

Jaqueline da Rosa Coelho

**PROTEÍNA HEMOCITÁRIA RELACIONADA AO  
FIBRINOGENIO (FREP) EM CAMARÕES *Litopenaeus vannamei*:  
EXPRESSÃO GÊNICA APÓS DESAFIOS MICROBIANOS E  
DURANTE O DESENVOLVIMENTO LARVAL**

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

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Maria Perazzolo  
Coorientador: Dr. Fabio Schneider Ribeiro

Florianópolis  
2016

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

Coelho, Jaqueline da Rosa  
Proteína hemocitária relacionada ao fibrinogênio (FREP)  
em camarões *Litopenaeus vannamei*: Expressão gênica após  
desafios microbianos e durante o desenvolvimento larval /  
Jaqueline da Rosa Coelho ; orientadora, Luciane Maria  
Perazzolo ; coorientador, Fabio Schneider Ribeiro . -  
Florianópolis, SC, 2016.  
76 p.

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

Inclui referências

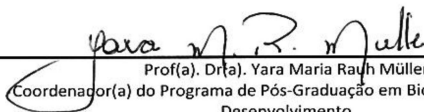
1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Imunidade  
de invertebrados. 3. *Litopenaeus vannamei*. 4. Expressão  
gênica. 5. Proteína relacionada ao fibrinogênio (FREP). I.  
Perazzolo, Luciane Maria. II. Ribeiro, Fabio Schneider.  
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV.  
Título.

**"Proteína hemocitária relacionada ao fibrinogênio (FREP) em camarões  
*Litopenaeus vannamei*: expressão gênica após desafios microbianos e durante o  
desenvolvimento larval"**

Por


**Jaqueline da Rosa Coelho**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da  
Banca Examinadora (16/PPGBCD/2016) do Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.

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

Banca examinadora:

  
Dr(a) Luciane Maria Perazzolo (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)

  
Dr(a) Felipe do Nascimento Vieira (Universidade Federal de Santa Catarina)

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

  
Dr(a) Ricardo Castillo Garcez (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 28 de Setembro de 2016.



Este trabalho é dedicado a Deus e aos  
meus queridos pais.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, pela vida, pelas oportunidades, por iluminar o meu caminho e por estar presente em todo momento.

Aos meus pais, Clotilde e Edoilde, pelo amor incondicional e apoio absoluto durante toda minha vida. Pelo companheirismo, por não me deixar desistir nos momentos mais difíceis, por me incentivarem a ser alguém melhor a cada dia, por confiarem e acreditarem em mim e pelo maravilhoso exemplo de vida. Todos os valores que trago são frutos da educação que recebi.

Obrigada também aos meus irmãos, Uendel por todo o auxílio nesses anos e ao Josué por toda a paciência, ensinamentos, preocupações e pela moradia.

Aos demais familiares, em especial a minha madrinha, por terem criado as condições para que eu pudesse realizar mais uma etapa da minha vida. Sem vocês eu não conseguiria chegar até aqui. Amo todos vocês!

Meus agradecimentos sinceros a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este estudo pudesse ser desenvolvido. Em especial, gostaria de agradecer:

À minha orientadora, Dra. Luciane Maria Perazzolo, pela oportunidade de integrar a equipe de trabalho do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA). Obrigada pela disponibilidade de tempo para a realização deste trabalho, pela paciência, pelos conselhos, ensinamentos, palavras de conforto nas horas difíceis e a confiança depositada.

Ao meu coorientador, Dr. Fabio Schneider Ribeiro, por todo o apoio e dedicação durante esta etapa. Obrigada por toda a amizade, as horas de conversas, as palavras de conforto, otimismo, fé, carinho, serenidade, confiança e pelos inúmeros conselhos. Sempre disposto a me ouvir pessoalmente, ou via conversa *on-line*.

Ao professor Rafael Diego da Rosa por todos os infinitos ensinamentos (profissionais e pessoais), pela atenção e disponibilidade que sempre teve em me ajudar, pela gigantesca paciência, compreensão, incentivo e inúmeros conselhos que levarei para a vida. Obrigada pela confiança e pela vontade em ver meu crescimento, com certeza ficará guardado em meu coração!

Aos Colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura, Amanda, Anderson, Adriane, Augusto, Bruno, Emily, Graziela, Gabriel, Mariana, Marcelo, Marco, Nicolas e Samuel por me aturarem nesses dois anos e por encherem de alegria meus dias.

Agradeço especialmente ao meu colega e “cocoorientador” Cairé, por me escutar, me auxiliar em vários momentos difíceis, por acreditar em mim e pela enorme paciência ao repassar o seu conhecimento. Mais que um colega, és meu irmão de coração. Agradeço também a querida Margherita pelo carinho, conselhos, ensinamentos e pelas guloseimas. Todos vocês são muito especiais e estão guardados em meu coração!

Ao Prof. Dr. Felipe do Nascimento Vieira e a todo o pessoal do setor do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM/UFSC) que sempre nos atenderam muito bem e sem eles esse trabalho não seria possível.

A toda a equipe do Laboratório de Protozoologia da UFSC, em especial as alunas Carime, Carine, Greice, Ana Paula e aos professores Edmundo Grisard e Patricia Stocco por sempre disponibilizarem seus equipamentos quando necessário.

Ao Professor Rodrigo Maggioni, e todo o pessoal do LABOMAR/UFC que colaboraram para este trabalho. Obrigada pela parceria.

Aos membros da banca: Dr. Felipe do Nascimento Vieira (CCA/AQI), Dr. Ricardo Castilho Garcez e Dr. Rafael Diego da Rosa pela disponibilidade de participar da avaliação deste trabalho e de contribuir com minha formação profissional.

A todos os funcionários da universidade que possibilitam a manutenção e o exercício dessa instituição. Em especial ao querido Anselmo pelas conversas, incentivo e pelas diversas informações sobre a instituição. Aos técnicos Ismael, Jalmor, Fernanda, Emily que sempre me auxiliaram, e aos demais servidores que estavam em constante contato comigo e sempre me atenderam muito bem. Aos profissionais da área da limpeza, em especial as amadas Leila e Simone. Obrigada, foi um prazer conhecer pessoas como vocês!

A TODOS os meus amigos e amigas que conquistei na UFSC, pelos vários momentos de angústias e de descontração que passamos juntos. Em especial as amigas Priscila, Clarissa, Alice e Elisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento e a todos os seus docentes, pelo excelente aprendizado.

À CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado e pelo financiamento do projeto.

A todos que direta ou indiretamente estão presentes em minha vida e que contribuem para que ela seja repleta de realizações e alegria, a minha sincera e carinhosa gratidão. De coração, **Muito obrigada!!!**



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



## RESUMO

Proteínas relacionadas ao fibrinogênio (FREPs) compreendem uma grande família gênica envolvida no reconhecimento microbiano atuando em muitas funções biológicas nos animais vertebrados e invertebrados. Pesquisas em banco de dados de sequências não anotadas (EST) apresentaram uma sequência homóloga de FREP-like de *L. vannamei* denominada no presente estudo de *LvFrep*. A sequência obtida possui um domínio conservado relacionado com o fibrinogênio (FR<sub>e</sub>D) e apresenta similaridade com as proteínas FREP-like de outros invertebrados e ficolinas de crustáceos. A expressão de *LvFrep* mostrou-se majoritária nos hemócitos circulantes e foi constitutivamente expresso nos hemócitos de camarões apenas em resposta a uma infecção por *Vibrio harveyi*, mas não pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). Além disso, níveis transcricionais de *LvFrep* foram detectados no início do desenvolvimento, desde ovos fertilizados até pós-larvas, sugerindo que este gene possa participar nas defesas antimicrobianas durante o desenvolvimento do camarão.

**Palavras chave:** proteína relacionada ao fibrinogênio (FREP), imunidade de camarões, expressão gênica, *Vibrio harveyi*, WSSV.



## ABSTRACT

Fibrinogen-related proteins (FREPs) comprise a large family of microbial recognition proteins involved in many biological functions in both vertebrate and invertebrate animals. By taking advantage of publicly accessible databases, we have identified a FREP-like homolog in the most cultivated penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* (*LvFrep*). The obtained sequence showed a conserved fibrinogen-related domain (FR<sub>e</sub>D) and displayed significant similarities to FREP-like proteins from other invertebrates and to ficolins from crustaceans. The expression of *LvFrep* appeared to be limited to circulating hemocytes. Interestingly, *LvFrep* gene expression was induced in shrimp hemocytes only in response to a *Vibrio* infection but not to the White spot syndrome virus (WSSV). Moreover, *LvFrep* transcript levels were detected early in fertilized eggs, suggesting the participation of this immune-related gene in the antimicrobial defenses during shrimp development.

**Keywords:** Fibrinogen-related protein (FREP); Crustacean immunity; Gene expression; *Vibrio harveyi*, WSSV



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Figura 1.** Exemplar adulto do camarão *Litopenaeus vannamei*. Imagem retirada do arquivo do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (UFSC/CCB/LIAA).....25
- Figura 2 -** Esquema comparativo da memória conferida pelo sistema imune adaptativo e da “memória treinada” do sistema imune inato. A memória imunológica adaptativa convencional está presente apenas nos vertebrados, enquanto que a “memória treinada” é uma resposta inata presente em plantas, invertebrados e vertebrados. Nas plantas, alterações epigenéticas induzem genes codificantes para moléculas de defesa em resposta a uma reexposição ao patógeno, fenômeno esse denominado de *resistência sistêmica adquirida*. Eventos semelhantes são observados em mamíferos, na qual a reprogramação epigenética também acontece na imunidade treinada. Os mecanismos principais que medeiam este evento incluem a reprogramação epigenética induzida por estruturas fúngicas, como as  $\beta$ -glicanas, acompanhada de metilação e acetilação de histonas (*adaptado de NETEA et al., 2015*).....30
- Figura 3 -** Respostas imunológicas induzidas pelos hemócitos dos crustáceos depois do reconhecimento do patógeno. Após o reconhecimento dos patógenos via PRRs/PRPs, diferentes reações de defesa são ativadas, compreendendo: (1) respostas celulares como fagocitose, formação de nódulos e cápsulas, infiltração e formação de armadilhas extracelulares de ácidos nucleicos; (2) uma resposta humoral baseada na degranulação com liberação de diferentes imunofatores e imunoreguladores e, (3) indução e/ou repressão de genes associados ao sistema imune. Fonte: BARRACO *et al.*, 2014.....32
- Figura 4 -** Modelo gráfico da proteína relacionada ao fibrinogênio codificada pelo gene FREP3 de *Biomphalaria glabrata*. A extremidade N-terminal apresenta um domínio do fator de crescimento epidérmico (EGF), um domínio da superfamília das imunoglobulinas 1 (IgSF1), uma região SCR (*small contacting region*), um domínio da superfamília das imunoglobulinas 2 (IgSF2), uma região intercessora (ICR) e, na extremidade C-terminal, um domínio relacionado ao fibrinogênio (FBG). Fonte: CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2013.....34
- Figura 5 -** Esquema ilustrativo do estímulo microbiano com juvenis de *Litopenaeus vannamei*. **-7 dias:** período de aclimação dos animais. **0**

**h:** estímulo microbiano. **48 h:** coleta dos tecidos/órgãos e processamento das amostras. **Círculo vermelho:** grupo estimulado com *Vibrio harveyi* ATCC 14126 (bactérias inativadas por calor); **Círculo preto:** animais não manipulados (grupo *naïve*).....41

**Figura 6** - Esquema ilustrativo das infecções experimentais virais e bacterianas com juvenis de *Litopenaeus vannamei*. **-7 dias:** início do período de aclimação dos animais. **0 h:** infecção experimental. **48 h:** coleta da hemolinfa e processamento das amostras. **Círculos vermelhos:** grupos experimentais (camarões infectados com o WSSV ou com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126); **Círculos azuis:** controles experimentais (animais injetados com inóculo livre de WSSV ou com água do mar filtrada); **Círculo preto:** animais não manipulados (grupo *naïve*). Para cada grupo experimental, foram feitos 3 *pools* de 5 animais.....43

**Figura 7** - Esquema ilustrativo (fora de escala) indicando os tecidos de juvenis *Litopenaeus vannamei* analisados neste estudo. Estômago (vermelho), hepatopâncreas (amarelo), intestino médio (verde), intestino posterior (azul), cordão nervoso, brânquias, músculo e hemolinfa (hemócitos) (adaptado de SOONTHORNCHAI *et al.*, 2010).....44

**Figura 8** - Perfil de migração do RNA total das amostras (*pools* de 3 camarões) nos hemócitos e em diferentes tecidos das duas condições experimentais (animais não manipulados ou estimulados com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126 inativada por calor). MS: Músculo, BR: Brânquias, CN: Cordão nervoso, ST: Estômago, HP: Hepatopâncreas, IM: Intestino médio, IP: Intestino posterior, HE: Hemócitos.....52

**Figura 9** - Análise semi-quantitativa por RT-PCR dos níveis de transcritos do *LvFrep* em diferentes tecidos de camarões após 48 h do estímulo bacteriano. Animais estimulados com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126 inativada por calor (E) e animais não manipulados (N). Plano superior: Níveis de transcritos *LvFrep* nos hemócitos (HE), Brânquias (BR), Músculo (MS), Cordão nervoso (CN), Estômago (ST), Hepatopâncreas (HP), Intestino médio (IM) e Intestino posterior (IP). Plano inferior: expressão do gene  $\beta$ -actina nos tecidos correspondentes.....52



**Figura 10** - Coeficiente de estabilidade dos genes candidatos à referência. Genes de referência e suas combinações: (A) *LvEF-1α* e *LvL40*; (B) *LvEF-1α*, *LvL40* e *LvRpS3A*; (C) *LvL40* e *LvRpS3A*; (D) *LvEF-1α*; (E) *LvL40*; (F) *LvEF-1α*, *LvL40* e *LvRpS6*; (G) *LvEF-1α* e *LvRpS3A*; (H) *LvEF-1α*, *LvRpS6* e *LvRpS3A*; (I) *LvL40*, *LvRpS6* e *LvRpS3A*; (J) *LvEF-1α*, *LvL40*, *LvRpS6* e *LvRpS3A*; (K) *LvEF-1α* e *LvRpS6*; (L) *LvL40* e *LvRpS6*; (M) *LvRpS3A*; (N) *LvRpS6* e *LvRpS3A* e (O) *LvRpS6*.....53

**Figura 11** - Curvas de dissociação das reações de RT-qPCR e eficiência dos iniciadores utilizados para a amplificação de *LvFrep*. **A:** Perfil derivado da curva de dissociação dos produtos de RT-qPCR dos iniciadores utilizados para a amplificação dos transcritos do *LvFrep*. Tm: Temperatura de desnaturação (*melting*). **B:** Curva linear resultante da amplificação da sequências de interesse (*LvFrep*) utilizando-se diluições seriadas (curva padrão: 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128) de um *pool* de todos os cDNAs das amostras de hemócitos das infecções virais e bacterianas. A eficiência (%) dos pares de iniciadores foi calculada segundo a fórmula:  $E = 10^{(-1/slope)} - 1$ .....55

**Figura 12** - Perfil transcricional do gene *LvFrep* em camarões juvenis. Análise do perfil transcricional do *LvFrep* por RT-qPCR nos hemócitos, 48 h após infecção experimental com *V. harveyi* ATCC 14126 (barras brancas) ou com WSSV (barras pretas). Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão de triplicatas biológicas (3 *pools* de 5 animais por condição) e as diferenças estatísticas estão indicadas por asterisco (\*) ( $P < 0,05$ ), obtidas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Tukey. N: grupo *naïve* (animais não manipulados); V-: animais injetados com água do mar estéril; V+: animais infectados com *Vibrio harveyi* ATCC 14126 ( $6 \times 10^7$  CFU/animal), W-: animais injetados com inóculo livre de WSSV; W+: animais infectados com WSSV ( $3 \times 10^2$  cópias genômicas/animal).....56

**Figura 13** - Perfil transcricional do gene *LvFrep* expresso em diferentes estágios do desenvolvimento de *L. vannamei*. **A.** Esquema ilustrativo dos estágios do desenvolvimento de *L. vannamei*. As amostras utilizadas no presente estudo foram: Ovos fertilizados de 0-4 h (EI) e de 7-11 h na pós-desova (EII), Náuplios I e V (NI e NV), Protozoas I e III (ZI e ZIII), Misis I e III (MI e MIII) e Pós-larvas com idade de 2, 9 e 17 dias (PL2, PL9 e PL17) e juvenis *naïve* foram utilizados como calibradores

para verificar a expressão de *LvFrep* em RT-qPCR (adaptado de QUISPE, 2016). **B.** Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas biológicas. As diferenças estatísticas estão indicadas por asterisco (\*) ( $P < 0,05$ ), obtidas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Tukey. As amostras de ovos fertilizados de 0-4 h (EI), ovos na pós-desova 7-11 h (EII) e Náuplios I (NI) apresentaram valores de  $C_q$  acima do limite de quantificação, portanto não foram considerados. O pontilhado vermelho indica a expressão basal do *LvFrep* nos hemócitos de camarões juvenis utilizados como grupo calibrador.....58

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Sequência dos iniciadores referentes aos genes utilizados nas análises de expressão gênica (RT-PCR e RT-qPCR).....	47
--	----



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AHPND - *Acute hepatopancreatic necrosis disease* (Síndrome da necrose aguda do hepatopâncreas)
- CFU - *Colony-Forming Units* (Unidades formadoras de colônia)
- Cq - Ciclo de quantificação
- DO - Densidade ótica
- Dscam - *Down syndrome cell adhesion molecule* (Molécula de adesão celular da Síndrome de Down)
- EMS - Síndrome da mortalidade precoce
- EST - *Expressed sequence tags* (etiquetas de sequência expressa)
- FBG - *Fibrinogen-related domain* (domínio relacionado ao fibrinogênio)
- FReD - *Fibrinogen-related domain* (domínio relacionado ao fibrinogênio)
- FREPs - *Fibrinogen-related proteins* (Proteínas relacionadas ao fibrinogênio)
- ICR - *Interceding region* (região intercessora)
- IgSF - *Immunoglobulin super family domain* (domínio da superfamília das imunoglobulinas)
- IHHNV - *Infectious hypodermal and Hematopoietic necrosis virus* (vírus da necrose hipodermal e hematopoiética)
- IMNV - *Infectious myonecrosis virus* (vírus da mionecrose infecciosa)
- M - Misis
- M/PAMPs - Padrões moleculares específicos de microrganismos/patógenos
- N - Náuplios
- PL - Pós-larvas
- PRRs/PRPs - Receptores/proteínas de reconhecimento de padrões moleculares
- WSSV - *White spot syndrome virus* (vírus da síndrome da mancha branca)
- Z - Protozoas

**Obs:** As siglas dos genes estão indicadas no Quadro 1.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O SISTEMA IMUNE DOS CRUSTÁCEOS.....	28
<b>1.1.1. FREPs de invertebrados.....</b>	<b>33</b>
<b>2. HIPÓTESE.....</b>	<b>37</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
3.1. OBJETIVO GERAL.....	37
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
4.1. ANIMAIS.....	39
4.2. DIAGNÓSTICO DE WSSV.....	39
4.3. DESAFIOS MICROBIANOS.....	40
<b>4.3.1. Estímulo dos animais com <i>V. harveyi</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>4.3.2. Infecção experimental com <i>V. harveyi</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>4.3.3. Infecção dos animais com WSSV.....</b>	<b>42</b>
4.4. COLETA DOS TECIDOS.....	43
4.5. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA.....	44
4.6. DESENHO DOS INICIADORES.....	45
4.7. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE PCR CONVENCIONAL (RT-PCR).....	46
4.8. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT-qPCR).....	48
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
5.1 IDENTIFICAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA PARA UMA PROTEINA RELACIONADA AO FIBRINOGÊNIO (FREP) EM <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	51
5.2. DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DA EXPRESSÃO DE <i>LvFrep</i> EM CAMARÕES JUVENIS ESTIMULADOS OU NÃO POR <i>Vibrio harveyi</i> .....	51
5.3. PERFIL TRANSCRICIONAL DO GENE <i>LvFrep</i> EM CAMARÕES JUVENIS INFECTADOS COM <i>V. harveyi</i> OU WSSV.....	53
5.4. PERFIL TRANSCRICIONAL DO GENE <i>LvFrep</i> AO LONGO DOS ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO DE <i>L. vannamei</i> .....	57
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>8. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>

**ANEXO A - Artigo científico publicado.....76**



## 1. INTRODUÇÃO

A Aquicultura é um dos setores da produção de alimentos que contribui de maneira significativa para o crescimento econômico de muitos países emergentes, sendo o cultivo de camarões marinhos ou carcinicultura, uma das atividades do agronegócio mais expressivas no mundo (FAO, 2014).

A espécie que domina a produção de crustáceos no mundo é o camarão peneídeo marinho *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) (**Figura 1**). Em 2014, essa espécie representou 80% da produção mundial de camarões (FAO, 2016), devido as suas excelentes características zootécnicas, rusticidade no manejo, elevada taxa de crescimento, tolerância à salinidade e a baixas temperaturas (FAO, 2004). Países orientais como China, Indonésia, Vietnã, Índia e Tailândia são os maiores produtores no continente asiático, enquanto nas Américas os maiores produtores são Equador, México e o Brasil (FAO, 2016).

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



Imagem retirada do arquivo do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (UFSC/CCB/LIAA).

O desenvolvimento do camarão *L. vannamei* compreende as fases de ovos, estágios larvais, estágios pós-larvais, juvenil e adulto. Como em outros crustáceos, a fertilização dos ovos ocorre externamente e logo após inicia-se os estágios sucessivos do desenvolvimento (DALL *et al.*, 1990). Os estágios larvais dos peneídeos consistem em cinco ou seis sub-estágios de Náuplios (NI a NV), no qual sua alimentação é

composta exclusivamente das suas reservas vitelínicas. O próximo estágio larval compreende três sub-estágios de Protozoas (ZI a ZIII), no qual deriva em uma larva alongada contendo urópodes, olhos compostos e um corpo coberto por uma carapaça. Durante esta fase do desenvolvimento, surge um intestino primitivo que possibilita aos animais se alimentarem de microalgas planctônicas, além de vitelo (MUHAMMAD *et al.*, 2012). O último estágio larval inclui três sub-estágios de Misis (MI a MIII), que se alimentam de zooplâncton e desenvolvem olhos pedunculados, telson e pleópodos, sendo semelhantes aos animais juvenis. Em seguida surgem as fases Pós-larvais (PL) que apresentam comportamento alimentar omnívoro (TREECE; FOX, 1993) e são numeradas de acordo com a idade em dias. As pós-larvas com idade de um mês são consideradas juvenis até que crescem em adultos.

No Brasil, a espécie *L. vannamei* foi introduzida na região Nordeste durante a década de 1980, onde se adaptou perfeitamente às condições climáticas e ambientais locais. Em 1998, o Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Estado de Santa Catarina (EPAGRI) introduziram e viabilizaram o cultivo de *L. vannamei* no Estado, iniciando assim, um novo período para a carcinicultura catarinense (COSTA *et al.*, 2000). O Estado de Santa Catarina mostrou um crescimento vigoroso na produção de peneídeos até o ano de 2004.

No entanto, em dezembro de 2004, os cultivos na região sul de Santa Catarina foram acometidos por grandes mortalidades nas fazendas, cujo agente etiológico foi diagnosticado como sendo o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV, do inglês *White spot syndrome virus*) (ABCC, 2013). Esta seria a primeira detecção oficial do WSSV no Brasil. Nos anos seguintes, a presença do WSSV foi também encontrada nos cultivos de vários Estados nordestinos (O POVO ONLINE, 2016), região que representa atualmente 99% da produção nacional de camarões marinhos (ABCC, 2013).

O surgimento de enfermidades na carcinicultura está normalmente associado a um desequilíbrio entre as condições ambientais, nutricionais, de saúde do animal e a presença de agentes potencialmente patogênicos nos sistemas de cultivo (FLEGEL, 2012). Condições ambientais desfavoráveis, como alta densidade populacional, nutrição inadequada, alterações bruscas de salinidade e temperatura, comprometem o estado geral de saúde dos animais, deixando-os mais propensos a enfermidades. Dentre estas doenças, destacam-se as

ocasionadas por vírus e bactérias, e menos frequentes as ocasionadas por fungos e protozoários (PANTOJA *et al.*, 2014).

As principais doenças bacterianas que acometem os peneídeos nos cultivos são causadas por bactérias Gram-negativas do gênero *Vibrio*. Os vibrios são microrganismos oportunistas que fazem parte da microbiota natural dos peneídeos e em condições estressoras podem causar infecções. Os sintomas das vibrioses variam de lesões cuticulares localizadas, apresentando melanização, até infecções orais e entéricas e septicemia (MORALES-COVARRUBIAS *et al.*, 2014). A doença é prevalente na fase pós-larval provocando a destruição do sistema digestório, principalmente do hepatopâncreas e intestino anterior. Porém, na fase juvenil, os camarões apresentam-se mais resistentes a essas infecções (SOONTHORNCHAI *et al.*, 2010). *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. penaeicida* e *V. campbelli* são as espécies frequentemente associadas a mortalidades em camarões (MORALES-COVARRUBIAS *et al.*, 2014; SUNG *et al.*, 2001).

No entanto, uma vibriose emergente conhecida como necrose hepatopancreática aguda (AHPND, do inglês *acute hepatopancreatic necrosis disease*) ou síndrome da mortalidade precoce (EMS, do inglês, *early mortality syndrome*) está causando um grande impacto econômico na carcinicultura de alguns países, especialmente no Sul da Ásia, com perdas anuais estimadas em 1 bilhão de dólares (ZORRIEZHARA; BANAEDERAKHSHAN, 2015). O agente etiológico da AHPND foi identificado como sendo cepas de *Vibrio parahaemolyticus* (TRAN *et al.*, 2013) e *Vibrio harveyi* (KONDO *et al.*, 2014) que apresentam um plasmídeo com genes codificantes para duas toxinas homólogas do inseto *Photorehabdus*, denominadas *pirA* e *pirB* (HAN *et al.*, 2015a; YANG *et al.*, 2014). As toxinas causam a destruição dos tecidos do animal, afetando principalmente o hepatopâncreas (TRAN *et al.*, 2013; HAN *et al.*, 2015b) e levam a mortalidades de até 100% nos cultivos, entre 20 e 30 dias (SCHRYVER *et al.*, 2014). Inicialmente a doença foi descrita na China, posteriormente diagnosticada no Vietnã, Malásia, Tailândia e, mais recentemente, no México (FAO, 2013). Embora no Brasil essa vibriose ainda não tenha sido detectada, torna-se primordial o desenvolvimento de medidas preventivas e profiláticas para que esta situação perdure.

Contudo, as viroses são as responsáveis pelas maiores perdas na carcinicultura a nível mundial (LIGHTNER *et al.*, 2012). Os principais vírus que ocorrem nos cultivos de camarão são o vírus da necrose hipodermal e hematopoiética (IHHNV, do inglês *Infectious hypodermal and Hematopoietic necrosis virus*), o vírus da cabeça amarela (YHV, do

inglês *Yellow head virus*), o vírus da síndrome de Taura (TSV, do inglês, *Taura syndrome virus*), o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV, do inglês, *Infectious myonecrosis virus*) e o WSSV (PANTOJA *et al.*, 2014). O WSSV é considerado o vírus mais impactante para a carcinicultura mundial, responsável por dizimar populações inteiras desde o seu surgimento, em Taiwan, em 1992, se espalhando para todos os continentes nos anos seguintes (FLEGEL, 2012; LIGHTNER *et al.*, 2012). Esse vírus envelopado pertence à família Nimaviridae e possui um genoma de DNA dupla fita circular (ESCOBEDO-BONILLA *et al.*, 2008). Ele é capaz de infectar todos os crustáceos da ordem Decapoda, infestando 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).

Considerando que o principal fator limitante para o sucesso da carcinicultura consiste no controle das infecções, principalmente de origem bacteriana e viral, é de extrema importância um melhor conhecimento das respostas de defesa desencadeadas pelos peneídeos para combater os patógenos. Essas informações são necessárias para o desenvolvimento de ferramentas que aumentem a imunocompetência dos animais a campo e, conseqüentemente, auxiliem no sucesso dos cultivos.

## 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O SISTEMA IMUNE DOS CRUSTÁCEOS

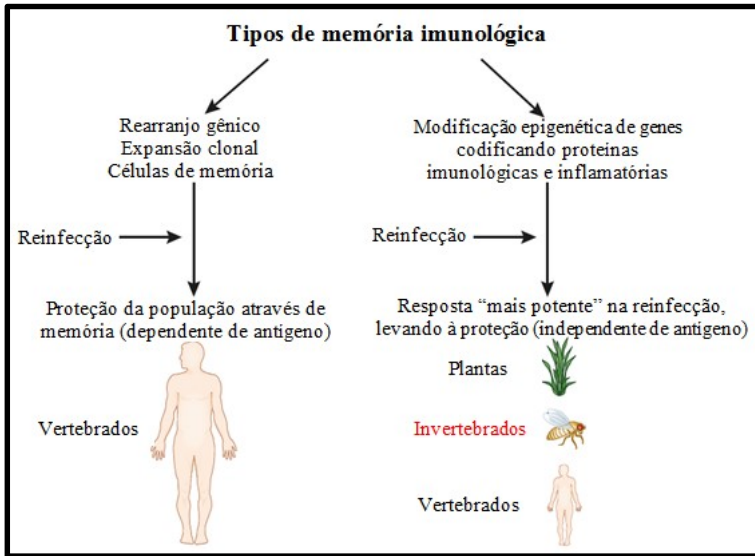
Os crustáceos contam com um sistema imune do tipo inato, não possuindo todo o arsenal imunológico adaptativo presente nos vertebrados, que define uma proteção altamente específica e memória a longo prazo. Dessa forma, a confecção de *vacinas* para os crustáceos, no termo clássico da palavra, é inviável (BARRACCO *et al.*, 2014). No entanto, recentemente vários estudos demonstraram que os invertebrados podem montar respostas de defesa altamente variáveis e dependentes do patógeno envolvido (*vide* revisão de CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2013). Existem evidências que alguns grupos de invertebrados podem sintetizar, de maneira aleatória ou não, proteínas imunológicas com uma grande variabilidade de sequências. Sendo assim, a diversidade de moléculas nestes animais, para combater parasitas e outros patógenos, parece ser muito mais abrangente do que

previamente estabelecido (BUCKLEY; RAST, 2012; GHOSH *et al.*, 2011).

Os mecanismos moleculares envolvidos na diversidade de moléculas nos invertebrados estão começando a ser desvendados. Como exemplos de moléculas hipervariáveis encontram-se as Dscam (do inglês, *Down syndrome cell adhesion molecule*), presentes nos artrópodes, e as proteínas relacionadas ao fibrinogênio (FREPs, do inglês *Fibrinogen-related proteins*), presentes em moluscos gastrópodes (ARMITAGE *et al.*, 2015; GORDY *et al.*, 2015). Ambas, Dscam e FREPs possuem domínios hipervariáveis da família das imunoglobulinas, que são regiões-alvo para a ocorrência de *splicing* alternativo responsável por essa diversidade molecular no animal (*vide* revisão de CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2013). As isoformas de Dscam e FREPs parecem ocorrer ao acaso e não em decorrência do contato prévio com o patógeno.

Por outro lado, estudos recentes apontam ainda para a existência de uma memória treinada (*trained immunity*) em plantas, invertebrados e vertebrados, baseada em *immune priming* (NETEA *et al.*, 2011; 2015) (**Figura 2**). Na memória treinada ocorrem “modificações” funcionais em células do sistema imune inato do hospedeiro, após um primeiro contato bem sucedido com o patógeno (*immune priming*). Essas modificações incluiriam desde alterações na expressão de receptores de superfície celular até a modulação na expressão gênica de imunofatores e imunoreguladores. Isso levaria, em última análise, a uma resposta secundária “mais potente” do hospedeiro durante uma reexposição ao mesmo patógeno (*vide* revisão de NETEA *et al.*, 2015) (**Figura 2**). Essas novas evidências questionam, portanto, os conceitos clássicos de imunidade inata e abrem novas perspectivas para estudos buscando terapias para o controle de infecções em invertebrados.

**Figura 2:** Esquema comparativo da memória conferida pelo sistema imune adaptativo e da “memória treinada” do sistema imune inato



A memória imunológica adaptativa convencional está presente apenas nos vertebrados, enquanto que a “memória treinada” é uma resposta inata presente em plantas, invertebrados e vertebrados. Nas plantas, alterações epigenéticas induzem genes codificantes para moléculas de defesa em resposta a uma reexposição ao patógeno, fenômeno esse denominado de *resistência sistêmica adquirida*. Eventos semelhantes são observados em mamíferos, na qual a reprogramação epigenética também acontece na imunidade treinada. Os mecanismos principais que medeiam este evento incluem a reprogramação epigenética induzida por estruturas fúngicas, como as  $\beta$ -glicanas, acompanhada de metilação e acetilação de histonas (adaptado de NETEA *et al.*, 2015).

Apesar dessas novas descobertas, classicamente a primeira linha de defesa dos crustáceos é uma barreira física, composta por uma carapaça externa rígida de quitina. Internamente, o trato gastrointestinal dos camarões é revestido por uma cutícula quitinosa, que impede a absorção da maioria dos nutrientes (MCGAW; CURTIS, 2013). A exceção disso é a região medial do intestino que é revestida por uma membrana peritrófica acelular e porosa, que permite a absorção seletiva de nutrientes e é composta por fibrilas quitinosas associadas à glicoproteínas e proteoglicanas (MCGAW; CURTIS, 2013; WANG *et al.*, 2012). Este revestimento do intestino médio serve como uma

barreira, separando os conteúdos do lúmen intestinal e o epitélio, protegendo assim o intestino médio da abrasão por partículas de comida e de microrganismos e parasitas (WANG *et al.*, 2012).

Além dessa barreira, o trato digestório possui enzimas digestivas capazes de digerir a maioria dos microrganismos. Quando essa inativação dos microrganismos não ocorre, e eles adentram o sistema circulatório do animal, diversas reações imunológicas são ativadas para eliminar o agente invasor (SOONTHORNCHAI *et al.*, 2010). Entretanto, o intestino médio é uma região altamente exposta a microrganismos e pouco se conhece sobre a imunidade intestinal desses animais e sua relação com microrganismos comensais e patogênicos.

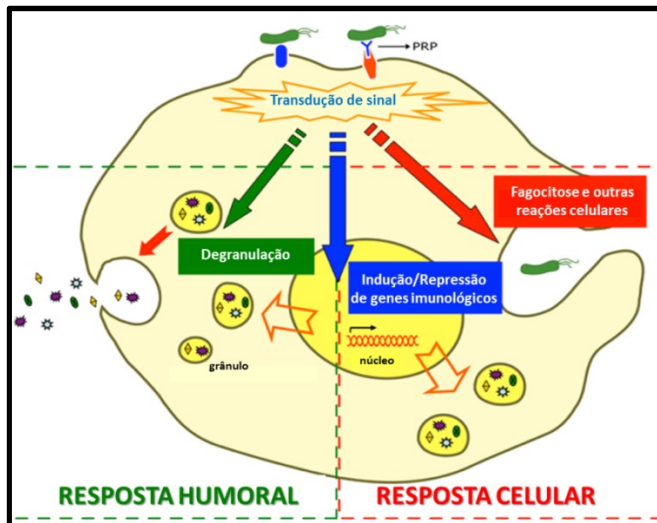
Os principais sistemas de defesa atualmente reconhecidos nos peneídeos e que participam do reconhecimento e destruição dos patógenos invasores, são: (1) reconhecimento do não próprio pelos receptores/proteínas de reconhecimento-padrão (PRRs/PRPs); (2) sinalização e ativação dos hemócitos; (3) respostas imuno-celulares (fagocitose, infiltração, formação de cápsulas e nódulos e armadilhas extracelulares de ácidos nucleicos); (4) produção de moléculas microbicidas, como as espécies reativas de oxigênio (ROIs, *reactive oxygen intermediates*) e de nitrogênio (RNIs, *reactive nitrogen intermediates*) e os peptídeos antimicrobianos (AMPs, *antimicrobial peptides*); (5) melanização mediada pelo sistema de ativação da pró-fenoloxidase (proPO) e (6) defesas antivirais mediadas por citocinas análogas a *interferons*, sistema RNA de interferência, apoptose e autofagia (BARRACCO *et al.*, 2014).

O sistema circulatório dos crustáceos é do tipo aberto ou semiaberto, por onde transita a hemolinfa, composta por uma fração celular, os hemócitos (células imunocompetentes), e uma fração líquida, o plasma, onde estão dissolvidos os fatores humorais. Os hemócitos desempenham um importante papel nas respostas citotóxicas de defesa, realizando fagocitose em presença de espécies ativas de oxigênio/nitrogênio e isolando os microrganismos/parasitas por nodulação ou encapsulamento (YANG *et al.*, 2015).

As respostas humorais são desencadeadas a partir do reconhecimento do agente invasor (ou de seus componentes estruturais) por receptores/proteínas de reconhecimento padrão (PRRs/PRPs, *pattern recognition proteins/receptors*). Essas moléculas, presentes no hospedeiro, reconhecem especificamente padrões moleculares exclusivos de microrganismos/patógenos, (M/PAMPs, do inglês *microbial/pathogen associated molecular patterns*) (YANG *et al.*, 2015). Elas podem ser secretadas para o plasma ou estar localizadas na

membrana das células, principalmente as do sistema imune ou estar livres no citosol (BARRACCO *et al.*, 2014). As PRRs/PRPs dos invertebrados são responsáveis pelo reconhecimento dos seguintes M/PAMPs: lipopolissacarídeos (LPS) da superfície de bactérias Gram-negativas, peptidoglicanas (PGNs) e ácido lipoteicoico (LTA) da parede de bactérias Gram-positivas,  $\beta$ -1,3-glicanas da parede de fungos e o RNA de longa dupla fita (dsRNA, do inglês *double-stranded RNA*), produzido por vários vírus durante a sua replicação no hospedeiro, o RNA de fita simples (ssRNA; do inglês, *single-strand RNA*) e motivos CpG (DNA não-metilado) de microrganismos (CHRISTOPHIDES *et al.*, 2004; JENSEN; THOMSEN, 2012). As diferentes respostas celulares e humorais de defesa atuam em sinergismo na proteção contra os patógenos (**Figura 3**).

**Figura 3:** Respostas imunológicas induzidas pelos hemócitos dos crustáceos depois do reconhecimento do patógeno.



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



Várias PRPs foram identificadas e caracterizadas na hemolinfa de crustáceos ( WANG; WANG, 2013a). Entre elas destacam-se as lectinas que são glicoproteínas presentes em plantas, animais e microrganismos (LAKHTIN *et al.*, 2011) que reconhecem e se ligam especificamente a carboidratos na superfície de diferentes células, incluindo microrganismos. Essas moléculas apresentam pelo menos dois sítios de ligação a carboidratos ou CRDs (do inglês, *carbohydrate recognition domain*), o que as tornam capazes de aglutinar células que expressam seus açúcares ligantes (*vide* revisão de WANG; WANG, 2013b). Além disso, as aglutininas também possuem outras funções biológicas, tais como interação celular, síntese e transporte de proteínas e transdução de sinal (MCGREAL *et al.*, 2004).

Até o momento sete famílias de lectinas são conhecidas em camarões, sendo elas: lectinas do tipo-C, cálcio dependentes (CTL ou *C-type lectin*), lectinas tipo-L, tipo-P e tipo-M, galectinas, calnexinas/calreticulinas e as lectinas cálcio-dependentes do tipo FREP (*vide* revisão de WANG; WANG, 2013b).

As lectinas do tipo FREP estão presentes em invertebrados e vertebrados e apresentam um domínio conservado na região C-terminal, relacionado ao fibrinogênio (FReD ou FBG, do inglês *Fibrinogen-related domain*), com aproximadamente 200 resíduos de aminoácidos (WANG *et al.*, 2005). Compreendem uma grande família gênica envolvidas no reconhecimento microbiano e em outras funções biológicas (*vide* revisão de GORDY *et al.*, 2015).

### 1.1.1. FREPs de invertebrados

A grande família das FREPs é encontrada tanto nos vertebrados, quanto nos invertebrados e incluem os fibrinogênios, as tenascinas, as proteínas associadas à microfibrilas, as ficolinas, as tachylectinas e as FREPs propriamente ditas (*vide* revisão de GOSH *et al.*, 2011). Essas moléculas apresentam um importante papel na defesa dos animais, pois participam do reconhecimento de patógenos, promovem a sua aglutinação, lise e *clearance* bacteriano e atuam ainda na defesa contra protozoários parasitas.

As FREPs de invertebrados foram primeiramente caracterizadas no caracol de água doce, *Biomphalaria glabrata*, uma das cinco espécies transmissoras da esquistossomose em humanos. Essas moléculas estão dissolvidas na hemolinfa do gastrópode e possuem em sua região N-terminal, um ou dois domínios da superfamília das imunoglobulinas (IgSF1 e/ou IgSF2) e na região C-terminal, um domínio de fibrinogênio

(FBG), além de outras regiões detalhadas na **Figura 4** (ADEMA *et al.*, 1997; *vide* revisão de CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2013; *vide* revisão de GORDY *et al.*, 2015).

Em *B. glabrata* existem 14 subfamílias de FREPs (*vide* revisão de GORDY *et al.*, 2015), sendo que a diversidade somática dessas moléculas é decorrente de *splicing* alternativo (ZHANG; LOKER, 2004), mutações pontuais ou conversão gênica (*vide* revisão GORDY *et al.*, 2015) nos domínios das superfamílias de imunoglobulinas (IgSF 1 e 2), nas regiões intercessoras (ICR, do inglês, *interceding regions*) e nos domínios FBG (DHEILLY *et al.*, 2015; HANINGTON; ZHANG, 2011; ZHANG *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2004).

**Figura 4:** Modelo gráfico da proteína relacionada ao fibrinogênio codificada pelo gene FREP3 de *Biomphalaria glabrata*.



A extremidade N-terminal apresenta um domínio do fator de crescimento epidermal (EGF), um domínio da superfamília das imunoglobulinas 1 (IgSF1), uma região SCR (*small contacting region*), um domínio da superfamília das imunoglobulinas 2 (IgSF2), uma região intercessora (ICR) e, na extremidade C-terminal, um domínio relacionado ao fibrinogênio (FBG). Fonte: CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2013.

Os gastrópodes são os primeiros hospedeiros intermediários de cerca de 25 mil espécies de helmintos trematódeos digenéticos (ESCH *et al.*, 2002). Evidências apontam que durante a infecção de *B. glabrata* pelo *Schistosoma mansoni*, as FREPs solúveis na hemolinfa reconhecem e se ligam às mucinas secretadas na superfície do trematódeo. Após esse reconhecimento, FREP-mucinas se ligam a outra proteína plasmática (TEP, do inglês, *Thioester-containing protein*) que recruta a defesa celular (encapsulamento e morte do parasita por espécies reativas de oxigênio) (*vide* revisão de GORDY *et al.*, 2015; HUMPHRIES; YOSHINO, 2008). Estudos apontam que o domínio FBG é o responsável pelo reconhecimento do parasita e ativação dos hemócitos (*vide* revisão de GORDY *et al.*, 2015).

De maneira interessante, as FREPs dos moluscos apresentam diferenças estruturais. Huang e colaboradores (2015) identificaram 190 sequências de FREPs no genoma da ostra do Pacífico, *Crassostrea*

*gigas*. Nesse bivalve, as FREPs apresentam um domínio FBG, porém, diferentemente dos gastrópodes, não possuem os domínios IgSF e ICR. A análise das sequências mostrou um elevado número de polimorfismos nos genes FREP de *C. gigas* (CgFREP) o que pode contribuir para uma função imunológica versátil de FREPs. Além disso, genes CgFREPs foram encontrados sendo constitutivamente expressos nas brânquias, glândula digestiva e nos hemócitos (HUANG *et al.*, 2015), no entanto as funções das FREPs em ostras não são ainda conhecidas. Além deste bivalve, uma FREP hemocitária também foi descrita no mexilhão *Mytilus galloprovincialis* (ROMERO *et al.*, 2011).

No grupo dos artrópodes, as FREPs são mais conhecidas nos insetos. No mosquito vetor da malária *Anopheles gambiae*, 59 genes da família FREP foram identificados, cuja estrutura molecular apresenta o domínio de fibrinogênio, porém, estando ausentes os demais domínios (IgSF e ICR) (DONG; DIMOPOULOS, 2009). Algumas FREPs do mosquito apresentam funções antibacterianas e antiparasitárias (DONG; DIMOPOULOS, 2009; RAFTO *et al.*, 2005).

Considerando o acima relatado, fica evidente que existem diferenças estruturais relevantes entre as FREPs de moluscos e de artrópodes. Enquanto, as FREPs dos gastrópodes apresentam domínios IgSF 1 e 2 e ICR, as mesmas regiões estão ausentes nas FREPs dos artrópodes. No entanto, ambos os filos possuem FREPs com domínio FReD/FBG responsável pelo reconhecimento e aglutinação microbiana e pelo *clearance* bacteriano (HANINGTON; ZHANG, 2011).

Em crustáceos, as FREPs foram primeiramente identificadas no lagostim de água doce *Pacifastacus leniusculus* e denominada como proteína de inibição de melanização (PIMIP). Essa proteína possui um domínio FReD/FBG semelhante ao domínio encontrado nas ficolinas de vertebrados e atua como um regulador da atividade fenoloxidase (PO), inibindo a melanização no lagostim (SÖDERHÄLL *et al.*, 2009). Outras duas proteínas semelhante às ficolinas foram identificadas em *P. leniusculus* (P\Fico1 e P\Fico2), capazes de se ligarem a bactérias Gram-negativas e promover o *clearance* bacteriano (WU *et al.*, 2011). Em camarões, as FREPs foram identificadas recentemente no dulcícola *Macrobrachium rosenbergii* (MrFico1 e MrFico2) (ZHANG *et al.*, 2014) e em duas espécies de peneídeos, *Penaeus monodon* (PmMIP) (ANGTHONG *et al.*, 2010) e *Marsupenaeus japonicus* (MjFREP1; MjFREP2) (CHAI *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2014).

Considerando que o principal fator limitante para o sucesso da carcinicultura consiste no controle das infecções, estudos que auxiliem na compreensão dos mecanismos antimicrobianos e das moléculas

envolvidas nesses processos, são fundamentais para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas visando uma melhora na imunocompetência dos animais. Nesse contexto, o presente estudo relata a presença e a expressão tecidual de um gene codificante para uma FREP na espécie mais cultivada no mundo, *L. vannamei*.

## 2. HIPÓTESE

O camarão *Litopenaeus vannamei* possui, pelo menos, um gene codificante para uma proteína relacionada ao fibrinogênio (FREP), cuja expressão é observada em todas as fases do desenvolvimento larval e pode ser modulada por infecções microbianas.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil transcricional de um gene codificante para proteínas relacionadas ao fibrinogênio (FREPs) no camarão *Litopenaeus vannamei*.

### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Identificar e analisar a distribuição da expressão de LvFrep em diferentes tecidos de camarões juvenis estimulados ou não com a bactéria *Vibrio harveyi*;

3.3.2. Avaliar a modulação gênica da FREP em camarões juvenis desafiados com a bactéria *V. harveyi* ou com o WSSV;

3.3.3. Avaliar a expressão gênica da FREP nos diferentes estágios do desenvolvimento do camarão.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. ANIMAIS

Foram utilizados camarões juvenis da espécie *Litopenaeus vannamei* ( $10 \pm 2$  g) ( $n=130$ ), de ambos os sexos, aparentemente saudáveis e em fase de intermuda, cedidos pelo Laboratório de Camarões Marinhos do Departamento de Aquicultura (UFSC/CCA/LCM). Além dos juvenis, utilizou-se camarões em diferentes estágios do desenvolvimento (ovos fertilizados de 0-4 h e de 7-11 h pós-desova, Náuplios I e V, Protozoas I e III, Misis I e III, pós-larvas de 2, 9 e 17 dias e juvenis), provenientes da desova de 23 fêmeas, conforme descrito em Quispe (2016). Os ovos, estágios larvais e pós-larvais foram coletados e processados *in loco* (LCM).

Os animais juvenis foram transferidos para o Setor de Bioensaios do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (UFSC/CCB/LIAA), alocados em dois tanques de 100 L (65 animais/tanque) contendo água salgada filtrada, aeração constante e com renovação diária da água de 50%. Antes do início dos experimentos, os animais foram aclimatados por sete dias e alimentados uma vez ao dia, com ração comercial (Guabi; POTIMAR 35 EXT) a uma biomassa de 2%. A temperatura da sala foi climatizada a 26°C, sendo que a temperatura da água permaneceu em torno de 23°C durante o período experimental.

### 4.2. DIAGNÓSTICO DE WSSV

Antes do início dos experimentos, 30% dos juvenis foram amostrados e avaliados quanto à presença do WSSV. A coleta da hemolinfa (Item 4.4) foi realizada para a extração do DNA genômico (gDNA) de hemócitos fixados em etanol 70%, utilizando-se o reagente DNAzol (Invitrogen®). Após, os hemócitos foram lavados com 10 mM Tris (pH 7,5) submetidos à extração com DNAzol (1 ml/precipitado) e o DNA extraído foi precipitado com isopropanol (400 µl). Finalmente, as amostras de DNA de hemócitos foram lavadas com etanol 75%, secas a temperatura ambiente e solubilizadas em 8 mM NaOH (200 µl). A pureza das amostras foi avaliada em espectrofotômetro (NanoVue Plus<sup>TM</sup>), considerando a relação  $A_{260}:A_{280}= 1,8-2,1$ . A amplificação das seqüências de DNA correspondentes ao WSSV foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase em dois passos (*nested PCR*), utilizando-se os iniciadores recomendados pela OIE (do inglês, *World organisation for*

*animal health*) apresentados no **Quadro 1**. As condições da primeira PCR para WSSV146 foram: 94°C por 4 min, com 39 ciclos de 55°C por 1 min, 72°C por 2 min. Na reação seguinte, as condições foram: 94°C por 1 min, com 39 ciclos de 55°C por 1 min, 72°C por 2 min e 72°C durante 5 min. A confirmação ou não da presença de sequências gênicas referentes ao vírus nos animais foi realizado através de análises em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídeo. A visualização dos géis foi realizada através do fotodocumentador e digitalizados pelo programa DigiDoc-ItLS. Como controle positivo da reação, foram utilizadas amostras de gDNA de animais comprovadamente infectados com WSSV.

### 4.3. DESAFIOS MICROBIANOS

#### 4.3.1. Estímulo dos animais com *V. harveyi*

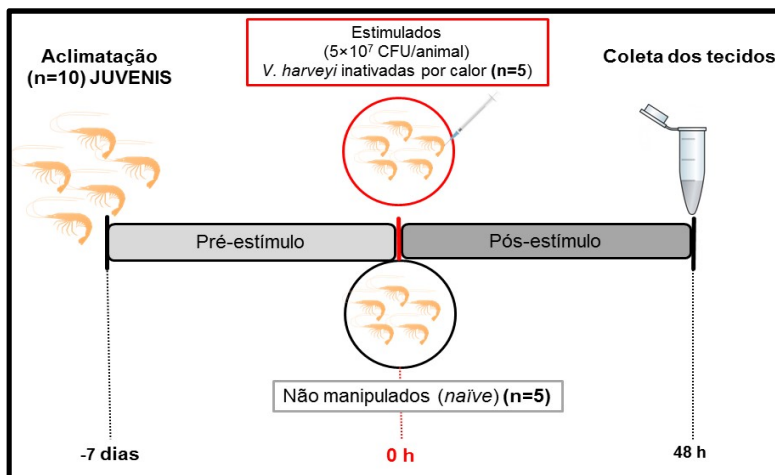
Para os experimentos de desafios microbianos, inicialmente realizou-se um estímulo bacteriano dos animais com a bactéria marinha *Vibrio harveyi* (ATCC 14126), inativada por calor. A cultura de *V. harveyi* foi obtida a partir do crescimento em meio LB-NaCl (1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 3% NaCl, pH 7,2) a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  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 suspensa em água do mar filtrada ( $0,45 \mu\text{m}$ ). A concentração bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro (Biowave II WPA<sup>®</sup>) para uma densidade óptica  $\text{DO}_{600 \text{ nm}} = 0,52$ , correspondente a  $5 \times 10^8$  CFU/ml. As bactérias foram então inativadas por calor a  $70^\circ\text{C}$  por 20 min e plaqueadas em meio sólido LB-NaCl ágar (LB-NaCl acrescido de 1,5% de ágar) para confirmação da eficiência do tratamento.

Após o período de aclimação de sete dias, os camarões juvenis ( $n=10$ ) foram acondicionados em tanques ( $n=5/\text{tanque}$ ), contendo 16 L de água salgada e injetados intramuscularmente na região dorsal (entre o primeiro e o segundo segmentos abdominais) com uma solução de bactérias inativadas (100  $\mu\text{l}$ ;  $5 \times 10^7$  CFU por animal) (**Figura 5**). Como controle, foram utilizados animais não manipulados (grupo *naïve*;  $n=5$ ). Os camarões ficaram sem alimentação nas 48 h seguintes, quando foi realizada a coleta da hemolinfa e a dissecação dos tecidos dos cinco animais de cada grupo e agrupados em uma única amostra por condição, segundo descrito no item 4.4. A análise foi realizada nas 48 h pós-injeção uma vez que a expressão de vários genes imunológicos de *L.*



*vannamei* mostrou ser modulada nesse período, em resposta a diferentes agentes patogênicos (GONÇALVES, *et al.*, 2014).

**Figura 5:** Esquema ilustrativo do estímulo microbiano com juvenis de *Litopenaeus vannamei*.



**-7 dias:** período de aclimação dos animais. **0 h:** estímulo microbiano. **48 h:** coleta dos tecidos e processamento das amostras. Círculo vermelho: grupo estimulado com *Vibrio harveyi* ATCC 14126 (bactérias inativadas por calor); Círculo preto: animais não manipulados (grupo *naïve*).

### 4.3.2. Infecção experimental com *V. harveyi*

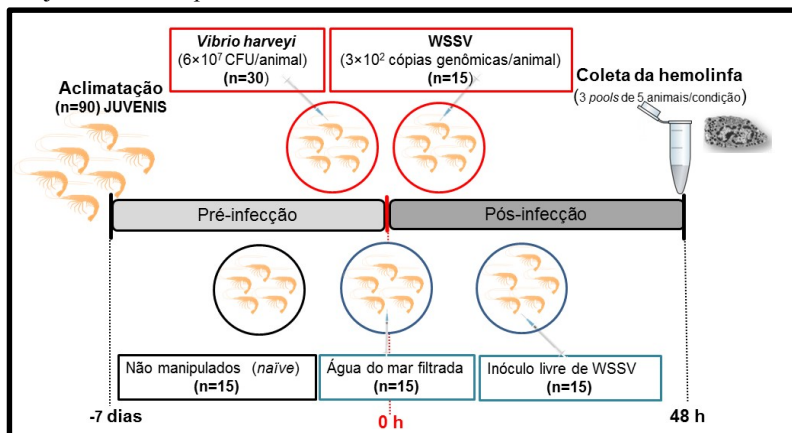
Para os ensaios de infecção bacteriana, utilizou-se a bactéria *V. harveyi* (ATCC 14126). Após o período de aclimação de sete dias, os camarões foram injetados intramuscularmente (n=30) como descrito acima, porém com inóculo bacteriano vivo ( $6 \times 10^7$  CFU por animal), diluído em água do mar filtrada (**Figura 6**). Essa dose bacteriana foi anteriormente padronizada no LIAA, a qual é capaz de matar 50% dos animais em um período de 48 h ( $DL_{50}$ ). Após a infecção, os camarões foram dispostos em tanques (n=5/tanque), contendo 16 L de água salgada. Os camarões não foram alimentados nas 48 h seguintes, quando então realizou-se a coleta da hemolinfa (3 *pools* de 5 animais), conforme descrito no item 4.4. Animais não manipulados (grupo *naïve*; n=15) ou injetados com água do mar filtrada (n=15) foram utilizados como controle.

### 4.3.3. Infecção dos animais com WSSV

Para os ensaios de infecção viral, utilizou-se um inóculo contendo o vírus da síndrome da macha branca (WSSV) obtido segundo o protocolo de Gonçalves e colaboradores (2014), com algumas modificações. Para tal, 10 g do tecido muscular de camarões diagnosticados por PCR como 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, em seguida, centrifugados a  $3.000 \times g$  por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi recuperado e centrifugado a  $12.000 \times g$  por 40 min a 4°C, filtrado (0,45 µm), aliquoteado e armazenado a -196°C. Seguindo a mesma metodologia, foi preparado um inóculo livre de WSSV, utilizando tecido muscular de animais previamente diagnosticados como negativos para o vírus.

Após o período de aclimação de sete dias, os animais foram injetados intramuscularmente (n=15), entre o primeiro e o segundo segmentos abdominais da região dorsal, com 100 µL do inóculo viral ( $3 \times 10^2$  cópias genômicas por animal) (**Figura 6**). Essa dose foi anteriormente padronizada no LIAA como sendo capaz de matar 50% dos animais em um período de 15 dias ( $DL_{50}$ ). Após a injeção, os camarões foram dispostos em tanques contendo 16 L de água salgada (n=5 animais/ tanque). Após 48 h da infecção foi realizada a coleta da hemolinfa (3 *pools* de 5 animais), segundo descrito no item 4.4. Como controle, foram utilizados animais não manipulados (grupo *naïve*; n=15) e animais injetados com 100 µL do inóculo livre de WSSV (n=15).

**Figura 6:** Esquema ilustrativo das infecções experimentais virais e bacterianas com juvenis de *Litopenaeus vannamei*.



**-7 dias:** início do período de aclimação dos animais. **0 h:** infecção experimental. **48 h:** coleta da hemolinfa e processamento das amostras. Círculos vermelhos: grupos experimentais (camarões infectados com o WSSV ou com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126); Círculos azuis: controles experimentais (animais injetados com inóculo livre de WSSV ou com água do mar filtrada); Círculo preto: animais não manipulados (grupo *naïve*). Para cada grupo experimental, foram feitos 3 *pools* de 5 animais.

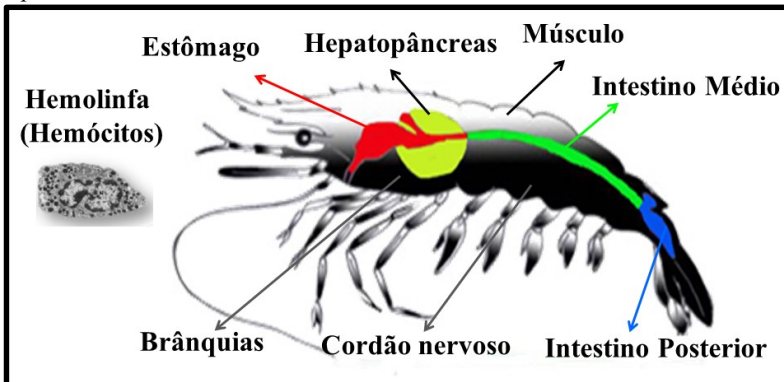
#### 4.4. COLETA DOS TECIDOS

A hemolinfa de camarões juvenis foi extraída na região ventral do abdome, entre o último esternito cefalotorácico e o primeiro abdominal, por inserção de uma agulha ( $13 \times 0,4$  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) (proporção 1:2, sendo 1 parte de hemolinfa para 2 de MAS), centrifugada ( $1.500 \times g$  por 10 min a  $4^\circ\text{C}$ ) e o precipitado celular suspenso em 1 ml do reagente TRIzol<sup>®</sup> (Thermo Scientific<sup>®</sup>). Após a extração da hemolinfa, os camarões foram anestesiados por hipotermia ( $-20^\circ\text{C}$  por 20 min) e posteriormente sacrificados para a dissecação e coleta dos seguintes tecidos: estômago, hepatopâncreas, intestino médio, intestino posterior, músculo, brânquias e cordão nervoso (**Figura 7**). Após a coleta, os tecidos foram lavados em solução Tris-NaCl (10 mM Tris, 330 mM NaCl, pH 7,4) e macerados na presença de 1 ml do reagente TRIzol<sup>®</sup> (Thermo Scientific<sup>®</sup>) com o auxílio de pistilos estéreis acoplados ao

homogeneizador VWR® *Disposable Pellet Mixers and Cordless Motor*. Após centrifugação ( $12.000 \times g$  por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ ), os sobrenadantes foram coletados e conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para a posterior extração de RNA total (item 4.5.).

As amostras de cDNA de camarões em diferentes estágios do desenvolvimento foram preparadas por Quispe e colaboradores (2016) e estavam armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  no LIAA. Quispe e colaboradores (2016) definiram cada estágio do desenvolvimento microscopicamente e coletaram três amostras independentes de cada estágio, compreendendo: ovos fertilizados de 0-4 h (EI) e de 7-11 h pós-desova (EII), Náuplios I e V (NI e NV), Protozoetas I e III (ZI e ZIII), Misis I e III (MI e MIII) e Pós-larvas com idade de 2, 9 e 17 dias (PL2, PL9 e PL17).

**Figura 7:** Esquema ilustrativo (fora de escala) indicando os tecidos de juvenis *Litopenaeus vannamei* analisados neste estudo.



Estômago (vermelho), hepatopâncreas (amarelo), intestino médio (verde), intestino posterior (azul), cordão nervoso, brânquias, músculo e hemolinfa (hemócitos) (adaptado de SOONTHORNCHAI *et al.*, 2010).

#### 4.5. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA

Para a obtenção do RNA total, os hemócitos e tecidos dos camarões juvenis foram conservados em TRIzol® (Thermo Scientific®) e submetidos à extração com clorofórmio. Após centrifugação ( $12.000 \times g$  por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ ), o RNA total obtido foi precipitado com isopropanol e lavado duas vezes com etanol 75% gelado. O precipitado de RNA foi suspenso em água livre de DNA/RNA/DNases/RNases e tratado com 1 U da enzima DNase I (Thermo Scientific®) por 15 min a  $37^{\circ}\text{C}$ , para a eliminação de DNA genômico (gDNA) contaminante. A enzima DNase

I foi então inativada (70°C por 15 min) e as amostras precipitadas com 0,3 M acetato de sódio (pH 5,2) e isopropanol (1:1; v:v). Finalmente, o RNA total foi lavado com etanol 75% gelado e suspenso em água livre de DNA/RNA/DNases/RNases.

Para a avaliação da distribuição gênica em diferentes tecidos de juvenis *L. vannamei*, o RNA total foi extraído individualmente das cinco amostras de todos os tecidos coletados das duas condições experimentais (animais estimulados e *naïve*). A concentração das amostras foi determinada pela leitura de absorbância em 260 nm ( $A_{260nm} = 1$ , equivalente a 40 µg RNA/ml) no espectrofotômetro NanoVue Plus<sup>TM</sup>. 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 três melhores amostras de cada tecido e de cada condição, foram agrupadas em um único *pool*, utilizando a mesma quantidade de RNA total extraído (5 µg/amostra). Em seguida, os *pools* de RNAs foram quantificados novamente e a integridade avaliada em gel de agarose 0,8%. As amostras de RNA total dos hemócitos de animais submetidos aos desafios virais e bacterianos (coletadas em *pools* de 5 animais por condição) foram diretamente processadas e a concentração, pureza e integridade avaliadas conforme descrito acima.

Para a síntese de cDNA, 1 µg de RNA total foi reversamente transcrito na presença de 200 U da enzima RevertAid<sup>®</sup> Reverse Transcriptase (Thermo Scientific<sup>®</sup>), 0,5 mM de dNTP Mix (Sinapse Inc<sup>®</sup>), 20 U da enzima RiboLock<sup>TM</sup> RNase Inhibitor (Thermo Scientific<sup>®</sup>) e 0,5 µg de oligo(dT)<sub>12-18</sub> (Sinapse Inc<sup>®</sup>), em um volume final de 20 µL. As amostras foram incubadas a 42°C por 60 min e a enzima inativada por calor a 65°C por 15 min. As amostras de cDNAs foram armazenadas a -20°C para utilização posterior.

#### 4.6. DESENHO DOS INICIADORES

A sequência de nucleotídeos que codifica para a proteína relacionada ao fibrinogênio 1 do camarão *Marsupenaeus japonicus* (MjFREP1; GenBank: JN100568) foi utilizada como referência para a busca de sequências ortólogas do camarão *L. vannamei* publicamente acessíveis no banco de dados de sequências não anotadas EST (*Expressed sequence tags*) (GenBank). Foi encontrada uma sequência do gene codificante para uma FREP de *L. vannamei* (GenBank:

FE071367) na qual foi utilizada para desenhar o par de iniciadores utilizado para as análises de expressão semi-quantitativas por PCR convencional (RT-PCR) e quantitativas em tempo real (RT-qPCR). No presente estudo esses iniciadores foram denominados *LvFrep* e suas sequências estão apresentadas no **Quadro 1**.

O potencial de auto complementariedade e formação de dímeros dos iniciadores foram verificados utilizando o *Software FastPCR* (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>). Para a escolha dos iniciadores utilizados neste estudo, os seguintes parâmetros foram observados: (1) temperatura de hibridização entre 58-62°C, (2) tamanho dos iniciadores de 20-21 pb, (3) conteúdo de C/G entre 50% e, (4) tamanho do produto de amplificação entre 100-200 pb.

#### 4.7. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DE PCR CONVENCIONAL (RT-PCR)

As análises de expressão semi-quantitativas de *LvFrep* em diferentes tecidos de *L. vannamei* (submetidos ou não a um estímulo bacteriano; Item 4.3.1) foram realizadas por 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 MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de dNTP Mix, 0,2 µM dos iniciadores senso e antissenso, 1 U da enzima *Taq* DNA polymerase (Sinapse Inc<sup>®</sup>) e 1 µL de cDNA (diluído 10 vezes). As reações foram realizadas de acordo com as seguintes condições: desnaturação a 95°C por 10 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, hibridização a 55°C por 30s, extensão a 72°C por 30s e 72°C por 5 minutos para a extensão final. As sequências dos iniciadores estão apresentadas no **Quadro 1**. Como controle de expressão e de qualidade das amostras foi avaliada a expressão do gene β-actina (**Quadro 1**), nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, hibridização a 50°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e 72°C por 5 minutos para a extensão final. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1,5%) corados com brometo de etídeo (Amresco<sup>®</sup>). Os tamanhos moleculares foram comparados com o padrão molecular de 100 pb (Sinapse Inc<sup>®</sup>). Os géis foram visualizados em um fotodocumentador utilizando fluorescência UV e digitalizados no programa DigiDoc-ItLS.

**Quadro 1:** Sequência dos iniciadores referentes aos genes utilizados nas análises de expressão gênica (RT-PCR e RT-qPCR).

Sigla	Gene	Sequência (5'-3')	Produto de amplificação (pb)	Nº GenBank	Referência
AV1/AV2	$\beta$ -actina	Fw TAATCCACATCTGCTGGAAGGTGG Rv TCACCAACTGGGATGACATGG	~846	-	Cadoret et al., 1999
LvActin	$\beta$ -actina	Fw CCACGAGACCACCTACAAC Rv AGCGAGGGCAGTGATTTC	142	AF300705	Wang et al., 2007
LvEF1a	Fator de elongação 1- $\alpha$	Fw TGGCTGTGAACAAGATGGACA Rv TTGTAGCCCACCTTCTTGACG	103	GU136229	De la Vega et al., 2008
LvL40	Proteína ribossomal L40	Fw GAGAATGTGAAGCCAAGATC Rv TCAGAGAGAGTGCGACCATC	104	KJ831563	Silveira, 2016
LvRpS6	Proteína ribossomal 40S S6	Fw AGCAGATACCCCTTGGTGAAG Rv GATGCAACCACGGACTGAC	193	FE080516	Goncalves et al., 2014
LvRpS3A	Proteína ribossomal S3A	Fw GGCTTGCTATGGTGTGCTCC Rv TCATGCTCTGGCTCGCTG	101	BF023924	De la Vega et al., 2008
<b>Gene codificante para a Frep de <i>L. vannamei</i></b>					
LvFrep	Proteína relacionada ao fibrinogênio (Frep)	Fw TAGGTGATTACTCGGCGAAC Rv TAATACTCCACGAGTCGAG	127	FE071367	Presente estudo
<b>Genes para diagnóstico viral</b>					
WSSV146-1	-	Fw ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG Rv TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACG	1447	-	OIE
WSSV146-2	-	Fw <i>GTAATGCGCCCTTCCAATCTCCA</i> Rv TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT	941	-	OIE

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

A expressão de *LvFrep* foi avaliada nos hemócitos de camarões juvenis desafiados com o WSSV ou com a bactéria *V. harveyi* e em camarões em diferentes estágios do desenvolvimento. As reações de transcrição reversa seguida por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas utilizando o aparelho *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems®). As reações ocorreram em um volume final de 15 µL contendo 1 µL de cDNA (diluído 1:20 para os camarões desafiados com o WSSV ou com a bactéria *V. harveyi* e cDNA diluído 1:8 para os camarões em diferentes estágios do desenvolvimento), 0,3 µM de cada iniciador e 7,5 µL do mix de reação (Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2×; Thermo Scientific®). As análises foram feitas em duplicata e as sequências dos iniciadores estão apresentadas no **Quadro 1**. Para a amplificação, foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15s e hibridização/extensão a 60°C por 1 min. A especificidade das reações foi confirmada pela análise de curvas de dissociação (60-95°C; 0,05°C/s), realizada após as etapas de amplificação.

Para a determinação da eficiência dos iniciadores foi avaliada a amplificação das sequências de interesse utilizando-se diluições seriadas (curva padrão: 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128) de um *pool* de todos os cDNAs das amostras de hemócitos das infecções virais e bacterianas. Os valores de C<sub>q</sub> (ciclo de quantificação) de cada diluição foram utilizados para a construção de uma curva linear, cujo valor de *slope* (coeficiente angular da reta) foi utilizado para o cálculo da eficiência (E) dos pares de iniciadores segundo a fórmula:  $E = 10^{(-1/slope)} - 1$ .

O programa RefFinder (<http://fulxie.0fees.us/>) foi utilizado para a escolha da melhor condição de referência entre quatro genes candidatos: *LvEF1α* (GenBank: GU136229), *LvL40* (GenBank: KJ831563), *LvRpS6* (GenBank: FE080516) e *LvRpS3A* (GenBank: BF023924). A escolha foi baseada no cálculo do coeficiente de estabilidade dos genes candidatos utilizando o programa RefFinder, que leva em consideração a variação dos valores de C<sub>q</sub> entre as diferentes amostras. Assim, quanto menor o valor do coeficiente, menor a variação de expressão do gene de referência entre as condições experimentais. Para uma análise mais apurada, foi considerada ainda a média geométrica dos valores de C<sub>q</sub> das diferentes combinações dos genes candidatos (VANDESOMPELE *et al.*, 2002).



Os valores de expressão relativa foram calculados com base nos valores de Cq dos genes de interesse em relação aos valores de Cq da referência ( $\Delta Cq = Cq$  do gene alvo subtraído do Cq da referência). Os níveis de expressão foram calculados pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando a expressão dos hemócitos do grupo *naïve* (camarões juvenis não manipulados) como condição calibradora. 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 comparação de médias de Tukey (*Statistica 7.0*).

Para a construção dos gráficos de expressão, foi utilizado o programa *GraphPad Prism 3* (*GraphPad Soft2007re, 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  $P < 0,05$ . As análises e a nomenclatura utilizadas neste trabalho foram baseadas nas recomendações do MIQE guidelines (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN *et al.*, 2009).



## 5. RESULTADOS

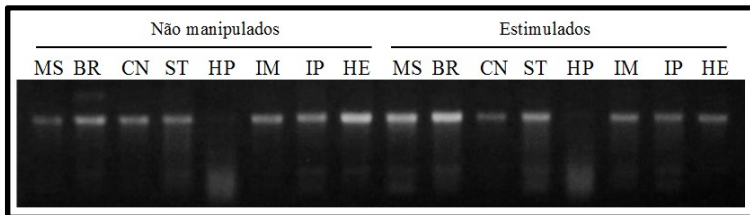
### 5.1. IDENTIFICAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA PARA UMA PROTEÍNA RELACIONADA AO FIBRINOGÊNIO (FREP) EM *Litopenaeus vannamei*

A sequência de nucleotídeos que codifica para a proteína relacionada ao fibrinogênio 1 do camarão *M. japonicus* (MjFREP1; GenBank: JN100568) foi utilizada como referência para a busca de sequências ortólogas do camarão *L. vannamei* publicamente acessíveis no banco de dados de sequências não anotadas EST (*Expressed sequence tags*) (GenBank). Foi encontrada uma sequência do gene codificante para uma FREP de *L. vannamei* (GenBank: FE071367) e para diferenciar das FREPs encontradas nos gastrópodes (que possuem na região N-terminal domínios IgSF) no presente estudo a FREP encontrada foi denominada como *LvFrep*.

### 5.2. DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DA EXPRESSÃO DE *LvFrep* EM CAMARÕES JUVENIS ESTIMULADOS OU NÃO POR *Vibrio harveyi*

A distribuição da expressão de *LvFrep* foi avaliada de forma semi-quantitativa (RT-PCR convencional) nos hemócitos e em sete tecidos (estômago, hepatopâncreas, intestino médio, intestino posterior, músculo, brânquias e cordão nervoso) de camarões estimulados ou não com bactérias *V. harveyi* ATCC 14126, inativadas por calor. Inicialmente, o perfil de migração de RNAs totais das diferentes amostras foi avaliado em gel de agarose (0,8%) (**Figura 8**). Foi possível visualizar bandas correspondentes aos diferentes tipos de RNA ribossomal. Embora as amostras tenham apresentado padrões distintos de migração e abundância dos diferentes tipos de RNA ribossomal (como exemplificado pelas amostras de hepatopâncreas), nenhum sinal evidente de degradação foi identificado.

**Figura 8:** Perfil de migração do RNA total das amostras (*pools* de 3 camarões) nos hemócitos e em diferentes tecidos das duas condições experimentais (animais não manipulados ou estimulados com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126 inativada por calor).

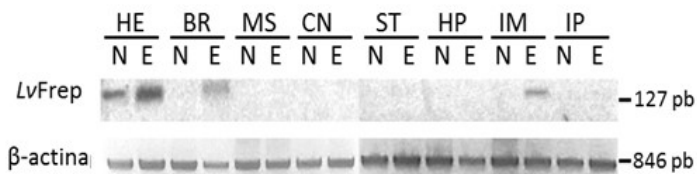


MS: Músculo, BR: Brânquias, CN: Cordão nervoso, ST: Estômago, HP: Hepatopâncreas, IM: Intestino médio, IP: Intestino posterior, HE: Hemócitos.

A amplificação de transcritos de  $\beta$ -actina mostrou-se estável em todas as amostras (**Figura 9**), validando assim as comparações de expressão tecidual do gene *LvFrep* entre os grupos experimentais (camarões estimulados ou não por bactérias inativadas).

Esse material foi, então, utilizado para as análises posteriores, de transcrição reversa, seguido de análise semi-quantitativa por PCR convencional (**Figura 9**). Os transcritos de *LvFrep* foram encontrados nos hemócitos de camarões *naïve*, sendo que o nível de expressão aumentou após 48 h do estímulo bacteriano (**Figura 9**). Baixos níveis de transcritos *LvFrep* foram identificados nas brânquias e no intestino, apenas em animais sob estímulo bacteriano (**Figura 9**).

**Figura 9:** Análise semi-quantitativa por RT-PCR dos níveis de transcritos de *LvFrep* em diferentes tecidos de camarões após 48 h do estímulo bacteriano.



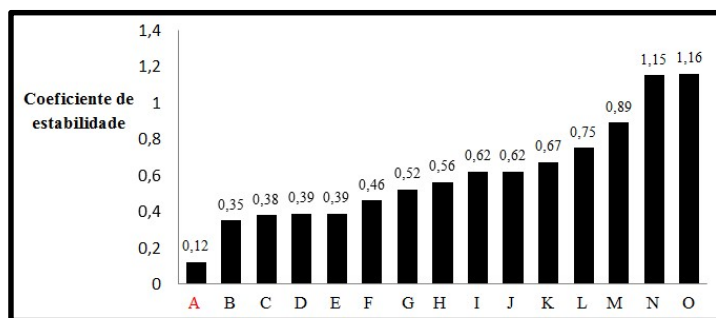
Animais estimulados com a bactéria *Vibrio harveyi* ATCC 14126 inativada por calor (E) e animais não manipulados (N). Plano superior: Níveis de transcritos *LvFrep* nos hemócitos (HE), Brânquias (BR), Músculo (MS), Cordão nervoso (CN), Estômago (ST), Hepatopâncreas (HP), Intestino médio (IM) e Intestino posterior (IP). Plano inferior: expressão do gene  $\beta$ -actina nos tecidos correspondentes.

### 5.3. PERFIL TRANSCRICIONAL DO GENE *LvFrep* EM CAMARÕES JUVENIS INFECTADOS COM *V. harveyi* OU WSSV

Os níveis de transcritos de *LvFrep* foram avaliados nos hemócitos 48 h após infecções experimentais dos camarões com a bactéria *V. harveyi* ATCC 14126 ou com o WSSV. A escolha do sítio de expressão de *LvFrep* foi avaliada apenas nos hemócitos, considerando os resultados das análises semi-quantitativas que revelou ser este o local de expressão em animais que não sofreram nenhum tipo de estímulo (camarões *naïve*).

Primeiramente, foi realizada a escolha da melhor referência para os cálculos de expressão relativa. Para isso, a expressão de quatro genes candidatos foi avaliada: a do Fator de alongação  $1\alpha$  (*LvEF-1 $\alpha$* ) e de três proteínas ribossomais (*LvL40*, *LvRpS6* e *LvRpS3A*). A análise para a escolha da melhor referência levou em consideração o coeficiente de estabilidade dos valores de Cq, calculado pelo programa RefFinder. A condição que apresentou a menor variação de expressão foi a média geométrica dos genes *LvEF-1 $\alpha$*  e *LvL40* (**Figura 10**).

**Figura 10:** Coeficiente de estabilidade dos genes candidatos à referência.

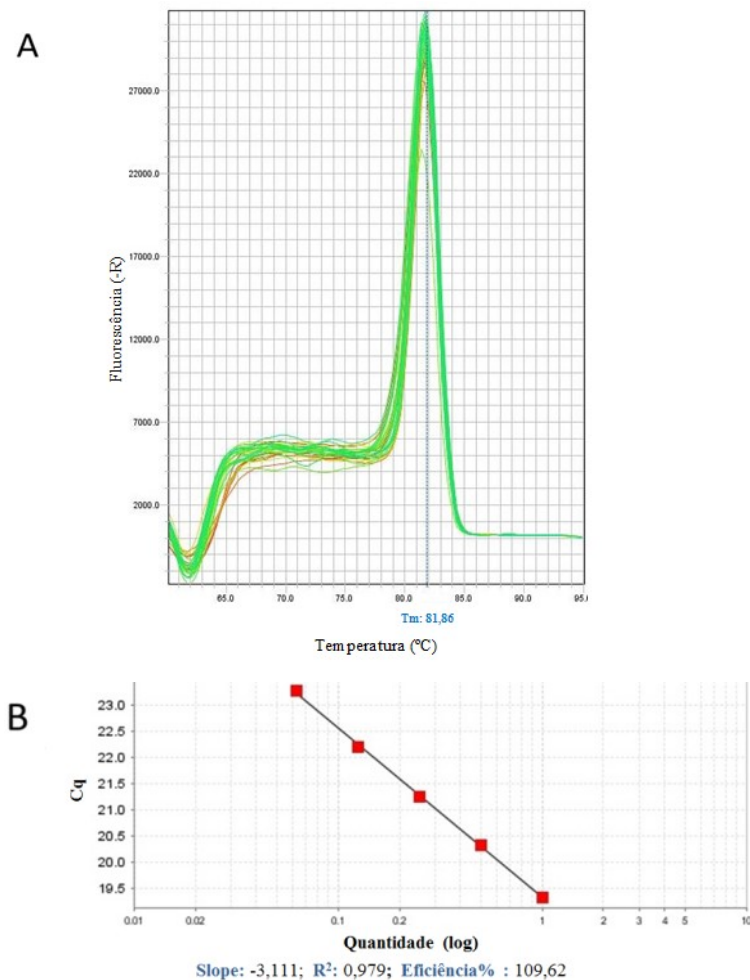


Genes de referência e suas combinações: (A) *LvEF-1 $\alpha$*  e *LvL40*; (B) *LvEF-1 $\alpha$* , *LvL40* e *LvRpS3A*; (C) *LvL40* e *LvRpS3A*; (D) *LvEF-1 $\alpha$* ; (E) *LvL40*; (F) *LvEF-1 $\alpha$* , *LvL40* e *LvRpS6*; (G) *LvEF-1 $\alpha$*  e *LvRpS3A*; (H) *LvEF-1 $\alpha$* , *LvRpS6* e *LvRpS3A*; (I) *LvL40*, *LvRpS6* e *LvRpS3A*; (J) *LvEF-1 $\alpha$* , *LvL40*, *LvRpS6* e *LvRpS3A*; (K) *LvEF-1 $\alpha$*  e *LvRpS6*; (L) *LvL40* e *LvRpS6*; (M) *LvRpS3A*; (N) *LvRpS6* e *LvRpS3A* e (O) *LvRpS6*.

Em seguida, foi avaliada a especificidade e a eficiência dos iniciadores específicos para a FREP de *L. vannamei*. A análise de curva de dissociação, mostrou que os iniciadores geraram um único pico (*LvFrep* Tm= 81,86°C), indicando a amplificação de uma única

sequência e confirmando a especificidade do par de iniciadores (**Figura 11A**). Os iniciadores utilizados para a amplificação de *LvFrep* apresentaram eficiência de 109,6% (**Figura 11B**).

**Figura 11:** Curvas de dissociação das reações de RT-qPCR e eficiência dos iniciadores utilizados para a amplificação de *LvFrep*.

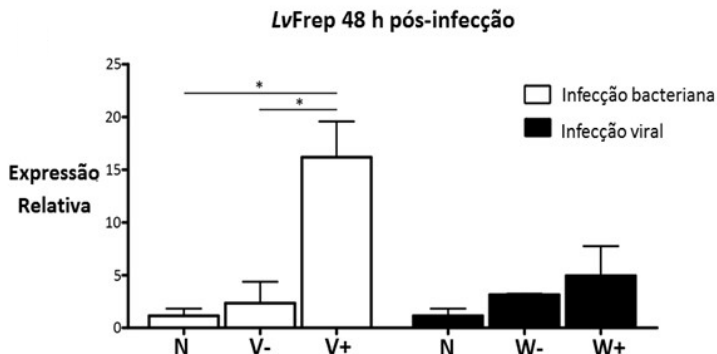


**A.** Perfil derivado da curva de dissociação dos produtos de RT-qPCR dos iniciadores utilizados para a amplificação dos transcritos de *LvFrep*. Tm: Temperatura de desnaturação (*melting*). **B.** Curva linear resultante da amplificação da sequência de interesse (*LvFrep*) utilizando-se diluições seriadas (curva padrão: 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128) de um *pool* de todos os cDNAs das amostras de hemócitos das infecções virais e bacterianas. A eficiência (%) dos pares de iniciadores foi calculada segundo a fórmula:  $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ .

Definidos esses parâmetros, partiu-se para as análises de expressão quantitativa de *LvFrep* em camarões após 48 h da infecção por *V. harveyi*, a fim de avaliar a resposta imune frente a uma infecção bacteriana e não apenas a um estímulo microbiano, como anteriormente avaliado (por expressão semi-quantitativa). Nos animais infectados com bactéria (V+), os níveis de expressão de *LvFrep* foram 7x superiores ao grupo controle injetado apenas com água do mar estéril (V-) ( $P<0,05$ ) e 14x superiores aos animais não manipulados (N) ( $P<0,05$ ) (**Figura 12**). Nenhuma diferença de expressão foi, contudo, observada entre os dois grupos controle (N×V-).

Em relação à infecção viral, não foram observadas diferenças nos níveis de expressão de *LvFrep* nos hemócitos de camarões 48 h após desafio com o WSSV (W+), quando comparados com animais injetados com inóculo livre do vírus (W-) ou com animais não manipulados (N) (**Figura 12**).

**Figura 12:** Perfil transcricional do gene *LvFrep* em camarões juvenis.



Análise do perfil transcricional de *LvFrep* por RT-qPCR nos hemócitos, 48 h após infecção experimental com *V. harveyi* ATCC 14126 (barras brancas) ou com WSSV (barras pretas). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas biológicas (3 *pools* de 5 animais por condição) e as diferenças estatísticas estão indicadas por asterisco (\*) ( $P<0,05$ ), obtidas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Tukey. N: grupo *naíve* (animais não manipulados); V-: animais injetados com água do mar estéril; V+: animais infectados com *Vibrio harveyi* ATCC 14126 ( $6 \times 10^7$  CFU/animal), W-: animais injetados com inóculo livre de WSSV; W+: animais infectados com WSSV ( $3 \times 10^2$  cópias genômicas/animal).

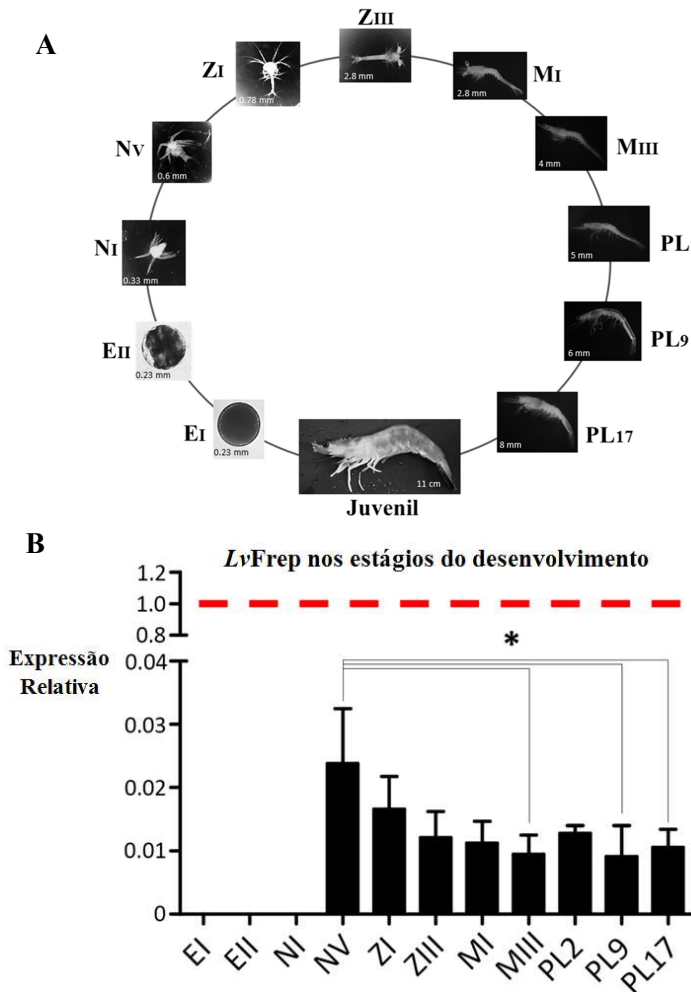


#### 5.4. PERFIL TRANSCRICIONAL DO GENE *LvFrep* AO LONGO DOS ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO DE *L. vannamei*

Os níveis de expressão gênica de *LvFrep* foram avaliados ao longo do desenvolvimento do camarão *L. vannamei*. Para isso, foram utilizadas doze amostras dos estágios do desenvolvimento, incluindo ovos, estágios larvais e pós-larvais (**Figura 13A**). Os genes de referência foram previamente escolhidos por Quispe (2016), segundo os critérios descritos no Item 4.8, sendo eles: *LvRpS6* (GenBank: FE080516) e  $\beta$ -actina (Genbank: AF300705), apresentados no **Quadro 1**.

Transcritos de *LvFrep* foram detectados em todos os estágios do desenvolvimento de *L. vannamei*, porém a quantificação da sua expressão só foi possível a partir do estágio de Náuplios V. Os níveis transcricionais de *LvFrep* foram significativos no estágio de Náuplios V em relação aos estágios de Misis III e PL9 e PL17. No entanto a maior quantidade de transcritos ocorreu nos hemócitos de camarões juvenis, sendo 95x superior aos camarões na fase de Pós-larvas (PL2, PL9 e PL17) ( $P < 0,05$ ) (**Figura 13B**).

**Figura 13:** Perfil transcricional do gene *LvFrep* expresso em diferentes estágios do desenvolvimento de *L. vannamei*.



**A.** Esquema ilustrativo dos estágios do desenvolvimento de *L.vannamei*. As amostras utilizadas no presente estudo foram: Ovos fertilizados de 0-4 h (**EI**) e de 7-11 h pós-desova (**EII**), Náuplios I e V (**NI** e **NV**), Protozoas I e III (**ZI** e **ZIII**), Misis I e III (**MI** e **MIII**) e Pós-larvas com idade de 2, 9 e 17 dias (**PL2**, **PL9** e **PL17**) e juvenis foram utilizados como calibradores para verificar a expressão de *LvFrep* em RT-qPCR (adaptado de QUISPE, 2016). **B.** Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão de triplicatas biológicas. As diferenças estatísticas estão indicadas por asterisco (\*) ( $P < 0,05$ ),

obtidas por análise de variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Tukey. As amostras de ovos fertilizados de 0-4 h (EI) e de 7-11 h pós-desova (EII) e Náuplios I (NI) apresentaram valores de C<sub>q</sub> fora do limite de quantificação, portanto não foram considerados. O pontilhado vermelho indica a expressão basal de *LvFrep* nos hemócitos de camarões juvenis utilizados como grupo calibrador.



## 6. DISCUSSÃO

A carcinicultura é um dos segmentos da aquicultura que mais tem crescido nos últimos anos, sendo responsável por milhões de empregos diretos e indiretos. Contudo, as doenças infecciosas são uma das maiores limitações para o sucesso dessa atividade e podem resultar em perdas econômicas catastróficas.

Como parte das primeiras reações de defesa dos crustáceos está o reconhecimento dos patógenos por receptores/proteínas de reconhecimento padrão (PRRs/PRPs) e moléculas de reconhecimento são extremamente importantes nesse processo inicial de defesa. Entre elas, destacam-se as proteínas relacionadas ao fibrinogênio ou FREPs (*Fibrinogen-related proteins*) identificadas nos invertebrados e que, em sua maioria, atuam como PRPs desempenhando papéis importantes na aglutinação microbiana, lise e *clearance* bacteriano e na defesa antiparasitária (GORDY *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2011).

No grupo dos invertebrados, moluscos e artrópodes são modelos animais utilizados em estudos sobre as FREPs, uma vez que estas moléculas atuam na defesa contra infecções bacterianas e/ou parasitárias. Contudo, no Filo dos Crustáceos ainda existem poucos estudos moleculares e funcionais das FREPs, especialmente nos crustáceos de interesse econômico, como os peneídeos.

No presente estudo um gene ortólogo ao gene codificante para uma FREP de *Marsupenaeus japonicus* (*MjFREP1*; GenBank: JN100568) foi identificado na espécie mais cultivada no mundo, *Litopenaeus vannamei* (*LvFrep*). As análises moleculares revelaram na região C-terminal a presença de um domínio relacionado com o fibrinogênio (FREd) (COELHO *et al.*, 2016), assim como ocorre nos genes *MjFREP1* e *MjFREP2* de *M. japonicus* (CHAI *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2014). Análises futuras para obter o sequenciamento completo de *LvFrep* poderão revelar se os outros domínios característicos das FREPs (IgSF e ICR) estão presentes ou não neste gene.

Sabe-se, contudo, que a maioria das FREPs de artrópodes não possuem o domínio das imunoglobulinas (IgSF) comumente encontrado nos gastrópodes (GORBUSHIN *et al.*, 2010). As regiões moleculares correspondentes aos domínios IgSF, ICR e FBG/FREd são passíveis de alterações/mutações que conduzem à formação de isoformas de FREPs. Isso lhes confere um alto grau de seletividade na sua capacidade de reconhecimento do patógeno, ampliando assim suas possibilidades de defesa (MONÉ *et al.*, 2010). No presente estudo, não foi possível avaliar a ocorrência de isoformas de FREP em *L. vannamei* decorrentes de

hipervariabilidade e análises posteriores se fazem necessárias para elucidar esta questão.

O gene *LvFrep* foi encontrando sendo constitutivamente expresso nos hemócitos de *L. vannamei*, tendo o nível de seus transcritos aumentado mediante um estímulo bacteriano, por *Vibrio harveyi* ATC14126 (48 h após o estímulo). Isso corrobora com o estudo descrito no mexilhão *Mytilus galloprovincialis*, no qual uma FREP foi expressa nos hemócitos e sua expressão gênica foi regulada positivamente após estímulo bacteriano *in vitro* utilizando um PAMP de bactérias Gram-negativas, LPS (ROMERO *et al.*, 2011). Contudo, no camarão *Penaeus monodon*, o gene *PmMIP* codificante para uma FREP inibidora de melanização, não foi expresso nos hemócitos, mas sim em vários outros tecidos (ANGTHONG *et al.*, 2010) em animais *naïve*. No entanto, quando os animais foram estimulados com a bactéria *V. harveyi* (morta por calor) detectou-se a presença da proteína *PmMIP* no plasma após 3, 6, 12, 48 e 72 h do desafio bacteriano (análise de *Western blot*) (ANGTHONG *et al.*, 2010).

Curiosamente, o gene *LvFrep* foi também detectado nas brânquias e no intestino médio de *L. vannamei* estimulados com *V. harveyi*, porém com níveis de expressão mais baixos. Ao contrário dos nossos achados, o *MjFREP1* do camarão *M. japonicus* apresentou níveis transcricionais baixos nos hemócitos e altos níveis nas brânquias, coração e hepatopâncreas. Após desafios dos animais com bactérias *Vibrio anguillarum* e *Staphylococcus aureus* ou com o WSSV, o nível transcricional do *MjFREP1* aumentou consideravelmente nas brânquias (CHAI *et al.*, 2012).

De maneira interessante, a sequência de aminoácidos deduzida de *LvFrep* apresentou 81% de identidade com *MjFREP1* de *M. japonicus*, sendo ainda semelhante a outras proteínas que contêm o domínio FREd, tais como as ficolinas (ZHANG *et al.*, 2014), tachylectinas (JU *et al.*, 2009) e o inibidor de melanização *PmMIP* (ANGTHONG *et al.*, 2010). Além disso, a sequência de *LvFrep* foi agrupada com outras sequências que possuem o domínio FREd (FREPs e proteínas relacionadas a ficolinas) em um clado bem definido de crustáceos (COELHO *et al.*, 2016).

Esse fato é curioso, pois a maior identidade do gene *LvFrep* (expresso majoritariamente nos hemócitos) foi encontrado com *MjFREP1* de *M. japonicus*, que é majoritariamente expresso nas brânquias e não nos hemócitos. Deve-se considerar, que Chai e colaboradores (2012) não utilizaram uma técnica (ex. hibridização *in situ*) para avaliar se a expressão *MjFREP1* nas brânquias não era

decorrente de infiltração hemocitária ou realmente tecido específica.

Sabe-se que o sistema circulatório dos crustáceos é aberto ou semiaberto, o que permite que a hemolinfa irrigue toda a cavidade corpórea do animal e que os hemócitos migrem aos locais da infecção (infiltração). Considerando esse fato, a expressão do gene *LvFrep* encontrado nas brânquias e no intestino médio de *L. vannamei* (estimulados com bactéria), pode ser decorrente de infiltração hemocitária. O fenômeno de infiltração hemocitária é bastante comum nos crustáceos (MUÑOZ *et al.*, 2002).

Outra hipótese seria a ocorrência de uma população hemocitária residente nestes tecidos. Um desafio bacteriano poderia “alertar” os hemócitos *residentes* nas brânquias e intestino médio, aumentando a expressão de genes envolvidos no reconhecimento e defesa antimicrobiana, como é o caso das FREPs. Brânquias e intestino representam locais estratégicos para a entrada dos microrganismos no hospedeiro. As brânquias estão em contato direto com a água que é rica em microrganismos, e o intestino médio é um tecido-alvo para infecções via oral, uma vez que é desprovido de um revestimento espesso de quitina que dificultaria a passagem dos microrganismos para a hemocele.

Uma terceira hipótese ainda seria a presença de FREPs em outros tecidos do camarão, que não sejam os hemócitos. Sabe-se que as FREPs de invertebrados compreendem uma grande e diversa família gênica com ampla distribuição de expressão tecidual (CHAI *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2014; WANG; ZHAO, 2005; YANG, *et al.*, 2014). Para esclarecer todas estas questões, estudos futuros utilizando hibridização *in situ* e análises citoquímicas/bioquímicas se fazem necessários para determinar a especificidade do sítio de expressão e a origem dos hemócitos presentes nas brânquias e no intestino médio (hemolinfa ou tecido-residentes).

A infecção experimental de *L. vannamei* com dois agentes patogênicos, a bactéria marinha Gram-negativa, *V. harveyi* (infectante) ou com o vírus WSSV, revelou que a expressão de *LvFrep* nos hemócitos foi induzida após 48 h, em resposta somente à infecção bacteriana e não à infecção viral.

Em outros estudos com bactérias, como no caso do gene que codifica para uma FREP no mexilhão *M. galloprovincialis* (*MuFREP*), altos níveis transcricionais foram observados nos hemócitos 24 h após desafio com a bactéria Gram-negativa *V. anguillarum* e com a bactéria Gram-positiva *Micrococcus lysodeikticus* (ROMERO *et al.*, 2011). Também no camarão *M. japonicus* desafiados com *V. anguillarum* os

maiores níveis transcricionais de *MjFREP2* foram encontrados nos hemócitos 24 h após o desafio, com uma queda destes níveis nas 48 h (SUN, *et al.*, 2014). Esses achados em conjunto sugerem que a indução por *V. harveyi* no presente estudo poderia ter sido aumentada se analisada no tempo de 24 h, indicando que 48 h tenha sido demasiadamente tarde para se registrar uma maior modulação na expressão do gene *LvFrep*.

Dentre os estudos sobre a participação na defesa antimicrobiana das FREPs de moluscos, artrópodes e crustáceos a grande maioria deles avaliam desafios dos animais com bactérias, e poucos com os vírus. No caso dos camarões, apenas estão disponíveis os relatos com o camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* (ZHANG *et al.*, 2014) e com o peneídeo *M. japonicus* (CHAI *et al.*, 2012), dificultando assim uma discussão mais aprofundada para os achados em nosso estudo. Em *M. japonicus*, a expressão do *MjFREP1* obteve uma indução apenas no início do desafio viral (2 horas), sendo observada uma queda nos níveis transcricionais 24 h pós-desafio. Além disso, análises *in vitro* demonstraram que a proteína recombinante de *MjFREP1* é capaz de se ligar a proteína do envelope do WSSV, a VP28 (CHAI *et al.*, 2012).

No dulcícola *Macrobrachium rosenbergii* infectados com WSSV, o nível transcricional das FREPs (*MrFico1* e *MrFico2*) foi regulado positivamente no hepatopâncreas 12 h após o desafio viral, observando-se uma queda nos níveis de transcritos 24 h após o desafio (ZHANG *et al.*, 2014). Com base nesses achados, pode-se sugerir que a falta de indução na expressão de *LvFrep* pela infecção com WSSV, possa ser decorrente de uma resposta temporal frente a infecções virais, indicando que 48 h tenha sido demasiadamente tarde para se registrar uma modulação significativa na expressão do gene *LvFrep*.

Pela primeira vez foi detectada uma FREP hemocitária no camarão *L. vannamei*. Um resultado interessante é que não registrou-se nenhuma mudança nos níveis de transcritos de *LvFrep* nos juvenis de *L. vannamei* do experimento controle, que foram injetados com água do mar estéril. Este achado indica que a expressão do gene *LvFrep* foi especificamente modulada por padrões moleculares bacterianos e não pela injúria causada no animal, sugerindo ainda que a proteína codificada pelo *LvFrep* deva participar na defesa contra bactérias Gram-negativas, como as vibriônicas.

As FREPs dos invertebrados são importantes proteínas de reconhecimento microbiano, atuando na defesa antimicrobiana a partir da sua ligação com os lipopolissacarídeos da superfície de bactérias Gram-negativas, peptidoglicanos e ácido lipoteicóico da parede de



bactérias Gram-positivas e às  $\beta$ -glicanas da parede de fungos (CHAI *et al.*, 2012; SUN, *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2014). Em *M. japonicus*, por exemplo, a proteína recombinante de *MjFREP1* é capaz de ligar-se fortemente a peptidoglicanos e lipopolissacarídeos, enquanto que a proteína recombinante de *MjFREP2* liga-se tanto a peptidoglicanos, como a ácidos lipoteicóicos e lipopolissacarídeos (CHAI *et al.*, 2012; SUN, *et al.*, 2014). Prover o repertório de respostas moleculares associadas às infecções microbianas é essencial para se desenvolver estratégias que previnam a mortalidade nos cultivos de camarão.

Finalmente, a expressão do gene *LvFrep* foi avaliada em doze estágios do desenvolvimento de *L. vannamei*, compreendendo ovos fertilizados, estágios larvais (Náuplios, Protozoas e Misis) e estágios pós-larvais. Transcritos de *LvFrep* foram detectados em todos os estágios do desenvolvimento do camarão, mas sua expressão só foi quantificável a partir do estágio de Náuplios V. Além disso, os maiores níveis de transcritos foram encontrados nos hemócitos de camarões juvenis. Uma expressão gênica tão precoce no desenvolvimento de *L. vannamei* (desde ovos fertilizados) poderia sugerir a participação da FREP na defesa antimicrobiana das larvas e pós-larvas deste peneídeo, em um momento em que o sistema imunológico está em desenvolvimento e, carecendo, portanto, de respostas protetoras mais potentes contra os agentes patogênicos. Contudo, essa hipótese só poderia ser comprovada mediante análises bioquímicas que demonstrassem a presença do produto gênico funcional (proteína), uma vez que a transcrição gênica não é necessariamente acompanhada pela imediata síntese da proteína correspondente (PERAZZOLO *et al.*, 1999).

A presença de transcritos de FREPs em fases iniciais do desenvolvimento já foi demonstrada em outro peneídeo e em gastrópodes. *PmMIP* de *P.monodon* foi detectado sendo expresso em todas as fases do seu desenvolvimento larval, desde ovos fertilizados até pós-larvas com idade de 9 dias (PL9) (ANGTHONG *et al.*, 2010). No gastrópode *B. glabrata*, os genes *BgFREPs* foram expressos em diferentes estágios do desenvolvimento do caracol (ZHANG *et al.*, 2008).

Nos peneídeos, alguns estudos tem demonstrado que as proteínas que contém o domínio FRED estão implicadas em muitas respostas imunológicas, tais como o reconhecimento microbiano e a aglutinação, a regulação da melanização induzida por fenoloxidase e nas defesas antivirais (WANG; WANG, 2013b). Sendo assim, estudos mais aprofundados são necessários para elucidar a função da grande família

gênica de FREPs e estabelecer a relação funcional entre eles. Isso poderá auxiliar na compreensão do papel dessas moléculas na imunidade dos crustáceos e se elas atuam no reconhecimento e na defesa antimicrobiana, a exemplo das FREPs dos gastrópodes e insetos.

Em conclusão, no presente estudo foi identificado um novo gene FREP em *L. vannamei* (*LvFrep*), cuja expressão foi detectada muito precocemente no desenvolvimento deste camarão, já em ovos fertilizados, se estendendo a todas as fases larvais e pós-larvais. Em camarões juvenis, a expressão de *LvFrep* foi constitutiva e majoritária nos hemócitos, podendo ser induzida 48 h após uma infecção bacteriana (*V. harveyi*), mas não frente a uma infecção viral (WSSV), sugerindo uma participação antibacteriana para a FREP de *L. vannamei*. Estes resultados representam o primeiro relato da expressão de uma FREP ao longo do desenvolvimento da espécie de peneídeo mais cultivada no mundo, *L. vannamei*, e apontam para uma potencial função das FREPs na defesa antibacteriana dos crustáceos. Estudos de genômica funcional, utilizando a técnica de RNA de interferência poderão, em futuro próximo, esclarecer o papel das FREPs na imunidade dos crustáceos de interesse econômico.

## 7. CONCLUSÕES

- Foi identificado um gene que codifica para uma FREP no camarão *L. vannamei*;
- Transcritos *LvFrep* são majoritários e com expressão constitutiva nos hemócitos circulantes;
- A expressão de *LvFrep* foi induzida em resposta à infecção por *Vibrio harveyi*, mas não ao WSSV;
- A expressão de *LvFrep* foi detectada em todas as fases do desenvolvimento de *L. vannamei* (ovos fertilizados – PLs).

## 8. PERSPECTIVAS

- Realizar hibridização *in situ* para determinar a especificidade do sítio de expressão;
- Sintetizar, em sistema recombinante, a proteína *LvFrep* e avaliar suas atividades antimicrobianas *in vitro*;
- Realizar o silenciamento pós-transcricional de *LvFrep* em camarões e avaliar suas funções biológicas *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- ABCC – Associação Brasileira de Criadores de Camarão. BORBA, M.; NOGUEIRA, J. Carcinicultura Brasileira: o perfil do setor em cada unidade federativa produtora em 2011. **Revista da ABCC**, ano XV, n. 2, p. 26-29, jun. 2013.
- ADEMA, C. M. et al. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by na invertebrate after infection, **Proceedings of the National Academy of Sciences**. U. S. A. v. 94, p. 8691-8696, Aug. 1997.
- ANGTHONG, P. et al. Cloning and characterization of a melanization inhibition protein (*PmMIP*) of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, n. 3, p.464-468, set. 2010.
- ARMITAGE, S. A.O. et al. Dscam and pancrustacean immune memory – A review of the evidence. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 48, n. 2, p.315-323, fev. 2015.
- BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Avances en la Inmunología del Camarón. In: Morales V, Cuéllar-Anjel J (Org.) Guía Práctica - Patología e Inmología de Camarones Penaeidos. 2 ed. Panamá: **OIRSA**, p. 237-304. 2014.
- BUCKLEY, K. M.; RAST, J. P. Dynamic Evolution of Toll-Like Receptor Multigene Families in Echinoderms. **Frontiers Immunology**, v. 3, 2012.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- CADORET, J. P. et al. Transient expression assays with the proximal promoter of a newly characterized actin gene from the oyster *Crassostrea gigas*. **FEBS Letters**, v. 460, p. 81-85, 1999.
- CERENIUS, L.; SODERHALL, K. Variable immune molecules in invertebrates. **Journal Of Experimental Biology**, v. 216, n. 23, p.4313-4319, 20 nov. 2013.

CHAI, Y. M. et al. A novel protein with a fibrinogen-like domain involved in the innate immune response of *Marsupenaeus japonicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 32, n. 2, p.307-315, fev. 2012.

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.

COSTA, S.W. et al. Caracterização do cultivo de camarões no Sul do Brasil. Em: Simposio Brasileiro de Aquicultura, 11, Florianópolis. Anais. Florianópolis: ABRAq (CD Room). Florianópolis. 2000.

DALL, W. et al. The biology of Penaeidae. **Advances in Marine Biology**, v. 27, p. 1-484, 1990.

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

DHEILLY, N. M. et al. A family of variable immunoglobulin and lectin domain containing molecules in the snail *Biomphalaria glabrata*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 48, n. 1, p.234-243, jan. 2015.

DONG, Y.; DIMOPOULOS, G. *Anopheles* Fibrinogen-related Proteins Provide Expanded Pattern Recognition Capacity against Bacteria and Malaria Parasites. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 284, n. 15, p.9835-9844, 4 fev. 2009.

ESCH, G. W. The Transmission of Digenetic Trematodes: Style, Elegance, Complexity. **Integrative And Comparative Biology**, v. 42, n. 2, p.304-312, 1 abr. 2002.

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

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Opportunities and challenges, 2014.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Fishery and Aquaculture Statistics**. 2014/FAO annuaire, 2016.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific**, 2004.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Fisheries and aquaculture report n° 1053. **FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304)**, 2013.

FLEGEL, T.W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n.2, p. 166-173, 2012.

GHOSH, J. et al. Invertebrate immune diversity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 9, p.959-974, set. 2011.

GONCALVES, P. et al. Molecular signatures at imminent death: Hemocyte gene expression profiling of shrimp succumbing to viral and fungal infections. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 42, n. 2, p. 294–301, 2014.

GORBUSHIN, A.M.; PANCHIN, Y.V.; IAKOVLEVA, N.V. In search of the origin of FREPs: Characterization of *Aplysia californica* fibrinogen-related proteins. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 34, n. 4, p.465-473, abr. 2010.

GORDY, M. A.; PILA, E. A.; HANINGTON, P. C. The role of fibrinogen-related proteins in the gastropod immune response. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 46, n. 1, p.39-49, set. 2015.

HAN, J. E. et al. QPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to

pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquaculture**, v. 442, p.12-15, maio 2015b.

HAN, J. E. et al. *Phototrhabdus* insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. **Diseases Of Aquatic Organisms**, v. 113, n. 1, p.33-40, 10 fev. 2015a.

HANINGTON, P.C.; ZHANG, S. M. The Primary Role of Fibrinogen-Related Proteins in Invertebrates Is Defense, Not Coagulation. **Journal of Innate Immunity**, v. 3, n. 1, p.17-27, 2011.

HUANG, B. et al. Highly diverse fibrinogen-related proteins in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 43, n. 2, p.485-490, abr. 2015.

HUMPHRIES, J. E.; YOSHINO, T. P. Regulation of hydrogen peroxide release in circulating hemocytes of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 32, n. 5, p.554-562, jan. 2008.

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.

JU, L. et al. Identification, expression and antibacterial activity of a tachylectin-related homolog in amphioxus *Branchiostoma belcheri* with implications for involvement of the digestive system in acute phase response. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 26, n. 2, p.235-242, fev. 2009.

KONDO, H. et al. Draft Genome Sequences of Six Strains of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Early Mortality Syndrome/Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Shrimp in Thailand. **Genome Announcements**, v. 2, n. 2, p 14, 10 abr. 2014.

KOU, G. H. et al. Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. In Flegel TW (ed) Advances in shrimp biotechnology. **National Center for Genetic Engineering and Biotechnology**, Bangkok, p. 267-271. 1998.

LAKHTIN, V.; LAKHTIN, M.; ALYOSHKIN, V. Lectins of living organisms. The overview. **Anaerobe**, v. 17, n. 6, p. 452–455, 2011.

LIGHTNER, D. V. et al. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 174–183, jun. 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, CA)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

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.

MCGREAL, E. P.; MARTINEZ-POMARES, L.; GORDON, S. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. **Molecular Immunology**, v. 41, n. 11, p.1109-1121, nov. 2004.

MONÉ, Y. et al. A Large Repertoire of Parasite Epitopes Matched by a Large Repertoire of Host Immune Receptors in an Invertebrate Host/Parasite Model. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, p.813, 7 set. 2010.

MORALES-COVARRUBIAS, M. S.; GOMEZ-GIL, B. Enfermedades bacterianas de camarones. In: Morales V, Cuéllar-Anjel J (Org.) Guía Práctica - Patología e Inmología de Camarones Penaeidos. 2 ed. Panamá: **OIRSA**, p. 166 – 196, 2014.

MUHAMMAD, F. et al. Ontogenesis of digestive system in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Crustacea: Decapoda). **Italian Journal of Zoology**, v. 79, n.1, p. 77-85, 2012.

MUÑOZ, M. et al. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 11, p. 2678–2689, 2002.

NETEA, M. G. et al. Innate immune memory: a paradigm shift in understanding host defense. **Nature Immunology**, v. 16, n. 7, p.675-679, 18 jun. 2015.

NETEA, M. G.; QUINTIN, J.; VAN DER MEER, J. W. M. Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. **Cell Host & Microbe**, v. 9, n. 5, p.355-361, maio 2011.

O POVO ONLINE. **Doença da mancha branca, que afeta camarões, se instala no Ceará.** Elaborado por Luana Severo. Disponível em: <<http://www.opovo.com.br/app/opovo/cotidiano/2016/08/03/noticias/jornalcotidiano,3642856/doenca-da-mancha-branca-que-afeta-camaroes-se-instala-no-ceara.shtml>>. Publicado em: 03 ago. 2016.

PANTOJA, C. R.; LIGHTNER, D. Enfermedades virales del camarón. In: Morales V, Cuéllar-Anjel J (Org.) Guía Práctica - Patología e Inmología de Camarones Penacidos. 2 ed. Panamá: **OIRSA**, p. 99 – 166, 2014.

PERAZZOLO, L. M. et al. Expression and Localization of Messenger Ribonucleic Acid for the Vitellogenin Receptor in Ovarian Follicles Throughout Oogenesis in the Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Biology Of Reproduction**, v. 60, p.1057-1068, 1999.

QUISPE, Ruth L. et al. Transcriptional profiling of immune-related genes in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during ontogenesis. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 58, p.103-107, nov. 2016.

ROMERO, Alejandro et al. Individual sequence variability and functional activities of fibrinogen-related proteins (FREPs) in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) suggest ancient and complex immune recognition models in invertebrates. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 3, p.334-344, mar. 2011.

SCHRYVER, P.; DEFOIRD, T.; SORGELOOS, P. Early Mortality Syndrome Outbreaks: A Microbial Management Issue in Shrimp Farming?. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 4. 2014.

SILVEIRA, A. S. **Avaliação do perfil transcricional de genes potencialmente envolvidos na imunidade intestinal do camarão**



*Litopenaeus vannamei*. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

SÖDERHÄLL, I. et al. A Novel Protein Acts as a Negative Regulator of Prophenoloxidase Activation and Melanization in the Freshwater Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 284, n. 10, p.6301-6310, 7 jan. 2009.

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, p. 19-28, 2010.

SUN, J. J. et al. A fibrinogen-related protein (FREP) is involved in the antibacterial immunity of *Marsupenaeus japonicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 39, n. 2, p.296-304, ago. 2014.

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.

TRAN, L. et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 105, n. 1, p. 45-55, 2013.

TREECE, G. D.; FOX, J. M. Desing, operation and training manual for intensice culture shrimp hatchery (with emphasis on *Peneus monodon* and *Penaeus vannamei*). **Texas A. and M. University**, 1993.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, 18 jun. 2002.

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, 2012.

WANG, X. W.; WANG, J. X. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 39, p.27-38, jan. 2013b.

WANG, X. W.; WANG, J. X. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 4, p.981-989, abr. 2013a.

WANG, X.; ZHAO, Q.; CHRISTENSEN, B. M. Identification and characterization of the fibrinogen-like domain of fibrinogen-related proteins in the mosquito, *Anopheles gambiae*, and the fruitfly, *Drosophila melanogaster*, genomes. **BioMed central Genomics**, v. 6, n. 1, p.114, 2005.

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.

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.

WU, C.; SÖDERHÄLL, K.; SÖDERHÄLL, I. Two novel ficolin-like proteins act as pattern recognition receptors for invading pathogens in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Proteomics**, v. 11, n. 11, p.2249-2264, 20 maio 2011.

YANG, C. C. et al. Immune gene expression for diverse haemocytes derived from pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shell Fish Immunology**, v. 44, p. 265-271. 2015.

YANG, Y.T. et al. Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. **Genome Announcements**, v. 2, n. 5, 2014.

ZHANG, S.M. et al. Parasite-responsive IgSF members in the snail *Biomphalaria glabrata*: characterization of novel genes with tandemly arranged IgSF domains and a fibrinogen domain. **Immunogenetics**, v. 53, n. 8, p.684-694, 1 out. 2001.

ZHANG, S.M.; ADEMA, C. M.; KEPLER T. B. Diversification of Ig Superfamily Genes in an Invertebrate. **Science**, v. 305, n. 5681, p.251-254, 9 jul. 2004.

ZHANG, S.M.; LOKER, E. S. Representation of an immune responsive gene family encoding fibrinogen-related proteins in the freshwater mollusc *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. **Gene**, v. 341, p.255-266, out. 2004.

ZHANG, S-M. et al. Fibrinogen-bearing protein genes in the snail *Biomphalaria glabrata*: Characterization of two novel genes and expression studies during ontogenesis and trematode infection. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 32, n. 10, p.1119-1130, jan. 2008.

ZHANG, X. W. et al. Cloning and characterization of two different ficolins from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 44, n. 2, p.359-369, jun. 2014.

ZORRIEHZAHRA, M. J.; BANAEDERAKHSHAN, R. Early mortality syndrome (EMS) as new emerging threat in shrimp industry. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 3, n. 2, p. 64–72, 2015.

## ANEXO A – Artigo científico

Fish & Shellfish Immunology 56 (2016) 123–126



Contents lists available at ScienceDirect

Fish & Shellfish Immunology

Journal homepage: [www.elsevier.com/locate/fsi](http://www.elsevier.com/locate/fsi)



Short communication

A hemocyte-expressed fibrinogen-related protein gene (*LvFrep*) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Expression analysis after microbial infection and during larval development



Jaqueline da Rosa Coelho, Cairé Barreto, Amanda da Silva Silveira, Graziela Cleusa Vieira, Rafael Diego Rosa, Luciane Maria Perazzolo\*

Laboratory of Immunology Applied to Aquaculture, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.046>