al., 2013). Em infecção oral por *V. harveyi* em *P. monodon*, o gene da peneidina (PEN3) foi altamente expresso nos hemócitos e moderado no intestino anterior e médio 24 h após o contato com a bactéria (SOONTHORNCHAI et al., 2010).

Neste trabalho, enquanto que o gene *Litvan ALF-B* não apresentou diferenças entre os níveis de transcritos frente a ambos os patógenos avaliados, *Litvan ALF-A* e *Litvan ALF-C* apresentaram modulação positiva frente à infecção bacteriana e apenas *ALF-A* apresentou redução nos níveis de transcritos em resposta ao WSSV. Em hemócitos circulantes, a expressão dos genes *ALF-B* e *ALF-C* modula em resposta à infecção com *F. solani* e injúria, enquanto que o *ALF-A* não é modulado (ROSA et al., 2013). Em um estudo com *ALF* recombinante em *P. monodon*, foi demonstrada a atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SOMBOONWIWAT et al., 2005). No lagostim *Pacifastacus leniusculus*, o gene *ALF* demonstrou ser capaz de reduzir a replicação do WSSV (LIU et al., 2006). Estudos indicam que o gene *ALF* é induzido frente a desafio bacteriano em muitos camarões (LIU et al., 2005; NAGOSHI et al., 2006), enquanto que em *P. leniusculus* é

induzido frente a infecção com WSSV (LIU et al., 2006). Os genes *Litvan* ALF-A e *Litvan* ALF-C geralmente são expressos em níveis menores do que o *Litvan* ALF-B, porém eles também possuem funções importantes na sobrevivência dos camarões em infecções contra bactérias e fungos (PONPRATEEP et al., 2012) a nível intestinal, evitando que esses patógenos entrem na cavidade do corpo e causem doença.

Diferente dos demais genes associados às defesas antivirais, o gene *LvDcr2* foi induzido no intestino médio nos camarões infectados com a bactéria *V. harveyi*. No trabalho de Gonçalves e colaboradores (2014), genes como *Lv-Ago 2*, *LvDcr2* e *Lv-Sid-1*, foram induzidos nos hemócitos de camarões *L. vannamei* 48 h após uma infecção letal com WSSV. Outros trabalhos também mostraram que as proteínas Sid-1, argonauta e Dicer são induzidas pelo WSSV. O gene Dicer 2 mostrou ser induzido quando camarões das espécies *L. vannamei* e *P. monodon* são tratados com dsRNA poli (C-G) ou poli (I:C) (CHEN et al., 2011; LI et al., 2013). Em *M. japonicus*, Dicer 2 mostrou mediar a biogênese de siRNA antiviral e impedir o aumento do número de cópias do WSSV 24 e 48 h após a infecção (HUANG; ZHANG, 2012).

A infecção foi padronizada em DL50, onde foi injetada uma dose de microrganismos capaz de matar 50% dos animais. Porém, o pico de mortalidade de camarões infectados com o *V. harveyi* ocorreu em 24 h. Como o trato gastrointestinal dos animais foi coletado em 48 h, foi observada a expressão gênica apenas dos sobreviventes. O pico de mortalidade para o WSSV, no entanto, ocorreu uma semana após a infecção, e neste experimento foi observada a expressão gênica tanto dos animais que iriam sobreviver como daqueles que morreriam. Isso pode estar sendo refletido em uma maior variabilidade expressão observada nos animais após a infecção viral.

Apesar de muitos genes terem apresentado modulação gênica no intestino médio frente ao desafio com a bactéria *V. harveyi* (mortas por calor), a infecção com a bactéria viva trouxe alguns resultados diferentes. Interações do patógeno com o hospedeiro podem ser as causas dessas expressões diferenciadas, pois muitas proteínas participam dessa interação e os diferentes padrões de expressão entre camarões desafiados com bactéria e vírus indicam que o hospedeiro possui diferentes estratégias para resistir a diferentes patógenos. Essas interações geram respostas evolutivas que podem estar atuando nos genes relacionados ao sistema imunológico, como os AMPs, propondo que as mutações dos patógenos podem estar aperfeiçoando as barreiras do sistema imune contra eles (SCHMITT; ROSA; DESTOUMIEUX-

GARZÓN, 2015). Os patógenos, quando vivos, podem ocasionar modulação (positiva ou negativa) nos genes do hospedeiro. No presente trabalho, essa modulação não foi observada com a bactéria morta, pois a indução dos genes foi o resultado do reconhecimento dos padrões moleculares.

Para realizar este trabalho, foi realizada infecção experimental por injeção para que fosse assegurado que tínhamos a mesma quantidade de vírus e bactérias nos animais. Porém, uma infecção oral (*per os*) poderia ser uma maneira melhor de mimetizar a rota natural do microrganismo e investigar as interações que ocorrem entre o patógeno e o hospedeiro no trato digestivo (SOONTHORNCHAI et al., 2015). Em camarões, existem diferentes rotas naturais de infecção por bactérias virulentas isoladas, que é a maneira oral, transcuticular, causada por ferimentos, ou por qualquer desequilíbrio na microbiota, porém, é provável que múltiplas rotas de infecção ocorram simultaneamente para o mesmo patógeno (SAULNIER et al., 2000).

A microbiota intestinal desempenha um importante papel na saúde do hospedeiro. Entender os processos dinâmicos de interação entre a microbiota e o hospedeiro frente a uma infecção é essencial para promover intervenções que ajudem a manter a saúde do animal (FRANK et al., 2007). As bactérias são capazes de se ligar a área do intestino médio dos camarões se tornando residentes de longo prazo devido ao fato de que essa área não é descartada durante a muda (SOONTHORNCHAI et al., 2015). Algumas bactérias secretam enzimas que degradam a MP, resultando na colonização da camada epitelial (PETERS, 1992). Existem alguns patógenos, como o *V. parahaemolyticus*, que produzem toxinas capazes de penetrar a MP e causar danos, sem que a bactéria atravesse a MP (MARTIN; RUBIN; SWANSON, 2004). Além da MP exercer uma barreira física para o estabelecimento de bactérias, a imunidade da mucosa do intestino de camarões pode controlar diretamente o número de microrganismos da microbiota (SOONTHORNCHAI et al., 2010). Muitos genes que codificam proteínas constituintes da MP são induzidos frente à infecção com *Pseudomonas* spp., confirmando o papel de defesa da membrana prevenindo o contato entre a bactéria e o epitélio do intestino (VODOVAR et al., 2005). Sabe-se que a hemolinfa de alguns invertebrados aquáticos possui um número baixo e estável de espécies e cepas bacterianas (FAGUTAO et al., 2009). Em camarões, existem moléculas capazes de regular a homeostase dessa microbiota, como por exemplo, uma lectina do tipo C (*MjHeCL*), que é constitutivamente expressa pelos hemócitos. Essa lectina possui a função indireta de

impedir que as bactérias dessa microbiota se proliferem. A atividade antimicrobiana direta é realizada pelos peptídeos antimicrobianos ALF4 e ALF6 (WANG et al., 2014). Outro exemplo de controle da microbiota é o gene ALF3 de *P. monodon*, que possui função de controlar a proliferação das bactérias da microbiota no hepatopâncreas e hemolinfa (PONPRATEEP et al., 2012).

As comunidades bacterianas da microbiota podem diferir de acordo com o habitat e o estado de saúde do hospedeiro. A variação dessa microbiota não é um processo aleatório e acontece através de um gradiente, onde essas mudanças estão relacionadas com a severidade das doenças que acometem os camarões (XIONG et al., 2015). Além disso, sob condições de estresse, alguns microrganismos oportunistas naturalmente presentes na microbiota intestinal desses animais podem se disseminar e causar enfermidades. Exemplos da aplicabilidade de estudos sobre a interação da microbiota endobionte e o sistema imune pode ser evidenciado em insetos vetores, os quais se encontram relativamente avançados e aplicados no controle de doenças humanas (BIAN et al., 2013). Em especial, foi demonstrado que a bactéria endobionte *Wolbachia pipientis* é capaz de bloquear a transmissão do vírus da dengue no mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti*, representando uma estratégia biotecnológica para o controle dessa doença (DONG; MANFREDINI; DIMOPOULOS, 2009; JACUPS et al., 2013). Da mesma forma, o estudo da microbiota endobionte de espécies cultivadas de crustáceos poderá despontar em futuro próximo como uma estratégia inovadora e promissora no controle de enfermidades.

Frente aos muitos problemas que enfrenta a carcinicultura com doenças ocasionadas por diferentes patógenos, o presente estudo abre possibilidades para a aplicação de ferramentas como a técnica de RNAi e genômica funcional. A técnica de RNAi pode ser utilizada para silenciar os genes diferencialmente expressos identificados nesse trabalho para verificar a função deles na manutenção da microbiota intestinal e no controle de infecções bacterianas e virais. Estudos dessa natureza são essenciais para o entendimento das relações patógeno-hospedeiro em camarões e para o desenvolvimento de novas estratégias para o controle de enfermidades nos cultivos.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

7.1. CONCLUSÕES

- Genes de diversas categorias funcionais associadas ao sistema imune são diferencialmente expressos nas quatro principais regiões do trato gastrointestinal do camarão *L. vannamei*;

- A expressão de alguns genes associados ao sistema imune de camarões é modulada no intestino médio frente a infecções bacterianas e virais.

7.2. PERSPECTIVAS

- Confirmar a localização dos sítios de expressão dos diferentes genes por hibridização *in situ* e/ou imunohistoquímica;

- Avaliar a expressão dos genes identificados neste estudo em animais após infecções orais (*per os*);

- Avaliar o papel dos genes expressos no trato gastrointestinal na manutenção da microbiota intestinal e no controle de enfermidades bacterianas e virais;

- Compreender o envolvimento da microbiota intestinal na regulação dos genes expressos no intestino.

REFERÊNCIAS

- AGAISSÉ, H.; PERRIMON, N. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 72–82, 2004.
- ALEXANDRE, D. et al. Spatial distribution of digestive proteinases in the midgut of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) indicates the existence of endo-ectoperitrophic circulation in Crustacea. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 172-173, p. 90–5, 2014.
- AMPARYUP, P.; CHAROENSAPSRI, W.; TASSANAKAJON, A. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. **Fish & shellfish immunology**, v. 34, n. 4, p. 990–1001, abr. 2013.
- BACHERE, E. et al. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 149–168, abr. 2004.
- BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Avances en la Inmunología del Camarón. In: MORALES, V. Q. Y.; CUÉLIAR-ANGEL, J. (Ed.). **Guía Técnica - Patología e inmunología de camarones penaeidos**. 2. ed. Panamá: [s.n.]. p. 237–287.
- BARTHOLOMAY, L. C. et al. Nucleic-acid based antivirals: augmenting RNA interference to “vaccinate” *Litopenaeus vannamei*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 110, n. 2, p. 261–6, jun. 2012.
- BOSTOCK, J. et al. Aquaculture: global status and trends. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 365, n. 1554, p. 2897–912, 27 set. 2010.
- BOWDISH, D. M. E.; DAVIDSON, D. J.; HANCOCK, R. E. W. A Re-evaluation of the Role of Host Defence Peptides in Mammalian Immunity. **Current protein & peptide science**, v. 6, n. 1, p. 35–51, 2005.
- BROWN, E. M.; SADARANGANI, M.; FINLAY, B. B. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. **Nature Immunology**, v. 14, n. 7, p. 660–667, 2013.
- CAVALLI, L. S. et al. White Spot syndrome virus in wild penaeid shrimp caught in coastal and offshore waters in the southern Atlantic Ocean. **Journal of fish diseases**, p. 533–536, 2010.
- CECCALDI, H. J. Anatomy and physiology of the digestive system. **Crustacean Nutrition. Baton Rouge: World Aquaculture Society**, p. 261–291, 1997.
- CHAIYAPECHARA, S. et al. **Bacterial community associated with the intestinal tract of *P. monodon* in commercial farms.**, maio 2012. (Nota técnica).
- CHEN, Y. H. et al. Two *Litopenaeus vannamei* HMGB proteins interact

- with transcription factors LvSTAT and LvDorsal to activate the promoter of white spot syndrome virus immediate-early gene ie. **Molecular Immunology**, v. 48, n. 5, p. 793–799, 2011.
- CHENG, W. et al. Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and β -1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 18, n. 4, p. 297–310, 2005.
- CHOU HSIN-YIU et al. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 23, n. 3, p. 165–173, 1995.
- CHRISTOPHIDES, G. K.; VLACHOU, D.; KAFATOS, F. C. Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 127–148, abr. 2004.
- CIRIMOTICH, C. M. et al. Mosquito immune defenses against *Plasmodium* infection. **Developmental and comparative immunology**, v. 34, n. 4, p. 387–95, abr. 2010.
- CIRIMOTICH, C. M. et al. NIH Public Access. v. 34, n. 4, p. 387–395, 2012.
- CLAYTON, A. M.; DONG, Y.; DIMOPOULOS, G. The *Anopheles* Innate Immune System in the Defense against Malaria Infection. **Journal of innate immunity**, 28 ago. 2013.
- DALL, W.; MORIARTY, D. J. W. Functional aspects of nutrition and digestion: the midgut. **The biology of Crustacea. Internal anatomy and physiological regulation**, v. 5, p. 215–261, 1983.
- DE LORGERIL, J. et al. A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. **Molecular Immunology**, v. 45, p. 3438–45, 2008.
- DILLON, R. J.; DILLON, V. M. The gut bacteria OF INSECTS: Nonpathogenic Interactions. **Annual Review of Entomology**, v. 49, n. 98, p. 71–92, 2004.
- DONG, Y.; MANFREDINI, F.; DIMOPOULOS, G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 5, p. e1000423, maio 2009.
- DRICKAMER, K.; TAYLOR, M. E. Biology of Animal Lectins. **Annual Review of Cell Biology**, v. 9, p. 273–264, 1993.
- ESCOBEDO-BONILLA, C. M. et al. Review A review on the morphology , molecular characterization , morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, v. 31, p. 1–18, 2008.
- FAGUTAO, F. F. et al. Increased bacterial load in shrimp hemolymph in the absence of prophenoloxidase. **The FEBS Journal**, 2009.
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. 2014.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nation;**

- fisheries and aquaculture department.** Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e00.htm>>.
- FLEGEL, T. W. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. **Aquaculture**, v. 258, n. 1-4, p. 1–33, ago. 2006.
- FLEGEL, T. W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. **Journal of invertebrate pathology**, v. 110, n. 2, p. 166–73, jun. 2012.
- FLEGEL, T. W.; SRITUNYALUCKSANA, K. Shrimp molecular responses to viral pathogens. **Marine biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 13, n. 4, p. 587–607, ago. 2011.
- FORTUN-LAMOTHE, L.; BOULLIER, S. A review on the interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity. Possible ways to improve the health of rabbits. **Livestock Science**, v. 107, n. 1, p. 1–18, mar. 2007.
- FRANK, D. N. et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 34, p. 13780–5, 2007.
- FUKATSU, K.; KUDSK, K. A. Nutrition and gut immunity. **The Surgical clinics of North America**, v. 91, n. 4, p. 755–70, vii, ago. 2011.
- GAO, D. et al. REUL is a novel E3 ubiquitin ligase and stimulator of retinoic-acid-inducible gene-I. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, 2009.
- GIBSON, R.; BARKER, P. L. The decapod hepatopancreas. **Oceanogr Mar Bio Ann Rev**, v. 17, p. 285–346, 1979.
- GOMEZ-GIL, B. et al. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, 1998.
- GROSS, P. S. et al. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, n. 7, p. 565–577, 2001.
- GUIDOTTI, L. G.; CHISARI, F. V. Cytokine-induced viral purging — role in viral pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 388–391, ago. 1999.
- GUILLAUME, J.; CECCALDI, H. J. Physiologie digestive des crevettes. **Nutrition et alimentation des poissons et crustacés**, n. 15, p. 297–312, 1999.
- HANCOCK, R. E. W.; DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 402–410, 2000.
- HARRIS, J. M. The presence, nature and role of gut microflora in aquatic

- invertebrates: a synthesis. **Microbial ecology**, v. 3, n. 25, p. 195–231, 1993.
- HEGEDUS, D. et al. New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. **Annual Review of Entomology**, v. 54, p. 285–302, 2009.
- HOFFMAN, M.; DECHO, A. Proteolytic enzymes in the marine bacterium *Pseudoalteromonas atlantica*: post-secretional activation and effects of environmental conditions. **Aquat Microb Ecol**, v. 23, p. 29–39, 2000.
- HUANG, T.; ZHANG, X. Functional analysis of a crustacean microRNA in host-virus interactions. **Journal of virology**, v. 86, n. 23, p. 12997–3004, 2012.
- ICELY, J. D.; NOTT, J. A. Chapter 6: Digestions and Absorptions: digestive system and associated organs. **Microscopic Anatomy of Invertebrates**, v. 10, p. 147–201, 1992.
- INADA, M. et al. Molecular cloning and characterization of the nitric oxide synthase gene from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. **Fish & shellfish immunology**, v. 28, n. 4, p. 701–11, abr. 2010.
- JACUPS, S. P. et al. Operational Use of Household Bleach to “Crash and Release” *Aedes aegypti* Prior to *Wolbachia*-Infected Mosquito Release. **Journal of medical entomology**, p. 344–351, 2013.
- JENSEN, S.; THOMSEN, A. R. Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. **Journal of virology**, v. 86, n. 6, p. 2900–10, mar. 2012.
- JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B. L.; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**, v. 211, n. 4, p. 213–36, jan. 2006.
- KOU, G. H. et al. Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. **In : Flegl TW (ed.) Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok**, p. 267–271, 1998.
- LABREUCHE, Y.; WARR, G. W. Insights into the antiviral functions of the RNAi machinery in penaeid shrimp. **Fish & shellfish immunology**, v. 34, n. 4, p. 1002–10, abr. 2013.
- LE ROUX, F. et al. Comparative analysis of *Vibrio splendidus* -related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. **Aquati Living Ressource**, v. 15, p. 251–258, 2002.
- LEE, S. Y.; SÖDERHÄLL, K. Early events in crustacean innate immunity. **Fish & shellfish immunology**, v. 12, n. 5, p. 421–437, 2002.
- LI, C. et al. Presence of Tube isoforms in *Litopenaeus vannamei* suggests various regulatory patterns of signal transduction in invertebrate NF- κ B pathway. **Developmental and comparative immunology**, v. 42, n. 2, p. 174–185, 2013.
- LI, F.; XIANG, J. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp. **Fish & shellfish immunology**, v. 34, n. 4, p. 973–80, abr. 2013.

LIGHTNER, D. V. Global transboundary disease politics: the OIE perspective. **Journal of invertebrate pathology**, v. 110, n. 2, p. 184–7, jun. 2012.

LIGHTNER, D. V. et al. **Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas** **Journal of Invertebrate Pathology**, jun. 2012.

LIN, F. Y. Scanning electron microscopic observations on the gland filters of the pyloric stomach of *Penaeus monodon* and *Metapenaeus ensis* (Decapoda, Penaeidae). **Crustaceana**, v. 73, n. 2, p. 163–174, 2000.

LIU, F. et al. Molecular Cloning and Expression Profile of Putative Antilipopolsaccharide factor in Chinese Shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). **Marine Biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 600–608, 2005a.

LIU, F. et al. Molecular Cloning and Expression Profile of Putative Antilipopolsaccharide factor in Chinese Shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). **Marine Biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 600–608, 2005b.

LIU, H. et al. Antilipopolsaccharide factor interferes with white spot syndrome virus replication in vitro and in vivo in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Journal of virology**, v. 80, n. 21, p. 10365–10371, 2006.

LIU, H. et al. The intestinal microbial diversity in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) as determined by PCR–DGGE and clone library analyses. **Aquaculture**, v. 317, n. 1–4, p. 32–36, jul. 2011.

LIU, H. et al. Isolation of a putative probiotic strain S12 and its effect on growth performance, non-specific immunity and disease-resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 41, n. 2, p. 300–307, 16 set. 2014.

LIU, W.-J. et al. White spot syndrome virus annexes a shrimp STAT to enhance expression of the immediate-early gene *ie1*. **Journal of virology**, v. 81, n. 3, p. 1461–1471, 2007.

LOVETT, D. L.; FELDER, D. L. Ontogenetic Change in Digestive Enzyme Activity of Larval and Postlarval White Shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). **Biological Bulletin**, v. 178, n. 1973, p. 144–159, 1990.

LUO, T. et al. PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. **FEBS Letters**, v. 551, n. 1–3, p. 53–57, 2003.

LUO, T. et al. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*.

Developmental and Comparative Immunology, v. 30, n. 7, p. 607–617, 2006.

LUO, Z. et al. Identification of a novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* and its role in defense against pathogens infection.

Chinese Journal of Oceanology and Limnology, n. 29, p. 942, 2011.

MA, T. H. T. et al. Molecular cloning of a C-type lectin (LvLT) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Early gene down-regulation after WSSV

- infection. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, n. 2, p. 430–437, 2007.
- MAEDA, M. Microbial communities and their use in aquaculture. In: Lee CS, O’Byrne P (eds) Microbial approaches to aquatic nutrition within environmentally sound aquaculture production systems. **The World Aquaculture Society**, p. 61–78, 2002.
- MARTIN, G. G. et al. Localization and roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapod crustaceans. **Biochemistry and Physiology**, n. 100, p. 517–522, 1991.
- MARTIN, G. G. et al. Peritrophic membrane of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*: Structure, formation, and permeability. **Biological Bulletin**, v. 211, n. 3, p. 275–285, 2006.
- MARTIN, G. G.; RUBIN, N.; SWANSON, E. *Vibrio parahaemolyticus* and *V. harveyi* cause detachment of the epithelium from the midgut trunk of the penaeid shrimp *Sicyonia ingentis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 60, n. 1, p. 21–29, 2004.
- MCGAW, I. J.; CURTIS, D. L. A review of gastric processing in decapod crustaceans. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 183, n. 4, p. 443–465, 2013.
- MEISTER, S. et al. Immune signaling pathways regulating bacterial and malaria parasite infection of the mosquito *Anopheles gambiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 32, p. 11420–5, 2005.
- MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura**. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Publicidade/Cartilha-Balanco-2013-Ministerio-Pesca-Aquicultura.pdf>>.
- MUTA, T.; IWANAGA, S. The role of hemolymph coagulation in innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, n. 8, p. 41–47, 1996.
- NAGOSHI, H. et al. Cloning and characterization of a LPS-regulatory gene having LPS binding domains in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. **Molecular Immunology**, n. 43, p. 2061–2069, 2006.
- NUNAN, L. et al. Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. **Diseases of aquatic organisms**, v. 111, n. 1, p. 81–6, 21 ago. 2014.
- OELSCHLAEGGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions - A review. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 300, n. 1, p. 57–62, jan. 2010.
- PAN, D. et al. Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 29, n. 2, p. 103–112, 2005.
- PETERS, W. Peritrophic Membranes. 1992.
- PONPRATEEP, S. et al. Gene silencing reveals a crucial role for anti-lipopolysaccharide factors from *Penaeus monodon* in the protection against

- microbial infections. **Fish & shellfish immunology**, v. 32, n. 1, p. 26–34, 2012.
- RAMIREZ, J. L. et al. The Role of Hemocytes in *Anopheles gambiae* Antiplasmodial Immunity. **Journal of innate immunity**, v. 20852, 24 jul. 2013.
- REN, Q. et al. A white spot syndrome virus microRNA promotes the virus infection by targeting the host. **Nature Publishing Group**, n. November, p. 1–12, 2015.
- ROBALINO, J. et al. Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. **Journal of virology**, v. 78, n. 19, p. 10442–8, out. 2004.
- ROBALINO, J. et al. Insights into the immune transcriptome of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: tissue-specific expression profiles and transcriptomic responses to immune challenge. **Physiological genomics**, v. 29, n. 1, p. 44–56, 2007.
- ROBALINO, J. et al. Contributions of functional genomics and proteomics to the study of immune responses in the Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 110–8, 15 mar. 2009.
- ROLLAND, J. L. et al. Stylicins, a new family of antimicrobial peptides from the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. **Molecular immunology**, v. 47, n. 6, p. 1269–77, mar. 2010.
- ROSA, R. D. et al. Functional divergence in shrimp anti-lipopolysaccharide factors (ALFs): from recognition of cell wall components to antimicrobial activity. **PLoS one**, v. 8, n. 7, p. e67937, jan. 2013.
- ROSA, R. D.; BARRACCO, M. A. Antimicrobial peptides in crustaceans. **Inv Surv J**, v. 7, p. 262–84, 2010.
- ROYET, J.; CHARROUX, B. Mechanisms and consequence of bacteria detection by the *Drosophila* gut epithelium. **Gut microbes**, v. 4, n. 3, p. 259–63, 2013.
- RUNGRASSAMEE, W. et al. Bacterial population in intestines of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under different growth stages. **PLoS one**, v. 8, n. 4, p. e60802, jan. 2013.
- SAULNIER, D. et al. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p. 133–144, nov. 2000.
- SCHMITT, P.; ROSA, R. D.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. An intimate link between antimicrobial peptide sequence diversity and binding to essential components of bacterial membranes. **BBA - Biomembranes**, v. in press, 2015.
- SHEN, Z.; JACOBS-LORENA, M. A type I peritrophic matrix protein from the malaria vector *Anopheles gambiae* binds to chitin. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 28, p. 17665–17670, 1998.
- SHI, X.-Z. et al. A galectin from the kuruma shrimp (*Marsupenaeus*

- japonicus) functions as an opsonin and promotes bacterial clearance from hemolymph. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e91794, 2014.
- SOMBOONWIWAT, K. et al. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Developmental and comparative immunology**, v. 29, n. 10, p. 841–851, 2005.
- SOONTHORNCHAI, W. et al. Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi*. **Developmental and comparative immunology**, v. 34, n. 1, p. 19–28, jan. 2010.
- SOONTHORNCHAI, W. et al. Interaction of *Vibrio* spp. with the Inner Surface of the Digestive Tract of *Penaeus monodon*. **Plos One**, v. 10, p. e0135783, 2015.
- SUN, C. et al. Molecular cloning and expression analysis of signal transducer and activator of transcription (STAT) from the Chinese white shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. **Molecular biology reports**, v. 38, n. 8, p. 5313–5319, 2011.
- SUNG, H.-H. et al. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the composition of *Vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. **Aquaculture**, v. 192, n. 2-4, p. 101–110, jan. 2001.
- SUPUNGUL, P. et al. Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 61, n. 1-2, p. 123–135, 2004.
- TANG, K. W.; TURK, V.; GROSSART, H. P. Linkage between crustacean zooplankton and aquatic bacteria. **Aquat Microb Ecol**, v. 61, p. 261–277, 2010.
- TASSANAKAJON, A. et al. Cationic antimicrobial peptides in penaeid shrimp. **Marine biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 12, n. 5, p. 487–505, out. 2010.
- TZUC, J. T. et al. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **SpringerPlus**, v. 3, p. 280, 2014.
- VERSCHUERE, L. et al. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 655–671, 1 dez. 2000.
- VODOVAR, N. et al. *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 32, p. 11414–9, 2005.
- WANG, L. et al. The immune role of C-type lectins in molluscs The phylum Mollusca is one of the largest and most important group in the animal kingdom . Recently , interest in molluscan immunity has increased

due to their importance in worldwide aquaculture, their role. **Invertebrate Survival Journal**, v. 8, n. 2, p. 241–246, 2011.

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

WANG, P. H. et al. An immune deficiency homolog from the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, activates antimicrobial peptide genes. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 8-9, p. 1897–1904, 2009.

WANG, P. H. et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of two novel Toll-like receptors (LvToll2 and LvToll3) and three putative Spz-like Toll ligands (LvSpz1-3) from *Litopenaeus vannamei*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 36, n. 2, p. 359–371, 2012b.

WANG, P.-H. et al. The shrimp IKK-NF- κ B signaling pathway regulates antimicrobial peptide expression and may be subverted by white spot syndrome virus to facilitate viral gene expression. **Cellular & molecular immunology**, v. 10, n. 5, p. 423–36, 2013.

WANG, X. et al. RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. **Science (New York, N.Y.)**, 2006.

WANG, X. W.; WANG, J. X. Crustacean hemolymph microbiota: Endemic, tightly controlled, and utilization expectable. **Molecular Immunology**, v. 68, n. 2, p. 404–411, 2015.

WANG, X.-W. et al. A shrimp C-type lectin inhibits proliferation of the hemolymph microbiota by maintaining the expression of antimicrobial peptides. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 17, p. 11779–90, 25 abr. 2014.

WANG, Y. T. et al. White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 52, p. 249–259, 2002.

WANG, Y.-C.; CHANG, P.-S.; CHEN, H.-Y. Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 23, n. 6, p. 1161–77, 2007.

WEN, R. et al. Shrimp MyD88 responsive to bacteria and white spot syndrome virus. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 34, n. 2, p. 574–581, 2013.

WU, C. H.; SIVA, V. S.; SONG, Y. L. An evolutionarily ancient NO synthase (NOS) in shrimp. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 35, n. 5, p. 1483–1500, 2013.

XIONG, J. et al. Changes in intestinal bacterial communities are closely associated with shrimp disease severity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2015.

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

2014.

ZORRIEHZAHRA, M. J.; BANAEDERAKHSHAN, R. Early Mortality Syndrome (EMS) as new Emerging Threat in Shrimp Industry. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 2, n. 2, p. 64–72, 2015.