

Karla Oliveira Ortiz

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA UBIQUITINA E
ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DO GENE QUE A CODIFICA NO CAMARÃO
Litopenaeus vannamei (Boone, 1931) CULTIVADO EM BIOFLOCOS E ÁGUA CLARA**

Trabalho Conclusão do Curso submetido ao Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Risoleta Freire Marques

Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme Razzera

Florianópolis

2017

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

Oliveira Ortiz, Karla

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA UBIQUITINA E ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DO GENE QUE A CODIFICA NO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) CULTIVADO EM BIOFLOCOS E ÁGUA CLARA / Karla Oliveira Ortiz ; orientadora, Maria Risoleta Freire Marques, coorientador, Guilherme Razzera, 2017.

60 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. *Litopenaeus vannamei*. 3. Ubiquitina. 4. WSSV. 5. *Vibrio alginolyticus*. I. Risoleta Freire Marques, Maria . II. Razzera, Guilherme . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Karla Oliveira Ortiz

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANADA UBIQUITINAE
ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DO GENE QUE A CODIFICA NO CAMARÃO
Litopenaeus vannamei(Boone, 1931) CULTIVADO EM BIOFLOCOS E ÁGUA
CLARA**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do grau de Licenciada em Ciência Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Centro de Ciências Biológicas.

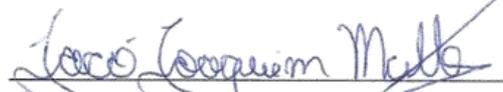
Florianópolis, 13 de dezembro de 2017.

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti
Co-ordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Maria Risoleta Freire Marques
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina


Dr.^a Juliana Righetto Moser
Universidade Federal de Santa Catarina


M. Sc. Jacó Joaquim Mattos
Universidade Federal de Santa Catarina

Bióloga Laura Freitas Saraiva de Oliveira
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Severiano Ribeiro Ortiz e Marinalva Oliveira Ortiz, por me ajudarem para a minha permanência durante esses anos na UFSC. Também aos manos das quebradas de SCS, minhas irmãs, pelo companheirismo tanto no momento de tristeza e felicidade.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Maria Risoleta Freire Marques por me aceitar como bolsista de iniciação científica e me ajudar a trilhar esse caminho; aprendi muito com ela nesses anos, tanto no âmbito profissional e pessoal.

Ao meu co-orientador Prof.^o Dr.^o Guilherme Razzera pelo profissionalismo e paciência.

Ao Tomás Pessatti, Juliana Tisca e Vera Helena Vidal Dias pelos conselhos, momentos de descontração e conversas animadas durante o nosso cafezinho diário.

A equipe do LABCAI pelo aprimoramento de aprendizagem em especial a Laura Freitas S. de Oliveira, Gabriel Matos, Luiz Otávio de Barros, Lucas Takinamani, Mateus Alencar, Gabrielle Müller, Talita Miguelão.

A Juliana Moser pelos primeiros ensinamentos básicos de laboratório. A Cecília Souza por me ajudar na realização desse trabalho, pelo companheirismo, confiança e amizade.

Aos meus amigos de graduação Karina Vieira, Cleide dos Santos e Aline Passamai Della, Aruana Hansel, Beatriz dos Santos, Matheus Reck e Samara Menezes pelo companheirismo durante esses anos. Ao meu namorado Jean Marcon por me acompanhar e apoiar no meu processo de evolução profissional.

A Universidade Federal Santa Catarina por oferecer a oportunidade de realizar o curso. A todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para minha formação no curso de Ciências Biológicas.

*Vigie seus pensamentos, eles tornam-se palavras.
Vigie suas palavras, elas tornam-se ações.
Vigie suas ações, elas tornam-se hábitos.
Vigie seus hábitos, eles formam seu caráter.
Vigie seu caráter, ele se torna seu destino.*

(Frank Outlaw)

RESUMO

Ao longo dos anos, a carcinicultura tem ampliado seu espaço no mercado mundial. Uma das espécies de camarão mais produzidas mundialmente é o camarão-branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*. Na última década, o Brasil e outros países produtores tiveram um grande desenvolvimento na produção dessa espécie de camarão. Em contrapartida, a carcinicultura tem sido afetada por enfermidades, as quais têm impactado negativamente a atividade. A doença causada pelo Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) tem causado alta mortalidade nos cultivos e, conseqüentemente, os maiores prejuízos econômicos em nível mundial. Além disso, outras enfermidades podem afetar os cultivos, como as vibrioses, desencadeadas por diferentes bactérias do gênero *Vibrio*. Fatores associados às condições de cultivo e manejo podem influenciar de forma positiva ou negativa a resposta imunológica dos camarões frente a um agente patogênico. Estudos recentes indicam que a proteína ubiquitina pode exercer atividade antimicrobiana e antiviral, participando, assim, das respostas de defesa dos invertebrados. Neste trabalho, a atividade antimicrobiana da ubiquitina de *L. vannamei* foi avaliada em ensaios *in vitro* frente a *Vibrio alginolyticus*. A análise comparativa da transcrição diferencial do gene que a codifica (*UBQ*) foi realizada em brânquias de camarões cultivados em Sistema Bioflocos (SBF) e em Sistema Tradicional Água Clara (SAC), antes e após a infecção experimental com o WSSV. As análises comparativas do nível dos transcritos foram realizadas por meio da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real quantitativa (*qPCR*). Os níveis de transcrição do *UBQ* nas brânquias dos camarões mantidos em SAC não apresentaram diferença estatística significativa entre os animais infectados e os não infectados com WSSV. Entretanto, os animais mantidos em SBF, e infectados experimentalmente com o WSSV, apresentaram nível de transcritos estatisticamente significativo ($p < 0,05$), tanto em relação ao grupo pré - infecção, quanto ao grupo pós-infecção. Pode-se considerar que durante o período de aclimação, os camarões mantidos em SAC não estiveram submetidos aos mesmos fatores presentes no SBF, o que poderia ter influenciado a resposta molecular contra o vírus WSSV durante a infecção. Esta consideração poderia estar refletida na ausência de transcrição diferencial do *UBQ* nos animais mantidos em SAC. A ubiquitina heteróloga purificada (*LvUBQr*) mostrou atividade antimicrobiana frente a *V. alginolyticus in vitro* compatível com aquela da lisozima nas mesmas condições. A *LvUBQr* inibiu parcialmente o crescimento dessa bactéria na concentração igual a 3,3 µg/mL. Esses resultados podem estar potencialmente associados a características da região C-terminal da *LvUBQ*, os quais, associados à transcrição diferencial do gene que a codifica frente a infecção pelo WSSV, fornecem subsídios relacionados ao envolvimento dessa proteína na resposta de defesa de *L. vannamei* contra patógenos.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*; Ubiquitina; WSSV; *Vibrio alginolyticus*.

ABSTRACT

Over the years shrimp farming has gained space in the world market. One of the most widely cultivated shrimp species in the world is the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. In the last decade, Brazil and other countries had experienced a great development in the production of this shrimp species. Nonetheless, shrimp farming has been continuously suffering from damages caused by diseases, which negatively interfere in farming success. The disease caused by the White Spot Syndrome Virus (WSSV) is associated with high mortality rates, which has caused great economic impacts to shrimp farming worldwide. In addition, vibrioses represent another disease that has been further impacting shrimp farming, being triggered by different bacteria of the genus *Vibrio*. Furthermore, different factors associated to farming and husbandry conditions may influence, in a positive or negative manner, shrimp immune response towards a pathogenic agent. Recent studies indicate that ubiquitin may display antimicrobial and antiviral activity, therefore, actively participating in invertebrate defense responses. In the present work, the antimicrobial activity of *L.vannamei* ubiquitin (*LvUBQ*) has been assayed *in vitro* towards *Vibrio alginolyticus*. Moreover, a comparative analysis of the transcriptional profile of the gene encoding (*UBQ*) has been performed in gill of shrimp kept in biofloc (SBF) and clear sea water (SAC), before and after WSSV challenge. The comparative transcriptional analyses were achieved through quantitative real time PCR (*qPCR*). *UBQ* transcriptional levels in gills of shrimp kept in SAC showed no statistical difference between WSSV infected and non-infected groups. However, shrimp kept in SBF and infected with WSSV displayed differences in *UBQ* transcription levels ($p < 0,05$), in comparison to both control and pre-infected groups. One could consider that since shrimp kept in SAC during the acclimation period were not submitted to the same factors present in SBF, this might have influenced their molecular responses upon WSSV infection. This consideration could be reflected in the absence of differential transcription of *UBQ* in shrimp kept in SAC. Recombinant *LvUBQr* showed antimicrobial activity towards *V.alginolyticus in vitro* which was compatible to that displayed by lysozyme under the same conditions. *LvUBQr* partially inhibited the growing of *V.alginolyticus* under the concentration of 3,3 µg/mL. These results may potentially be associated to molecular characteristics of the *LvUBQ* C-terminal region. These findings, associated to the *UBQ* differential transcription upon WSSV infection, provide clues to the enrollment of *LvUBQ* in the defense responses of *L.vannmei* towards pathogens.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*; Ubiquitin; WSSV; *Vibrio alginolyticus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Espécimes de <i>L. vannamei</i> , camarão-branco do Pacífico.	15
Figura 2. Morfologia do vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV). A- Representação das estruturas do WSSV: envelope, nucleocapsídeo e o apêndice na sua extremidade. B- Microscopia eletrônica do WSSV. As setas pretas indicam os apêndices. Barra = 250 nm. ...	17
Figura 3. Camarão, <i>Litopenaeus vannamei</i> , com inclusões brancas na cutícula, observação associada com a Síndrome da Mancha Branca.	18
Figura 4. <i>Vibrio cholerae</i> ao microscópio eletrônico de varredura. Barra = 1 µm.	20
Figura 5. Representação da estrutura da ubiquitina de <i>L. vannamei</i> , sendo destaca a porção C-terminal. A. Representação total da estrutura com ênfase na porção C-terminal. B. Porção C-terminal ampliado. As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos diferentes estão em azul, enquanto as iguais estão mostradas em amarelo.	23
Figura 6. Processo de degradação de proteína, através da ubiquitinação.	24
Figura 7. Representação esquemática da distribuição dos camarões nos aquários com Bioflocos e Água Clara (n=12 animais/aquário). Em cada sistema ou condição, um aquário foi considerado como grupo controle (não-infectado), sendo os animais dos demais aquários desafiados com o WSSV.	29
Figura 8. Representação esquemática da distribuição do meio Mueller Hinton em microplaca de 96 poços, utilizada para os ensaios de atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	35
Figura 9. Representação esquemática da diluição seriada estabelecida para os ensaios de atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> em placa de 96 poços. Tons de azul, laranja e verde representam a adição da LvUBQ, tampão de diálise e lisozima (LSZM), respectivamente. Tons mais claros representam as concentrações menores de LvUBQ, tampão de dialise e LSZM, resultante da diluição seriada. Colunas marcadas com retângulos vermelhos representam os poços aos quais foi adicionada somente solução salina (sem bactérias), enquanto, nas colunas não marcadas, aos poços foi adicionada solução salina contendo bactéria, sendo a turbidez da suspensão próxima àquela da solução padrão de McFarlan de 0,5.	36
Figura 10. Sinais clínicos observados nos espécimes de <i>L. vannamei</i> após a infecção experimental com vírus da mancha branca (WSSV). A. Camarão aclimatado no SAC, antes da infecção experimental. B. Camarão aclimatado no SBF, após a infecção experimental. C. Camarão aclimatado em SAC, após a infecção experimental.	38

Figura 11. Níveis de transcritos de <i>UBQ</i> nos animais infectados experimental com WSSV durante 48h em relação ao grupo pré-infecção. As análises foram realizadas em brânquia dos <i>L. vannamei</i> aclimatados em SBF (Sistema Bioflocos) e SAC (Sistema Água Clara).* refere-se à diferença estática significativa ($p < 0,05$).	41
Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida 18%, em condições desnaturantes (PAGE-SDS). Alíquotas das frações de <i>LvUBQr</i> obtidas através por cromatografia de afinidade (IMAC), na presença de concentrações distintas de Imidazol presente no tampão utilizado para sua eluição e purificação: 20, 50, 100, 200 e 500 mM. PM: marcador de peso molecular.	45
Figura 13. Resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> da <i>LvUBQr</i> contra o <i>V. alginolyticus</i> . Valores de absorbância <i>versus</i> tempo de incubação. A concentração de lisozima e de <i>LvUBQr</i> foram iguais. Em a e b , as concentrações utilizadas foram 3,3 e 0,015 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos iniciadores utilizados nos ensaios de <i>qPCR</i>	31
Tabela 2. Nível da transcrição diferencial do Gene <i>EF-1α</i> nos camarões infectados experimentalmente com o WSSV, em 48h após a infecção, em dois sistemas distintos de cultivo.....	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Cultivo de camarões marinhos	15
1.2	Vírus da síndrome da mancha branca (WSSV)	16
1.3	Bactérias do gênero <i>Vibrio</i>	19
1.4	Sistema imune de camarões	21
1.5	Ubiquitina	22
1.6	Sistema de Cultivo com Bioflocos (SBF) e tradicional Água Clara (SAC)	25
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo geral.....	27
2.2	Objetivos específicos.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Delineamento Experimental	28
3.1.1	Material biológico e Delineamento Experimental 1 – Aclimação	28
3.1.2	Delineamento Experimental 2 - Desafio com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV).....	28
3.2	Extração de RNA Total e Síntese de cDNA	30
3.3	Análise de Transcrição Diferencial, através da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativa (<i>q</i> PCR).....	30
3.4	Análise Estatística	31
3.5	Clonagem do <i>UBQ</i>	31
3.6	Expressão heteróloga da <i>LvUBQ</i>	32
3.7	Purificação da <i>LvUBQ</i>	32
3.8	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PADE).....	33
3.9	Diálise.....	33
3.10	Dosagem de proteínas.....	33

3.11	Preparação da suspensão de bactérias <i>Vibrio alginolyticus</i>	34
3.12	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1	Infecção com vírus da WSSV	37
4.2	Avaliação dos efeitos da infecção com WSSV nos <i>L.vannamei</i> aclimatados no sistemas de cultivos SAC e SBF.....	39
4.2.1	Avaliação dos genes regência <i>EF-1α</i> , <i>18S RNAr</i> e <i>GADPH</i>	39
4.2.2	Transcrição diferenciação do gene da ubiquitina de <i>L.vannamei</i>	40
4.3	Teste de atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	44
5	CONCLUSÕES	49
6	PERSPECTIVAS	50
	REFERÊNCIAS	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA - Albumina bovina sérica

CIM - Concentração Inibitória Mínima

EF-1 α - Fator de Alongamento Alpha 1

GAPDH - Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase

IMAC - Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados (do inglês: *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*)

g - gravidade

IPTG - isopropil- β -D-galactosídeo

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês: *Polymerase Chain Reaction*)

pH - Potencial Hidrogeniônico

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonila

M - molar

mM - milimolar

nm - nanômetro

RNA - Ácido ribonucléico

RNAm - Ácido ribonucléico mensageiro

SBF- Sistema de Cultivo Bioflocos

SAC- Sistema de Cultivo Água Clara

SDS-PAGE = Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
(do inglês: *Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

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

μ l – microlitro

μ g – micrograma

Delineamento experimental; Dados de níveis de transcritos da ubiquitina, genes normalizadores, mortalidade dos *L. vannamei* no período de aclimação e desafio experimental integram a tese da doutoranda Cecília de Souza Valente, do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cultivo de camarões marinhos

O camarão marinho é um recurso importante para a economia mundial pesqueira, e, conseqüentemente, apresentando um grande valor comercial, tem sido largamente explorado. Para suprir esta demanda, a carcinicultura passou a ser bastante incentivada. Entre as espécies cultivadas, o camarão-branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) representa umas das espécies mais exploradas comercialmente em nível mundial (MARTINS, 2003) (Figura 1).

Figura 1. Espécimes de *L. vannamei*, camarão-branco do Pacífico.



Fonte: VANNAMEI shrimp to be harvested from trial farm. Disponível em: <<http://www.thehindu.com/news/cities/Kochi/vannamei-shrimp-to-be-harvested-from-trial-farm/article7328002.ece>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

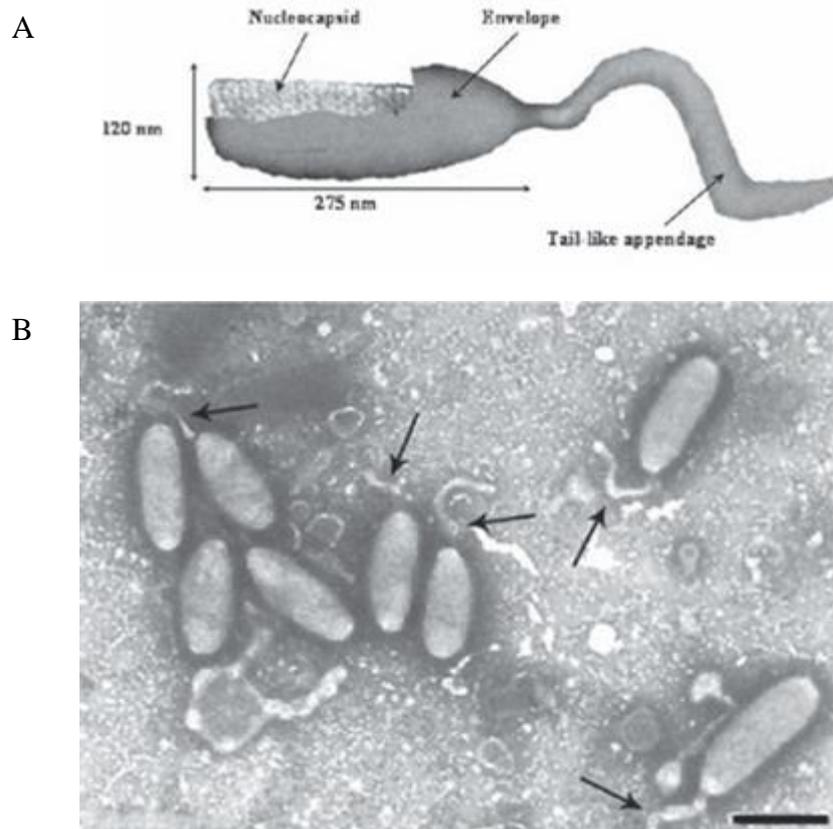
O cultivo de camarão na América Latina vem sistematicamente ganhado importância no cenário mundial. Os países americanos que se destacam na carcinicultura são Equador, Honduras, México e o Brasil (LIGHTNER, 2011). A região Sul do Brasil possui um clima com temperaturas baixas, dificultando o cultivo de algumas espécies de camarões. Entretanto, como o *L. vannamei* é uma espécie resistente a algumas variações dos parâmetros de cultivo, a introdução dessa espécie teve êxito também na região Sul do país (POERSCH *et al.*, 2006).

As doenças causam impactos negativos significativos na carcinicultura em nível mundial, e, conseqüentemente, afetado a economia dos principais países produtores (LIGHTNER, 2005; 2011). As enfermidades que afetam os camarões marinhos são múltiplas, sendo de origem infecciosa e não-infecciosa (COUCH, 1978; LIGHTNER; REDMAN, 1998). Os principais agentes etiológicos de doenças infecciosas de camarões são vírus, bactéria, metazoários e fungos. As doenças de origem não-infecciosa podem ter causas relacionadas tanto a desequilíbrios nutricionais, quanto a fatores ambientais e a fatores genéticos (LIGHTNER; REDMAN, 1998). Dentre os agentes de etiologia viral e bacteriana, podemos destacar o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) e as bactérias do gênero *Vibrio*.

1.2 Vírus da síndrome da mancha branca (WSSV)

Atualmente o WSSV é classificado como pertencente à família Nimaviridae, gênero *Whispovirus* (MAYO, 2002). Esse vírus é envelopado, baciliforme, tem o nucleocapsídeo em formato de bastão, e seu DNA é circular de dupla-fita. Além disso, apresenta um apêndice na forma de uma cauda, o qual lembra um flagelo (DURAND *et al.*, 1996, CHEN *et al.*, 2002; VAN HULTEN *et al.*, 2000) (Figura 2).

Figura 2. Morfologia do vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV). **A-** Representação das estruturas do WSSV: envelope, nucleocapsídeo e o apêndice na sua extremidade. **B-** Microscopia eletrônica do WSSV. As setas pretas indicam os apêndices. Barra = 250 nm.



Fonte: A. ESCOBEDO-BONILLA *et al.*, 2008; B. DURAND *et al.*, 1996.

O WSSV infecta tecidos de origem mesodérmica, ectodérmica (CHANG *et al.*, 1996), conectivos, hematopoiéticos, além do epitélio cuticular (SHI *et al.*, 2005). Os principais sintomas nos camarões infectados são inapetência, aumento no tempo de coagulação da hemolinfa, letargia, cutícula mole, coloração avermelhada no corpo e nos seus apêndices, aumento e uma coloração amarelada no hepatopâncreas (LO *et al.*, 1996a; DURAND *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2000).

Os animais também podem apresentar inclusões brancas na cutícula. Entretanto, esse sinal clínico não é observado com frequência em todos os camarões (Figura 3). Contudo, o nome da doença é proveniente exatamente deste último sinal clínico citado (ESCOBEDO-BONILLA *et al.*, 2008).

Figura 3. Camarão, *Litopenaeus vannamei*, com inclusões brancas na cutícula, observação associada com a Síndrome da Mancha Branca.



Fonte: FRENG, S. *et al.* (2017).

A infecção dos camarões pelo WSSV pode ocasionar até 100% de mortalidade, entre três e dez dias, após o início dos primeiros sinais clínicos (CHOU *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1995; LO *et al.*, 1996b; XU; HAN; ZHANG, 2006).

O WSSV pode infectar várias espécies, em diferentes famílias de crustáceos, sejam eles cultivados, ou nativos (SCHUUR, 2003; VASEEHARAN; JAYAKUMAR; RAMASAMY, 2003; COSTA *et al.*, 2012). Além dos crustáceos, o vírus foi identificado em outros organismos, como poliquetas, rotíferos, e algumas larvas de insetos (ESCOBEDO-BONILLA *et al.*, 2008).

O WSSV tem similarmente ocasionado alta mortalidade em cultivos de camarões *L.vannamei*, desde a década de 1990 (LO *et al.*, 1996a). A doença causada pelo Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) foi observada inicialmente em 1992 em viveiros de *Penaeus japonicus* na China, espalhando-se, rapidamente para diversas fazendas naquele país, e, possivelmente, para fazendas de Taiwan (LO, 2003). Além disso, o WSSV é o vírus que mais causou danos para carcinicultura em nível mundial (LIGHTNER *et al.*, 1998; TAPAY; NADALA; LOH, 1999; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ; AGUIRRE-GUSMÁN; MEJÍA-RUIZ, 2007). Além dos primeiros casos da doença detectados no Norte da Ásia (INOUE *et al.*, 1994; LO *et al.*, 1996a; 1999), a ocorrência do WSSV foi também registrada nos Estados Unidos da América, em 1995, cuja introdução foi rastreada a partir da entrada de camarões congelados importados da Ásia (NUNAN; LIGHTNER, 1997; NUNAN; POULOS;

LIGHTNER, 1998). Em seguida, a presença do WSSV foi relatada no Peru em 1998, e, registrada nos países da América Central em 1999.

Já no Brasil, o primeiro registro oficial da ocorrência do WSSV nos cultivos data de 2005, no estado de Santa Catarina (SEIFFERT *et al.*, 2005), a partir do diagnóstico realizado em janeiro daquele ano na Universidade do Arizona (UAZ), e, na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A presença deste vírus foi relatada também em cultivos da região de Aracati no Ceará, naquele mesmo ano. A região Nordeste que é a maior produtora de camarão cultivado do país tem registrado um alastramento do WSSV nos cultivos dos diferentes estados que integram a região, a partir de 2011, na Paraíba e Pernambuco, em 2014 no Rio Grande do Norte, e, em 2016, no Ceará e Piauí (ACCC, 2017).

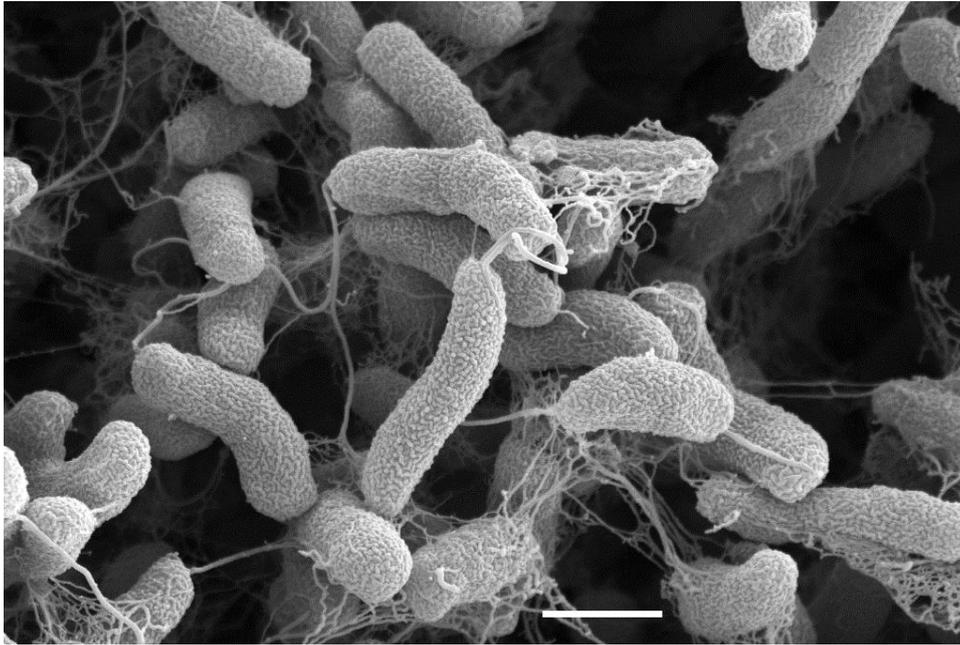
Em nível mundial, o registro mais recente de novo surto do WSSV ocorreu na Austrália, em dezembro de 2016, na região sudeste de Queensland, conforme relato do Departamento de Agricultura daquele país. Cabe salientar que, apesar deste evento recente, houve registro prévio do WSSV naquele continente, em camarão importado em 1999 (Ministério da Agricultura da Austrália, 2017).

1.3 Bactérias do gênero *Vibrio*

Em 1965, as bactérias do gênero *Vibrio* pertencem à família Vibrionaceae, que é caracterizada por bacilos, gram-negativos, com movimentos por flagelos e oxidase-positivos. Essa primeira designação da família foi conveniente para diferenciar essas bactérias das Enterobacteriaceae (KONEMAN *et al.*, 2001). Originalmente, a família Vibrionaceae incluía quatro gêneros: *Vibrio*, *Aeromonas*, *Photobacterium* e *Plesiomonas*, os quais foram agrupados juntos por serem encontrados na água, e por provocar doenças gastrointestinais (BAUMANN *et al.*, 1984). Atualmente, com as novas técnicas moleculares empregadas na taxonomia, foi evidenciado que, dos quatro gêneros pertencentes à Vibrionaceae, três deles pertencem a outras famílias. Assim sendo, o gênero *Vibrio* pertence à família Vibrionaceae, o gênero *Aeromonas* à família Aeromonadaceae, e os outros dois gêneros foram alocados na família Enterobacteriaceae (MURRAY *et al.*, 2004).

Os víbrios são bactérias que habitam o meio aquático, são curtas, curvadas, em forma de bastão, e possuem um flagelo polar, como mostrado na Figura 4. Sobrevivem e se reproduzem em águas com alta salinidade e temperatura, entre 10 a 30°C (MANJUSHA *et al.*, 2005; MURRAY *et al.*, 2004).

Figura 4. *Vibrio cholerae* ao microscópio eletrônico de varredura. Barra = 1 μ m.



Fonte: Özel e Holland (2014).

Alguns víbrios podem ser patogênicos aos peneídeos, como por exemplo, ao *L. vannamei*. O termo vibriose refere-se às doenças causadas pelo víbrios, consideradas, majoritariamente, como infecções secundárias, podendo infectar todos os estágios de vida do camarão (FRELIER; LOY; REDDINGTON, 2004), causando lesões teciduais, com ou sem necrose, comprometimento no desenvolvimento larval, apresentando taxas variáveis de mortalidade (COSTA *et al.*, 2009).

Além disso, a infecção pode ser cuticular, intestinal e sistêmica. Os víbrios normalmente afetam o coração, o órgão linfóide, a glândula antenal, o músculo esquelético, o tecido conectivo e o cordão nervoso. A bacteremia causada pela vibriose pode ter efeito sobre a cascata de coagulação, o que, conseqüentemente, prolonga o tempo de coagulação da hemolinfa (FRELIER; LOY; REDDINGTON, 2004). As vibrioses em camarões são frequentemente causadas pelos *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. penaeicida*, *V. splendidus*, *V. damsela* e *V. harveyi* (COSTA, 2006).

As vibrioses na carcinicultura causam impactos de dimensões variáveis, podendo em infectar mais de 70% dos camarões produzidos. No caso da infecção por *V. alginolyticus* e *V. parahaemolyticus* a mortalidade cumulativa pode ser muito alta, atingindo até 80% (CHANDRAKALA; PRIYA, 2017). Nas vibrioses crônicas, os camarões saudáveis podem canibalizar os mortos e os enfermos e, em virtude disso, espalhar a doença para o resto da população (NUNES; MARTINS, 2002).

A septicemia decorrente da infecção por vibrios é considerada como uma doença sistêmica grave. Os camarões afetados apresentam-se letárgicos e mostram comportamento de natação anormal. Os pereópodes e pleópodes podem parecer avermelhados e os camarões podem mostrar ligeira flexão da musculatura abdominal. Em casos mais graves há formação de extensivas bolhas pretas vistas na carapaça e no abdômen, tendo sido associada à presença de *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum* ou *V. parahaemolyticus* (CHANDRAKALA; PRIYA, 2017). A via de infecção eventual de humanos por *V. alginolyticus* ocorre por meio do contato com água que contenha esse patógeno, ou alimentos contaminados, como por exemplo, frutos do mar. Nos indivíduos infectados podem ser observadas septicemia, infecções em tecidos moles e extra intestinais (DECHET; KORAM; PAINTER, 2008; NEWTON *et al.*, 2012; SLIFKA; NEWTON; MAHON, 2017).

Slifka, Newton e Mahon (2017) ao investigarem infecções causadas pelo *V. alginolyticus* nos Estados Unidos da América em humanos, constataram que 95% dessas infecções foram relatadas em estados costeiros. Além disso, essas infecções foram associadas predominantemente à pele, particularmente nas extremidades inferiores e na orelha externa, provavelmente porque a transmissão ocorre principalmente através do contato direto com água.

Além disso, algumas infecções em seres humanos podem ocorrer pela ingestão de alimentos contaminados, sejam crus ou malcozidos, sendo essas intoxicações alimentares consideradas casos de saúde pública (MENDES, 2009). Uma das espécies do gênero *Vibrio* que merece destaque neste cenário é o *V. cholerae*. Algumas cepas do *V. parahaemolyticus* também se destacam por causar intoxicações alimentares. Outras espécies do gênero *Vibrio* também podem causar diarreia e enfermidades, mas com menor frequência (COSTA, 2006).

Apesar dos vibrios mostrarem aspectos negativos para a carcinicultura e para a saúde pública, essas bactérias são importantes para os ecossistemas, pois atuam na ciclagem da matéria orgânica (THOMPSON; LIDA; SWINGS, 2004). Além disso, são importantes em função da sua presença na microbiota intestinal de diversas espécies que vivem no meio aquático (KUMAR *et al.*, 2007).

1.4 Sistema imune de camarões

As defesas moleculares e celulares dos camarões contra patógenos envolvem as respostas associadas ao sistema imune inato, pois os crustáceos não possuem sistema imune

adaptativo, como os animais vertebrados. (BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2007). A defesa primária desses animais é o exoesqueleto rígido, que representa uma barreira física para os patógenos. Se o patógeno ultrapassar essa barreira, proteínas e peptídeos presentes na hemolinfa representam a linha de defesa seguinte (BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2007).

O sistema imune inato dos invertebrados é essencialmente composto por componentes celulares e humorais, incluindo a cascata da pró-fenoloxidase (ASHIDA; BREY, 1998) e a formação de peptídeos antimicrobianos (ENGSTROM, 1999). A pró-fenoloxidase (proPO) é um sistema enzimático importante para os invertebrados, sendo a fenoloxidase, a enzima que possui um papel fundamental nesse sistema. A fenoloxidase é capaz de aumentar a síntese de melanina e compostos tóxicos dela derivados na hemolinfa, conseqüentemente, aniquilando os patógenos (GILLESPIE; KANOST; TRENZCEK, 1997).

Outro processo importante envolve a apoptose, processo que tem participação na regulação da homeostase, no desenvolvimento de tecidos e nas defesas relacionadas ao próprio sistema imune. A apoptose também funciona eliminando células aberrantes criadas por danos ao DNA, e aquelas infectadas por agentes patogênicos virais. Esse mecanismo é caracterizado pela condensação da cromatina, além da segmentação do DNA (ROULSTON; MARCELLUS; BRANTON, 1999).

Camarões da espécie *Penaeus monodon*, diagnosticados com WSSV, mostraram sinais de apoptose, sendo, inclusive, a extensão da apoptose proporcionalmente relacionada à gravidade da infecção por esse agente etiológico viral (LEU *et al.*, 2012). A eliminação viral é causada pela apoptose, entretanto, alguns autores propõem que o aumento progressivo da apoptose induz a morte do hospedeiro viral (ANGGRAENI; OWENS, 2000; FLEGEL, 2007).

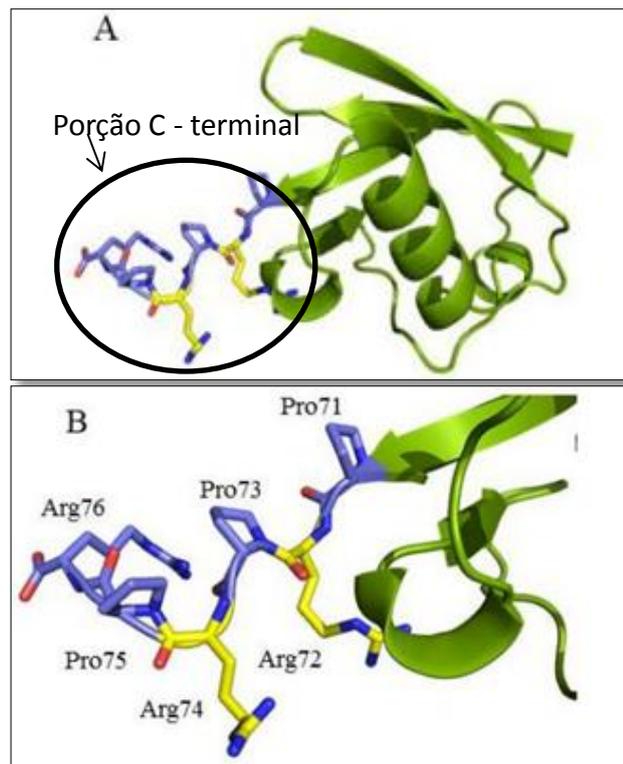
1.5 Ubiquitina

Quando da sua primeira descrição, a ubiquitina foi denominada provisoriamente de *Ubiquitous Immunopoietic Polypeptide* ou simplesmente de UBIP. Tendo sido isolada pela primeira vez a partir do timo bovino (GOLDSTEIN *et al.*, 1975), essa proteína é largamente distribuída, sendo também encontrado em células de vários organismos, desde protozoários até vertebrados (GOLDSTEIN *et al.*, 1975; HICKE, 2001). O peso molecular da ubiquitina é em torno de 8.5 kDa, sendo composta por cerca de 76 resíduos de aminoácidos (GOLDSTEIN *et al.*, 1975; WATSON; LEVY; DIXON, 1978). A ubiquitina participa da via de degradação das proteínas por meio do complexo proteossoma (HEGDE, 2004).

A ubiquitina é uma proteína presente nos eucariotos. Ela é altamente conservada, como evidenciado, por exemplo, pela comparação das sequências da ubiquitina de levedura e humana, a qual mostra diferença de três resíduos de aminoácidos (FINLEY; CHAU, 1991).

Cerca de 200 seqüências primárias de ubiquitinas de diferentes espécies foram analisadas comparativamente, mostrando que a ubiquitina de *L. vannamei*, *LvUBQ*, apresenta um alto grau de homologia com aquelas descritas (MATOS, 2015), diferindo, entretanto, na porção C-terminal, a qual contém um motivo Prolina-Arginina que se repete três vezes (Figura 5). Na estrutura da *LvUBQ*, conforme descrita por MATOS (2015), destacam-se 54 folhas β e 3 α -hélices. Além disso, a carga da superfície da porção C-terminal dessa proteína é positiva, quando comparada com a ubiquitina humana que apresenta carga líquida neutra.

Figura 5. Representação da estrutura da ubiquitina de *L. vannamei*, sendo destaca a porção C-terminal. **A.** Representação total da estrutura com ênfase na porção C-terminal. **B.** Porção C-terminal ampliada. As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos diferentes estão em azul, enquanto as iguais estão mostradas em amarelo.



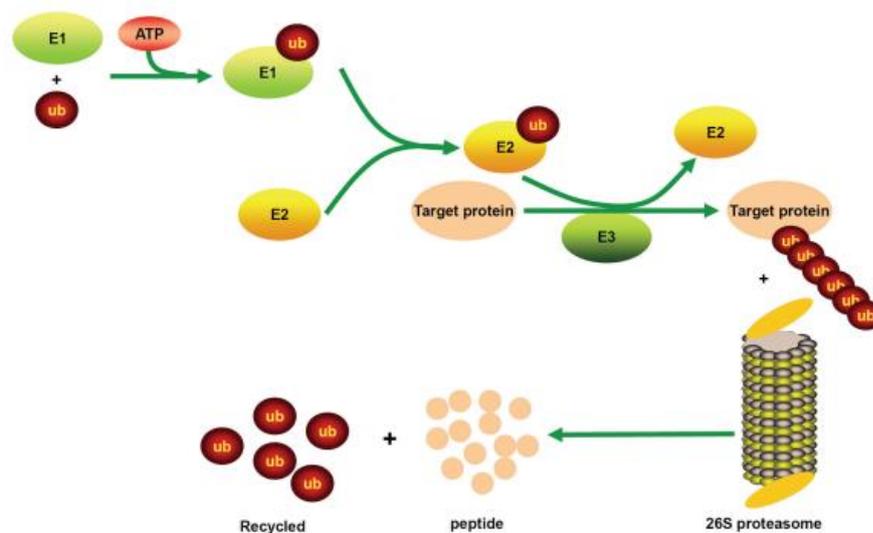
Fonte: MATOS, G. M, (2015).

A ubiquitinação é um processo que envolve três enzimas: (E1) enzima ativadora da ubiquitina (do inglês, *ubiquitin activating enzyme*), (E2) enzima conjugadora de ubiquitina

(do inglês, *ubiquitin conjugating*) e (E3) ubiquitina ligase (*ubiquitin ligase*), com a finalidade de ligar covalentemente a ubiquitina ao substrato proteico para degradação do mesmo. Na porção C-terminal da UBQ há um resíduo de glicina (Gly76) que se liga na E1, através de uma ligação tio-éster. Essa etapa envolve ATP, sendo denominada de ativação. Em seguida, ocorre a troca de E1 e E2 com a ubiquitina ativada (LIU *et al.*, 2015).

A E3 interage com E2 permitindo a transferência da ubiquitina para a proteína alvo. Através desse processo, a porção C-terminal da ubiquitina é ligada ao resíduo de Lisina da proteína-alvo. Em seguida, o proteossoma 26S é capaz de reconhecer a proteína conjugada com ubiquitina, sendo a mesma degradada em peptídeos, ou aminoácidos, pelas enzimas proteossomais, ver figura 6 (PICKART; EDDINS, 2004; TU *et al.*, 2012).

Figura 6. Processo de degradação de proteína, através da ubiquitinação.



Fonte: TU *et al.* (2012).

Várias ubiquitinas podem se ligar à proteína-alvo, formando uma cadeia poliubiquitina. Além disso, a ubiquitina tem várias lisinas (K) relevantes para a sua ação, sendo elas, a K6, K11, K27, K29, K33, K48 e K63, totalizando sete lisinas diferentes (DAVIS; GACK, 2015).

Além da via de degradação de proteínas, a ubiquitina também participa de outras funções nas células, como ativação de células do sistema imune (SCHEID *et al.*, 1975) e apoptose (LEU *et al.*, 2012), sendo, ainda, sugerida uma atividade antimicrobiana (SEO *et al.*, 2013).

Frente à infecção pelo WSSV, foi observado que camarões apresentaram um aumento da expressão da ubiquitina (HE *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2006). MÜLLER (2009) mostrou

que, entre a alteração do perfil de indução e repressão de alguns genes em *L.vannamei* infectados pelo WSSV, o gene que codifica a ubiquitina foi transcrito diferencialmente, sendo induzido em comparação com os camarões não infectados. Os animais analisados foram provenientes de fazendas de cultivo da região Sul de Santa Catarina, infectados naturalmente pelo vírus.

1.6 Sistema de Cultivo com Bioflocos (SBF) e tradicional Água Clara (SAC)

O sistema de cultivo em bioflocos (SBF) utiliza um conjunto de aglomerados de diversos micro-organismos, associados à matéria orgânica presente na água (FORSTER, 1976). Estes agrupamentos servem de alimento para o camarão, e, conseqüentemente, diminuem a quantidade de ração a ser utilizada, e aumentam a densidade de estocagem, bem como englobam o nitrogênio que está no meio aquoso (WASIELESKY *et al.*, 2006; GAO *et al.*, 2012). Uma característica do SBF é a diminuição da renovação de água, contrapondo-se com os cultivos tradicionais (WASIELESKY *et al.*, 2006), o que contribui para um maior controle da sanidade dos cultivos e diminuição do impacto ecológico da atividade.

No sistema de cultivo tradicional em água clara (SAC), a renovação de água do mar periodicamente permite que os níveis de amônia, alcalinidade, pH e salinidade sejam controlados, possibilitando assim a alta sobrevivência do camarão marinho. Normalmente, a água do cultivo é liberada no meio ambiente. Em comparação com o SBF, a densidade da estocagem é menor, a quantidade de ração utilizada é maior e a turbidez da água desde cultivo é pequena.

O cultivo pode influenciar a condição de saúde do camarão. As doenças são ocasionadas ou resultantes da interação de três principais elementos que são: o patógeno, o hospedeiro e o ambiente (SNIESZKO, 1973). O ambiente de cultivo de camarão pode expor o animal a condições de estresse e, conseqüentemente, diminuir a sua capacidade imunológica. Entretanto, algumas vezes o ambiente pode ter uma potencialidade de aumentar a resposta imune do organismo, como se atribui, por exemplo, ao SBF.

O SBF apresenta potencial de estimular o sistema imune da maioria dos organismos nele cultivado, uma vez que, o ambiente por ele proporcionado tem uma alta quantidade de bioativos nos flocos, como por exemplo, enzimas, vitaminas, fotopigmentos e fito-esteroides. Quando o animal se alimenta desses flocos, isso pode contribuir para melhorar sua resposta

imune, diminuindo, portanto, a mortalidade, ou, ainda, a chance de muitos animais adoecerem (BURFORD, 2004; XU; PAN, 2013).

No presente trabalho, dois grupos de camarões *L.vannamei* foram aclimatados em condições distintas, um grupo no SAC e outro no SBF, sendo, em seguida, desafiados experimentalmente com vírus WSSV, a fim de avaliar os níveis de transcritos do gene *UBQ*. Além disso, dado que um estudo mostrou ação antimicrobiana da ubiquitina da ostra do Pacífico, *Crassostrea gigas* (SEO, 2013), neste trabalho a atividade antimicrobiana da ubiquitina recombinante de *L. vannamei* foi investigada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do cultivo em bioflocos nos níveis de transcritos do gene que codifica a ubiquitina no camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei* frente à infecção com WSSV, e investigar a potencial atividade antimicrobiana desta proteína contra a cepa de *Vibrio alginolyticus*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar comparativamente os níveis de transcritos do gene que codifica a ubiquitina (*UBQ*) em camarões *L. vannamei*, mantidos em bioflocos e em água clara, através da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real quantitativa (*qPCR*);
- Avaliar comparativamente, níveis de transcritos da *UBQ* em *L. vannamei* mantidos em SBF e SAC, e infectados experimentalmente com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), através de *qPCR*;
- Clonar o *UBQ* de *L. vannamei* em vetor pET14b;
- Realizar a expressão heteróloga da Ubiquitina de *L. vannamei* (*LvUBQ*) e obter a proteína purificada;
- Avaliar a atividade antibacteriana da *LvUBQ* *in vitro*, utilizando uma cepa de *V. alginolyticus*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento Experimental

3.1.1 Material biológico e Delineamento Experimental 1 – Aclimação

Parte deste trabalho integra a tese de doutorado da MSc. Cecília de Souza Valente, do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, tendo o delineamento experimental e a análise dos níveis transcritos realizados de forma conjunta.

Espécimes juvenis do camarão *Litopenaeus vannamei* ($8,0\pm 2,0g$) foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Camarões Marinhos – LCM, do Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC. Um total de 460 camarões, retirados aleatoriamente, de tanques de cultivo em bioflocos foram separados em dois grupos experimentais, sendo um deles ($n=160$) transferido para um tanque com água clara, enquanto o outro ($n=300$) foi mantido em um tanque com SBF. Os dois grupos foram aclimatados nas respectivas condições por um período de quinze dias. Neste período, os parâmetros usuais de manejo (pH, temperatura, oxigênio dissolvido e amônia) foram monitorados diariamente (ver Apêndice A), sendo os camarões alimentados, diariamente, com 3% da sua biomassa com ração comercial. O período de aclimação dos camarões ao seu respectivo sistema de cultivo foi realizado no LCM.

3.1.2 Delineamento Experimental 2 - Desafio com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV)

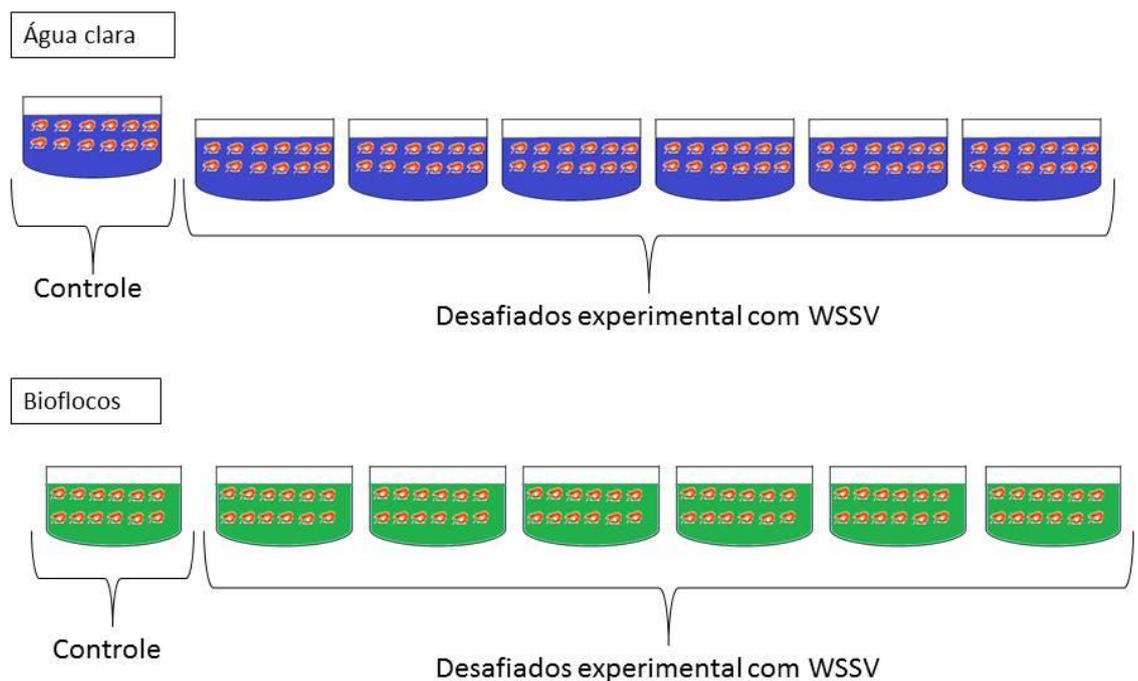
Ao término do período de aclimação, os camarões *L. vannamei* foram transferidos para a sala de bioensaios do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI). Um total de 84 espécimes de *L. vannamei* de cada sistema de cultivo foram aleatoriamente distribuídos em aquários de 25 L ($n=12$ animais/aquário), conforme as condições da aclimação prévia, de modo a totalizar sete aquários com bioflocos, e sete aquários com água clara (Figura 7). Os camarões foram mantidos por um período adicional de aclimação de 48 horas antes do desafio experimental, com a finalidade de diminuir um possível estresse dos animais, devido o transporte de um laboratório para o

outro. A avaliação dos parâmetros usuais de manejo, e a alimentação dos animais foram realizadas como descrito anteriormente.

Ao final do período de 48h, antes da realização da infecção experimental (i.e) com o WSSV, quatro camarões saudáveis de cada um dos aquários foram coletados aleatoriamente para análise dos níveis de transcritos do gene da *UBQ*. As brânquias desses animais foram excisadas, e, imediatamente, transferidas para nitrogênio líquido. Posteriormente, essas amostras foram armazenadas a temperatura de -80°C até seu processamento.

Para o infecção experimental (i.e), um aquário de cada um dos sistemas, SBF e SAC, foi considerado como grupo controle (não-inoculado com o vírus), sendo os restantes utilizados para a inoculação viral.

Figura 7. Representação esquemática da distribuição dos camarões nos aquários com Bioflocos e Água Clara (n=12 animais/aquário). Em cada sistema ou condição, um aquário foi considerado como grupo controle (não-infectado), sendo os animais dos demais aquários desafiados com o WSSV.



. **Fonte:** elaborado pela autora.

A i.e. foi realizada através da injeção intramuscular de $100\ \mu\text{l}$ de um inóculo viral, preparado a partir de tecido muscular de camarão infectado (MOSER, 2011), contendo $5,3 \times 10^4$ partículas virais/ μl . Paralelamente, os camarões dos grupos controles foram injetados com $100\ \mu\text{l}$ de solução salina (NaCl 3%, pH=7,2) autoclavada. Após 48h da inoculação viral (48 p.i.), quatro camarões foram aleatoriamente retirados de cada aquário, inclusive dos

aquários correspondentes aos grupos controle, sendo as brânquias coletadas e armazenadas conforme descrição anterior.

3.2 Extração de RNA Total e Síntese de cDNA

As brânquias coletadas dos animais, antes da i.e. e após 48h infecção, foram submetidas à extração de RNA total, com QIAzol Lysis Reagent (Qiagen®), de acordo com as informações do fabricante. Para a síntese de cDNA foi utilizado o método de Transcrição Reversa, utilizando o *Kit* Omniscript RT (Qiagen), seguindo as especificações do manual do fabricante. Em seguida, foi realizada a quantificação do cDNA, através da razão da absorbância a 260/230, determinada em espectrofotômetro (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific).

3.3 Análise de Transcrição Diferencial, através da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativa (*q*PCR)

Para a análise comparativa da transcrição diferencial do gene da *Lv*UBQ por *q*PCR foi utilizada a concentração de 100 ng de cDNA por amostra, sendo o par de iniciadores específicos aqueles apresentados na Tabela 1. Para as reações foi utilizado o kit Quantifast SYBR green (Qiagen®), de acordo com as especificações do fabricante.

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett Lifesciences). As amostras foram analisadas em duplicata. A desnaturação inicial foi a 95 °C, durante o período de 5min. Os parâmetros de ciclagem utilizados foram: 50 ciclos a temperatura de 95 °C, durante 30s; 53 °C durante 30s, e 72 °C durante 10s. O produto foi submetido a uma curva de dissociação, entre de 55 °C a 95 °C, sendo a variação da temperatura realizada a intervalos crescentes de 1 °C.

Para o cálculo da expressão gênica relativa foi utilizado o método do $\Delta\Delta$ CT (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001)

Como genes normalizadores foram testados os genes que codificam para o RNA ribossomal 18S (18S rRNA), para a Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH), e para

o Fator de alongação-1 α (EF-1 α), cujas sequências dos respectivos iniciadores estão incluídos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências dos iniciadores utilizados nos ensaios de *q*PCR.

	Iniciador <i>reverse</i> (5'-3')	Iniciador <i>forward</i> (5'-3')	Referência
<i>LvUBQ</i>	AGT CAG ACA GAG TGC GAC CAT CTT	AAG GCC AAG ATC CAG GAT AAG GAG	MULLER, 2009
<i>GAPDH</i>	ATG AGG CCC TCT ACT ATC TC	CTG TGG CGT TAA CTT GGA	MOSER, 2005
<i>EF-1α</i>	GCA TCT CCA CAG ACT TTA CC	TGG AGA CTG GTA TCC TGA AG	MULLER, 2009
<i>18S rRNA</i>	CCG AAT GGT CGT GCA TGG AAT GAT	GAA TTT CAC CTC TAG CGT CGC AGT	MOSER, 2011

Fonte: Elaborada pela autora.

3.4 Análise Estatística

Para analisar os níveis de transcritos dos animais cultivados nos SBF e na SAC, foram comparados os grupos pré-infecção e pós a infecção viral de cada um dos sistemas, separadamente. Foram comparados, ainda, os sistemas infectados experimentalmente entre si. Os tratamentos estatísticos aplicados foi o do teste t para amostras independentes com $p < 0,05$.

3.5 Clonagem do *UBQ*

A proteína de interesse para a clonagem, ou seja, a sequência correspondente ao gene da *LvUBQ*, foi inicialmente sintetizada e subclonada em vetor plasmidial bacteriano (PIDT-U, IDT Technologies), com base na sequência de nucleotídeos determinada a partir de uma biblioteca de cDNA obtida por MULLER (2009). Além disso, foram adicionados sítios de restrição para as enzimas *NdeI* e *BamHI* (Thermo Fisher Scientific).

Após clivagem do plasmídeo, a sequência de interesse foi purificada utilizando-se o *kit* Quiaquick gel extraction (Qiagen). O gene foi subclonado no vetor de expressão pET 14b (Novagen) pela enzima T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific).

3.6 Expressão heteróloga da *LvUBQ*

A expressão heteróloga da *LvUBQ* foi obtida a partir da transformação de bactérias competentes *E. coli*, linhagem BL21 *plys*. A transformação das bactérias foi realizada através de choque térmico. Para essa etapa, 50ng do vetor, contendo o fragmento de interesse (pET-14b-*LvUBQ*), foram incubados com 50 μ L de *E. coli* competentes em gelo durante 20 minutos. Em seguida, foi realizada uma incubação durante 1 minuto a 42° C e, posteriormente, nova incubação em gelo por 1 minuto, sendo adicionado 1 mL de meio LB (20 g/L). As bactérias já transformadas e em meio LB foram submetidas à agitação durante 1h a 37 °C. Na sequência, foram submetidas à centrifugação a 7000xg durante 15 minutos. Após a retirada de 800 μ L de sobrenadante, o sedimento foi ressuscitado no volume restante, e, posteriormente, transferido para placa de cultura com meio LB ágar (35 g/L), contendo ampicilina (100 μ g/mL) e cloranfenicol (50 μ g/mL), a qual foi incubada a 37 °C durante 16h.

Colônias de bactérias isoladas foram, então, cultivadas a 37 °C sob agitação em meio LB (20 g/L), contendo ampicilina e cloranfenicol nas mesmas concentrações mencionadas acima. No momento em que a densidade óptica atingiu os valores entre 0,600 e 0,800 em 600 nm, foi adicionado, imediatamente, IPTG na concentração final de 1M para indução da expressão da proteína recombinante. As bactérias foram mantidas sob agitação durante 3h a 37 °C. Em seguida, o meio de cultura foi centrifugado a 7000 g por 20min a 4 °C e o sedimento armazenado a -20 °C para uso posterior.

3.7 Purificação da *LvUBQ*

Foram adicionados 5 mL de tampão de lise fosfato (NaCl 250 mM, fosfato Na₂HPO₄ 20mM e glicerol 5%, pH 7,4) para ressuscitar o sedimento armazenado. Em seguida, foi adicionado PMSF na concentração final de 1 mM. Para o rompimento das paredes celulares bacterianas foi utilizado um sonicador (Fisher Scientific Model Sonic Dismembrator) em 8 ciclos de 20s. A amostra foi centrifugada a 18000 xg, por 20min a 4 °C. A purificação da *LvUBQ* foi realizada por Cromatografia de Afinidade por Metal Imobilizado (IMAC). Para

tanto, o sobrenadante foi injetado em coluna HisTrap (Amersham Biosciences) de 1 mL, a qual foi lavada com o tampão citado acima. Em seguida, para eluição da proteína, a coluna foi lavada com o mesmo tampão contendo diferentes concentrações de imidazol: 0, 20, 50, 100, 200, e, finalmente, 500mM.

3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PADE)

A purificação foi avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida 18%, em condições desnaturantes (PAGE-SDS). Alíquotas do material eluído da coluna foram acrescidas de tampão da amostra (glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5%, SDS 2,3%, Tris-HCl 0,0625M, pH 6,8), em seguida, incubadas a 100°C por 1min, e, imediatamente transferidas para o gelo.

A eletroforese foi realizada inicialmente a 80V por 30 min, seguido por 2h a 120V, de modo que as amostras migrassem até a extremidade final inferior do gel. Após a eletroforese, o gel foi corado com Commassie Blue G-250 (Sigma-Aldrich).

3.9 Diálise

Após a purificação, a LvUBQ foi submetida a diálise por 16 horas, utilizando o *kit* Mini Dialysis (GE Healthcare), conforme a instrução do fabricante. O tampão utilizado para diálise foi o mesmo tampão de purificação, mas sem Imidazol. A diálise foi realizada visando eliminar o Imidazol da amostra, de modo a não interferir nos ensaios antimicrobianos *in vitro*. Após diálise, as amostras foram concentradas usando filtros Amicon-Ultra (MiliPore).

3.10 Dosagem de proteínas

A quantificação de proteínas nas amostras foi realizada pelo método de Bradford (1976) modificado. Como padrão foi utilizada Albumina Bovina Sérica (BSA) na faixa de concentração entre 0,05 a 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, de modo a se obter uma curva padrão. Os ensaios foram realizados em microplaca de 96 poços em triplicata. Antes da determinação da absorbância, as amostras foram mantidas por 5min a 20°C. A absorbância foi determinada a 595 nm.

3.11 Preparação da suspensão de bactérias *Vibrio alginolyticus*

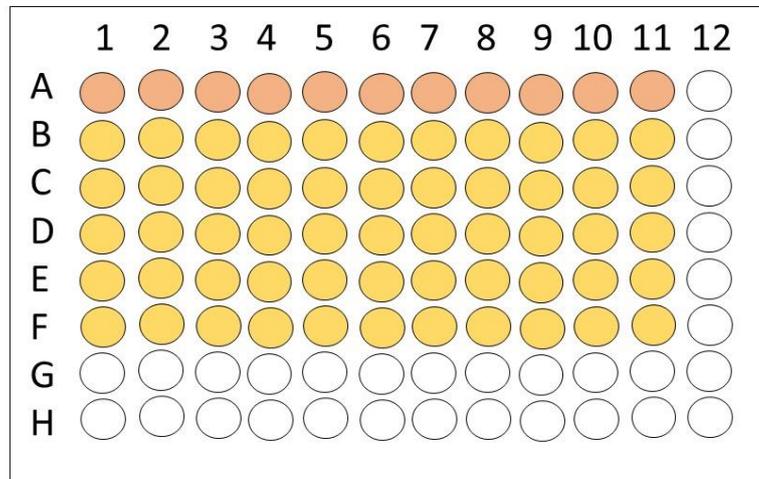
Visando a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana com a LvUBQ, bactérias *Vibrio alginolyticus* da coleção mantida no LABCAI foram semeadas em meio de cultura TSB (30g/L) em microtubos de 2mL. As suspensões de bactérias foram mantidas sob agitação por 2h a 30°C. Ao término deste período, uma alíquota de 100µl foi retirada e semeada em placas de Petri contendo meio Ágar TCBS (88g/L). As placas foram, em seguida, incubadas por 24h a 30°C.

3.12 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A atividade antimicrobiana da LvUBQ foi analisada em ensaios *in vitro*, através da determinação da CIM, utilizando a técnica de Microdiluição em Placa. Para tanto, foram realizadas diluições seriadas da LvUBQ em caldo Mueller Hinton (21g/L). Em paralelo, como controle positivo, foram também realizadas diluições seriadas da proteína Lisozima (LSZM), nas mesmas condições, a qual tem atividade antimicrobiana comprovada. A LSZM interage com o esqueleto glicosídico do peptidoglicano rompendo a parede celular da bactéria. A concentração máxima tanto para LvUBQ quanto para LSZM, foi de 3,3 µg/mL. A bactéria utilizada nos ensaios foi o *V. alginolyticus*. As colônias bacterianas crescidas no meio ágar TCBS foram suspensas em solução salina (NaCl 3%) com a turbidez próxima a solução padrão de McFarlan de 0,5.

O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços. A cada um dos onze poços da primeira linha da microplaca foram adicionados 190 µL de meio Müller Hinton, enquanto nos primeiros onze poços da segunda linha até sexta linha foram adicionados 90µL do mesmo meio (Figura 8).

Figura 8. Representação esquemática da distribuição do meio Mueller Hinton em microplaca de 96 poços, utilizada para os ensaios de atividade antimicrobiana *in vitro*.



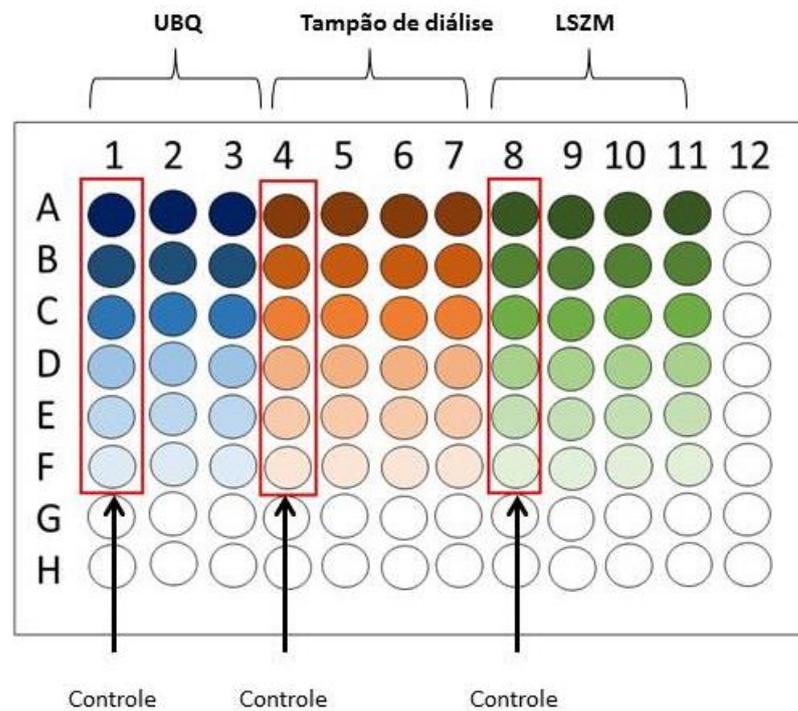
Quantidade de meio Mueller Hinton

- 190 μ L
- 90 μ L

Fonte: Elaborada pela autora.

Aos três primeiros poços da primeira linha da placa foram adicionados 100 μ L de *LvUBQ* recombinante. Do quarto até o sétimo poço, foram adicionados 100 μ L de tampão coletado após a diálise. Um volume de 100 μ L de lisozima foi incluído do oitavo até décimo primeiro poço (Figura 9). Todos os poços da primeira linha foram homogeneizados, sendo um volume de 100 μ L de cada poço retirado e transferido para o próximo poço de sua respectiva coluna. Esse procedimento foi repetido até os últimos poços da sexta linha, de modo a se obter a diluição seriada da amostra. A avaliação da atividade antimicrobiana potencial da *LvUBQ* recombinante foi realizada comparativamente àquela observada para a LSZM. O tampão da diálise, a princípio, foi utilizado como controle negativo do ensaio, comparativamente à atividade da *LvUBQ* e LSZM.

Figura 9. Representação esquemática da diluição seriada estabelecida para os ensaios de atividade antimicrobiana *in vitro* em placa de 96 poços. Tons de azul, laranja e verde representam a adição da *LvUBQ*, tampão de diálise e lisozima (LSZM), respectivamente. Tons mais claros representam as concentrações menores de *LvUBQ*, tampão de diálise e LSZM, resultante da diluição seriada. Colunas marcadas com retângulos vermelhos representam os poços aos quais foi adicionada somente solução salina (sem bactérias), enquanto, nas colunas não marcadas, aos poços foi adicionada solução salina contendo bactéria, sendo a turbidez da suspensão próxima àquela da solução padrão de McFarlan de 0,5.



Fonte: Elaborada pela autora.

Nas colunas 1, 4 e 8 foram acrescentados 10 μ L de solução salina, sendo estes considerados como controles (Figura 9). Nos demais poços foram adicionados 10 μ L de suspensão de bactérias *V.alginolyticus*. Em seguida, a microplaca foi incubada a 30°C durante 10h. Para analisar o crescimento bacteriano foi realizada a leitura da absorbância no comprimento de onda de 600nm, a cada 15min durante as 10h.

Com os valores de absorbância foi obtida a média das duplicatas dos resultados observados com a *LvUBQ* e das triplicatas do tampão de diálise e da LSZM, sendo a média subtraída do controle de cada reagente, respectivamente. Os dados obtidos foram analisados comparativamente a partir de gráficos construídos com o *Software* GraphPad Prism 4.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Infecção com vírus da WSSV

Durante o ensaio experimental não foi registrada mortalidade entre os camarões *L.vannamei* dos aquários controles, seja no SBF ou em SAC. Além disso, nenhum dos camarões desses aquários apresentou qualquer alteração em relação à alimentação, padrão natatório, ou aspecto externo geral do exoesqueleto.

No caso dos camarões experimentalmente infectados com o WSSV, 24h após a inoculação (24 p.i.), observou-se que a maioria dos animais apresentava-se letárgica e havia diminuído o consumo de ração. Após esse período, além das observações iniciais relatadas, os sinais clínicos foram se intensificando, destacando-se mudança de coloração externa para rosa avermelhado ou marrom avermelhado; cutícula facilmente removível e diminuição da coagulação da hemolinfa. A mudança de cor dos indivíduos pode ser facilmente observada como mostrado na Figura 10. Todos os sinais clínicos são associados à infecção pelo WSSV (CHOU *et al.*, 1995; FLEGEL, 1997; LIGHTNER *et al.*, 1998 WANG; POULOS; LIGHTNER, 2000), não sendo, entretanto exclusivos dessa infecção viral.

Figura 10. Sinais clínicos observados nos espécimes de *L. vannamei* após a infecção experimental com vírus da mancha branca (WSSV). **A.** Camarão aclimatado no SAC, antes da infecção experimental. **B.** Camarão aclimatado no SBF, após a infecção experimental. **C.** Camarão aclimatado em SAC, após a infecção experimental.



Fonte: Fotos de autoria de Cecília Sousa Valente.

Os sinais clínicos descritos acima foram observados nos *L. vannamei* mantidos tanto no SBF, como em SAC. Não foi registrada mortalidade no período de até 24h p.i. em nenhuma das condições, seja SBF, ou SAC.

No entanto, em 48h p.i. foi registrada a mortalidade de um total de 21 camarões, sendo n=6 indivíduos em SAC, e n=15 no SBF. Todos os camarões mortos apresentaram os sintomas descritos anteriormente. De acordo com CHOU *et al.* (1995) e LIGHTNER (2011), quando camarões são infectados com o WSSV, a mortalidade pode ocorrer no intervalo entre 2 a 7 dias. Com base nos resultados de mortalidade, sugere-se que o SBF, aparentemente, não contribuiu de modo significativo para a estimulação do sistema imune dos camarões ali mantidos, uma vez que houve igualmente mortalidade frente à infecção com o WSSV em 48, de modo análogo ao observado em SAC. Essa taxa de mortalidade foi inclusive superior àquela observada entre os camarões mantidos em SAC. No entanto, um estudo envolvendo um número maior de indivíduos seria necessário para melhor investigar esse resultado em termos de estatísticos.

4.2 Avaliação dos efeitos da infecção com WSSV nos *L.vannamei* aclimatados no sistemas de cultivos SAC e SBF

Os efeitos da infecção experimental com WSSV foram analisados em relação aos níveis de transcritos do gene *UBQ* nos *L. vannamei*. Foi ainda realizada uma comparação entre os níveis desses transcritos entre os animais da pré-infecção e pós-infecção de cada sistema, e comparados os resultados entre os sistemas.

Para análise dos níveis dos transcritos foi necessário utilizar um gene referência, os genes analisados com esse objetivo foram *EF-1 α* , *18S RNAr* e *GADPH*, sendo o *18S RNAr* selecionado.

4.2.1 Avaliação dos genes referência *EF-1 α* , *18S RNAr* e *GADPH*

Inicialmente, para a análise da transcrição diferencial do gene da Ubiquitina de *L.vannamei* (*LvUBQ*) foi analisada a expressão diferencial dos genes *EF-1 α* , *18S RNAr* e *GADPH*, como candidatos a genes referência. Conforme BUSTIN (2000), as variações quantitativas dos níveis dos transcritos dos genes alvo em um dado grupo experimental devem ser avaliadas de forma comparativa, em relação a pelo menos um gene referência.

Os animais cultivados em SAC apresentaram diferenças nos níveis de transcrição para *EF-1 α* nas brânquias, sendo essa diferença estatística significativa entre os animais da pré e pós-infecção (Tabela 2). Já para os animais cultivados no SBF não foi observada diferença estatística em relação a este mesmo gene. Ainda nas brânquias dos animais infectados e não infectados, os níveis de transcritos do *GADPH*, não mostraram diferença estatística significativa entre os animais aclimatados no SBF e SAC. Entretanto, quando o *GADPH* foi analisado em outros tecidos este gene apresentou diferença transcricional (dados não mostrados). Em se tratando de um gene normalizador, é necessário que o nível de sua transcrição se mantenha constante entre as diversas células e/ou tecidos do organismo estudado. Além disso, recomenda-se, ainda, que os níveis de seus transcritos sejam constantes em todos os estágios do desenvolvimento desse mesmo organismo, ainda, que também não ocorra alteração devida os tratamentos experimentais (BUSTIN, 2000). Dado que o *EF-1 α* e *GADPH* apresentaram diferença transcricional, ou entre os grupos distintos do tratamento experimental, ou entre diferentes tecidos, esses genes não foram utilizados como genes normalizadores nas análises comparativas que se seguiram no presente trabalho.

Tabela 2. Nível da transcrição diferencial do Gene *EF-1 α* nos camarões infectados experimentalmente com o WSSV, em 48h após a infecção, em dois sistemas distintos de cultivo.

Sistema de Cultivo	Nível de transcritos
Água Clara (SAC)	4,8 vezes maior
Bioflocos (BFS)	-

Fonte: elaborada pela autora.

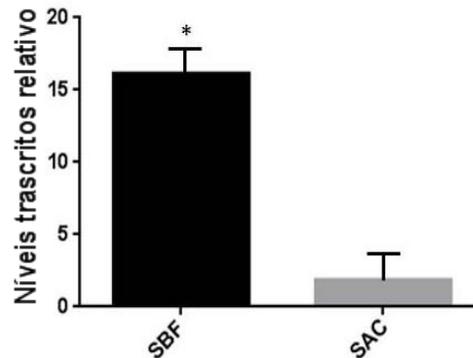
A transcrição do *rRNA18S* se manteve constante, tanto entre diferentes tecidos quanto em relação aos sistemas SBF e SAC. Entanto, neste presente trabalho não se testou o *18S RNAr* como normalizador em diferentes estágios de vida dos *L. vannamei*. Como esse gene não mostrou alteração no nível de seus transcritos nas duas situações citadas, e como há trabalhos na literatura recomendando a sua utilização como gene normalizador em crustáceos (SHEKHAR; KIRUTHIKA; PONNIAH, 1968; GAO; GILLEN, WHEATLY, 2006; DHAR *et al.*, 2009; UNDERWOOD *et al.*, 2010; PHINYO *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2015), o *RNAr 18S* foi utilizado como gene normalizador nas análises realizadas no presente estudo.

4.2.2 Transcrição diferenciação do gene da ubiquitina de *L.vannamei*

Nos dois sistemas, SBF e SAC, como citado anteriormente, com base nos sinais clínicos observados, pode-se considerar que a infecção foi estabelecida a partir do desafio experimental. Desta forma, as análises relativas aos níveis de transcritos da UBQ em *L. vannamei* foram abordadas em termos comparativos entre camarões infectados e não-infectados.

Os níveis de transcrição de *UBQ* analisados em brânquia dos camarões *L. vannamei* mantidos em SAC não apresentaram diferença estatística significativa, em relação aos camarões infectados e aqueles não infectados com o WSSV (Figura 11). Entretanto, os dados das análises realizadas nos *L. vannamei* mantidos no SBF indicam que, após a infecção experimental houve aumento do nível de transcritos em relação ao grupo pré-infecção ($p < 0,05$) igual a 16,14 vezes (Figura 11).

Figura 11. Níveis de transcritos de *UBQ* nos animais infectados experimentalmente com WSSV durante 48h em relação ao grupo pré-infecção. As análises foram realizadas em brânquia dos *L. vannamei* aclimatados em SBF (Sistema Bioflocos) e SAC (Sistema Água Clara). * refere-se à diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



Fonte: elaborado pela autora.

Como os animais do SAC não apresentaram diferença em relação aos níveis de transcritos de *UBQ*, este resultado pode indicar que a infecção do WSSV não estimulou a expressão da *UBQ* nesse sistema. Entretanto, os animais infectados do SBF mostraram uma indução maior da *UBQ* em relação aos animais não infectados mantidos no mesmo sistema. Com base nesse resultado, poder-se-ia sugerir que o SBF teve maior impacto em *UBQ* nos camarões infectados pelo WSSV.

Estudos anteriores mostraram que camarões infectados pelo vírus WSSV mostram níveis mais elevados de transcrição do gene *UBQ* (VIDYA; GIREESH-BABU; PRASAD, 2013; WANG, 2006). Müller (2009), em seu estudo com animais coletados em fazendas de cultivo, observou um aumento na expressão relativa do gene *UBQ* de 91 vezes em camarões infectados naturalmente pelo WSSV.

Além disso, em outro estudo, realizado em condições de laboratório, *L. vannamei* expostos a Permetrina, inseticida utilizado na rizicultura, não foi observada diferença quanto à transcrição diferencial do gene da *LvUBQ*. Entretanto, quando estes animais, além da exposição à Permetrina também foram infectados com o WSSV, foi detectada alteração na transcrição deste gene (MOSER, 2011).

Retomando a questão da mortalidade dos camarões ao longo do presente estudo, associada à infecção experimental, foi observado que um total de 21 camarões morreram em 48h p.i., sendo seis animais em SAC e quinze no SBF, ou seja, a mortalidade foi maior entre os *L. vannamei* infectados com o vírus no SBF. A este resultado, acrescenta-se a detecção da transcrição mais elevada do gene da *LvUBQ* nos camarões do SBF, em contraposição aos níveis observados em SAC. Diante disso, pode-se inferir que as condições encontradas no

SBF poderiam ter influenciado e potencializado o aumento da mortalidade, e, também, a expressão diferencial do gene da *LvUBQ* nesse sistema.

De acordo com SNIESZKO (1973), as enfermidades são decorrentes da interação entre patógeno, hospedeiro e ambiente, uma vez que fatores inerentes a cada um desses elementos pode acarretar em um desequilíbrio e afetar negativamente essa interação. O ambiente de cultivo, onde o camarão está inserido, pode apresentar diferentes características, podendo expor o animal a fatores estressores, o que pode afetar diretamente sua capacidade imunológica para enfrentar os patógenos.

Em condições de cultivo, diversos parâmetros inerentes ao cultivo e ao manejo dos camarões podem influenciar não só a sobrevivência, como também o desenvolvimento, o crescimento e a sanidade dos animais.

Quando os parâmetros de manejo são devidamente controlados podem contribuir diretamente para diminuir a mortalidade dos animais no cultivo (BOYD; TUCKER, 1998). Desta forma, o possível estresse associado ao manejo inadequado ao longo do experimento, o qual poderia ter acarretado no aumento da mortalidade, pode ser descartado no presente estudo. Os parâmetros de cultivo e manejo neste trabalho foram cuidadosamente controlados, observando-se, inclusive, a boa sobrevivência dos camarões nos grupos controles de SBF e SAC.

Como parte integrante de outro estudo, igualmente associado ao experimento realizado e aqui relatado, foram também coletadas amostras de hemolinfa tanto dos camarões não infectados, quanto infectados com o WSSV, de ambos os sistemas, SAC e SBF. No caso das amostras de hemolinfa dos camarões não infectados pelo WSSV, evidenciou-se a ausência de bactérias circulantes, após o seu plaqueamento em Ágar TSB. Entretanto, o contrário foi observado nos camarões inoculados com o WSSV, ou seja, foi observado crescimento bacteriano nessas amostras de hemolinfa oriundas de ambos os sistemas, SAC e SBF, e igualmente plaqueadas (VALENTE *et al*, 2016).

Dado que as amostras de hemolinfa de *L. vannamei* infectados com o WSSV apresentam a presença de bactérias, poder-se-ia sugerir que a infecção por esse vírus esteja funcionando como porta de entrada para outros micro-organismos no hospedeiro. Como o SBF pode ter uma quantidade maior de micro-organismo, ou até mesmo a presença de micro-organismos potencialmente mais patogênicos do que aqueles encontrados no SAC, isso possibilitaria uma infecção mais severa, o que poderia explicar a mortalidade mais elevada entre os animais do SBF.

A infecção viral pelo WSSV pode tornar os camarões *L. vannamei* mais suscetíveis e vulneráveis a certas condições, como ao estresse ambiental e à presença de outros agentes etiológicos; condições estas que podem ocorrer simultaneamente (MANIVANNAN *et al.*, 2002; MENG *et al.*, 2010).

Durante o período de aclimação de quinze dias, os camarões do SBF permaneceram em um tanque com capacidade para 1000L de água (n=300), usual para as condições de cultivo no LCM. Já os animais do SAC permaneceram em um tanque com capacidade para 5000L de água (n=160). Durante esse período, foi observado canibalismo no SBF, enquanto no SAC em nenhum momento isto foi observado. Dessa forma, poderia ser sugerido que os animais no SBF estiveram mais sujeitos a estresse por densidade de estocagem, além de estarem expostos a uma maior quantidade e diversidade de micro-organismos neste período, o que poderia potencialmente contribuir para uma maior susceptibilidade a estes agentes patogênicos, quando da infecção com o WSSV.

Por outro lado, o SBF, pelas suas características inerentes, permite o cultivo em uma alta densidade de estocagem (OTOSHI *et al.*, 2007). A alta densidade acarreta, conseqüentemente, a diminuição do espaço para os camarões, gerando, assim, estresse, e, conseqüentemente, levando ao canibalismo (ARNOLD *et al.*, 2005; FRÓES, 2012).

Os animais do SAC não foram submetidos ao mesmo estresse no mesmo período de quinze dias de aclimação. Essa diferença em relação a este período inicial poderia ter influenciado a resposta molecular contra o vírus WSSV durante a infecção, o que poderia estar refletido na ausência de transcrição diferencial do gene da *LvUBQ* neste grupo de animais.

Cabe destacar que, em 48h p.i., os camarões do SBF apresentaram uma taxa de mortalidade duas vezes superior em relação ao SAC, apresentando, ainda, uma maior transcrição do gene da *LvUBQ*. A ausência da transcrição diferencial da *LvUBQ* nos animais do SAC poderia estar relacionada ao menor estresse pré-infecção. Por outro lado, não poderia ser descartada a hipótese de certo condicionamento prévio do sistema imune em um estado mais estimulado pelo contato com os micro-organismos presentes no SBF durante o período de aclimação.

No estudo de JEENA *et al.* (2012) as condições de manejo foram semelhantes às descritas no presente trabalho. JEENA *et al.* (2012) mantiveram camarões, *Penaeus monodon*, em SAC em tanques com capacidade para 1.000 L (25 camarões / tanque), durante duas semanas, antes da i.e. com o WSSV, ou seja, em baixa densidade de estocagem. Ao analisar a

expressão diferencial do gene da Ubiquitina de *P.monodon* (*PmUBQ*), após a i.e. com o WSSV, em 24 horas pós-infecção os animais mostraram indução do *PmUBQ* 24.0 vezes maior. Entretanto, em 48 h, os animais mostraram uma diminuição deste nível de transcrição, o qual mostrou uma indução inferior a 2.0 vezes. Nosso estudo não avaliou a transcrição da *LvUBQ* em 24h p.i.. No entanto, os níveis de transcrição nos camarões do SAC após este intervalo de tempo p.i. foi igual a 1.84 vezes.

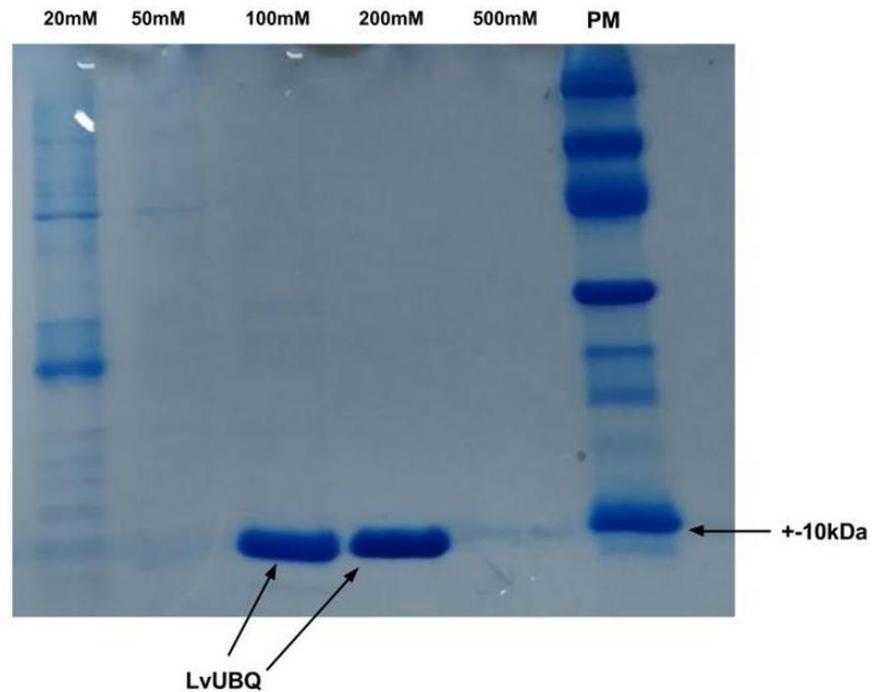
Comparando-se os dois estudos, observamos que a transcrição da UBQ mostrou um perfil semelhante. Assim, podemos sugerir que o ambiente e as condições às quais os camarões foram submetidos podem interferir na sobrevivência e nas respostas moleculares frente ao WSSV. Além disso, há relatos de que camarões infectados com o WSSV mostram um aumento no número de células apoptóticas (HENDERSON; STUCK, 1999, *apud* LEU *et al.*, 2012), sabendo-se que a UBQ está envolvida com o processo de apoptose (LEU *et al.*, 2012).

Quando as células são infectadas com vírus tem início o processo de apoptose para inibir a multiplicação viral, através da eliminação da célula infectada (KOYAMAN *et al.*, 2000). A infecção por WSSV induz a apoptose em crustáceos. A extensão do apoptose está relacionada à gravidade da infecção pelo WSSV, além de variar em relação a diferentes tecidos e órgãos, também dependendo da espécie do hospedeiro infectado (LEU *et al.*, 2012). O aumento da UBQ nas células infectados com WSSV pode está relacionado com o aumento da apoptose.

4.3 Teste de atividade antimicrobiana *in vitro*

Quando a *LvUBQ* recombinante foi expressa em *E. coli*, observou-se um aumento de quantidade da proteína, após a adição do IPTG. A *LvUBQr* obtida após a expressão heteróloga e indução foi purificada por cromatografia de afinidade, estando a concentração de Imidazol necessária para obtenção da proteína com grau de pureza > 90% na faixa de 100mM a 200mM. Conforme mostrado na Figura 12, a expressão heteróloga e a purificação foram realizadas com êxito. A massa molecular da *LvUBQ* é de 8.5 kDa. Entretanto, em função da estratégia de purificação da proteína, uma cauda de histidina foi adicionada à mesma, através do vetor pET-14b, correspondendo a um aumento em torno 2.0 kDa, sendo, conseqüentemente, a massa molecular da *LvUBQ* recombinante (*LvUBQr*) obtida neste trabalho em torno de 10 kDa (Figura 12).

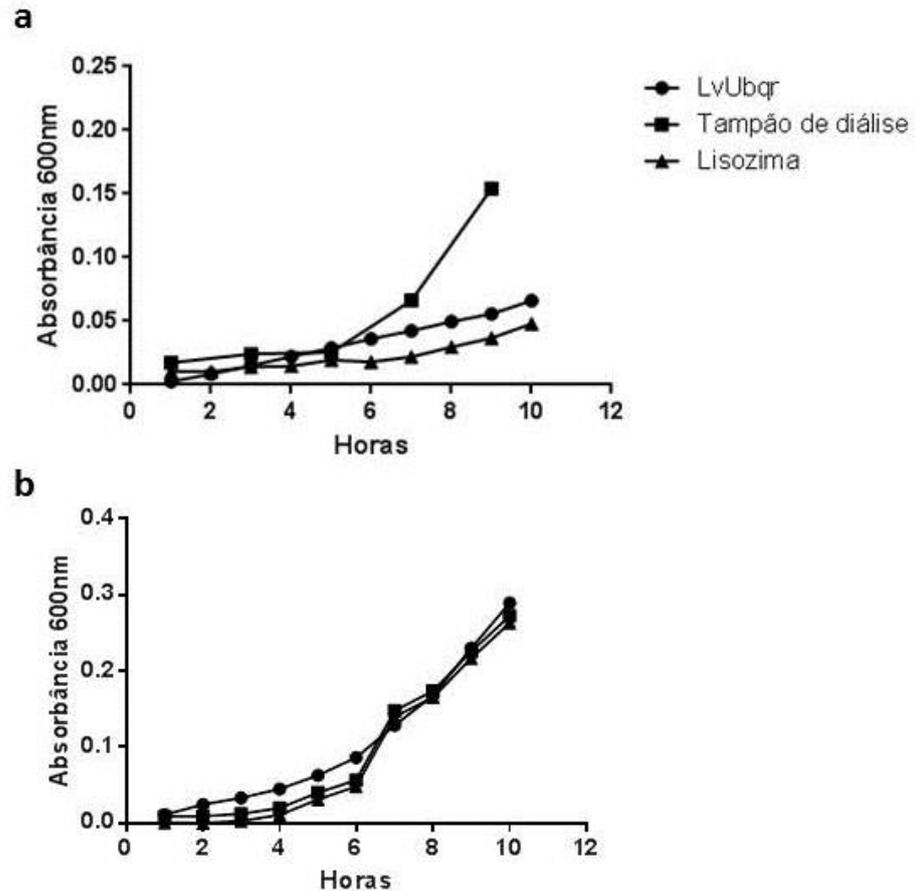
Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida 18%, em condições desnaturantes (PAGE-SDS). Alíquotas das frações de *LvUBQr* obtidas através por cromatografia de afinidade (IMAC), na presença de concentrações distintas de Imidazol presente no tampão utilizado para sua eluição e purificação: 20, 50, 100, 200 e 500 mM. PM: marcador de peso molecular.



Fonte: Foto da autora.

A *LvUBQr* purificada e dialisada foi utilizada para realizar os ensaios de atividade antimicrobiana *in vitro*, conforme descrito em Material e Métodos, frente a *Vibrio alginolyticus*. Foi observado um aumento da absorbância nos poços contendo tampão de diálise ao longo do tempo de incubação, conforme mostrado na Figura 13. Por outro lado, um perfil oposto foi observado nos poços contendo *LvUBQr* e lisozima (Figura 13).

Figura 13. Resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana *in vitro* da LvUBQr contra o *V. alginolyticus*. Valores de absorbância *versus* tempo de incubação. A concentração de lisozima e de LvUBQr foram iguais. Em **a** e **b**, as concentrações utilizadas foram 3,3 e 0,015 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.



Fonte: elaborada pela autora.

Tanto na presença de lisozima, quanto de LvUBQr, na concentração igual a 3,3 $\mu\text{g/mL}$, foi observado um aumento da absorbância ao decorrer do tempo de incubação (Figura 13). O aumento da absorbância indica crescimento bacteriano, tendo-se observado um crescimento bacteriano mais acentuado nos poços contendo o tampão de diálise. Nota-se que a partir de sete horas de incubação houve aumento da absorbância nos poços contendo tampão de diálise. Por outro lado, na presença de 3,3 $\mu\text{g/mL}$ de LvUBQr, ou de lisozima, isso não foi observado de forma semelhante. Apesar dessa concentração não inibir completamente o crescimento do *V. alginolyticus*, os valores de absorbância foram comparativamente menores em relação àqueles observados na presença do tampão de diálise.

Com base nos resultados apresentados foi evidenciado que a LvUBQr inibiu parcialmente o crescimento de *V. alginolyticus in vitro*.

A concentração inibitória mínima (CIM) da atividade antimicrobiana de uma dada proteína ou peptídeo depende da natureza e das características da molécula, de sua origem, e, ainda, da espécie de micro-organismo alvo. Por exemplo, a ação antimicrobiana, em termos de CIM, da lisozima de ovo de galinha para *Micrococcus luteus* foi determinada como igual a 5mg/ml, enquanto que para *Candida albicans* como igual a 10mg/ml (RUAS, 2010).

Em invertebrados, a atividade antimicrobiana da UBQ frente a bactérias do gênero *Vibrio* foi recentemente investigada com a UBQ da ostra *Crassostrea gigas* (CgUBQ) (SEO, 2013). A atividade antimicrobiana da CgUBQ foi investigada contra onze microrganismos diferentes, sendo a CIM contra *V. parahaemolyticus* determinada como igual a 9µg/ml (SEO, 2013).

Recentemente, Matos (2015) analisou a sequência primária e realizou a modelagem 3D da LvUBQ, comparando seus resultados com a UBQ humana (HsUBQ). Com base nessa comparação, seu estudo mostrou que a região C-terminal da LvUBQ apresenta repetições de motivos Prolina-Arginina (Pro-Arg), enquanto que a HsUBQ apresenta duas repetições de Leucina-Arginina (Leu-Arg), seguidas por uma ou duas glicinas finais na mesma região C-terminal.

Essa diferença na composição e na sequência dos aminoácidos da região C-terminal observada entre as duas moléculas pode representar uma característica importante também para a atividade biológica da proteína, uma vez que, no caso da LvUBQ, essa região pode se apresentar carregada positivamente no pH intracelular, enquanto que na HsUBQ a mesma região apresenta-se como neutra.

Por outro lado, a atividade antimicrobiana da CgUBQ pode estar relacionada com a sua região-C terminal, justamente por ela não possuir as duas glicinas finais (Gly75 e Gly76) que estão presentes na HsUBQ, podendo apresentar atividade antimicrobiana mais proeminente em relação a esta última (MATOS, 2016). Como a ubiquitina de *L. vannamei* apresenta a região-C terminal carregada positivamente, esta observação poderia fundamentar os resultados obtidos em nosso estudo, relativos ao seu efeito sobre o crescimento bacteriano.

As características estruturais da LvUBQ podem estar associadas com a inibição parcial do crescimento do *V. alginolyticus*, conforme nossos ensaios *in vitro*. Entretanto, os testes foram realizados com a LvUBQr, a qual apresenta uma cauda de histidina. Assim sendo, não podemos descartar totalmente a hipótese de que essa porção adicional na molécula poderia ser a responsável pela interação com a bactéria, inibindo o seu crescimento. A realização de ensaios de atividade anti-microbiana *in vitro* futuros, após a remoção desta cauda de histidina

da *LvUBQr* poderão fornecer subsídios para esta questão, bem como a inclusão de outras espécies de bactérias nos ensaios, frente a uma gama mais ampla de concentração da proteína em estudo.

5 CONCLUSÕES

Os camarões *Litopenaeus vannamei* aclimatados no SAC após 48h de infecção com WSSV não apresentaram alteração na transcrição diferencial da Ubiquitina, diferentemente dos animais aclimatados no SBF apresentaram.

Pode-se considerar que durante o período de aclimação, os camarões mantidos em SAC não estiveram submetidos aos mesmos fatores presentes no SBF, o que poderia ter influenciado a resposta molecular contra o vírus WSSV, considerando a resposta em termos do nível de transcritos para o gene UBQ.

O SBF parece potencializar os efeitos da infecção viral no que concerne os níveis de transcritos da UBQ.

A ubiquitina recombinante de *L.vannamei* purificada mostrou atividade antimicrobiana frente a *V. alginolyticus in vitro* compatível com aquela da lisozima nas mesmas condições.

6 PERSPECTIVAS

A avaliação da atividade anti-microbiana *in vitro* da Ubiquitina de *Litopenaeus vannamei*, obtida a partir de expressão heteróloga, pode ser ampliada, após a remoção das cauda de histidina da LvUBQr.

A realização dos referidos ensaios frente a concentrações maiores da proteína, e frente a uma gama mais ampla de micro-organismos, poderá fornecer subsídios adicionais para melhor caracterizar sua atividade antimicrobiana, bem como a realização de testes *in vivo* em *L.vannamei*.

APÊNDICE

Apêndice A – Média dos parâmetros de qualidade de água coletados durante o período de aclimação dos camarões aos SAC e SBF. Dados integrantes da Tese de Doutorado de Cecília de Souza Valente, e gentilmente cedidos pela mesma.

Parâmetro	Água clara	Bioflocos
Salinidade (ppt)	31,6	31,1
Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)	6,4	5,9
Sólidos suspensos totais (mg.L ⁻¹)	-	452,7
Amônia (mg.L ⁻¹)	0,2	0,1
pH	7,7	7,5
Temperatura (°C)	27,8	30,2
Alcalinidade (mg.L ⁻¹)	124	148

REFERÊNCIAS

- ACCC - Associação Cearense de Criadores de Camarão. Disponível em: <http://pecnordestefaec.org.br/2017>. Acesso: Novembro de 2017.
- ANDERSON, D. et al. Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors. **Science**, v. 250, p. 979– 982,1990.
- ANGGRAENI, M.S.; OWENS, L. The haemocytic origin of lymphoid organ spheroid cells in the penaeid prawn *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 40, p. 85– 92, 2000.
- ARNOLD, S.J. et al. Response of juvenile brown tiger shrimp (*Penaeus esculentus*) to intensive culture conditions in a flow through tank system with threedimensional artificial substrate. **Aquaculture**, v.246, p.231238, 2005.
- BARRACO, M.A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. **Imunologia de crustáceos com ênfase em camarões**. Universidade Federal de Santa Catarina, (2007).
- BAUMANN, P.; SCHUBERT, R. H.W. Family II. Vibrionaceae. Vernon 1965. In Krieg N.R.; Holt, J. G. (eds): **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 1, p. 516-550, Baltimore, Williams & Wilkins, 1984.
- BOYD, C.E.; TUCKER, C.S. **Pond aquaculture water quality management**. Boston: Kluwer, p.700-711, 1998.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BURFORD, M.A.; LORENZEN, K. Modeling nitrogen dynamics in intensive shrimp ponds: the role of sediments remineralization. **Aquaculture**, v.229, p.129–145, 2004.
- BUSTIN, S.. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal Of Molecular Endocrinology**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.169-193, 1 out. 2000. BioScientifica. <http://dx.doi.org/10.1677/jme.0.0250169>.
- CHANDRAKALA, N.;PRIYA, S. Vibriosis in Shrimp Aquaculture: A Review. **International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology**, p. 27-33. abr. 2017.
- CHANG, P. S. et al. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 27, p.131-139, 1996.
- CHEN, L. L. et al. Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spots syndrome virus. **Virology**, v. 301, p.136-147, 2002.

- CHOU, H. Y. et al. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.23, p.165-173, 1995.
- COSTA, S. W.; FRAGA, A.P.M.; ZAMPARETTI, A.S.; MARQUES, M.R.F.; ANDREATTA, E.R. Presence of the white spot syndrome virus (WSSV) in wild decapods crustaceans in coastal lagoons in southern Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.64, n.1, p.209-216, 2012.
- COSTA, R.A.; VIEIRA, G.H.F.; VIEIRA, R.H.S.F.; SAMPAIO, S.S. Vibrio em amostras de água de viveiros de cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, no Ceará Brasil. **Atlântica**, v.31, p.177-182, 2009.
- COSTA, R. A. **Pesquisa de Vibrio no cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no Estado do Ceará**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais. Instituto de Ciências do Mar) – Universidade Federal do Ceará, Ceará.
- COUCH, J. A. Diseases, parasites and toxic responses of commercial penaeid shrimp of the Gulf of Mexico and South American Coasts of North America. **Fishery Bulletin**, v. 76, p.1-44, 1978.
- DHAR A.K. et al. Read Validation of reference genes for quantitative measurement of immune gene expression in shrimp. **Molecular Immunology**, v.46, p.1688–1695, 2009.
- DAVIS, M.; GACK, M. U. Ubiquitination in the antiviral immune response. **Virology**, v. 480, p.52-65. 2015
- DECHET, A.M.; KORAM, N.; PAINTER J. Nonfoodborne *Vibrio* infections: an important cause of morbidity and mortality in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, p.1997–2006, 2008.
- DURAND, S. et al. Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.27, p.59-66, 1996.
- DURAND, S. et al. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 29, p.205–211, 1997.
- ENGSTROM, Y. Induction and regulation of antimicrobial peptides in *Drosophila*. **Developmental and Comparative Immunology**, v.23, p.345–358, 1999.
- 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.
- FENG, S. et al. Recent progress in the development of white spot syndrome virus vaccines for protecting shrimp against viral infection. **Archives Of Virology**, [s.l.], v. 162, n. 10, p.2923-2936, 24 jun. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-017-3450-x>.
- FLEGEL, T.W. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 31, p. 217-231, 2007.

FINLEY, D.; CHAU, V. Ubiquitination. **Annual Review Of Cell Biology**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.25-69, nov. 1991. Annual Reviews.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cb.07.110191.000325>.

FRELIER, P. F.; LOY, J. K. REDDINGTON, J. Diferenciação no campo e em laboratório do NHP e da vibriose. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, set. 2004.

FRÓES, C. N. **Aprimoramento das técnicas de manejo do cultivo do camarão branco *Litopenaeus vannamei* (Boone) em sistema de bioflocos**. 2012. Tese (Doutorado em Aquicultura), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

GAO, Y.; GILLEN, C.M.; WHEATLY, M.G. Molecular characterization of the sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) from crayfish *Procambarus clarkii*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.144, p.477–487, 2006.

GILLESPIE, J. P.; KANOST, M. R.; TRENZCEK, T. Biological mediators of insect immunity: A Review. **Entomology**, v.42, p.611–643, 1997.

GOLDSTEIN, G., SCHEID, M.S., HAMMERLING, V., BOYSE, E.A., SCHLESINGER, D.H., NIALL, H.D. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.72, p.11–15, 1975.

He, F. et al. Viral ubiquitin ligase WSSV222 is required for efficient white spot syndrome virus replication in shrimp. **J. Gen. Virol.**, v.90, p.1483-1490, 2009.

HE, N.; QIN, Q.; XU, X. Differential profile of genes expressed in hemocytes of White Spot Syndrome Virus-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization. **Antiviral Research**, v. 6 (1), p. 39-45, 2005.

HENDERSON, T.; STUCK, K.; Induction of apoptosis in response to white spot syndrome virus in the pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. In: **Anon, editor. Book of abstracts, aquaculture America 1999**, Tampa, Florida. Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society; 1999.

HICKE, L., Protein regulation by monoubiquitin. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.2, p.1905–201, 2001.

INOUE, K. et al. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: electron microscopic evidence of the causative virus. **Fish Pathology**, v.29, p.149-158, 1994.

JEENA, K. et al. Expression profiling of wssv orf 199 and shrimp ubiquitin conjugating enzyme in wssv infected *Penaeus monodon*. **Asian-Aust J Anim Sci.**, v. 25 p. 84-89. 2012

JIANG, H. et al. Identification and characterization of reference genes for normalizing expression data from red swamp crawfish *Procambarus clarkii*. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, p.21591-21605, 2015.

KONEMAN, E.W. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5. ed. São Paulo: MEDSI, 2001.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; SCHRECKENBERGER, C. W. J. W. C. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e atlas colorido**. Koogan S.A. : 5ª ed. 2001.

KUMAR, S. et

al. Molecular typing of bacteria *Vibrio harveyi* and *V.alginolyticus* from shrimp farming systems. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 36, p. 4350, 2007.

LEU, J. et al. A model for apoptotic interaction between white spot syndrome virus and shrimp. **Fish & shellfish immunology**, p.1-7, 2012.

LIGHTNER, D. V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas). A review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v 106, p.110-130. Jan. 2011.

LIGHTNER, D.V. Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.36, p.229-248, 2005.

LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture**, v. 164, p.201–220, mai.1998.

LIGHTNER, D.V. et al. Experimental Infection of Western Hemisphere Penaeid Shrimp with Asian White Spot Syndrome Virus and Asian Yellow Head Virus. **Journal of Aquatic Animal Health**, p.271–281, 1998.

LO, C. F. et al. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 35, p. 175-185, 1999.

LO, C. F. et al. Detection of baculovirus associated with White spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.25, p.133-141, mai. 1996a.

LO, C.F. et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 27, p. 215–225, 1996b.

MANJUSHA, S. et al. Multiple antibiotic resistances of *Vibrio* isolates from coastal and brackish water areas. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, p.201 – 206, 2005.

MARTINS, P.C.C. **Influência das condições ambientais e das técnicas do manejo de produção sobre a ocorrência de enfermidades no cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, no Estado do Ceará**. 2003. Tese (Doutora em Ecologia e Recursos Naturais) – Curso De Pós-Graduação Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

MATOS, G. M. **Expressão heteróloga da ubiquitina de *Litopenaeus vannamei* e avaliação da sua transcrição frente a infecção pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV)**. 2015. TCC (Graduação), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

Disponível em:

<<https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/174762/Gabriel%20Machado%20Matos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 11 nov. 2017.

MAYO, M. A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. **Archives of Virology**, v. 147, p.1655-1663, 2002.

MENG, S. et al. Transmission dynamics of rabies in China over the last 40 years: 1969–2009 **Journal of Clinical Virology**, v.49, p.47-52, 2010.

MENDES, E. S. *Vibrio* spp. Isolados de camarão e água de cultivo de fazenda marinha em Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 1191-1199, 2009.

Ministério da Agricultura/Parlamento da Austrália. Disponível em:

https://www.aph.gov.au/About_Parliament/Parliamentary_Departments/Parliamentary_Library/pubs/rp/rp1718/Chronology/WhiteSpotDiseaseAustralia. Acesso: Novembro de 2017.

MONROY-DOSTA, M. et al. Composición y abundancia de comunidades microbianas asociadas al biofloc en un cultivo de tilapia. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v.48, p. 511-520, 2013.

MOSER, J.R. **Respostas bioquímicas do camarão-branco, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), exposto ao inseticida Carbofuran e determinação da prevalência natural do vírus da Necrose Hipodermal e Hematopoiética Infecciosa – IHHNV**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina. 2005.

MOSER, J. R. **Biomarcadores moleculares no camarão branco, *Litopenaeus vannamei* (crustacea: decapoda), submetido a estresse ambiental e infectado pelo vírus da síndrome da mancha branca (White Spot Syndrome Virus, WSSV)**. 2011. 93f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2011.

MÜLLER, I. C. **Genes diferencialmente expressos em camarões de cultivo *Litopenaeus vannamei* infectados pelo vírus da síndrome da mancha branca e genotipagem de isolados geográficos brasileiros do vírus**. 2009. 150f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2009.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia medica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

NEWTON, A. et al. Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996–2010: review of surveillance data from 2 systems. **Clinical Infectious Disease**, v.54, 2012.

NUNAN, L. M.; POULOS, B. T.; LIGHTNER, D. V. The detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) and Yellow Head Virus (YHV) in imported commodity shrimp. **Aquaculture**, v. 160, p.19-30, 1998.

NUNAN, L. M.; LIGHTNER, D. V. Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). **Journal of Virology Methods**, v. 63, p.193-201, 1997.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda. **Revista Panorama da Aquicultura**, v.12, p. 23 – 33, 2002.

ÖZEL, M.; HOLLAND, G. **Vibrio cholerae**. 2014. Disponível em: <http://www.rki.de/EN/Content/infections/Diagnostics/NatRefCentresConsultantLab/CONSULAB/EM-images/EM_Tab_Vibrio_cholerae_en.html?nn=2371422>. Acesso em: 01 dez. 2017.

PHINYO, M. et al. Characterization and expression of cell division cycle 2 (Cdc2) mRNA and protein during ovarian development of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. **General and Comparative Endocrinology**, v.193, p.103–111, 2013.

PICKART C.M.; EDDINS M.J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1695, p.55-72, 2004.

POERSCH, L. et al. Perspectivas para o desenvolvimento dos cultivos de camarões marinhos no estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 4, p.1337-1343, ago. 2006.

ROULSTON, A.; MARCELLUS, R.C.; BRANTON, P.E. Viruses and apoptosis. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p.577-628, 1999.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, J. G.; AGUIRRE-GUSMÁN, G.; MEJÍA-RUIZ, H. White Spot Syndrome Virus in cultured shrimp: A review. **Aquaculture Research**, v.38, p.1339-1354, 2007.

SCHUUR, A. M. Evaluation of biosecurity applications for intensive shrimp farming. **Aquacultural Engineering**, v. 28, p.3-20, 2003.

SEIFFERT, W. A mancha branca em Santa Catarina. **Revista da ABCC**, p. 34-36, 2005.

SEO, J. et al. Purification and antimicrobial function of ubiquitin isolated from the gill of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Molecular Immunology**, v.53, p. 88-98. 2013.

SHEKHAR, M.S.; KIRUTHIKA, J.; PONNIAH, A.G. Identification and expression analysis of differentially expressed genes from shrimp (*Penaeus monodon*) in response to low salinity stress. **Fish and Shellfish Immunology**, v.35, p.1957–1968, 2013.

SHEVACH, E. M. et al. Ir GENES AND ANTIGEN RECOGNITION. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, [s.l.], v. 249, n. 1, p.541-547, fev. 1975. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1975.tb29103.x>.

SHI, Z. et al. Response of crayfish, *Procambarus clarkii*, haemocytes infected by white spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, v.28, p.151–156, 2005.

SLIFKA, K.J.; NEWTON, A.; MAHON, B. *Vibrio alginolyticus* infections in the USA, 1988–2012. **Epidemiology and Infection**, v145, p. 1491-149, 2017.

SNIESZKO, S.F. Diseases of fishes and their control in the US. In **The Two Lakes Fifth Fishery Management Training Course Report**. Jansen, London, p. 55–66, 1973.

TAPAY, L.; NADALA, C.; LOH, P. A polymerase chain reaction protocol for the detection of various geographical isolates of white spot virus. **Journal of Virological Methods**, v.82, p.39-43, 1999.

THOMPSON, F. L.; LIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of vibrios. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, p.403-431, set. 2004.

TU, Y. et al. The Ubiquitin Proteasome Pathway (UPP) in the regulation of cell cycle control and DNA damage repair and its implication in tumorigenesis. **International Journal Of Clinical And Experimental Pathology**, p. 726-738, out. 2012.

VALENTE , C.S. , ORTIZ, K.O.; DEBERSCHIMDT, R.; MARQUES, M. R. F. Molecular responses in *Litopenaeus vannamei* kept in BFS and infected with WSSV. **European Aquaculture Society Meeting**. Edimburgo, Scotland. 2016.

VAN HULTEN, M.C. et al.. Identification of two major virion protein genes of whitespot syndrome virus of shrimp. **Virology**, v.266, p.227–236, 2000.

VANNAMEI shrimp to be harvested from trial farm. Disponível em: <<http://www.thehindu.com/news/cities/Kochi/vannamei-shrimp-to-be-harvested-from-trial-farm/article7328002.ece>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

VASEEHARAN, B.; JAYAKUMAR, R.; RAMASAMY, P. PCR-based detection of white spot syndrome virus in cultured and captured crustaceans in India. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 443-447, 2003.

VIDYA, R.; GIREESH-BABU, P.; PRASAD, K.P. White spot syndrome virus manipulates ubiquitin gene expression in *Penaeus monodon*. **Indian Journal of Virology**, v.24, p. 82-84, 2013.

UNDERWOOD, D.J. et al. Gill-associated virus and recombinant protein vaccination in *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v.308, p. 82-88, 2010.

WANG, B.; LI, F.; DONG, B.; ZHANG, X.; ZHANG, C.; XIANG, J. Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray. **Marine Biotechnology**, v. 8, p. 491-500, 2006.

WANG, C. H. et al. Nested polymerase chain reaction and in situ hybridization for detection of nucleopolyhedrosis. **Journal of Virological Methods**, v.84, p.65–75, 2000.

WANG, C. H. et al. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.23, p.239-242, 1995.

WANG, Q.; POULOS, B. T.; LIGHTNER, D. V. Protein analysis of geographic isolates of shrimp white spot syndrome virus. *Archives of Virology*, v.145, p. 263-274, 2000.

WANG, X.; ZHAN, W. Development of an immune chromatographic test to detect White Spot Syndrome Virus of shrimp. **Aquaculture**, v. 255, p.196-200, 2006.

WASIELESKY, J. R. W.; ATWOOD, H.; STOKES, A.; BROWDY, C.L. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**. 2006.

WATSON, D.C., LEVY, W.B., DIXON, G.H. Free ubiquitin is a non-histone protein of trout testis chromatin. **Nature**, v. 276, p.196–198, 1978.

XU, W.J.; Pan, L.Q.; Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. **Aquaculture**, Amsterdam, v.412-413, p.117-124. 2013.

XU, J.; HAN, F., ZHANG, X. Silencing shrimp White Spot Syndrome Virus (WSSV) genes by siRNA. **Antiviral Resear**