



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

Flávio Finati Bernardo Júnior

**Identificação de genes candidatos a uma assinatura transcricional no intestino médio de camarões *Litopenaeus vannamei* associada ao cultivo em bioflocos e à infecção pelo vírus da síndrome da mancha branca**

Florianópolis

2021

Flávio Finati Bernardo Júnior

**Identificação de genes candidatos a uma assinatura transcricional no intestino médio de camarões *Litopenaeus vannamei* associada ao cultivo em bioflocos e à infecção pelo vírus da síndrome da mancha branca**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Prof<sup>ta</sup> Luciane Maria Perazzolo, Dr<sup>a</sup>.  
Coorientador: Prof. Guilherme de Toledo-Silva, Dr.

Florianópolis

2021

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

Bernardo-Júnior, Flávio Finati

Identificação de genes candidatos a uma assinatura transcricional no intestino médio de camarões *Litopenaeus vannamei* associada ao cultivo em bioflocos e à infecção pelo vírus da síndrome da mancha branca / Flávio Finati Bernardo Júnior ; orientador, Luciane Maria Perazzolo, coorientador, Guilherme de Toledo Silva, 2021.

63 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. *Litopenaeus vannamei*. 3. Assinaturas transcricionais. 4. BFT. 5. Imunidade intestinal. I. Perazzolo, Luciane Maria . II. Silva, Guilherme de Toledo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Flávio Finati Bernardo Júnior

**Identificação de genes candidatos a uma assinatura transcricional no intestino médio de camarões *Litopenaeus vannamei* associada ao cultivo em bioflocos e à infecção pelo vírus da síndrome da mancha branca**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof<sup>a</sup>. Luciane Maria Perazzolo, Dr<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Patricia Hermes Stoco, Dr.(a)  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Felipe do Nascimento Vieira, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em aquicultura.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

---

Prof<sup>a</sup>. Luciane Maria Perazzolo, Dr<sup>a</sup>  
Orientadora

Florianópolis, 2021

Ofereço este trabalho a todos que se dedicam ao desenvolvimento da produção sustentável e racional de produtos de origem animal.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à professora Dra. Luciane Maria Perazzolo que me orientou durante este trabalho de mestrado. Sou imensamente grato por toda sua confiança e direção. Com certeza meu aprendizado foi além da bancada e hoje me sinto mais desenvolvido profissional e pessoalmente. Obrigado também por proporcionar todo este conhecimento que adquiri fazendo parte de seu grupo de pesquisa e por ter se mostrado acessível e presente a todo momento.

Também agradeço ao professor Dr. Guilherme Toledo-Silva por ter sido um excelente coorientador. Sempre com muita boa vontade e dando ótimos conselhos que tornaram possível esta pesquisa. Agradeço por ter aceitado participar deste trabalho e me iniciado neste universo de bioinformática.

Não poderia deixar de agradecer aos colegas do LIAA, mestres e mestrandos que me ensinaram muito e prontamente se dispunham em ajudar. Especialmente à Dra. Mariana R. Pilotto que me ensinou os primeiros passos dentro do laboratório, e por ter deixado o material necessário para conduzir os experimentos deste estudo. Também ao mestre Gabriel Matos por ter auxiliado e coordenado no desenho dos iniciadores usados nas análises de RT-qPCR. Da mesma forma eu agradeço ao colega Nicolas Argenta por ter compartilhado seu conhecimento em meus primeiros experimentos com RT-qPCR, e por ter fornecido amostras de cDNAs de hemócitos e intestino de camarões para a análise de expressão tecidual (item 2.6), além de ter ajudado a realizar análises para identificar os genes de referência utilizados para validação por RT-qPCR. Agradeço ainda ao professor Dr. Rafael que faz parte da direção do LIAA e esteve sempre disposto a dar bons conselhos e conhecimento sobre as técnicas de biologia molecular. Aos demais colegas do LIAA, mestres Cairé, Natan e Leandra, aos mestres Gustavo, Talita, Juliana e ao aluno de biologia Breno que sempre me proporcionaram ótimos momentos de aprendizagem e apoio neste grupo de pesquisa. Agradecimento especial ao doutorando Felipe Bittencourt do PPGFAP que me apoiou e auxiliou uso do programa “R” e edição de gráficos.

Aos funcionários da UFSC como e todos os professores que cuidam do ensino, segurança, limpeza, organização e transporte. Também ao Programa de Pós Graduação em Aquicultura e toda sua direção. Pessoas que tornaram parte do meu dia-a-dia e tornaram meu aprendizado de qualidade.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil - (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Os mecanismos moleculares envolvendo a imunidade de camarões associada ao intestino, bem como a interação patógeno-hospedeiro nesse tecido permanecem desconhecidos. O presente estudo avaliou o perfil transcricional no intestino médio (IM) de camarões *Litopenaeus vannamei* e identificou 19 genes candidatos a uma assinatura transcricional associada ao cultivo em bioflocos e ao desafio oral pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). O efeito do cultivo (bioflocos ou água clara) revelou 347 genes diferencialmente expressos (GDEs) no IM de camarões cultivados em bioflocos (B) e 277 GDEs em animais em água clara (C). A presença do WSSV no intestino promoveu diferenças na abundância de *clusters* associada à condição de cultivo. Animais cultivados em água clara (CW/C) registraram 771 GDEs, sendo 359 mais expressos em CW e 412 em C. Já, nos animais cultivados em bioflocos, 834 GDEs foram encontrados no IM, sendo 270 mais expressos em BW e 564 nos animais não desafiados (B). Estes resultados indicam que a infecção pelo WSSV, independente do cultivo, alterou a expressão de um menor número de transcritos no IM dos camarões. O efeito de ambas condições, abiótica (cultivo) e biótica (infecção viral), sobre o perfil transcritômico dos camarões (BW/CW) revelou a expressão diferencial de 117 genes, especialmente em camarões cultivados em água clara (CW; 70). A validação dos dados transcritômicos permitiu identificar 19 genes candidatos (30% dos 67 DEGs avaliados) a compor uma assinatura transcricional do intestino médio em camarões, associada ao cultivo em bioflocos e à infecção pelo WSSV. Entre eles, destacam-se uma *C-type lectin protein*, uma *chitinase 5* e uma *chitin binding-like protein*, além de oito novos transcritos ainda não anotados. Ademais, genes associados às vias de sinalização IMD e JAK-STAT, à defesa antiviral via RNAi e ao gene da dual oxidase-1 apresentaram expressão diferencial em função do sistema de cultivo e/ou da infecção viral. O transcriptoma intestinal de *L. vannamei* permitiu ainda identificar um transcrito do *Wenzou shrimp virus 8*, codificante para a enzima RdRP, cuja expressão foi significativa em animais cultivados em bioflocos e infectados pelo WSSV. Contudo, o significado deste achado é ainda desconhecido. Em conjunto, os resultados do presente estudo servem de base para um melhor entendimento da participação do intestino na imunidade dos peneídeos, bem como podem auxiliar no desenvolvimento futuro de ferramentas biotecnológicas visando o controle de viroses nos cultivos.

**Palavras-chave:** Aquicultura. *Litopenaeus vannamei*. Assinaturas transcricionais. BFT. Imunidade intestinal.

## ABSTRACT

The molecular mechanisms involving the gut-associated immunity of shrimp, as well as the pathogen-host interaction in this tissue remain unknown. The present study evaluated the transcriptional profile in the midgut (MG) of *Litopenaeus vannamei* shrimp and identified 19 candidate genes for a transcriptional signature associated with biofloc culture and oral challenge by white spot syndrome virus (WSSV). The culture effect (biofloc or clear water) revealed 347 differentially expressed genes (GEDs) in MG of shrimp grown in biofloc (B) and 277 GEDs in clear water (C). The presence of WSSV in the gut promoted differences in cluster abundance associated with culture conditions. Animals reared in clear water (CW/C) recorded 771 GEDs, with 359 more expressed in CW and 412 in C. However, in animals reared in biofloc, 834 GDEs were found in MG, being 270 more expressed in BW and 564 in the non-challenged animals (B). These results indicate that WSSV infection, independent of culture, altered the expression of a lower number of transcripts in the shrimps MG. The effect of both abiotic (culture) and biotic (viral infection) conditions on the transcriptomic profile of shrimp (BW/CW) revealed 117 genes with differential expression, especially in shrimp reared in clear water (CW; 70). Transcriptomic data validation allowed the identification of 19 candidate genes (30% of the 67 DEGs evaluated), that potentially compose a midgut transcriptional signature in shrimp associated with biofloc culture and WSSV infection. These include a C-type lectin protein, a chitinase 5 and a chitin binding-like protein, as well eight new transcripts not annotated yet. Furthermore, genes associated with IMD and JAK-STAT signaling pathways, antiviral defense via RNAi and the dual oxidase-1 gene showed differential expression depending on the culture system and/or viral infection. The intestinal transcriptome of *L. vannamei* also allowed the identification of a transcript from Whenzou shrimp virus 8, encoding for the RdRp enzyme, whose expression was significant in animals cultured in biofloc and infected by WSSV. However, the significance of this finding is still unknown. Taken together, the results of the present study serve as basis for a better understanding of the gut participation in the immunity of penaeids, as well may assist in the future development of biotechnological tools aiming to control crops viruses.

**Keywords:** Aquaculture. *Litopenaeus vannamei*. Transcriptional signature. BFT. Gut immunity.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Exemplar adulto do camarão *Litopenaeus vannamei*. ..... 15
- Figura 2** – Gráficos de dispersão (Volcano plot) representando os níveis de expressão de todos os clusters gênicos (32.754) identificados no transcrito do intestino médio de *L. vannamei*. ..... 34
- Figura 3** – Comparação entre o perfil transcricional dos clusters selecionados do transcrito do intestino médio de *L. vannamei* e validados em PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). ..... 38
- Figura 4** – Expressão diferencial de genes relacionados ao sistema imune considerando as comparações entre os grupos experimentais. .... 42
- Figura 5** – Perfil transcricional do gene codificante para uma RdRp codificada pelo “*Wenzhou shrimp virus 8*” (TAX: 1923655).. ..... 43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Sequências de iniciadores utilizados nas análises de expressão relativa dos genes relacionados ao sistema imune .....	30
<b>Tabela 2</b> – Genes selecionados do transcrito de intestino médio de <i>L. vannamei</i> (RNASeq) para validação em PCR quantitativa em tempo real .....	36
<b>Tabela 3</b> – Especificidade tecidual dos transcritos validados do transcrito do intestino médio de <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	40
<b>Tabela 4</b> – Expressão de alguns genes do sistema imune no intestino médio de <i>L. vannamei</i> , associada às condições de cultivo [bioflocos (B) e água clara (C)] e ao desafio com o WSSV (BW e CW).....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>B</b>	(Grupo de animais cultivados em Bioflocos)
<b>BFT</b>	( <i>Biofloc Technology</i> )
<b>BLAST</b>	( <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> )
<b>BW</b>	(Grupo de animais cultivados em Bioflocos e desafiados com WSSV)
<b>C</b>	(Grupo de animais Cultivados em Água Clara)
<b>Cq</b>	(Ciclo de quantificação)
<b>CW</b>	(Grupo de animais cultivados em Água Clara e desafiados com WSSV)
<b>DNA</b>	(Ácido Desoxiribonucleico)
<b>dsRNA</b>	(RNA de dupla fita)
<b>ERN</b>	(Espécies Reativas de Nitrogênio)
<b>ERO</b>	(Espécies Reativas de Oxigênio)
<b>Figura</b>	(Figura)
<b>g</b>	(Gramas)
<b>h</b>	(Hora)
<b>IM</b>	(Intestino médio)
<b>LPS</b>	(Lipopolissacarídeos)
<b>MAMP</b>	(Padrões moleculares associados a microrganismos)
<b>mg</b>	(Miligrama)
<b>min</b>	(Minuto)
<b>miRNA</b>	(micro RNA)
<b>mL</b>	(mililitro)
<b>MMT</b>	(Milhões de toneladas métricas)
<b>mRNA</b>	( <i>Messenger</i> RNA, RNA mensageiro)
<b>PAM</b>	(Peptídeos antimicrobianos)
<b>pb</b>	(pares de bases)
<b>PCR</b>	(Reação em cadeia da polimerase)
<b>PO</b>	(Fenoloxidase)
<b>proPO</b>	(Profenoloxidase)
<b>proPO</b>	(Pró-fenoloxidase)
<b>PRP/R</b>	(Proteínas de reconhecimento de padrões moleculares/receptor)
<b>RNA</b>	(Ácido Ribonucleico)
<b>RNAi</b>	(RNA de interferência)

<b>RNAseq</b>	(Sequenciamento de RNA)
<b>RNAseq</b>	(Sequenciamento de RNA)
<b>RT-qPCR</b>	(PCR quantitativa em tempo real)
<b>s</b>	(Segundo)
<b>SC</b>	(Santa Catarina)
<b>t</b>	(Toneladas)
<b>Tabela</b>	(Tabela)
<b>TM</b>	(Toneladas métricas)
<b>US\$</b>	(Dólar)
<b>WSSV</b>	(White Spot Syndrome Virus)
<b>µg</b>	(Micrograma)
<b>µL</b>	(microlitro)
<b>µM</b>	(Micromolar)

## LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$	(Graus Celsius)
$\leq$	(Maior ou igual)
$\geq$	(Menor ou igual)
$\%$	(Porcentagem)
$\Delta$	(Letra grega delta)
$\mu$	(Micro)
$\pm$	(Mais ou menos)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>15</b>
1.1	OBJETIVOS DO TRABALHO .....	22
1.1.1	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>22</b>
1.1.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>22</b>
1.2	ESTRUTURA DO TRABALHO .....	22
<b>2</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>23</b>
2.1.	INTRODUÇÃO.....	25
2.2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.2.1	<b>Animais e desenho experimental</b> .....	<b>26</b>
2.2.2	<b>Desafio per os com WSSV e coleta dos intestinos médios</b> .....	<b>27</b>
2.2.3	<b>Análise de expressão diferencial dos clusters gênicos</b> .....	<b>27</b>
2.2.4	<b>Seleção de genes diferencialmente expressos para validar os dados transcritômicos.</b> .....	<b>28</b>
2.2.5	<b>Validação dos dados transcritômicos e análise de expressão de genes associados ao sistema imune</b> .....	<b>28</b>
2.2.6.	<b>Especificidade de expressão tecidual dos transcritos validados</b> .....	<b>31</b>
2.3	RESULTADOS .....	32
2.3.1	<b>O perfil transcricional do intestino médio é alterado pelas condições de cultivo e infecção pelo WSSV</b> .....	<b>32</b>
2.3.2	<b>Genes diferencialmente expressos validados por RT-qPCR demonstram diferenças de expressão associadas ao cultivo em bioflocos e à infecção pelo WSSV</b> .....	<b>35</b>
2.3.3	<b>Alguns genes do sistema imune apresentam expressão diferencial em função do cultivo ou da infecção viral</b> .....	<b>41</b>
2.3.5	<b>Identificação de um transcrito codificante para uma RdRp do ribovírus <i>Whenzou 8</i> modulado pelo efeito do cultivo em bioflocos e presença do vírus no intestino médio de camarões</b> .....	<b>42</b>
2.4	DISCUSSÃO.....	44

2.5	AGRADECIMENTOS.....	53
	REFERÊNCIAS .....	53
<b>3</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A produção de organismos aquáticos ou aquicultura é um importante setor dentro do agronegócio a nível mundial, considerando que a contribuição da pesca extrativista nos oceanos permanece estagnada enquanto a produção por animais cultivados cresce em diferentes partes do mundo (FAO, 2020). O cultivo de crustáceos em 2018 foi de 9,4 milhões de toneladas, representando 8,2 % na produção total da aquicultura mundialmente (FAO, 2020). Devido ao seu alto valor de mercado, o cultivo de crustáceos responde por 24,6% (US\$ 57,1 bilhões) do valor total gerado.

A espécie que domina o cultivo de crustáceos no mundo é o camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931), popularmente conhecido como camarão-branco-do-pacífico (Figura 1) que, em 2018, representou cerca de 53% da produção mundial de crustáceos, equivalendo a 87% da produção de peneídeos (FAO, 2020). Esse destaque se dá por essa espécie possuir excelentes características zootécnicas, como elevada taxa de crescimento, tolerância à altas e baixas salinidades, e à alta densidade de estocagem e rusticidade no manejo (BRIGGS et al., 2004).

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



Fonte: Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura – LIAA

A produção global de camarões foi de 4.055.690 toneladas métricas (TM) em 2016, e aumentou para 4.267.500 TM (cerca de 5%), em 2017. Os países asiáticos (China, Tailândia, Vietnã, Indonésia, Malásia, Filipinas, Índia e Bangladesh, principalmente) contribuíram com 3,42 milhões de toneladas métricas (MMT) ou cerca de 80,1% da produção global em 2017. Os países latino-americanos Equador, México, Brasil, Venezuela, Honduras, Nicarágua, Guatemala, Belize, Panamá e Peru produziram cerca de 756.430 toneladas (17,7%) e países de

outras partes do Globo foram responsáveis por cerca de 85.000 TM (2 %) (JORY, 2018). No Brasil, a região Nordeste concentra 99,4% da produção total de camarões marinhos, sendo o Rio Grande do Norte o principal estado produtor (43,2% da produção), seguido pelo Ceará (28,5%) (IBGE, 2019).

O rápido crescimento e o uso de técnicas de maneira inadequada na carcinicultura são acompanhados de uma série de prejuízos para a sustentabilidade do cultivo a longo prazo (HOSSAIN et al, 2000; RIBEIRO et al, 2014). Entre esses se destacam a contaminação das águas e sedimentos pelo excesso de ração e fezes dos animais; e disseminação de doenças entre os camarões cultivados. Conforme sugerem Sahu et al. (2013) a adubação e alimentação dos viveiros devem ser aplicadas de maneira calculada para não gerar excedentes, pois a maior parte dos problemas ambientais da criação de camarões estão relacionados com efluentes que são gerados no cultivo e liberados no ambiente sem tratamento prévio (ABCC, 2012; SAHU et al, 2013). As enfermidades nos cultivos surgem quando os manejos incorretos constituem um intenso fator de estresse para os animais (PERAZZOLO et al, 2010), causando um desequilíbrio na homeostase e levando ao aumento de infecções oportunistas (EGAN; GARDINER, 2016).

A história da carcinicultura tem sido cenário de sérias pandemias globais e doenças causadas por bactérias, vírus e fungos que têm limitado periodicamente a sustentabilidade do setor. A principal enfermidade causada por bactérias é a doença da necrose hepatopancreática aguda (AHPND, do inglês *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease*), uma doença de origem bacteriana causado pelo *Vibrio parahaemolyticus*. Esse patógeno causou mortalidades em massa em países asiáticos, pela primeira vez na China em 2009, depois no Vietnã e na Malásia em 2011, na Tailândia em 2012, no México em 2013, e em Filipinas em 2015 (OIE, 2019; FAO, 2018). Já as doenças causadas por fungos no cultivo são principalmente fusarioses causadas por infecções de espécies patogênicas do gênero *Fusarium* sp, mas principalmente nos estágios larvais dos camarões em incubadoras (GONÇALVES et al, 2013). Por fim, os vírus são considerados os patógenos mais importantes de camarões, com mais de 20 vírus identificados como patogênicos para camarões, sendo que cinco desses são listados pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) como sendo patógenos de notificação obrigatória (OIE, 2019).

O patógeno viral mais devastador na história da carcinicultura é o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV, do inglês *White spot syndrome virus*), que desde o seu surgimento em 1992, na Ásia e em 1999, nas Américas, ocasionou perdas catastróficas ao setor (LIGHTNER et al., 2012). Todas as espécies de camarões peneídeos estudadas são altamente suscetíveis à infecção pelo WSSV (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008), que podem ser infectados ao longo de todo seu ciclo de vida e em diferentes sistemas de cultivo (NUNES;

FEIJÓ, 2016). Uma vez infectados, os animais apresentam os primeiros sinais clínicos, como natação errática e diminuição das atividades metabólicas, e o aparecimento eventual de manchas brancas na cutícula abaixo do exoesqueleto, associado ao acúmulo de sais de cálcio (WANG et al., 1999; LIGHTNER et al., 2012). Essas manchas brancas não são comumente vistas em *L. vannamei*, mas são frequentes em *Penaeus monodom* infectados. Em cultivos tradicionais semi-intensivos, como em viveiros de terra, a mortalidade pode atingir 100% entre 3 a 10 dias, após o surgimento dos primeiros sintomas (CHOU et al., 1995; WANG, et al., 1999).

O WSSV se replica em células de diferentes tecidos, especialmente as de origem ectodérmica e mesodérmica (CHANG et al., 1996, KOU et al., 1998), incluindo o tecido hematopoiético. Um fato relevante é que a infecção compromete seriamente o sistema imunológico dos camarões, uma vez que o WSSV se replica em hemócitos, que são importantes células imunocompetentes dos camarões (WANG et al., 2002). Adicionalmente, análises ultraestruturais evidenciaram a presença do WSSV também no intestino médio dos animais, que é de origem endodérmica (ARTS et al., 2007). O modelo do ciclo de vida e morfogênese do WSSV foi sugerido por Escobedo-Bonilla et al (2008). Ao longo dessas fases, uma grande variedade de interações moleculares ocorre entre o WSSV e seu hospedeiro (VERBRUGGEN et al., 2016). Essas interações moleculares podem ser fatores-chave para a suscetibilidade do hospedeiro, além de oferecer subsídios para a criação de ferramentas que oportunizem formas de prevenção e/ou tratamento.

Até o ano de 2004, não havia registros oficiais no Brasil de perdas na carcinicultura devido ao WSSV. No entanto, em dezembro daquele ano houve surtos em fazendas no município de Imaruí, sul do estado de Santa Catarina (SC). A carcinicultura catarinense foi altamente impactada pela síndrome da mancha branca, sendo que em 2004 a produção de camarões de 4.189 toneladas caiu para 284,2 toneladas, em 2017 (EPAGRI, 2018). Até o presente momento, a carcinicultura em SC não se recuperou e atualmente existem apenas 10 das 108 fazendas existentes em 2005. Na região Nordeste, surtos de mancha branca foram inicialmente relatados em 2008, em cultivos no Sul da Bahia (ABCC, 2016; NUNES; FEIJÓ, 2016), sendo que o vírus se espalhou rapidamente para os estados vizinhos e reduziu a produção em 21,2% nos últimos anos (IBGE, 2019).

Frente a essa realidade, o uso de medidas profiláticas visando a contenção de doenças e a busca por ferramentas biotecnológicas que aumentem a resistência e a imunocompetência dos animais são de fundamental importância para promover a sustentabilidade da carcinicultura. Nesse sentido, formas diferenciadas de cultivo têm emergido como alternativas aos sistemas

tradicionais. Como exemplo, tem-se o cultivo superintensivo utilizando bioflocos (BFT ou *Biofloc Technology*) que surgiu simultaneamente para camarões nos Estados Unidos e tilápias, em Israel (AVNIMELECH, 1999; TAW, 2010). Essa tecnologia se caracteriza por um cultivo em altas densidades de estocagem, porém de maneira sustentável e segura sanitariamente, com ausência ou baixa renovação de água no sistema. Em cultivos tradicionais, os resíduos gerados pelos tanques são liberados no ambiente sem um tratamento prévio, e essa prática ambientalmente incorreta é uma das principais formas de se propagar patógenos entre as fazendas de camarões (MOSS et al., 2012).

Os bioflocos são compostos por uma complexa comunidade microbiana formada não só por bactérias, mas também por algas, fungos, protozoários, rotíferos, nematoides e outros organismos. Em um estudo recente realizado em nosso laboratório, Pilotto et al. (2020) sugerem que o cultivo BFT melhora as condições gerais de saúde dos camarões, quando comparado ao cultivo em água verde, evidenciado pelo aumento na expressão de vários genes associados à imunidade no intestino médio dos animais. Contudo, os mecanismos moleculares associados a essa melhora na imunidade estão ainda por ser elucidados.

A primeira barreira de proteção dos crustáceos contra a entrada de patógenos é proporcionada por uma carapaça externa rígida (exoesqueleto), que reveste o animal, incluindo partes do sistema digestório, que além de possuir enzimas e moléculas, algumas com atividade antimicrobiana (SOONTHORNCHAI et al., 2010), possuem a proteção oferecida pela comunidade microbiana endobionte do intestino do animal (RUNGRASSAMEE et al., 2013).

De maneira geral, as respostas de defesa nos crustáceos são decorrentes de uma imunidade inata e estão intimamente ligadas à hemolinfa dos crustáceos, que circula em um sistema aberto ou semiaberto. A hemolinfa é composta por uma fração celular, representada pelos hemócitos (células imunocompetentes) e uma fração líquida, representada pelo plasma, onde estão dissolvidos diversos fatores humorais (TASSANAKAJON et al., 2013; YANG et al., 2015). Tais respostas são desencadeadas a partir do reconhecimento do agente invasor através de seus componentes estruturais, por proteínas de reconhecimento de padrão/receptores (PRP/PRR, *pattern recognition proteins/receptors*), presentes no hospedeiro. Estas moléculas reconhecem especificamente os padrões moleculares específicos de microrganismos (MAMP, *microbial-associated molecular patterns*), especialmente os lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias Gram-negativas, as peptidoglicanas e ácido lipoteicoico das bactérias Gram-positivas, as  $\beta$ -1,3/1,6-glicanas dos fungos e os ácidos nucleicos [DNA simples-fita e RNA dupla-fita (dsRNA)] dos vírus (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2015). A partir do reconhecimento do não-próprio, diferentes respostas celulares e humorais são simultaneamente acionadas à

indução/repressão de diferentes imunoreguladores e imunofatores, visando em conjunto, a proteção do organismo contra os patógenos.

Entre os mecanismos atualmente reconhecidos em crustáceos, envolvidos na destruição de patógenos destacam-se: (1) o reconhecimento do não-próprio por receptores/proteínas de reconhecimento-padrão (PRR/PRP); (2) a ativação de vias de sinalização intracelular; (3) a fagocitose, encapsulamento e nodulação associadas à formação de armadilhas extracelulares de ácidos nucleicos; (4) a produção de moléculas microbidas, como as espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) e os peptídeos antimicrobianos (PAM); (5) a melanização mediada pelo sistema de ativação da prófenoloxidase (proPO), gerando moléculas intermediárias altamente citotóxicas; (6) a coagulação da hemolinfa; (7) a aglutinação celular mediada por lectinas e, (8) os sistemas antivirais mediados pela interferência por RNA (RNAi), citocinas análogas a interferons, apoptose e autofagia (TASSANAKAJON et al., 2013; BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2014; LI; WENG; HE, 2019).

Os processos imunológicos acima mencionados estão muito bem caracterizados em crustáceos e todos estão intimamente associados à hemolinfa, caracterizando uma imunidade celular e humoral. No entanto, recentemente tem-se voltado à atenção para uma imunidade extra hemocitária, associada aos epitélios, como aqueles presentes no intestino dos camarões. Embora muito pouco ainda se conheça sobre a potencial imunidade intestinal em camarões, a participação do intestino na imunidade dos insetos já está muito bem caracterizada (CAPO; WILSON; DI CARA, 2019). Por exemplo, sabe-se que as células epiteliais do intestino médio de *Drosophila melanogaster* sintetizam moléculas antimicrobianas e citotóxicas, tais como os PAM e espécies reativas de oxigênio que protegem o hospedeiro contra o estabelecimento de patógenos (LEE et al., 2019).

Em relação à morfologia do trato gastrointestinal dos decápodos, o mesmo é constituído pelo intestino anterior (incluindo a boca, esôfago e estômago), intestino médio e intestino posterior (reto e ânus), acrescido da glândula digestiva denominada hepatopâncreas (SOONTHORNCHAI et al., 2010; MCGAW; CURTIS, 2013). Diferentemente do restante do tubo digestivo, que é revestido por uma cutícula quitinosa, a região medial do intestino possui apenas uma membrana peritrófica quitinosa, acelular e porosa, que permite a absorção seletiva de nutrientes (WANG et al., 2012; MCGAW; CURTIS, 2013; SOONTHORNCHAI et al., 2015).

A prática de canibalismo entre os camarões é muito comum (LO; KOU, 1998), portanto esses animais podem facilmente infectar-se pelo trato gastrointestinal. Apesar das barreiras

físicas (cutícula quitinosa) e químicas (enzimas digestivas, baixo pH, etc) presentes no intestino anterior, os microrganismos podem alcançar o intestino médio, ultrapassar a barreira conferida pela membrana peritrófica e adentrar no organismo via epitélio, tornando esta porção do intestino susceptível às infecções (ARTS et al., 2007; WANG et al., 2012). Em contrapartida, acredita-se que estratégias de defesa tenham sido evolutivamente impostas ao intestino para que estes animais sobrevivessem em ambientes ricos em microrganismos há pelo menos 500 milhões de anos (GORDON; GREEN, 2018).

A identificação de genes associados à defesa imunológica tem sido foco de trabalhos recentes, para descrever a resposta imunológica dos camarões frente às diversas infecções causadas por microrganismos. O uso de técnicas genômicas e transcritômicas (RNAseq) em larga escala tem permitido a identificação de importantes imunofatores em diferentes espécies, incluindo os camarões (ROBALINO et al., 2009). Métodos baseados nas ciências “ômicas” (transcritômica, genômica, proteômica e metabolômica) estão sendo cada vez mais aplicados para auxiliar na compreensão da biologia de espécies de interesse aquícola e para desenvolvimento de ferramentas genômicas no combate a enfermidades (GUPPY et al., 2018).

Nos últimos anos, nosso grupo (Laboratório de Imunologia Aplicada a Aquicultura LIAA) tem dirigido esforços para elucidar o papel do intestino nas defesas antimicrobianas e antivirais de *L. vannamei*. Em um primeiro estudo, Silveira et al. (2018) demonstraram que o trato gastrointestinal é um importante sítio de expressão de vários genes associados à imunidade de camarões *naïve* ou desafiados com bactérias *Vibrio harveyi* e WSSV. A expressão de alguns genes foi induzida no intestino médio após 48h do desafio bacteriano, mas nenhum dos genes avaliados foi modulado em resposta à infecção viral. A análise global do bacterioma intestinal de *L. vannamei* cultivados em sistema de bioflocos (BFT, Biofloc technology) e submetidos a uma infecção oral pelo WSSV foi apresentada e discutida por Pilotto et al. (2018), bem como o efeito de uma alimentação suplementada com a cianobactéria *Arthrospira platensis* (espirulina) sobre o sistema imune dos camarões (PILLOTO et al., 2019). Mais recentemente, o impacto das condições ambientais de cultivo sobre a imunidade intestinal de camarões foi avaliado por Pilotto et al. (2020), onde os ambientes ricos em microrganismos encontrados nos cultivos BFT agem como imunoestimulantes alterando o perfil de expressão gênica no intestino médio.

O transcritoma corresponde ao conjunto completo de transcritos (RNAs mensageiros, RNAs ribossomais, RNAs transportadores e os microRNAs) expressos em um dado tecido ou amostra. O perfil do transcritoma pode variar segundo o estado fisiológico, estímulos físicos, químicos, biológicos ou doenças. Com isso, estudos que auxiliem na compreensão dos

mecanismos de defesa antiviral, e forneçam ferramentas para desenvolver o manejo dos camarões em cultivos alternativos e mais seguros sanitariamente, assim como a busca futura de linhagens mais tolerantes ou resistentes, são muito importantes para a carcinicultura mundial. Os transcritomas têm sido de grande importância para se estudar as bases moleculares envolvendo eventos biológicos, principalmente em organismos não-modelo, como camarões (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

Alguns trabalhos avaliaram o transcritoma do intestino de *Litopenaeus vannamei* (DUAN et al., 2019; QI et al., 2017) e de outras espécies de camarões, como *Marsupenaeus japonicus* (HUI; REN; CAO, 2019) e *Macrobrachium rosenbergii* (DING; JIN; REN, 2018). Estes trabalhos investigaram o efeito da infecção causada por patógenos de grande importância para a carcinicultura, como o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) e o *Vibrio parahaemolyticus* (QI et al., 2017). Contudo, ainda não há estudos relacionados ao transcritoma do intestino médio de camarões *L. vannamei* submetidos desafio viral em animais criados em bioflocos.

Com isso, Pilloto (2019) identificou o perfil transcritômico do intestino médio de camarões juvenis de *Litopenaeus vannamei* criados em bioflocos e desafiados oralmente por WSSV. Neste transcritoma as bibliotecas de dados foram construídas de acordo com o protocolo TruSeq Stranded mRNA (Illumina) utilizando-se a plataforma Illumina MiSeq (método de *reads* pareados; 2x150 pb). As sequências montadas a partir deste sequenciamento foram agrupadas em *clusters* utilizando o programa Corset (versão 1.06) (DAVIDSON; OSHLACK, 2014) e então anotados através do programa Blast2GO (CONESA et al., 2005). No entanto, se faz necessário verificar a confiabilidade do sequenciamento dos transcritos (RNAseq), uma vez que a técnica está sujeita a fatores intrínsecos de gerar sequências de baixa qualidade. Neste contexto, o presente estudo realizou a validação dos resultados obtidos pelo sequenciamento utilizando a técnica de transcrição reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), conhecida por ser a técnica mais utilizada para este procedimento. Adicionalmente foi avaliada a expressão relativa de alguns genes conhecidos e relacionados ao sistema imune do camarão, identificando transcritos associados à presença ou defesa contra o WSSV no intestino médio de animais cultivados em bioflocos. Deste modo, os genes identificados nesse estudo poderão auxiliar na elucidação da relação microbiota-patógeno-hospedeiro ocorrendo entre vírus e crustáceos, e servir como candidatos a assinaturas moleculares associados à imunidade intestinal de *L. vannamei* contra o WSSV.

## 1.1 OBJETIVOS DO TRABALHO

### 1.1.1 Objetivo geral

Identificar transcritos candidatos a uma assinatura transcricional no intestino médio (IM) de camarões juvenis *Litopenaeus vannamei* associados ao cultivo em bioflocos e à infecção pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV).

### 1.1.2 Objetivos específicos

- a) Identificar os *clusters* gênicos de maior expressão diferencial no transcrito do intestino médio de camarões, em diferentes condições experimentais;
- b) Validar os dados transcritômicos a partir das análises de expressão gênica por RT-qPCR;
- c) Avaliar a especificidade tecidual de expressão (hemócitos e intestino médio) dos transcritos validados;
- d) Avaliar a expressão de sete (7) genes pertencentes a cinco (5) categorias funcionais (defesas antimicrobiana e antiviral e homeostasia) relacionadas à imunidade de camarões.

## 1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO

As análises e os resultados aqui apresentados referem-se à etapa de validação dos dados transcritômicos anteriormente obtidos em nosso laboratório, por meio de sequenciamento em larga escala dos transcritos do intestino médio de *L. vannamei* cultivados em bioflocos e desafiados oralmente com o WSSV (PILOTTO, 2019). O artigo final será submetido à publicação no periódico “*Fish & Shellfish Immunology*” (Qualis CAPES A1) e conterà resultados do transcrito (Tese de doutorado de Mariana R. Pilotto, 2019) e dados obtidos no presente estudo. Ressalta-se aqui, que por se tratar de uma Dissertação de Mestrado, serão apresentados aqui apenas os dados obtidos por Flávio F. Bernardo Jr.

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

### **IDENTIFICAÇÃO DE GENES CANDIDATOS A UMA ASSINATURA TRANSCRICIONAL NO INTESTINO MÉDIO DE CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* ASSOCIADA AO CULTIVO EM BIOFLOCOS E INFECÇÃO PELO VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA**

Mariana R. Pilotto<sup>1a</sup>, Flávio Finati Bernardo Júnior<sup>1a</sup>, Priscila Goncalves<sup>1</sup>, André N. A. Goncalves<sup>1b</sup>, Breno Cora<sup>1</sup>, Guilherme de Tolelo e Silva<sup>2</sup>, Evelyne Bachère<sup>3</sup>, Rafael D. Rosa<sup>1</sup>, Luciane M. Perazzolo<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA), Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil;

<sup>2</sup>Laboratório de Genômica, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>3</sup>Ifremer, UMR 5244, IHPE Interactions-Hosts-Pathogens-Environment, UPVD, CNRS, Université de Montpellier, 34095 Montpellier, France.

<sup>a</sup>M.R. Pilotto e F.F. Bernardo Júnior contribuíram igualmente para esse trabalho

<sup>b</sup>Endereço atual: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

\*Autor correspondente: Tel.: +55 48 3721 4196; Fax: +55 48 3721 5528

E-mail: l.m.perazzolo@ufsc.br (L.M. Perazzolo)

## RESUMO

Os mecanismos moleculares envolvendo a imunidade de camarões associada ao intestino, bem como a interação patógeno-hospedeiro nesse tecido permanecem desconhecidos. O presente estudo avaliou o perfil transcricional no intestino médio (IM) de camarões *Litopenaeus vannamei* e identificou 19 genes candidatos a uma assinatura transcricional associada ao cultivo em bioflocos e ao desafio oral pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). O efeito do cultivo (bioflocos ou água clara) revelou 347 genes diferencialmente expressos (GDEs) no IM de camarões cultivados em bioflocos (B) e 277 GDEs em animais em água clara (C). A presença do WSSV no intestino promoveu diferenças na abundância de *clusters* associada à condição de cultivo. Animais cultivados em água clara (CW/C) registraram 771 GDEs, sendo 359 mais expressos em CW e 412 em C. Já, nos animais cultivados em bioflocos, 834 GDEs foram encontrados no IM, sendo 270 mais expressos em BW e 564 nos animais não desafiados (B). Estes resultados indicam que a infecção pelo WSSV, independente do cultivo, alterou a expressão de um menor número de transcritos no IM dos camarões. O efeito de ambas condições, abiótica (cultivo) e biótica (infecção viral), sobre o perfil transcritômico dos camarões (BW/CW) revelou a expressão diferencial de 117 genes, especialmente em camarões cultivados em água clara (CW; 70). A validação dos dados transcritômicos permitiu identificar 19 genes candidatos (30% dos 67 DEGs avaliados) a compor uma assinatura transcricional em camarões, associada ao cultivo em bioflocos e à infecção pelo WSSV. Entre eles, destacam-se uma *C-type lectin protein*, uma *chitinase 5* e uma *chitin binding-like protein*, além de oito novos transcritos ainda não anotados. Ademais, genes associados às vias de sinalização IMD e JAK-STAT, à defesa antiviral via RNAi e ao gene da dual oxidase-1 apresentaram expressão diferencial em função do sistema de cultivo e/ou da infecção viral. O transcritoma intestinal de *L. vannamei* permitiu ainda identificar um transcrito do *Wenzhou shrimp virus 8*, codificante para a enzima RdRP, cuja expressão foi significativa em animais cultivados em bioflocos e infectados pelo WSSV. Contudo, o significado deste achado é ainda desconhecido. Em conjunto, os resultados do presente estudo servem de base para um melhor entendimento da participação do intestino na imunidade dos peneídeos, bem como podem auxiliar no desenvolvimento futuro de ferramentas biotecnológicas visando o controle de viroses nos cultivos.

**Palavras-chave:** imunidade associada ao intestino, marcadores moleculares, BFT, WSSV, transcritoma, expressão gênica.

## 2.1. INTRODUÇÃO

Entre os patógenos virais que acometem a carcinicultura, o vírus síndrome da mancha branca (WSSV, do inglês *White spot syndrome virus*) possui um histórico de prejuízos significativos ao setor. Em cultivos tradicionais semi-intensivos, como em viveiros de terra, a mortalidade pode atingir 100% entre 3 a 10 dias, após o surgimento dos primeiros sintomas (CHOU HSIN-YIU et al., 1995; WANG et al., 1999). Nesse contexto, a tecnologia de cultivo em bioflocos (*biofloc technology*, BFT) se destaca como alternativa para superar esses desafios (EMERENCIANO et al., 2017). Essa técnica de cultivo é conhecida por proporcionar um ambiente que favorece o desenvolvimento do animal, uma vez que o sistema fechado e rico em microrganismos proporciona manutenção da boa qualidade da água principalmente através da ciclagem de nutrientes, e baixa ou nenhuma renovação de água (MOSS et al., 2012). Estudos têm indicado que o cultivo em bioflocos pode trazer importantes benefícios aos camarões, não só relacionados ao desempenho zootécnico (KIM et al., 2014), mas também promovendo estimulação do sistema imune e aumento da resistência dos animais a enfermidades (CRAB et al., 2012; EKASARI et al., 2014). Ademais, a diversidade dos microrganismos dos bioflocos e seus componentes celulares podem ser utilizados como probióticos e imunoestimulantes para ativar a imunidade inata dos camarões (PANIGRAHI et al., 2018).

O trato gastrointestinal dos camarões participa da primeira linha de defesa desses animais, tendo a sua maior parte revestida por uma cutícula quitinosa e impermeável, muito semelhante à estrutura da carapaça dos crustáceos. Porém, a porção do intestino médio não possui a mesma cutícula, mas sim uma membrana peritrófica quitinosa e porosa, que permite a passagem seletiva de nutrientes. A eficácia desta parede intestinal é dependente da integridade de sua estrutura, da composição da microbiota intestinal e de componentes imunológicos (CHEN; HE, 2019). Como os camarões são animais bentônicos, que praticam canibalismo de animais doentes e moribundos (LO; KOU, 1998), podendo se infectar com patógenos pelo trato gastrointestinal. Assim, o intestino médio pode ser considerado uma das principais vias de entrada de patógenos no organismo dos camarões por meio da membrana peritrófica (WANG et al., 2012a). Neste caso, a exemplo de outros artrópodes como os insetos (BROWN; SADARANGANI; FINLAY, 2013), o epitélio intestinal dos crustáceos deve possuir respostas imunológicas específicas contra microrganismos, mas que são ainda pouco conhecidas.

A identificação de genes associados à defesa imunológica tem sido foco de trabalhos recentes para descrever a resposta imunológica dos camarões frente às diversas infecções causadas por microrganismos. Nesse sentido, o uso de técnicas genômicas e transcritômicas em

larga escala tem permitido a identificação de importantes imunofatores em diferentes espécies, incluindo os camarões (ROBALINO et al., 2009). Alguns trabalhos avaliaram o transcrito do intestino do *Litopenaeus vannamei* (DUAN et al., 2019; QI et al., 2017) e de outras espécies de camarões, como *Marsupenaeus japonicus* (HUI; REN; CAO, 2019) e *Macrobrachium rosenbergii* (DING; JIN; REN, 2018) Estes trabalhos investigaram o efeito da infecção causada por patógenos de grande importância para a carcinicultura e respostas moleculares envolvendo o epitélio intestinal. Porém, o efeito do cultivo em bioflocos e o desafio oral por WSSV sobre a expressão de transcritos envolvidos em mecanismos de defesa imune no intestino médio de camarões juvenis de *L. vannamei* ainda não foi explorado. Com isso, neste trabalho serão apresentados genes candidatos a potenciais assinaturas transcricionais associados ao sistema de cultivo e a defesa contra o WSSV a partir do transcrito do intestino médio de camarões criados em bioflocos, em água clara, e desafiados oralmente por WSSV em cada um desses sistemas de cultivo. Adicionalmente foi avaliada a expressão relativa de alguns genes conhecidos e relacionados ao sistema imune do camarão, identificando transcritos associados à presença ou defesa contra o WSSV no intestino médio de animais cultivados em bioflocos

## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Animais e desenho experimental

Pós-larvas (PLs) 5 da espécie *Litopenaeus vannamei* da linhagem HB12 e livres de WSSV foram adquiridas da empresa Aquatec (Canguaretama, RN, Brasil) e cultivadas no Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC (LCM, Centro de Ciências Agrárias, UFSC). Imediatamente após a chegada, as pós-larvas foram alocadas em 8 tanques internos de 9 m<sup>3</sup>, divididas de acordo com o tipo de cultivo: sistema de bioflocos (**B**; 4 tanques) e água clara (**C**, cultivo controle; 4 tanques), numa densidade inicial de 300 e 20 PLs/ m<sup>3</sup>, respectivamente. A troca de água diária dos tanques com água clara foi de 80%, enquanto que nos tanques com bioflocos, água só era adicionada para repor a água evaporada. Os detalhes sobre as condições de cultivo estão descritos em (PILOTTO et al., 2018). Depois de 4 meses, quando as PL5 atingiram o estágio de juvenis (5-8 g), cerca de 30% dos animais de cada tanque foram selecionados para se confirmar a ausência do WSSV por meio da técnica de Nested-PCR (LO et al., 1996). Finalmente, os camarões (n= 120/tipo de cultivo) foram transferidos para o Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (Centro de Ciências Biológicas, UFSC).

### 2.2.2 Desafio per os com WSSV e coleta dos intestinos médios

O inóculo viral foi preparado conforme descrito anteriormente por (PILOTTO et al., 2018) a partir de tecidos de animais comprovadamente infectados pelo WSSV, por Nested-PCR. Oitenta animais de cada condição foram desafiados com WSSV (100  $\mu$ L contendo  $5 \times 10^6$  cópias virais), por meio de escoamento do inóculo na cavidade oral com o auxílio de uma micropipeta, sem causar injúrias no animal. Os animais restantes ( $n=40$ /grupo) não foram manipulados. Após 48h do desafio viral, 80 animais de cada cultivo e desafiados com WSSV (**BW** e **CW**) e 40 animais de cada cultivo não desafiados (**B** e **C**), foram eutanasiados por hipotermia e o intestino médio (IM) dissecado assepticamente e seccionado em três porções de igual tamanho. As porções de intestino foram agrupadas em *pools* de modo que cada *pool* fosse igualmente representado por cada região do IM. O agrupamento foi feito segundo a análise a que se destinaram, como segue: (a) dois *pools* de 20 intestinos por condição, para o sequenciamento do transcrito (RNAseq); (b) quatro *pools* de 10 intestinos por condição para análise da expressão gênica por RT-qPCR e, (c) um *pool* de 40 intestinos por condição, para a caracterização da abundância de composição da comunidade bacteriana (sequenciamento do gene 16S rRNA) publicado em [18]. As amostras destinadas às análises transcritômicas e de expressão gênica tiveram o conteúdo intestinal previamente retirado por raspagem e lavado com etanol 70% e água do mar estéril. A detecção do WSSV foi realizada individualmente por Nested-PCR em todos os intestinos de animais desafiados, para confirmar a presença do vírus [19].

### 2.2.3 Análise de expressão diferencial dos clusters gênicos

Para a validação dos dados transcritômicos obtidos por Pilotto (2019) (PILOTTO, 2019), primeiramente procedeu-se a avaliação da expressão diferencial dos *clusters* gênicos ( $fold\text{-}change \geq 2$ ,  $padj \leq 0,05$ ) utilizando o software START (<https://kcvi.shinyapps.io/START/>) (NELSON et al., 2017). A análise foi feita mediante a comparação da expressão entre os grupos B/C (avaliando o efeito da condição de cultivo), CW/C e BW/B (avaliando o efeito da infecção pelo vírus) e entre BW/CW (considerando ambos, condição de cultivo e infecção do vírus). A matriz de análise incluiu apenas *clusters* presentes em todas as réplicas das quatro condições experimentais. Os dados foram analisados utilizando o método estatístico *voom* do pacote Bioconductor 'limma' (LAW et al., 2014) para transformar as contagens brutas em valores de intensidade *log* e normalizados. Os valores referentes à mudança da expressão foram calculados a partir do log do *fold change* (LogFC) de cada comparação. Os valores de *p* ajustados (*padj*) de Benjamini-Hochberg foram calculados para cada comparação entre os grupos experimentais.

Os dados de comparação da expressão diferencial dos *clusters* entre os grupos foram representados por gráficos de dispersão do tipo *Vulcano plot* considerando a relação do log de *fold change* (eixo X) pelo  $[-\log_{10}]$  do valor de *p*<sub>adj</sub> (eixo Y) elaborados a partir do pacote *EnhancedVolcano* (BLIGHE; RANA; LEWIS, 2019).

#### **2.2.4 Seleção de genes diferencialmente expressos para validar os dados transcritômicos.**

Apenas *clusters* gênicos apresentando *hits* com percentual de cobertura (*query cover*) acima de 80% e corte de valor de *e*-value em  $1e^{-5}$  foram selecionados e suas regiões codificantes (*coding sequence* ou CDS) traduzidas a partir do programa *ExPasy Translate Tool* (<https://web.expasy.org/>). As regiões (*frames*) traduzidas foram então avaliadas quanto à similaridade com outras sequências depositadas nos bancos de dados disponíveis (*GenBank*), a fim de garantir especificidade no desenho dos iniciadores que flanqueassem regiões específicas para cada gene. Para tal, utilizou-se a ferramenta BlastX (*Basic Local Alignment Search Tool, Standalone, BLAST*) para identificar possíveis regiões conservadas e evitar domínios presentes em múltiplos genes. Os iniciadores foram desenhados a partir de uma CDS predita de pelo menos 200 nucleotídeos. As sequências encontradas como “não-annotadas” (NA, *non-annotated*) tiveram sua presença confirmada no banco de dados genômico (BlastN com a biblioteca GCA\_003789085.1) referente ao genoma do *L. vannamei* disponibilizada em dezembro de 2018 (ZHANG et al., 2019).

Uma vez selecionados, procedeu-se ao desenho das sequências dos iniciadores considerando os seguintes parâmetros: (a) temperatura de hibridização entre 58 °C - 62 °C, (b) tamanho dos iniciadores de 20 - 21 nucleotídeos, (c) conteúdo de C/G entre 45 - 55% e (d) tamanho do produto de amplificação entre 100 - 200 pb, com o auxílio da ferramenta *primer-BLAST* (YE et al., 2012) para identificar a melhor região de desenho dos iniciadores que contemple essas condições. O potencial de auto complementariedade e formação de dímeros foram verificados pelo programa *FastPCR* (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>) (KALENDAR et al., 2017). Os iniciadores foram sintetizados pela empresa Invitrogen™ e diluídos em água livre de DNA/RNA/DNases/RNases para uma solução de estoque a 100uM.

#### **2.2.5 Validação dos dados transcritômicos e análise de expressão de genes associados ao sistema imune**

Os dados transcritômicos que apresentaram expressão diferencial entre os grupos B, C, BW e CW foram validados por análises de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Igualmente, a expressão de sete genes associados ao sistema imune de *L. vannamei* foram

avaliados, pertencentes a cinco categorias funcionais, como segue: (i) vias de sinalização celular (*LvIMD* e *LvSTAT*); (ii) RNAi (*LvArs2* e *LvTRBP1*); (iii) Proteínas de reconhecimento de padrões moleculares - PRPs (*LvGAL*); (iv) Sistema Redox (*LvDUOX1*), e (v) peptídeos antimicrobianos (*LvALF-B*). Os iniciadores utilizados para esta análise estão apresentados na **Tabela 1**.

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

Sigla	Nome do gene	Nº GenBank	Sequência (5' - 3')	Amplicon (pb)	Referência
<b>Genes de referência</b>					
			<i>Fw</i>	<i>Rv</i>	
<i>LvEF1<math>\alpha</math></i>	Elongation factor 1- $\alpha$	GU136229	TGGCTGTGAACAAGATGGACA	TTGTAGCCCACCCTTCTTGACG	103 [27]
<i>LvL40</i>	Ubiquitin/ribosomal L40 fusion protein	KJ831563	GAGAAATGTGAAGGCCAAGATC	TCAGAGAGAGTGGACCATC	104 [27]
<i>LvRpS3A</i>	S3A ribosomal protein	BF023924	GGCTTGCTATGGTGTGCTCC	TCATGCTCTTGGCTCGCTG	101 [28]
<i>LvActin</i>	$\beta$ -actin	AF300705	CCACGAGACCACCTACAAC	AGCGAGGGCAGTGATTTTC	142 [29]
<b>Via de sinalização</b>					
<i>LvIMD</i>	Immune deficiency (Imd)	FJ592176	AAGTCGAGGTCAGCGAAC	GATCATCTGGGTGAGTCTGG	107 [30]
<i>LvSTAT</i>	Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)	HQ228176	CATGGCTCTGGCAGATAAGC	GCACTCTGGTGGTCTCTCTTC	192 [31]
<b>RNAi</b>					
<i>LvArs2</i>	Arsenite-resistance protein 2-like protein (Ars2)	HQ692888	GCCATTTAATTTGGGAGAGGAC	CTGTAACTCCAATCTGTTCCTCTG AC	115 [32]
<i>LvTRBP1</i>	Transactivating response RNA-binding protein isoform 1	HQ541157	CAAGAGTTGTGTATGCCGAG	AGCACCACCCTGGATGATG	195 [33]
<b>Proteínas de reconhecimento de padrões moleculares - PRPs</b>					
<i>LvGal</i>	Galectin	KF179103	AATGCTTTCACACGAGCAGC	GTCTTCAATCCAGACACAGG	237 [28]
<b>Sistema Redox</b>					
<i>LvDuox1</i>	Dual oxidase (Duox)	MG734366. 1	GGTACAAGTTCGAGGTCCGG	TGGTGACATCCTCCCGCTCC	173 [34]
<b>Peptídeos antimicrobianos</b>					
<i>LvALF-B</i>	ALF Group B	GQ227486	GTGTCTCCGTGTGACAAGC	ACAGCCCAACGATCTTGCTG	123 [35]

Para tal, 1 µg de RNA total foi reversamente transcrito utilizando a enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific®), na presença de 0,5 mM de dNTP Mix, 20 µM do iniciador oligo(dT)12-18 e inibidor de RNase. A amplificação de sequências gênicas foi realizada no equipamento StepOnePlus™ (Thermo Fisher Scientific®), na presença de 1 µL de cDNA (diluído na 20x), 0,5 µL (0,3 µM) dos iniciadores e 7,5 µL de Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (análises dos genes do sistema imune) ou de PowerUP® SYBR Green Master Mix (validação dados transcritômicos) (Thermo Scientific®) e 6 µL de água livre de DNA/RNA/DNases/RNases (volume final de 15 µL). As reações foram realizadas em duplicata de acordo com as seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s e hibridização/extensão a 60 °C por 1 min. Ao término dos ciclos, as amostras foram submetidas a uma curva de dissociação para verificação da especificidade dos iniciadores. Os dados foram normalizados utilizando a média geométrica de três (3) ou quatro (4) genes de referência (fator de alongação 1 $\alpha$ , proteína ribossomal RPS3A,  $\beta$ -actina e 40S *ribosomal protein S6*) no caso da análise dos genes do sistema imune ou dos dados transcritômicos, respectivamente. A escolha para melhor condição de referência foi baseada no cálculo do coeficiente de estabilidade dos genes candidatos utilizando o programa RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>), que leva em consideração a variação dos valores de Cq entre as diferentes amostras. Assim, quanto menor o valor do coeficiente, menor a variação de expressão do gene de referência entre as condições experimentais (VANDESOMPELE et al., 2002). Os níveis de expressão foram calculados através da fórmula  $2^{-\Delta Cq}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A diferença na expressão foi considerada estatística através do teste-t Student não pareado (*fold-change cut-off* de 2,  $p \leq 0,05$ ). As análises e a nomenclatura utilizadas neste trabalho foram baseadas nas recomendações do MIQE guidelines (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN et al., 2009).

#### **2.2.6. Especificidade de expressão tecidual dos transcritos validados**

Com o intuito de verificar se os genes validados no transcrito intestinal possuíam também expressão hemocitária (decorrente de hemócitos infiltrados no intestino), realizou-se primeiramente uma análise *in silico* para identificar homologia entre sequências preditas depositadas em bancos de dados transcritômicos de hemócitos de *L. vannamei*. Para essas análises, utilizou-se os programas STAR (DOBIN et al., 2013) e o RSEM (LI; DEWEY, 2011). Em seguida, tais resultados foram confrontados com análises *in situ* utilizando amostras de hemócitos de três (3) *pools* de cDNA e de intestino médio provenientes de camarões juvenis *L.*

*vannamei* cultivados em água clara. As condições utilizadas nessas análises foram as mesmas descritas no item 2.5.

### 3 RESULTADOS

#### 2.3.1 O perfil transcricional do intestino médio é alterado pelas condições de cultivo e infecção pelo WSSV

O sequenciamento dos transcritos presentes no intestino médio (IM) de camarões *L. vannamei* cultivados em duas condições de cultivo (bioflocos e água clara) e desafiados pelo WSSV permitiu a obtenção de 64.104 *contigs* que foram agrupados em *clusters* gênicos resultando em 40.855 *clusters*, como detalhado em Pilotto (2019) (PILOTTO, 2019). A abundância desses *clusters* gênicos foi aqui analisada, de forma a incluir nas análises estatísticas apenas os *clusters* presentes nas duas réplicas das quatro condições experimentais (B, C, BW e CW). Ou seja, os *clusters* gênicos que foram detectados apenas em uma das réplicas da condição analisada foram descartados. Dessa forma, foram mantidos 32.754 *clusters* gênicos (80,17%) que foram submetidos à análise de expressão diferencial (apresentados na **Figura 1**). A anotação e caracterização funcionais foram anteriormente realizadas por Pilotto (2019) (PILOTTO, 2019). Ressalta-se que, para as análises de expressão diferencial, considerou-se o efeito do ambiente de cultivo (B/C), o efeito da infecção pelo WSSV nos animais em cada condição de cultivo (CW/C; BW/B) e o efeito de ambos, cultivo e presença do vírus (BW/CW) sobre o perfil transcricional.

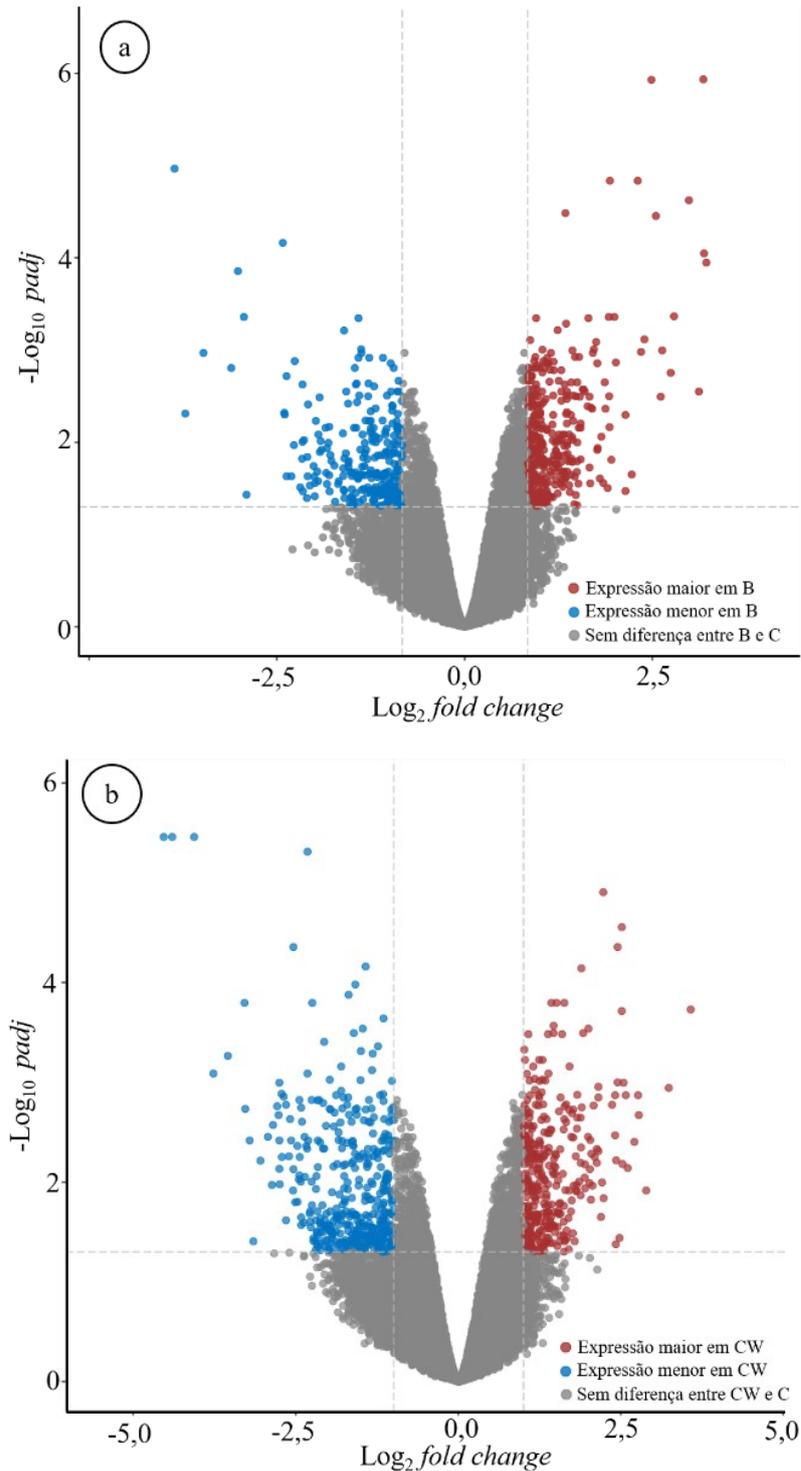
Em relação ao efeito do cultivo, encontrou-se 624 *clusters* gênicos diferencialmente expressos na comparação B/C (**Figura 1a**). Desses, 347 apresentaram maior expressão em animais cultivados em bioflocos (B) (55,6 %) e 277 nos animais controle, cultivados em água clara (C) (44,4%). Dos *clusters* mais expressos no intestino médio de camarões cultivados em bioflocos, destacaram-se os genes codificantes para uma proteína não anotada (NA) (14,5 vezes), uma *chitin binding-like protein* (14,1 vezes) e uma *uncharacterized protein* LOC113807558 (14 vezes). No caso dos animais cultivados em água clara, os *clusters* que se destacaram foram os codificantes para uma *uncharacterized protein* LOC113800584 (24,9 vezes), uma proteína predita para *peritrophin-1-like* (22 vezes) e uma *uncharacterized protein* LOC113822228 (18 vezes).

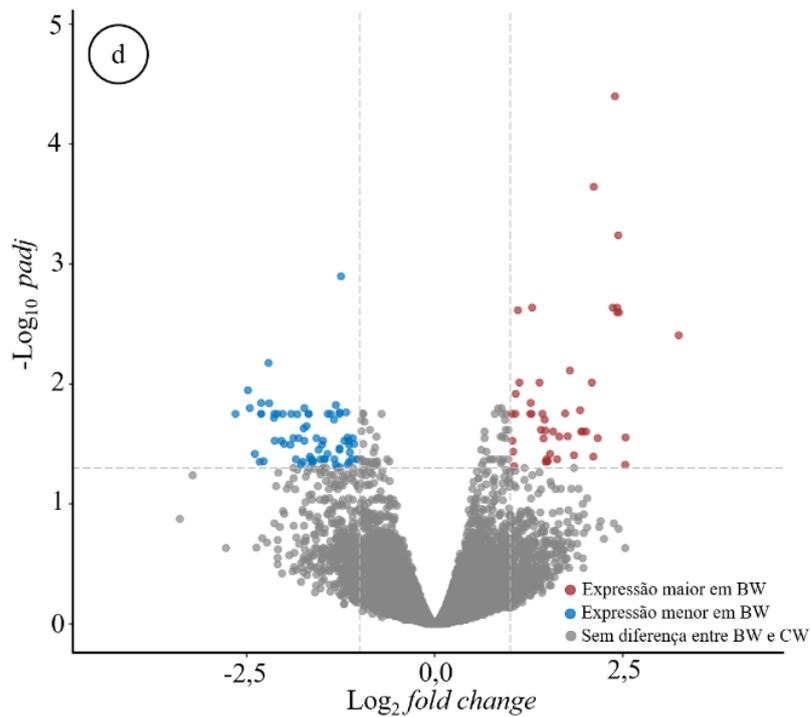
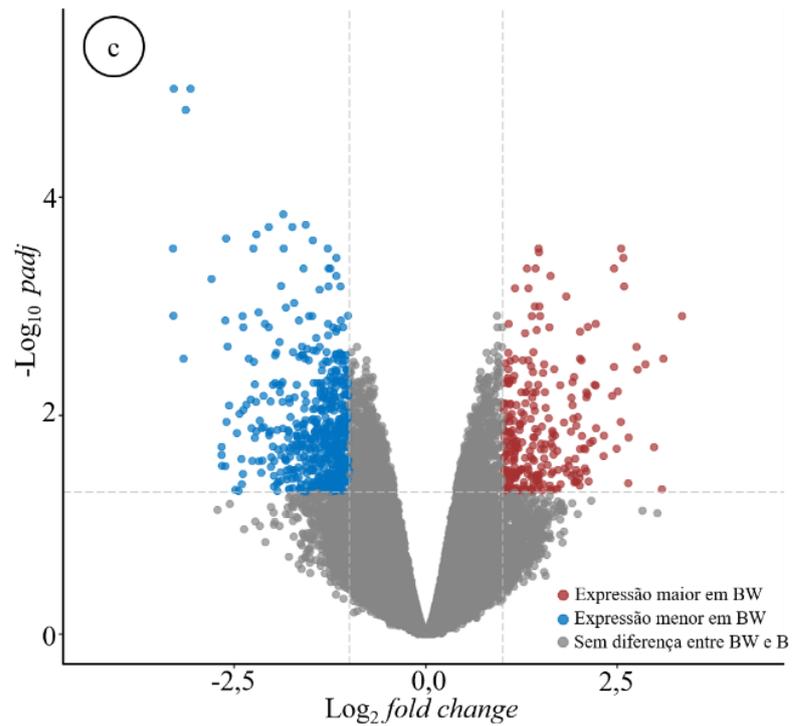
A comparação entre as amostras de intestino médio de camarões infectados com o WSSV revelou diferenças na abundância de *clusters* associada à condição de cultivo. Animais cultivados em água clara apresentaram 771 *clusters* diferencialmente expressos entre os animais desafiados e não desafiados com WSSV (CW/C), sendo 359 (46,6%) mais expressos nos

camarões infectados e 412 (53,4%) mais expressos em não desafiados (**Figura 1b**). Já, em animais cultivados em bioflocos foram identificados 834 *clusters* diferencialmente expressos entre os animais desafiados e não desafiados (BW/B), sendo 270 (32,4%) mais expressos nos animais infectados (BW) e 564 (67,6%) mais expressos nos camarões não infectados (B) (**Figura 1c**). Os *clusters* que tiveram o maior *fold change* (valor de expressão diferencial; 11,9; 9,4 e 7,4) em animais desafiados na comparação CW/C, não foram ainda anotados nos bancos de dados. Já, em animais cultivados em água clara e não desafiados (C), os *clusters* gênicos com maior expressão foram os codificantes para *sialin-like isoform XI* (23 vezes), *putative inorganic phosphate cotransporter* (21 vezes) e para uma sequência ainda não anotada (NA) (16 vezes). Na comparação BW/B, nos animais do grupo BW destacam-se também transcritos ainda não anotados (NA) cujos valores de *fold change* foram 10; 7 e 6,7 respectivamente. No grupo B destacaram-se dois (2) *clusters* ainda não anotados (NA) (ambos 9,8 vezes mais expressos) e um codificante para a *sialin-like isoform XI* (9,7 vezes).

Finalmente, avaliou-se o efeito de ambos, condição de *cultivo* e infecção viral, sobre o perfil transcricional do intestino médio de *L. vannamei* (BW/CW). De maneira interessante, apenas 117 *clusters* foram diferencialmente expressos nesta comparação. Camarões em bioflocos e infectados pelo WSSV (BW) registraram 47 (40,2%) *clusters* gênicos com expressão diferencial, enquanto camarões cultivados no sistema controle (CW) tiveram 70 DEGs (59,8%) (**Figura 1d**). Os *clusters* que se destacaram por haver maior expressão diferencial em animais cultivados em bioflocos, na comparação BW/CW, são uma *putative RNA-dependent RNA polymerase* (9,4 vezes); uma *hypothetical protein* (5,4 vezes); e uma *uncharacterized protein* LOC113807085 (5,7 vezes). Já, na condição CW foram os transcritos codificantes para *protein lethal(2)essential for life-like* (6,2 vezes), uma sequência NA (5,6 vezes) e uma codificante para *E3 ubiquitin-protein ligase UBR4-like* (5,5 vezes), os de maior expressão diferencial.

**Figura 2** – Gráficos de dispersão (Volcano plot) representando os níveis de expressão de todos os clusters gênicos (32.754) identificados no transcrito do intestino médio de *L. vannamei*. Os animais foram cultivados em bioflocos (B) ou água clara (C) e desafiados oralmente com o WSSV (BW e CW). Pontos em vermelho correspondem aos *clusters* gênicos com maior expressão diferencial no grupo B em relação ao grupo C (a), no grupo CW em relação ao C (b), no grupo BW em relação ao grupo B (c) ou ao grupo CW(d). Pontos azuis indicam menor expressão diferencial entre a relação destes mesmos grupos ( $p_{adj} < 0,05$ ). Os pontos em cinza indicam os *clusters* gênicos que não apresentaram diferença estatística a nível de expressão ou não atingiram níveis mínimos de expressão cada ponto representa um *Cluster* plotado considerando os níveis mínimos de expressão ( $fold-change < 2$ ), onde a relação do log de  $fold-change$  (eixo X) pelo  $[-\log_{10}]$  do valor de  $p_{adj}$  (eixo Y).





### 2.3.2 Genes diferencialmente expressos validados por RT-qPCR demonstram diferenças de expressão associadas ao cultivo em bioflocos e à infecção pelo WSSV

Para validar os genes diferencialmente expressos (GDEs) identificados pelo RNASeq, foram selecionados 67 *clusters* gênicos apresentando diferentes perfis de expressão e pertencentes a diferentes categorias funcionais ou ainda não-caracterizados (“*uncharacterized*

protein” e “non-annotated”) (Tabela 2). Avaliaram-se 10, 19, 17 e 21 GDEs respectivamente nas comparações B/C, CW/C, BW/B e BW/CW. Além destes, foram selecionados dois *clusters* correspondentes às sequências gênicas parcial (\*<sup>a</sup>) e completa (\*<sup>b</sup>) de uma RNA-polimerase dependente de RNA (RdRP) codificada pelo *Wenzhou shrimp virus 8* (Tabela 2).

**Tabela 2** – Genes selecionados do transcrito de intestino médio de *L. vannamei* (RNASeq) para validação em PCR quantitativa em tempo real

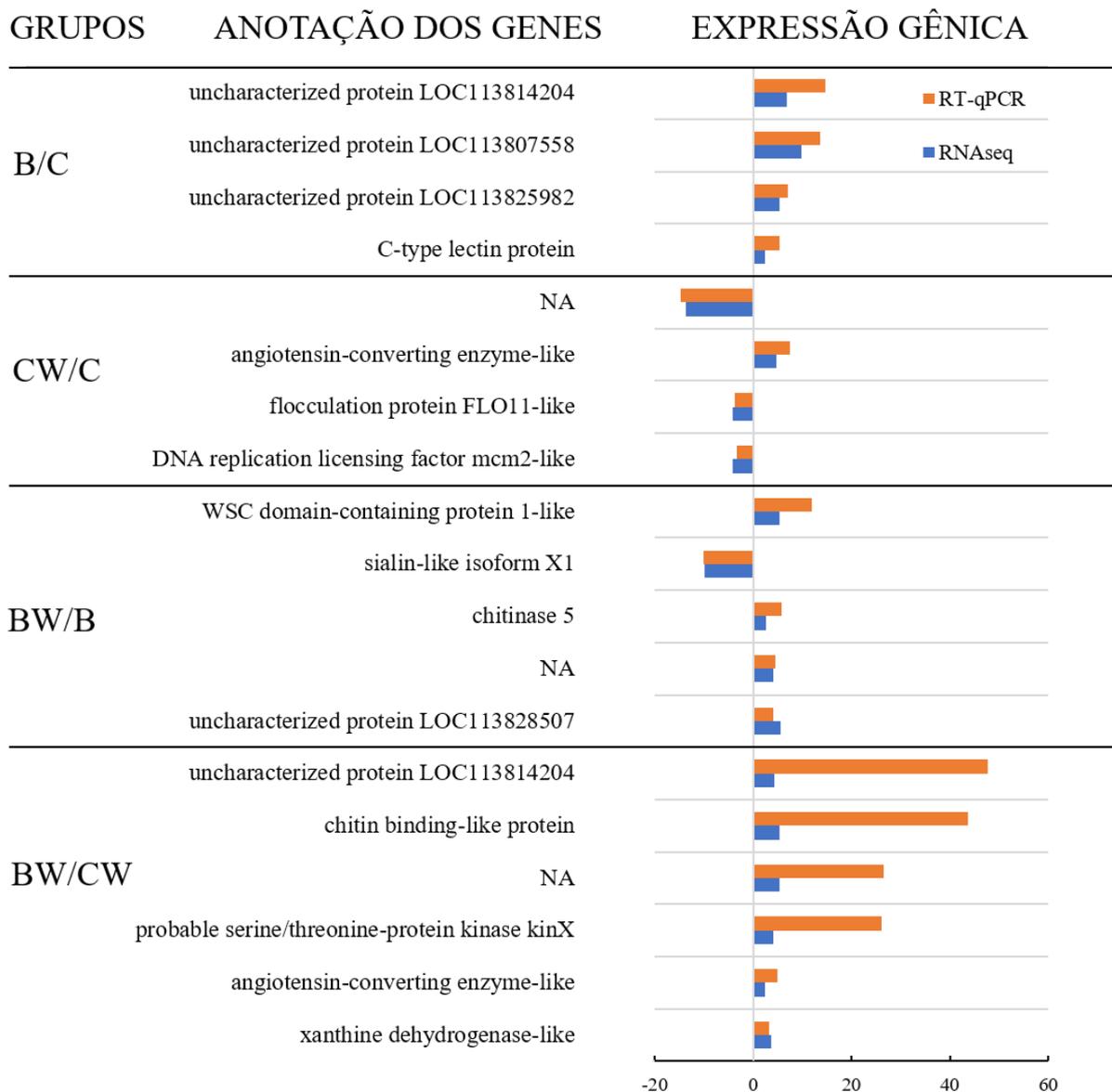
Grupos	Anotação do gene	Gene ID (Cluster)	Fold-change		Número de Acesso (GenBank)
			RNAseq	RT-qPCR	
<b>B/C</b>					
	Uncharacterized protein LOC113814204	33810.0	6,8***	14,7***	XP_027222037
	Uncharacterized protein LOC113807558	26199.0	9,8**	13,5**	XP_027214648
	Uncharacterized protein LOC113825982	1173.0	5,3***	7,0**	XP_027234654
	C-type lectin protein	18606.0	2,4*	5,3*	ROT76828
	Chitin binding Peritrophin-A domain-containing	21448.0	2,6***	ND	XP_027239585
	Cytochrome P450 2L1-like	32938.0	2,5**	ND	XP_027222444
	C-type lectin	17775.1	2,2**	ND	XP_027211117
	Toll-like receptor 6	21638.0	2,2**	ND	XP_027229461
	Chitin binding Peritrophin-A domain-containing	3694.0	2,2**	ND	ROT83210
	PREDICTED: peritrophin-1-like	20235.0	-22,1**	ND	XP_003702704
<b>CW/C</b>					
	---NA---	26488.0	-13,7***	-14,7**	-
	Angiotensin-converting enzyme-like	24548.0	4,7***	7,6*	XP_037804888.1
	Flocculation protein FLO11-like	18257.0	-4,2***	-3,8**	XP_027238604
	DNA replication licensing factor mcm2-like	11353.0	-4,1*	-3,4*	XP_027228471
	---NA---	18105.0	-7,6**	-12,35	-
	Hypothetical protein C7M84_020204	17541.0	6,5**	7,20	ROT61971
	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	27419.0	5,7***	5,38	XP_027227390
	Putative legumain-like protease precursor	11735.0	4,4**	4,26	WP_069134460
	Uncharacterized protein LOC113818003	32294.0	5,3**	3,67	XP_027225922
	Zinc finger protein 853-like isoform X2	33224.0	5,5**	1,60	XP_027216373
	---NA---	780.0	9,4***	ND	-
	---NA---	30804.0	7,4**	ND	-
	---NA---	1415.0	6,8**	ND	-
	---NA---	879.0	6,0***	ND	-
	---NA---	14216.0	5,8**	ND	-
	Phosphatidylinositol phosphatase PTPRQ	29131.0	5,4**	ND	ROT81280
	---NA---	21673.0	5,2***	ND	-
	Putative inorganic phosphate cotransporter	6549.0	-21,2***	ND	XP_027238598
	THAP domain-containing protein 2-like isoform X5	2911.0	-4,0*	ND	XP_027213409
<b>BW/B</b>					
	WSC domain-containing protein 1-like	21891.0	5,4**	12,0**	ROT68322
	Sialin-like isoform X1	15110.0	-9,8***	-10,0*	XP_027238597
	Chitinase 5	14157.0	2,6**	5,8**	MH001173.1
	---NA---	33102.0	4,0**	4,4**	-
	Uncharacterized protein LOC113828507	1001.0	5,5***	4,0**	XP_027237291

Hemocyanin subunit L1	31875.0	-6,1**	-9,12	AHY86471
---NA---	25331.4	-9,9***	-3,24	-
Forkhead box protein L1-like	28015.0	-3,3***	-2,38	XP_027226564
C-type lectin protein	18606.1	-3,2**	-2,12	XP_027226682
ETS homologous factor-like	31417.0	-6,4*	-2,01	ROT74458
C-type lectin containing domain protein	20920.0	-5,8***	ND	XP_027215892
---NA---	33817.0	4,6***	ND	-
Low-density lipoprotein receptor-related protein 1	11796.0	4,6**	ND	XP_027207399
Putative mucin-2-like isoform X2	341.0	3,7**	ND	XP_027230563
Phosphatidylinositol phosphatase PTPRQ	29131.0	4,3*	ND	ROT81280
SCP-like extracellular domain containing protein 1	2760.0	-4,5**	ND	ROT65899
Uncharacterized protein LOC113827495	16609.0	-3,8**	ND	XP_027236185
<b>BW/CW</b>				
Uncharacterized protein LOC113814204	33810.0	4,3***	47,6**	XP_027222037
Chitin binding-like protein	30088.0	5,4**	43,6*	ROT74831
---NA---	31366.1	5,5**	26,4*	QCY01003823.1
Probable serine/threonine-protein kinase kinx	9441.0	4,0*	26,0*	XP_027234239
Angiotensin-converting enzyme-like	24548.0	2,5**	4,9*	XP_037804888.1
Xanthine dehydrogenase-like	7292.0	3,6*	3,3*	XP_027230445
---NA---	5547.0	-2,7*	-23,83	-
---NA---	31496.0	-5,6**	-10,05	-
Xanthine dehydrogenase/oxidase-like	26266.0	3,5**	2,84	XP_027230445
---NA---	10872.0	-5,0**	-2,35	-
---NA---	16657.0	-2,8*	-2,17	-
Protein lethal(2)essential for life-like	12864.0	-6,3**	-1,63	XP_027228825
Betaine--homocysteine S-methyltransferase 1-like	23100.0	-3,5**	-1,56	XP_027225305
DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB4-like protein	19635.0	2,0**	1,21	ROT66909
E3 ubiquitin-protein ligase UBR4-like	7342.0	-5,5**	-0,86	ROT75023
Fibrillin-2-like	27047.0	-4,9**	-0,93	ROT78882
Neurobeachin isoform X13	33630.0	-4,9**	-0,58	ROT66208
Uncharacterized protein LOC113807085	34023.0	5,7*	ND	XP_027214053
Uncharacterized protein LOC113825982	1173.0	3,8*	ND	XP_027234654
Chitin binding Peritrophin-A domain-containing protein	3694.0	2,6**	ND	ROT83210
Uncharacterized protein LOC113822113	10163.0	-2,7*	ND	XP_027230440
Putative RNA-dependent RNA polymerase <sup>*a</sup>	33328.2	9,4**	2,01	YP_009336733
Hypothetical protein [Wenzhou shrimp virus 8] <sup>*b</sup>	33328.1	5,8*	5,83	YP_009336733

Os animais foram cultivados em bioflocos (B) ou água clara (C) e desafiados oralmente com o WSSV (BW e CW). A diferença entre o perfil transcricional dos *clusters* gênicos selecionados no RNASeq e validados em RT-qPCR estão apresentados em valores de *fold-change*  $\leq 2$  e  $*p \leq 0,05$ ;  $**p \leq 0,01$  ou  $***p \leq 0,001$ , considerando as comparações entre B/C, CW/C, BW/B e BW/CW. Valores em azul indicam a expressão gênica dos genes validados que foram estatisticamente superiores e, em vermelho, expressão gênica estatisticamente inferior ao grupo em comparação. **Gene ID**: código de identificação de cada *Cluster* sequenciado no transcrito. *Clusters* correspondentes às sequências gênicas parcial (<sup>\*a</sup>) e completa (<sup>\*b</sup>) da RNA-polimerase dependente de RNA (RdRP) codificada pelo *Wenzhou shrimp virus 8* e identificados no transcrito do IM dos camarões. **ND**: valores não determinados devido a problemas de amplificação. **NA**: genes não anotados.

Do total de 67 genes selecionados, 19 foram validados (cerca de 30% do total) por RT-qPCR, confirmando a expressão diferencial encontrada nas análises transcritômicas RT-qPCR (**Figura 2**). Os demais genes não foram considerados devido a problemas de amplificação (isoformas, formação de dímeros, ciclos acima do limite de detecção ou nenhuma amplificação; cerca de 40%) ou não atingiram níveis mínimos de expressão diferencial (cerca de 30%).

**Figura 3** – Comparação entre o perfil transcricional dos clusters selecionados do transcrito do intestino médio de *L. vannamei* e validados em PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Os camarões foram cultivados em bioflocos (B) ou água clara (C – controle) e desafiados oralmente com o WSSV (BW e CW). Em azul estão representados os valores de expressão gênica obtidos pelo RNASeq e, em laranja, valores obtidos pela RT-qPCR. Os valores de expressão gênica estão apresentados como *fold-change* (*cut-off* de 2) e  $p \leq 0,001$  a 0,05.



A maioria dos genes validados apresentaram níveis de expressão bastante semelhantes àqueles obtidos pelo sequenciamento (**Tabela 2; Figura 2**), com exceção de seis genes que

apresentaram valores de expressão superiores, ou seja, o dobro (**B/C**: *uncharacterized protein* LOC113814204; **BW/B**: *WSC domain-containing protein 1-like*) ou de 26 a 47,6 vezes maior (**BW/CW**: *uncharacterized protein LOC113814204, chitin binding-like protein, NA, probable serine/threonine-protein kinase kinx*).

Analisando o efeito do cultivo sobre o perfil transcritômico de *L. vannamei*, o sistema BFT revelou a presença de quatro genes diferencialmente expressos que foram validados sendo eles, codificantes para uma lectina do tipo-C (*C-type lectin*; 5,3 vezes) e três para *proteínas não-caracterizadas* LOC113807558, LOC113814204 e LOC113825982, com expressão 14,7; 13,5 e 7,0 vezes superior em BFT comparada aos animais controle (C), respectivamente.

Já, a presença do vírus no IM dos animais cultivados na condição controle (água clara) evidenciou a repressão de três dos quatro GDEs encontrados, sendo eles, uma proteína não-annotada (NA; -14,7 vezes), uma proteína de floculação (*flocculation protein FLO11-like*; -3,8 vezes) e um fator de replicação de DNA (*DNA replication licensing factor mcm2-like*; -3,4 vezes). Apenas um gene validado teve maior expressão nos animais CW: uma proteína anotada para *angiotensin-converting enzyme-like* (7,6 vezes). Considerando o efeito da infecção viral nos animais em bioflocos (BW), a maioria dos genes validados tiveram expressão aumentada em relação ao grupo não desafiado (B), destacando-se uma *WSC domain-containing protein 1-like* (12,0 vezes), uma *chitinase 5* (5,8 vezes), um gene não-annotado (4,4 vezes) e uma proteína não-caracterizada (*uncharacterized protein* LOC113828507; 4,0 vezes). Nestes animais o gene codificante para uma *sialin-like isoform XI* foi reprimido 10 vezes (**Tabela 2; Figura 2**).

O efeito de ambas condições, abiótica (cultivo) e biótica (infecção viral), sobre o perfil transcritômico dos camarões (BW/CW) revelou a expressão diferencial aumentada de seis genes no grupo BW: uma *angiotensin-converting enzyme-like* (4,9 vezes), uma *xanthine dehydrogenase-like* (3,3 vezes) e outros quatro transcritos com níveis de expressão marcadamente altos, como para uma proteína não-caracterizada (LOC113814204; 47,6 vezes), uma proteína semelhante à que se liga à quitina (*chitin binding-like protein*; 43,6 vezes), NA (26,4 vezes) e uma cinase *probable serine/threonine-protein kinase kinX* (26 vezes) (**Figura 2**).

### 2.3.3 A maioria dos transcritos validados possuem expressão específica do epitélio intestinal

Com o intuito de verificar se a expressão dos genes selecionados para validação era específica do epitélio intestinal ou decorrente de hemócitos infiltrados no tecido (devido à circulação semi-aberta dos crustáceos), realizou-se uma análise *in silico* seguida por análise de expressão gênica (item 2.6). Dos 69 *clusters* selecionados para validação, a maioria das

sequências (76,8%), ou seja, 53 delas foram encontradas nos bancos de hemócitos de peneídeos, e apenas 16 estavam ausentes. Para confirmar os resultados *in silico*, análises de expressão *in situ* dos RT-qPCR 19 transcritos validados foi avaliada em amostras de hemócitos de camarões cultivados em água clara. De maneira interessante, 13 dos 19 genes apresentaram expressão específica do intestino e não proveniente de hemócitos, ou seja, a grande maioria dos transcritos diferencialmente expressos validados (73,7%) (Tabela 3). Houveram seis (6) sequências com expressão em ambos os tecidos (intestino médio e hemócitos) validados por RT-qPCR, entre elas estão duas proteínas não caracterizadas (Numero de *Cluster*: 33810.0 e 1173.0), a *DNA replication licensing factor mcm2-like*, *Chitinase 5* e a *Chitin binding-like protein*, os demais genes candidatos apresentaram expressão unicamente nas amostras de intestinos médios (Tabela 3).

**Tabela 4** – Especificidade tecidual dos transcritos validados do transcriptoma do intestino médio de *Litopenaeus vannamei*

Grupos	Anotação	Gene ID ( <i>Cluster</i> )	Expressão Gênica	
			IM	Hemócitos (TPM)
B/C	Uncharacterized protein LOC113807558	26199.0	✓	✗(0)
	Uncharacterized protein LOC113814204	33810.0	✓	✓(14,63)
	Uncharacterized protein LOC113825982	1173.0	✓	✓(0,52)
	C-type lectin protein	18606.0	✓	✗(0)
CW/C	Angiotensin-converting enzyme-like	24548.0	✓	✗(0)
	NA	26488.0	✓	✗(ND)
	Flocculation protein FLO11-like	18257.0	✓	✗(ND)
	DNA replication licensing factor mcm2-like	11353.0	✓	✓(5,89)
BW/B	Uncharacterized protein LOC113828507	1001.0	✓	✗(0)
	WSC domain-containing protein 1-like	21891.0	✓	✗(0)
	Chitinase 5	14157.0	✓	✓(86,17)
	NA	33102.0	✓	✗(ND)
BW/CW	Sialin-like isoform X1	15110.0	✓	✗(0)
	NA	31366.1	✓	✗(ND)
	Chitin binding-like protein	30088.0	✓	✓(4,02)
	Uncharacterized protein LOC113814204	33810.0	✓	✓(14,63)
	Probable serine/threonine-protein kinase kinx	9441.0	✓	✗(0)
	Xanthine dehydrogenase-like	7292.0	✓	✗(0)
	Angiotensin-converting enzyme-like	24548.0	✓	✗(0)

Expressão gênica em PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) com amostras de intestino médio (IM) de camarões não desafiados e cultivados na condição controle (água clara). ✓ = presença de expressão RT-qPCR; ✗ = ausência de expressão. RT-qPCR TPM = transcritos por milhão (análises *in silico*). ND = não detectado nas análises *in silico*

### 2.3.4 Alguns genes do sistema imune apresentam expressão diferencial em função do cultivo ou da infecção viral

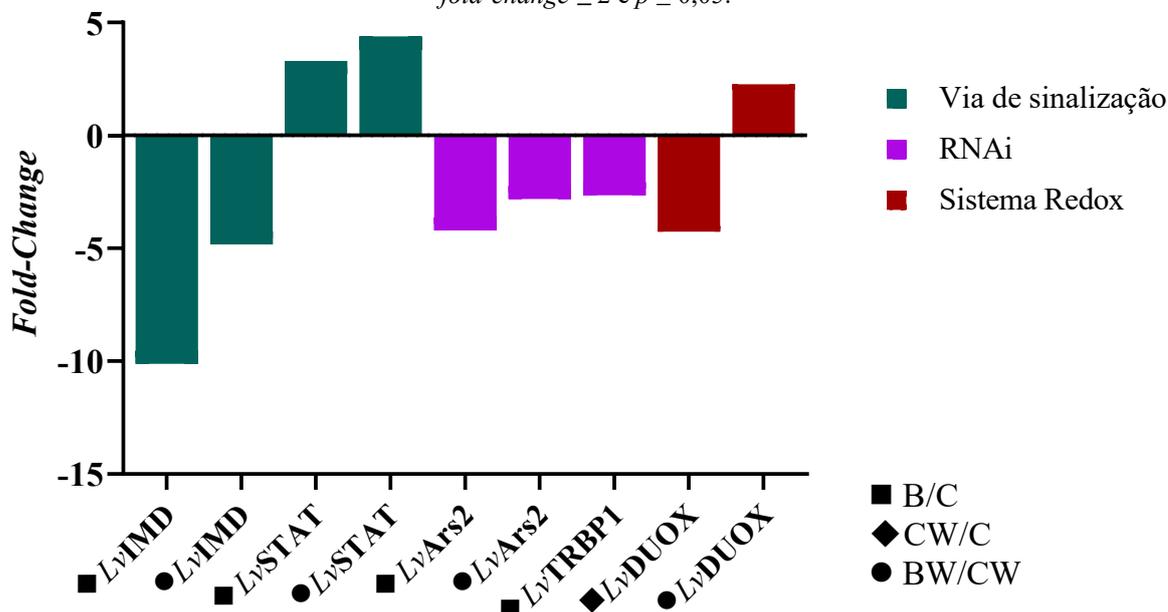
Com o objetivo de identificar genes de conhecidas categorias funcionais relacionadas ao sistema imune (vias de sinalização, RNAi, sistema redox, peptídeos antimicrobianos e proteínas de reconhecimento de padrões) foram analisados por RT-qPCR a partir das mesmas amostras dos grupos analisados no sequenciamento (C, B, CW e BW). Dos sete (7) genes associados ao sistema imune de camarões, 5 deles apresentaram expressão diferencial no intestino médio, associado ao fator abiótico avaliado (condição de cultivo) ou ao fator biótico (infecção viral) (**Tabela 4, Figura 3**).

Os dois genes analisados pertencentes a vias de sinalização apresentaram expressão diferencial. A expressão do transcrito relacionado à via IMD (*Immune deficiency*), *LvIMD*, foi 10,12 vezes superior em camarões cultivados em água clara, que os em bioflocos (**Tabela 4, Figura 3**). A infecção pelo WSSV nestes animais (CW) continuou relacionada a alta expressão, cerca de 5 vezes superior comparado aos animais em BFT e infectados (BW) (**Tabela 4, Figura 3**). Já, o gene pertencente à via de sinalização JAK-STAT, *LvSTAT* (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) apresentou expressão induzida em 3,3 vezes em animais cultivados em bioflocos, comparado aos de água clara (B/C), não sendo sua expressão alterada em função da presença do WSSV.

Dos genes pertencentes à defesa antiviral mediada pelo sistema RNAi (RNA de interferência), o *LvArs2* (*Arsenite-resistance protein 2-like protein*) apresentou a expressão induzida 4,2 vezes em animais no cultivo controle (água clara, C) comparado aos em B; ao contrário, sua expressão foi reprimida cerca de 3 vezes nos animais em bioflocos e infectados (BW/CW) (**Tabela 4, Figura 3**). Outro gene dessa categoria, o *LvTRBP* (*Transactivating response RNA-binding protein isoform 1*) foi 2,6 vezes mais expresso em animais cultivados em água clara que nos cultivados em bioflocos (B/C), mas não houve expressão diferencial entre animais dos outros grupos (**Tabela 4, Figura 3**).

Como parte da categoria funcional do sistema Redox, a expressão do gene que codifica para a enzima Duol oxidase 1, o *LvDuox*, foi modulada em função da presença do vírus no IM dos camarões. Animais cultivados em água clara e infectados com o WSSV tiveram a expressão de *LvDuox* reduzida cerca de 4 vezes (CW/C) e, aumentada 3 vezes em animais criados em bioflocos e infectados (BW/CW) (**Tabela 4; Figura 3**). Quanto aos genes pertencentes às categorias de peptídeos antimicrobianos e de proteínas de reconhecimento padrão avaliados, não houve mudança no perfil transcricional em nenhum dos grupos experimentais.

**Figura 4** – Expressão diferencial de genes relacionados ao sistema imune considerando as comparações entre os grupos experimentais. Os animais analisados foram cultivados em sistema de bioflocos (B) e água clara (C) e após, desafiados oralmente por WSSV (BW e CW). valores de expressão gênica estão apresentados em *fold-change*  $\geq 2$  e  $p \leq 0,05$ .



**Tabela 3** – Expressão de alguns genes do sistema imune no intestino médio de *L. vannamei*, associada às condições de cultivo [bioflocos (B) e água clara (C)] e ao desafio com o WSSV (BW e CW).

Categoria	Nomenclatura	Expressão Gênica			
		B/C	CW/C	BW/B	BW/CW
<b>Vias de sinalização</b>					
LvIMD	Immune deficiency (Imd)	-10,12*	0,70	1,46	-4,83*
LvSTAT	Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)	3,30**	0,86	1,14	4,39***
<b>Sistema RNAi</b>					
LvArs2	Arsenite-resistance protein 2-like protein (Asr2)	-4,21**	0,89	1,33	-2,82**
LvTRBP1	Transactivating response RNA-binding protein isoform 1	-2,65*	0,79	1,29	0,61
<b>Sistema Redox</b>					
LvDUOX	Duol Oxidase (DUOX)	0,58	-4,26*	1,00	2,27*
<b>Peptídeos antimicrobianos</b>					
LvALF-B	ALF Grupo B	-2,75	1,91	1,56	-3,39
<b>Proteínas de reconhecimento de padrões</b>					
LvGAL	Galectin	1,30	1,11	1,13	1,33

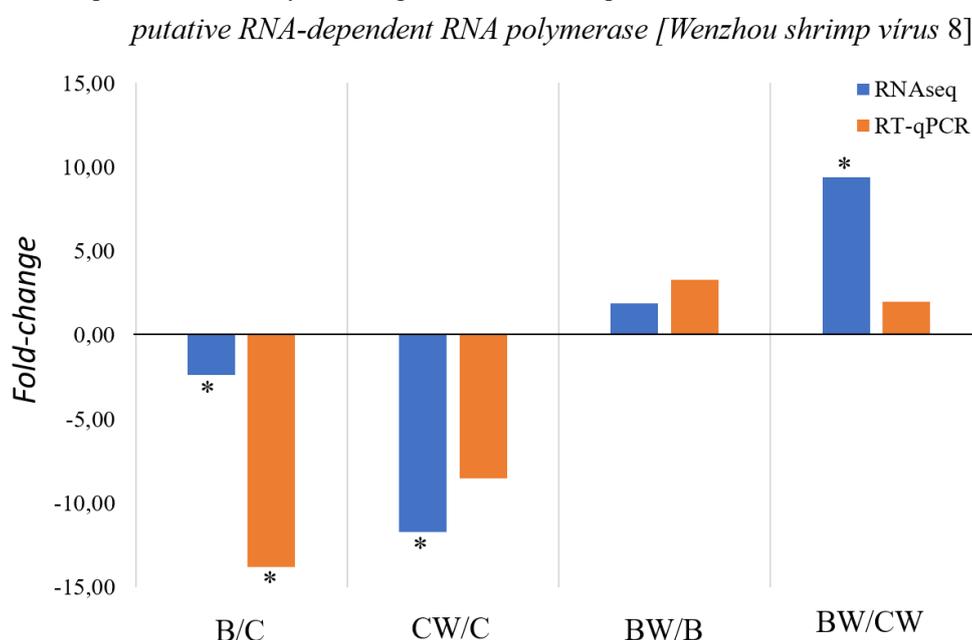
Expressão gênica em PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) entre os grupos estão representadas em valores de *fold-change*. Em vermelho estão os transcritos com maior expressão diferencial, e em azul os de menor expressão diferencial considerando a comparação entre os grupos B/C, CW/C, BW/B e BW/CW.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

### 2.3.5 Identificação de um transcrito codificante para uma RdRp do ribovírus Whenzou 8 modulado pelo efeito do cultivo em bioflocos e presença do vírus no intestino médio de camarões

Os dados transcritômicos do intestino médio revelaram a presença de um transcrito viral identificado como codificante para uma proteína anotada como “*putative RNA-dependent RNA*

*polymerase*” (*Cluster-33328.2*, número de acesso: KX883984.1), pertencente ao ribovírus “*Wenzhou shrimp vírus 8*” (TAX: 1923655). A identidade entre a sequência identificada e àquela depositada no GenBank foi de 95,38% (*e-value*: 0.0). Embora no transcrito estivesse 9 vezes mais expresso nos animais cultivados em BFT e desafiados pelo WSSV (BW comparado ao CW), esses valores não atingiram o mesmo resultado pela RT-qPCR (**Figura 4**).

**Figura 5** – Perfil transcricional do gene codificante para uma RdRp codificada pelo “*Wenzhou shrimp vírus 8*” (TAX: 1923655). As análises são referentes ao intestino médio de camarões cultivados em bioflocos (B) ou água clara (C) e desafiados oralmente com o WSSV (BW e CW). Valores azul correspondem aos valores do perfil do transcrito obtido pelo RNASeq e, em laranja, aos de expressão obtidas pela PCR quantitativa em tempo real. Os valores de expressão estão apresentados como *fold-change*  $\leq 2$ . \*valores de  $p \leq 0,05$  estão indicados em asterisco.



A análise por RT-qPCR (nos mesmos parâmetros de validação) identificou que este transcrito é expresso positivamente (cerca de 14 vezes mais) em animais cultivados em água clara que em animais cultivados em bioflocos (B/C). Entretanto, teve expressão 8,5 vezes menor em animais cultivados em água clara quando infectados com o vírus (CW/C) (**Figura 4**). De modo geral o perfil de expressão por RT-qPCR foram semelhantes aos observados por RNAseq, mas os níveis de expressão não se mantiveram os mesmos e não foi encontrado diferença estatística por RT-qPCR nas comparações que analisam o efeito do WSSV entre os cultivos (BW/CW) e o efeito do WSSV em animais cultivados em bioflocos (BW/B) sobre a expressão desta sequência viral.

## 2.4 DISCUSSÃO

Ao que é de nosso conhecimento até o presente momento, não foi encontrado nenhum estudo que relate o efeito do cultivo em sistema BFT e da infecção com WSSV por via oral sobre os transcritos do intestino médio de *L. vannamei*. Dentro desse contexto, nosso grupo realizou recentemente o sequenciamento em larga escala dos transcritos (RNASeq) expressos no intestino médio de juvenis de *L. vannamei* cultivados em bioflocos (B) ou água clara (C) e desafiados com o WSSV (CW, BW) (PILOTTO, 2019). O conjunto das análises possibilitou identificar 32.754 *clusters* gênicos, cuja expressão foi analisada entre os grupos (condição cultivo e presença do vírus). Quando avaliamos o efeito exclusivamente do cultivo, em animais não desafiados (B/C) identificamos um maior número de modificações na expressão dos *clusters* expressos no IM dos camarões cultivados em bioflocos em comparação com os cultivados em água clara. Dos quatro (4) *clusters* validados neste grupo todos apresentaram maior expressão no IM de animais cultivados em bioflocos. Conforme o que foi demonstrado por (BURFORD et al., 2004; PILOTTO et al., 2018), o ambiente de cultivo em bioflocos e os componentes imunoestimulantes presentes nele podem causar uma alteração no perfil de expressão de genes diferencialmente expressos, trazendo uma possível imunoestimulação, inclusive, em genes relacionados com a imunidade dos camarões.

A presença do vírus no organismo do animal, independentemente da condição de cultivo dos camarões (CW, BW), esteve associada à modulação de um menor número de genes expressos no IM, quando comparado aos animais não desafiados, respectivos (C, B). Contudo, observando a expressão diferencial dos *clusters* sequenciados nos camarões desafiados oralmente com o WSSV fica evidenciado que houve um perfil de expressão maior em animais cultivados em bioflocos, mesmo se comparado a animais não desafiados (BW/B). Nossos resultados indicam que o WSSV promoveu mudanças no perfil de expressão gênica do intestino médio dos animais, e que essas mudanças são maiores em animais cultivados em água clara, sendo que a maioria dos transcritos avaliados na condição controle (água clara) tiveram sua expressão diminuída em animais desafiados (CW/C). Esses resultados são coerentes, uma vez que em sistemas de cultivo tradicionais, com alta taxa de renovação de água e isenta da rica comunidade microbiana do BFT, não ocorre as conhecidas melhorias proporcionadas pelo sistema de cultivo em bioflocos (BURFORD et al., 2004; PILOTTO et al., 2018). Ao avaliar a expressão relativa de 67 genes candidatos a potenciais assinaturas transcricionais entre estes grupos de comparação, validamos os dados transcritômicos reforçando a identificação de 19 possíveis assinaturas transcricionais associados ao cultivo, no caso de GDEs dos grupos de

comparação B/C e BW/CW, ou à defesa antiviral de camarões pelo intestino médio, no caso de GDEs dos grupos de comparação BW/B e CW/C.

O sistema imunológico em invertebrados não possui memória imunológica a longo prazo mediada por linhagens clonais, e contam apenas com uma imunidade do tipo inata, intimamente associada à sua hemolinfa, particularmente aos hemócitos (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). Entre as inúmeras respostas de imunidade inata está a participação das proteínas do hospedeiro que fazem o reconhecimento de componentes não-próprios, presentes nos microrganismos (WANG; WANG, 2013). As proteínas de reconhecimento de padrões moleculares (PRPs) participam de uma etapa crítica para desencadear mecanismos imunológicos humorais e celulares, e dentre elas, destacam-se as aglutininas ou lectinas (SÁNCHEZ-SALGADO et al., 2021). Em nosso estudo, uma sequência codificada para uma lectina do tipo-C (*cluster-18606.0*) foi encontrada sendo mais expressa (5x) no transcrito intestinal de animais cultivados em bioflocos (B/C). As lectinas do tipo-C (CTLs) são uma superfamília de proteínas de reconhecimento de carboidratos, que recebem a designação “tipo-C” por serem  $Ca^{2+}$  dependentes. Essas proteínas reconhecem diversos carboidratos terminais de glicoproteínas e glicolipídios em microrganismos, participando significativamente no papel de reconhecimento do não próprio e eliminação de invasores (LIN et al., 2020). Em camarões peneídeos, as lectinas do tipo-C já foram descritas participando de vários processos de defesa, entre eles reconhecimento e aglutinação/encapsulamento, modulação de peptídeos antimicrobianos e manutenção da microbiota da hemolinfa, fagocitose e *clearance* bacteriano, estimulação da exocitose e ativação do sistema proPO e inibição da infecção pelo WSSV em estágios iniciais, mas promovendo a infecção em estágios tardios (*vide* revisão de Wang et al., 2020) (WANG; VASTA; WANG, 2020).

As lectinas do tipo-C possuem uma ampla variedade estrutural resultante da formação de proteínas "quiméricas" ou "mosaico" em que os domínios de ligação a carboidratos das CTLs se unem formando domínios estruturais funcionalmente diversos (ZELENSKY; GREARY, 2005). Nos últimos anos, uma diversidade de Lectinas do tipo-C tem sido identificada entre os crustáceos, particularmente em camarões, e alguns são específicos para tecidos. A recente revisão de Wang et al. (2020) relatam, por exemplo, proteínas do tipo-C de camarão *L. vannamei* distribuída em hepatopâncreas (*LvAV*), outra de hemócitos (*LvLdlrCTL*) e uma amplamente distribuída (*LvCTL4*) (WANG; VASTA; WANG, 2020). Outros dois estudos relatam a *Lv CTL 3* (LI et al., 2014) e *LvCTL4* (LI et al., 2015) que possuem ampla distribuição tecidual. Contudo, devido a esses dados não serem de hibridização *in situ*, muito provavelmente referem-se à expressão proveniente de hemócitos infiltrados nos diferentes tecidos. Avaliar a

expressão tecidual desses transcritos é importante para determinarmos a relação deste gene com a imunidade exclusivamente intestinal, uma vez que os hemócitos podem estar infiltrados no intestino médio devido ao comportamento migratório dessas células circulantes. Este fato foi apresentado em um estudo realizado por Silveira e colaboradores (2018) através de ensaios de imunofluorescência, confirmando a presença de hemócitos infiltrantes no intestino de camarões *L. vannamei* (SILVEIRA et al., 2018). Como sugerem esses autores, os hemócitos infiltrados no intestino médio podem ser responsáveis pela expressão de genes relacionados ao sistema no intestino médio. Esses achados, ao que é do nosso conhecimento, são únicos, pois ao avaliar a expressão tecidual da lectina identificada no presente transcrito, encontramos que ela é expressa apenas nas amostras de IM do *L. vannamei* e mais expressa em animais cultivadas em bioflocos, e se esta proteína possui um potencial envolvimento na melhoria da imunidade intestinal dos camarões, se trata de um interessante candidato como assinatura transcricional para estudos que busquem a prevenção de enfermidades através desse sistema de cultivo.

Outro gene validado no transcrito de IM de *L. vannamei* foi um transcrito anotado para uma proteína (1-like) contendo o domínio WSC (*Wall Stress-responsive Component* ou “componente de parede responsivo ao estresse”). Esse transcrito é específico do intestino (sem expressão hemocitária) e foi fortemente induzido em animais desafiados oralmente com WSSV e cultivadas em bioflocos (BW/B). Não há relatos na literatura sobre esse transcrito em peneídeos, contudo proteínas com domínio WSC estão presentes na parede celular e membrana plasmática de leveduras e hifas de fungos entomopatogênicos (TONG et al., 2016). Essas moléculas estão envolvidas na manutenção da integridade da parede celular em situações de choque térmico; ou ainda participando de uma via de sinalização de integridade da parede celular, que compreende uma cascata de proteínas quinases ativadas por mitogênios (MAPKs) necessária para tolerância a múltiplos estresses em fungos (KLIS et al., 2002). É importante ressaltar que todas as proteínas contendo o domínio WSC único atuam como reguladores positivos de múltiplas respostas ao estresse em *B. bassiana* (TONG et al., 2016). Fungos associados à raiz de plantas também secretam essas proteínas, que se liga especificamente à  $\beta$ -1,3-glicanas, um dos principais componentes da parede celular de fungos, compondo uma característica de ancoragem fungo-fungo (TONG et al., 2016).

O domínio WSC também pode ser encontrado como mais cópias em tandem ou em combinação com outros domínios, como em lectinas expressas por fungos associados à raiz de plantas (WAWRA et al., 2019). Estes autores revelaram que a recombinante SiWSC3 induz raízes de plantas a se associar a fungos de maneira inespecífica. Como o ambiente do sistema de cultivo em bioflocos é rico em microrganismos incluindo fungos que podem fornecer

padrões moleculares conservados associados a patógenos, que no caso são as  $\beta$ -1,3-glicanas de fungos, a expressão deste gene se mostrou ser estimulada em animais desafiados pelo WSSV pelo cultivo em sistema de BFT, e não pela infecção pelo vírus.

Assim como o gene para a lectina tipo-C e a proteína com domínio WSC, outro transcrito específico do intestino médio foi validado do transcrito e está anotado para uma proteína semelhante à enzima conversora de angiotensina (ECA; *Angiotensin-converting enzyme-like*). A enzima conversora de angiotensina é bem conhecida em vertebrados por sua dupla ação na conversão de Angiotensina I inativa em Angiotensina II ativa e na degradação da bradicinina ativa (BK), e tem sido alvo de estudos que desempenham um papel importante no controle da pressão arterial em humanos (BERNSTEIN et al., 2013). Inibidores potentes da ECA, como o captopril, são produzidos para tratar a hipertensão e estudos relatam o isolamento de peptídeos inibitórios de ACE a partir da carapaça de camarão (FENG et al., 2016). No caso de camarões, não há relatos na literatura. No entanto, um gene para ACE foi identificado nas brânquias do caranguejo *Carcinus maenas* envolvido na regulação do Hormônio Hiperglicêmico de Crustáceos (CHH) na hemolinfa, podendo ser um substrato endógeno para esta enzima. Maiores estudos deverão ser realizados para elucidar o seu papel no intestino do camarão, especialmente de animais que possam ter maiores níveis de expressão deste gene, que codifica para uma importante molécula de interesse farmacêutico. As análises de expressão diferencial deste gene indicam um envolvimento do desafio viral na mudança da expressão deste gene ao avaliar o efeito da presença do vírus em animais cultivados em água clara (CW/C), apontando este transcrito como um forte potencial assinatura transcricional da infecção em camarões. Este transcrito também foi encontrado com alto valor de expressão gênica ao comparar animais desafiados pelo WSSV entre os cultivos, e foi observado que a expressão deste é maior em animais cultivados em bioflocos (BW/CW), isso infere a um provável envolvimento do BFT na expressão deste gene em animais desafiados.

Outro transcrito candidato foi anotado para uma provável proteína cinase serina/treonina “KinX” (*Probable serine/threonine-protein kinase kinx*), que se destaca por ser expresso 26 vezes mais em animais desafiados oralmente pelo WSSV e cultivados em bioflocos. A sua função específica em *L. vannamei* ainda não está definida. Em um estudo realizado por (RUAN et al., 2014) caracterizaram uma proteína cinase serina/treonina nesse peneídeo e avaliaram sua expressão gênica a nível transcricional em diversos tecidos incluindo o intestino, e testaram o efeito da inibição desta proteína em animais desafiados por WSSV. Estes autores relataram uma diminuição nos níveis transcricionais de proteínas do vírus em animais cuja proteína serina/treonina foi inibida, e sugeriram um possível envolvimento desta proteína com a infecção

pelo WSSV. As proteínas cinases são uma grande família de proteínas e responsáveis pela regulação diversas de vias de transdução de sinal, por meio da fosforilação de resíduos de serina, treonina ou tirosina (SILVA et al., 2009). As respostas a nível transcricional encontrado em nosso estudo sugerem uma possível melhora na expressão deste transcrito em animais cultivados em bioflocos, mesmo após desafiados oralmente pelo WSSV. Sendo assim, este poderia ser um transcrito com potencial envolvimento nas respostas imunes do epitélio intestinal frente ao WSSV, uma vez que sua expressão é específica do IM.

Além destes mecanismos, o intestino do camarão possui diversas barreiras que funcionam como proteção contra a entrada de microrganismos patogênicos. Entre esses podem ser descritos mecanismos físicos como a estrutura quitinosa que compõe a membrana peritrófica e o muco que é secretado para a luz do intestino. Neste estudo identificamos no transcrito do intestino médio do camarão *L. vannamei* uma sequência codificada para uma Quitinase 5 com maior expressão em animais desafiados pelo WSSV e cultivados em bioflocos. As quitinases são um grupo de enzimas hidrolíticas que hidrolisam a quitina, principal carboidrato que compõe a estrutura da membrana peritrófica que reveste o intestino médio (WANG et al., 2012a). Em artrópodes, embora seja bem conhecido que as quitinases estão envolvidas no crescimento, muda e desenvolvimento do camarão. O conhecimento atual sobre o papel das quitinases na imunidade, especialmente na regulação imunológica, permanece amplamente desconhecido. A sequência anotada para a quitinase encontrada em nosso estudo é altamente semelhante a estudada por (NIU et al., 2018). Esses autores sugeriram que a Quitinase 5 do camarão poderia desempenhar um papel na regulação das respostas imunes humoral e celular em *L. vannamei*. Indicaram também que esta proteína contém um domínio catalítico e um domínio de ligação à quitina e não mostra efeito inibidor sobre o crescimento de bactérias *in vitro*. No entanto, experimentos *in vivo* demonstraram que o silenciamento desta Quitinase 5 aumentou a mortalidade de camarões infectados (por via sistêmica/endotérmica) pelo WSSV e *Vibrio parahaemolyticus*, e regulou positivamente a carga de patógenos nos tecidos analisados. Além disso, a proteína recombinante produzida aumentou a taxa fagocítica de bactérias pelos hemócitos. Em conjunto com esses achados, e com o resultado obtido neste transcrito podemos elencar este transcrito como um candidato em potencial a assinaturas transcricionais relacionada ao efeito do cultivo em bioflocos sob a expressão de genes e defesa antiviral pelo WSSV. Contudo, encontramos que este transcrito é expresso também por hemócitos, assim como encontrado por (NIU et al., 2018), portanto, é possível que os níveis de expressão encontrados nestes tecidos sejam provenientes de hemócitos infiltrados nos tecidos, e para

compreender o exato envolvimento desta molécula e sua interação com patógenos, mais estudos precisam ser realizados.

Ainda envolvido com a proteção oferecida pelas estruturas a base de quitina contra patógenos, foi encontrado em nossas análises transcritômicas uma sequência anotada para uma proteína semelhante a ligante de quitina (*Cluster-30088.0*) com expressão diferencial de 43,6 vezes mais em animais desafiados oralmente pelo WSSV e cultivados em bioflocos (BW/CW). As proteínas que contém domínio de ligação à quitina desempenham papéis de manutenção das estruturas extracelulares a base de quitina, assim como em funções relacionados aos tecidos quitinosos. Ainda não está bem esclarecido a função dessas proteínas em camarões peneídeos. Entretanto, dois estudos realizados com *Penaeus monodon* (CHEN et al., 2009; LI et al., 2016) avaliaram a capacidade deste domínio em se ligar a proteínas do envelope do WSSV, e revelaram que a proteína ligante de quitina pode se ligar à proteína estrutural VP24 de WSSV no trato digestório deste peneídeo e auxiliar na entrada do vírus na célula. O gene que encontramos em nossos dados transcritômicos anotados para essa proteína apresentou um perfil de expressão maior em animais cultivados em bioflocos e desafiados oralmente pelo WSSV, possivelmente causado pelos compostos imunoestimulantes presentes no sistema de cultivo em BFT, porém esta proteína apresentou expressão por hemócitos em nossas análises de expressão tecidual, e isso implica em uma possível presença de hemócitos infiltrados expressando este gene no intestino médio. Apesar disso, esse ainda é um interessante candidato a uma assinatura molecular associado ao cultivo em BFT e defesa contra o WSSV.

Outro gene validado do transcrito foi uma sequência semelhante a proteína de floculação FLO11 (*cluster-18257.0*). Esta proteína é conhecida por participar do processo no qual células aderem para formar agregados (flocos), reconhecida como uma proteína de parede celular que participa de adesão célula-célula durante a floculação de leveduras. Esta proteína identificada em um transcrito do cordão abdominal da lagosta *Procambarus clarkii*, nesse estudo realizado por (CALDERÓN-ROSETE et al., 2018) ela foi relatada como envolvida na via imunológica de coagulação e melanização deste crustáceo. Em *Litopenaeus vannamei* ainda é pouco conhecido o envolvimento desta proteína nos processos imunológicos da espécie, porém identificamos este transcrito com menor expressão em animais desafiados, quando avaliado no cultivo em água clara (CW/C). Isto pode ser causado pelo desafio causado pelo WSSV, causando uma diminuição na expressão deste transcrito. Este transcrito pode ser considerado um bom candidato como assinatura transcricional associado à defesa antiviral pelo epitélio intestinal, uma vez que foi expresso apenas no intestino, descartando a hipótese de ter sido expresso por hemócitos infiltrados.

No grupo que avalia o efeito do desafio oral por WSSV entre ambos os tipos de cultivo (BW/CW), foi identificado um transcrito anotado para uma proteína semelhante a Xantina-desidrogenase (Cluster-7292.0). Em mamíferos, a xantina-desidrogenase é conhecida por compor uma subfamília de subfamília de molibdo-flavoenzima que geram espécies reativas de oxigênio (EROs) (GARATTINI et al., 2003). Já em crustáceos, o único estudo realizado até o momento com essa proteína foi realizado por (OKAMURA et al., 2018), onde os autores caracterizaram uma xantina desidrogenase (XDH) e uma aldeído-oxidase (AOX) no camarão *Marsupenaeus japonicus* e sua resposta a microrganismos patógenos. Nas análises de expressão realizada por estes autores, eles relatam que a XDH é altamente expressão em tecidos do coração e estômago e foi regulada positivamente no órgão linfoide em resposta ao *Vibrio penaeicida* (48 e 72 horas após injeção). De maneira interessante eles também determinaram que as concentrações de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) aumentaram significativamente 6, 12, 48 e 72 h após a injeção de WSSV. A XDH identificada em nosso estudo foi identificada com expressão no intestino médio (não foi detectado em hemócitos), e com expressão maior em animais cultivados em sistema de bioflocos (BW). O seu envolvimento com a produção de EROs aponta este transcrito como um interessante candidato a uma assinatura transcricional envolvida com a saúde intestinal de camarões. Ao que se sabe, em crustáceos, as espécies reativas de oxigênio participam na linha de frente de defesa contra infecções microbianas (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). As análises de expressão sugerem, que a maior expressão deste transcrito em animais cultivados em bioflocos pode ter sido causada pela capacidade imunoestimulante deste sistema de cultivo, mas serão necessário maiores estudos para determinar o envolvimento deste gene na imunidade intestinal de camarões.

Algumas das anotações realizadas nas sequências do transcrito revelaram proteínas que possuem um potencial indicativo do estado de saúde geral dos camarões, mas que não são sequências que possuem relatos sobre suas relações claras com a defesa imune dos camarões. Uma delas foi anotada para uma proteína de fator de licenciamento de replicação de DNA semelhante a MCM2 (Cluster-11353.0). Em camarões ainda não há uma clara especificação de sua função, mas ela parece ser bem descrita em plantas. Basicamente, esta proteína pode desempenhar um papel crucial no controle dos processos de desdiferenciação e proliferação celular em raízes, sendo também essencial em processos embrionários (NI et al., 2009). A sua expressão foi maior em animais desafiados e cultivados em sistema de água clara (CW/C), como sua expressão foi maior em animais desafiados, a presença do vírus no intestino médio dos camarões pode promover a expressão deste transcrito.

Outra sequência identificada no transcrito foi anotada para a uma proteína semelhante a uma Isoforma X1 de Sialina (*Cluster-15110.0*). Esta isoforma não possui descrição definida em invertebrados, e o que se encontra de referência sobre este gene é identificado principalmente em humanos. A Sialina é conhecida por transportar o ácido glicurônico e o ácido siálico livre para fora dos lisossomos. Também funciona como um co-transportador de íons na membrana plasmática das células de glândulas salivares em mamíferos (QIN et al., 2012). Ainda serão necessários maiores estudos para entender o envolvimento deste transcrito e de uma possível regulação negativa do WSSV na expressão dele, uma vez que teve expressão maior em animais não desafiados e cultivados em BFT (BW/B). Porém, a expressão deste transcrito não foi encontrada em hemócitos, então pode ser um transcrito que ainda assim sirva de candidato a assinatura transcricional.

Entre as principais sequências validadas, cinco delas são sequências ainda não caracterizadas (*uncharacterized proteins*), ou seja, já identificadas como possíveis sequências codificantes para proteínas (depositadas no *GenBank*), porém sem ainda uma classificação funcional. De maneira semelhante, foram identificadas 3 sequências gênicas não anotadas (NA) nos bancos de dados disponíveis. Essas sequências, em particular, merecem estudos mais aprofundados pois podem representar genes/proteínas com função relevante para a imunidade dos peneídeos.

Adicionalmente, a expressão de 7 genes reconhecidamente envolvidos no sistema imune de camarões foi avaliada nestes mesmos animais. A primeira categoria avaliada foi de genes envolvidos em Vias de Sinalização onde identificamos que os níveis transcricionais de um deles, o *LvIMD* (*Immune deficiency*) apresentou aumento de expressão nos cultivados em água clara, desafiados (CW) ou não (C) quando comparado com animais cultivados em BFT (B/C). Após o desafio viral (CW), também apresentaram expressão maior em animais criados em água clara. A sinalização realizada pelo IMD tem um importante papel nas defesas de artrópodes, atuando na regulação de genes relacionados ao sistema imunológico envolvidos nas defesas antimicrobianas e antivirais e também no controle da microbiota intestinal (COSTA et al., 2009). Em um estudo realizado por (PILOTTO et al., 2019), que visou identificar efeitos imunomodulatórios em camarões *L. vannamei* suplementos com a cianobactéria *Arthrospira platensis* também foi identificado uma expressão maior deste gene no intestino médio dos camarões cultivados em água clara. Os autores sugerem que este efeito pode ser causado por um descontrole na regulação da microbioma intestinal, mediado pelo IMD e por efeitos indiretos da infecção pelo WSSV.

Outro gene avaliado foi o *LvSTAT* pertencente à via de sinalização JAK-STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), associada à indução de respostas imunes a infecções virais, havendo alguns estudos relatados com o WSSV (YAN et al., 2015). Esse gene apresentou maior expressão diferencial em animais cultivados em bioflocos, independente da infecção viral (3,3 vezes maior em B e 4,39 vezes maior em BW). Em um estudo realizado por (KIM et al., 2014) os autores sugerem que o sistema de cultivo em bioflocos causem melhoras no crescimento e na ativação do sistema imune de camarões *Litopenaeus vannamei*, o que corrobora com nossos achados, que demonstram que a expressão do *LvSTAT* é maior em animais cultivados em bioflocos, mesmo sob condições de desafio viral.

Também foi avaliada a categoria funcional de mecanismos de defesa antiviral por RNA de interferência (RNAi). Neste grupo foi avaliado a expressão gênica dos genes *LvArs2* e *LvTRBP*. Em um trabalho de caracterização os autores demonstraram que a *LvArs2* pode estar envolvido na regulação miRNA e siRNA em *L. vannamei* (CHEN et al., 2011) O *LvTRBP* está relacionado ao recrutamento de proteínas Argonautas que compõem o mecanismo de RNAi (WANG et al., 2012b). Em nosso estudo, ambos os genes foram mais expressos em camarões cultivados em água clara, independente da infecção viral, comparado aos animais cultivados em bioflocos. Em relação à categoria funcional do sistema Redox, a expressão do gene codificante para a enzima duol-oxidase (*LvDUOX-1*) foi maior em animais em água clara e desafiados oralmente pelo WSSV. De forma interessante, identificamos que também houve uma maior expressão deste gene em animais desafiados e cultivados em bioflocos, do que em animais cultivados em água clara (BW/CW). Em um estudo realizado por (YANG et al., 2016) no intestino do peneídeo *Marsupenaeus japonicus* os autores apresentaram que as espécies reativas de oxigênio (ROS) associados à Duox podem estar envolvidas na inibição de patógenos bacterianos. ROS incluem radicais de oxigênio e alguns agentes oxidantes formados pela redução parcial de oxigênio, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxil ( $OH^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (JI; YAO; WANG, 2011).

A sustentabilidade da carcinicultura mundial enfrenta constantemente desafios decorrentes de mortalidades advindas de doenças infecciosas (bacterioses e viroses). A presença de múltiplos vírus no organismo de camarões é comum e não necessariamente implica em enfermidade (RYABOV, 2017). Recentemente, transcritos de um vírus de RNA não associado a patogenicidade, chamado *Wenzhou shrimp virus 8*, foram identificados em diferentes tecidos de moluscos e crustáceos (SHI et al., 2016). Identificou-se em meio aos transcritos sequenciados do camarão, um anotado para a enzima viral “RNA dependente de RNA polimerase” (RdRp) (KX883984.1), expresso pelo *Wenzhou shrimp virus 8* (TAX: 1923655)

com 95,38% de identidade (e-value: 0.0) com o *cluster-33328.2*. Nossos achados sugerem a presença de Wenzhou vírus no intestino médio de camarões *L. vannamei*, tanto de animais não desafiados quanto desafiados com o WSSV, possivelmente fazendo parte do viroma intestinal do camarão. Contudo, a expressão do gene RdRp parece ser modulada em função do ambiente de cultivo (BFT mais expresso que em água clara) e da presença do WSSV no organismo do camarão. Entretanto, o significado destes achados não é ainda compreendido e maiores estudos deverão ser conduzidos para caracterizar o viroma intestinal e a sua implicação na sua saúde dos camarões.

Em conclusão, identificou-se 19 genes diferencialmente expressos no transcrito de *L. vannamei* cultivados em BFT e desafiados oralmente com o WSSV e que estes transcritos são candidatos a compor uma assinatura transcricional associada à infecção pelo WSSV e/ao sistema de cultivo. A maioria destes genes (13) são especificamente expressos no intestino médio dos camarões e, portanto, não são oriundos de hemócitos infiltrados no epitélio intestinal. Outro relevante achado foi a presença de um transcrito anotado para RdRp do *Wenzhou shrimp virus 8*, cuja expressão esteve associada ao cultivo em BFT e à infecção pelo WSSV. Não compreendemos ainda o significado da presença do *Wenzhou shrimp virus 8* no intestino de camarões, porém sugerimos que ele faça parte do viroma intestinal de camarões. Maiores estudos merecem ser realizados para elucidar sua eventual participação na homeostasia e saúde do animal. Por fim, ao validar candidatos à possíveis assinaturas transcricionais, apresentamos uma variedade de genes que podem servir como indicativos da saúde intestinal de camarões cultivados em bioflocos, visando o controle das infecções virais na carcinicultura.

## 2.5 AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer aos professores, técnicos e alunos do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) da UFSC/CCA pelo apoio e fornecimento dos animais e água marinha utilizados nesse trabalho. FFB recebeu bolsa PROEX (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil CAPES) e o trabalho recebeu apoio financeiro pelo projeto CIMAR - 1974/ 2014.

## REFERÊNCIAS

BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Avances en la Inmunología del Camarón. In: MORALES, V.; CUÉLLAR-ANJEL, J. (Eds.). . **Guía Práctica - Patología e Inmología de Camarones Penaeidos**. Panamá: OIRSA, 2014. p. 237–304.

- BERNSTEIN, K. E. et al. A modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of angiotensin-converting enzyme. **Pharmacological Reviews**, v. 65, n. 1, p. 1–46, 2013.
- BLIGHE, K.; RANA, S.; LEWIS, M. **EnhancedVolcano: Publication-ready volcano plots with enhanced colouring and labelinR-Package**, 2019.
- BROWN, E. M.; SADARANGANI, M.; FINLAY, B. B. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. **Nature Immunology**, v. 14, n. 7, p. 660–667, 2013.
- BURFORD, M. A. et al. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. **Aquaculture**, v. 232, n. 1–4, p. 525–537, 2004.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- CALDERÓN-ROSETE, G. et al. Transcriptional identification of related proteins in the immune system of the crayfish *Procambarus clarkii*. **High-Throughput**, v. 7, n. 3, p. 1–15, 2018.
- CHEN, K. Y. et al. *Penaeus monodon* chitin-binding protein (PmCBP) is involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 27, n. 3, p. 460–465, 2009.
- CHEN, Y. H. et al. Identification and functional characterization of Dicer2 and five single VWC domain proteins of *Litopenaeus vannamei*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 6, p. 661–671, 2011.
- CHEN, Y. H.; HE, J. G. Effects of environmental stress on shrimp innate immunity and white spot syndrome virus infection. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 84, n. August 2018, p. 744–755, 2019.
- CHOU HSIN-YIU et al. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 23, n. 3, p. 165–173, 1995.
- COSTA, A. et al. The Imd pathway is involved in antiviral immune responses in *Drosophila*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, 2009.
- CRAB, R. et al. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. **Aquaculture**, v. 356–357, p. 351–356, 2012.
- DING, Z.; JIN, M.; REN, Q. Transcriptome analysis of *Macrobrachium rosenbergii* intestines under the white spot syndrome virus and poly (I:C) challenges. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, p. 1–12, 2018.
- DOBIN, A. et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 15–21, 2013.
- DUAN, Y. et al. Transcriptomic and microbiota response on *Litopenaeus vannamei* intestine

subjected to acute sulfide exposure. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 88, n. February, p. 335–343, 2019.

EKASARI, J. et al. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 41, n. 2, p. 332–339, 2014.

EMERENCIANO, M. G. C. et al. Biofloc Technology (BFT): A Tool for Water Quality Management in Aquaculture. In: **Water Quality**. [s.l: s.n.].

FENG, S. et al. Preparation and purification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from hydrolysate of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) shell waste. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 7, p. 1610–1617, 2016.

GARATTINI, E. et al. **Mammalian molybdo-flavoenzymes, an expanding family of proteins: Structure, genetics, regulation, function and pathophysiology** **Biochemical Journal**, 2003.

HUI, K.; REN, Q.; CAO, J. Insights into the intestine immune of *Marsupenaeus japonicus* under the white spot syndrome virus challenge using RNA sequencing. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 208, n. December 2018, p. 25–33, 2019.

JI, P. F.; YAO, C. L.; WANG, Z. Y. Reactive oxygen system plays an important role in shrimp *Litopenaeus vannamei* defense against *Vibrio parahaemolyticus* and WSSV infection. **Diseases of Aquatic Organisms**, 2011.

KALENDAR, R. et al. FastPCR: An in silico tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. **Genomics**, 2017.

KIM, S. K. et al. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 2, p. 362–371, 2014.

KLIS, F. M. et al. **Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*** **FEMS Microbiology Reviews**, 2002.

LAW, C. W. et al. Voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. **Genome Biology**, v. 15, n. 2, p. 1–17, 2014.

LI, B.; DEWEY, C. N. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. **BMC Bioinformatics**, 2011.

LI, H. et al. A C-type lectin (LvCTL4) from *Litopenaeus vannamei* is a downstream molecule of the NF- $\kappa$ B signaling pathway and participates in antibacterial immune response. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 43, n. 1, p. 257–263, 2015.

LI, M. et al. Identification of a C-type lectin with antiviral and antibacterial activity from Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 46, n. 2, p. 231–240, 2014.

LI, Z. et al. VP24 Is a Chitin-Binding Protein Involved in White Spot Syndrome Virus Infection. **Journal of Virology**, v. 90, n. 2, p. 842–850, 2016.

LIN, J. et al. Transcriptomic analysis and expression of C-type lectins in response to *Vibrio*

parahaemolyticus challenge in *Scapharca subcrenata*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 106, n. April, p. 365–373, 2020.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

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, n. 1–2, p. 133–141, 1996.

LO, C. F.; KOU, G. H. Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: A review. **Fish Pathology**, v. 33, n. 4, p. 365–371, 1998.

MOSS, S. M. et al. The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 247–250, 2012.

NELSON, J. W. et al. The START App: A web-based RNAseq analysis and visualization resource. **Bioinformatics**, v. 33, n. 3, p. 447–449, 2017.

NI, D. A. et al. The Arabidopsis MCM2 gene is essential to embryo development and its over-expression alters root meristem function. **New Phytologist**, 2009.

NIU, S. et al. A chitinase from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* involved in immune regulation. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 85, p. 161–169, 2018.

OKAMURA, Y. et al. Characterization of xanthine dehydrogenase and aldehyde oxidase of *Marsupenaeus japonicus* and their response to microbial pathogen. **Molecular Biology Reports**, v. 45, n. 4, p. 419–432, 2018.

PANIGRAHI, A. et al. Carbon: Nitrogen (C:N) ratio level variation influences microbial community of the system and growth as well as immunity of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in biofloc based culture system. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 81, n. March, p. 329–337, 2018.

PILOTTO, M. et al. Exploring the Impact of the Biofloc Rearing System and an Oral WSSV Challenge on the Intestinal Bacteriome of *Litopenaeus vannamei*. **Microorganisms**, v. 6, n. 3, p. 83, 2018.

PILOTTO, M. R. ENVOLVIMENTO DO INTESTINO MÉDIO NA IMUNIDADE DE *Litopenaeus vannamei* EM RESPOSTA AO WSSV E AO SISTEMA DE CULTIVO. p. 165, 2019.

PILOTTO, M. R. et al. Potential immunomodulatory and protective effects of the *Arthrospira*-based dietary supplement on shrimp intestinal immune defenses. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 88, n. February, p. 47–52, 2019.

QI, C. et al. Transcriptomic and morphological analyses of *Litopenaeus vannamei* intestinal barrier in response to *Vibrio parahaemolyticus* infection reveals immune response signatures and structural disruption. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 70, p. 437–450, 2017.

- QIN, L. et al. Sialin (SLC17A5) functions as a nitrate transporter in the plasma membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2012.
- ROBALINO, J. et al. Contributions of functional genomics and proteomics to the study of immune responses in the Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 110–118, 2009.
- RUAN, L. et al. Molecular cloning and characterization of a threonine/serine protein kinase lvakt from *Litopenaeus vannamei*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 32, n. 4, p. 792–798, 2014.
- RYABOV, E. V. Invertebrate RNA virus diversity from a taxonomic point of view. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 147, p. 37–50, 2017.
- SÁNCHEZ-SALGADO, J. L. et al. Pattern recognition receptors in the crustacean immune response against bacterial infections. **Aquaculture**, v. 532, n. July 2020, p. 735998, 2021.
- SHI, M. et al. Redefining the invertebrate RNA virosphere. **Nature**, v. 540, n. 7634, p. 539–543, 2016.
- SILVA, B. V. et al. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 453–462, 2009.
- SILVEIRA, A. S. et al. An immune-related gene expression atlas of the shrimp digestive system in response to two major pathogens brings insights into the involvement of hemocytes in gut immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 79, p. 44–50, 2018.
- TONG, S. M. et al. Subcellular localization of five singular WSC domain-containing proteins and their roles in *Beauveria bassiana* responses to stress cues and metal ions. **Environmental Microbiology Reports**, v. 8, n. 2, p. 295–304, 2016.
- VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, 2002.
- WANG, L. et al. Structure and partial protein profiles of the peritrophic membrane (PM) from the gut of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 33, n. 6, p. 1285–1291, 2012a.
- WANG, S. et al. TRBP and eIF6 Homologue in *Marsupenaeus japonicus* Play Crucial Roles in Antiviral Response. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e30057, 2012b.
- WANG, X. W.; VASTA, G. R.; WANG, J. X. The functional relevance of shrimp C-type lectins in host-pathogen interactions. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 109, n. April, 2020.
- WANG, X. W.; WANG, J. X. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. **Fish and Shellfish Immunology**, 2013.
- WANG, Y. G. et al. Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 39, n. 1, p. 1–11, 1999.

WAWRA, S. et al. FGB1 and WSC3 are in planta-induced  $\beta$ -glucan-binding fungal lectins with different functions. **New Phytologist**, v. 222, n. 3, p. 1493–1506, 2019.

YAN, M. et al. Identification of a JAK/STAT pathway receptor domeless from Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 44, n. 1, p. 26–32, 2015.

YANG, H. T. et al. Dual oxidases participate in the regulation of intestinal microbiotic homeostasis in the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 59, p. 153–163, 2016.

YE, J. et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC bioinformatics**, 2012.

ZELENSKY, A. N.; GREASY, J. E. **The C-type lectin-like domain superfamily** *FEBS Journal*, 2005.

ZHANG, X. et al. Penaeid shrimp genome provides insights into benthic adaptation and frequent molting. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.

## 4 CONCLUSÕES GERAIS

As análises transcritômicas do intestino médio de *L. vannamei* revelaram uma série de genes diferencialmente expressos que foram selecionados como potenciais candidatos a uma assinatura transcricional associado ao cultivo em BFT e à infecção pelo WSSV. Uma das sequências identificadas foi para uma Lectina do Tipo-C expressa de maneira específica no intestino médio de camarões, resultado esse inédito até então em camarões. Outro achado interessante foi a identificação de 13 dos 19 genes validados apresentando especificidade tecidual de expressão no IM (e não pelos hemócitos infiltrados); além disso um gene codificante para uma proteína não caracterizada anotado para *uncharacterized protein* LOC 113814204 pode ser considerado como um candidato à assinatura transcricional associado ao cultivo de camarões em BFT por apresentar valores de expressão maiores em animais cultivados em bioflocos, independente do desafio viral (B/C e BW/CW); e, finalmente, a identificação de um transcrito codificante para uma RdRp do *Wenzhou shrimp virus*  $\delta$ , possivelmente integrante do viroma intestinal de camarões, e que mostrou ser modulado pelo desafio com o WSSV e pelo ambiente de cultivo.

Esses resultados possibilitarão a identificação e caracterização de novos efetores envolvidos nas interações patógeno-hospedeiro associados a diferentes tipos de cultivos e a imunidade intestinal contra patógenos virais. Para isso, análises de genômica funcional poderão auxiliar na compreensão do papel dos genes validados na imunidade intestinal de camarões. Técnicas como silenciamento gênico por RNAi permitirão elucidar o papel destes genes na manutenção da microbiota endobionte dos camarões e sua sobrevivência frente ao desafio pelo WSSV.

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology 9th Ed.** [s.l: s.n.].
- ABCC. Procedimentos De Boas Práticas De Manejo E Medidas De Biossegurança Para a Carcinicultura Brasileira. p. 1–49, 2012.
- ARTS, J. A. J. et al. Haemocyte reactions in WSSV immersion infected *Penaeus monodon*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, n. 1, p. 164–170, 2007.
- AVNIMELECH, Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 176, n. 3–4, p. 227–235, 1999.
- BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Avances en la Inmunología del Camarón. In: MORALES, V.; CUÉLLAR-ANJEL, J. (Eds.). **Guía Práctica - Patología e Inmología de Camarones Penaeidos**. Panamá: OIRSA, 2014. p. 237–304.
- BRIGGS, M. et al. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. **RAP publication 2004/10**, v. 75, n. January, p. 1–12, 2004.
- CAPO, F.; WILSON, A.; DI CARA, F. The intestine of *Drosophila melanogaster*: An emerging versatile model system to study intestinal epithelial homeostasis and host-microbial interactions in humans. **Microorganisms**, v. 7, n. 9, 2019.
- CHOU HSIN-YIU et al. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 23, n. 3, p. 165–173, 1995.
- CONESA, A. et al. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, 2005.
- DAVIDSON, N. M.; OSHLACK, A. Corset: Enabling differential gene expression analysis for de novo assembled transcriptomes. **Genome Biology**, 2014.
- DING, Z.; JIN, M.; REN, Q. Transcriptome analysis of *Macrobrachium rosenbergii* intestines under the white spot syndrome virus and poly (I:C) challenges. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, p. 1–12, 2018.
- DUAN, Y. et al. Transcriptomic and microbiota response on *Litopenaeus vannamei* intestine subjected to acute sulfide exposure. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 88, n. February, p. 335–343, 2019.
- EGAN, S.; GARDINER, M. Microbial dysbiosis: Rethinking disease in marine ecosystems. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUN, p. 1–8, 2016.
- EPAGRI, E. DE P. A. E E. R. DE S. C. Síntese Informativa da Maricultura 2015. p. 1–7, 2016.
- ESCOBEDO-BONILLA, C. M. et al. Review A review on the morphology , molecular characterization , morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, v. 31, p. 1–18, 2008.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020**. [s.l: s.n.].

FAO, F. AND A. O. OF THE U. N. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Rome: [s.n.]. v. 35

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

GUPPY, J. L. et al. The state of “omics” research for farmed penaeids: Advances in research and impediments to industry utilization. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. AUG, 2018.

HUI, K.; REN, Q.; CAO, J. Insights into the intestine immune of *Marsupenaeus japonicus* under the white spot syndrome virus challenge using RNA sequencing. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 208, n. December 2018, p. 25–33, 2019.

JORY, D. E. Current production, challenges and the future of shrimp farming. **Global Aquaculture Alliance**, n. June, p. 1, 2018.

KIBENGE, F. S. **Emerging viruses in aquaculture** *Current Opinion in Virology*, 2019.

KOU, G. H. et al. Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. In: **Advances in shrimp biotechnology**. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok. [s.l: s.n.]. p. 267–271.

LEE, H. Y. et al. The role of commensal microbes in the lifespan of *Drosophila melanogaster*. **Aging**, v. 11, n. 13, p. 4611–4640, 2019.

LI, C.; WENG, S.; HE, J. WSSV–host interaction: Host response and immune evasion. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 84, n. August 2018, p. 558–571, 2019.

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

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, n. 1–2, p. 133–141, 1996.

LO, C. F.; KOU, G. H. Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: A review. **Fish Pathology**, v. 33, n. 4, p. 365–371, 1998.

MCGAW, I. J.; CURTIS, D. L. A review of gastric processing in decapod crustaceans. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 183, n. 4, p. 443–465, 2013.

MOSS, S. M. et al. The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 247–250, 2012.

NUNES, A. J. P.; FEIJÓ, R. G. Convivência com o vírus da mancha branca no cultivo de camarão marinho no Brasil. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, v. 2, p. 30–36, 2016.

OIE. Infection with white spot syndrome virus. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**, 2019.

PILOTTO, M. et al. Exploring the Impact of the Biofloc Rearing System and an Oral WSSV Challenge on the Intestinal Bacteriome of *Litopenaeus vannamei*. **Microorganisms**, v. 6, n. 3, p. 83, 2018.

PILOTTO, M. R. et al. Potential immunomodulatory and protective effects of the Arthrospira-based dietary supplement on shrimp intestinal immune defenses. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 88, n. February, p. 47–52, 2019.

PILOTTO, M. R. et al. Environmental rearing conditions are key determinants of changes in immune gene expression patterns in shrimp midgut. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 106, n. January, p. 103618, 2020.

QI, C. et al. Transcriptomic and morphological analyses of *Litopenaeus vannamei* intestinal barrier in response to *Vibrio parahaemolyticus* infection reveals immune response signatures and structural disruption. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 70, p. 437–450, 2017.

RIBEIRO, L. F. et al. Desafios da carcinicultura: aspectos legais, impactos ambientais e alternativas mitigadoras. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, v. 14, n. 3, p. 365–383, 2014.

ROBALINO, J. et al. Contributions of functional genomics and proteomics to the study of immune responses in the Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 110–118, 2009.

RUNGRASSAMEE, W. et al. Bacterial Population in Intestines of the Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) under Different Growth Stages. **PLoS ONE**, 2013.

SAHU, B. C.; ADHIKARI, S.; DEY, L. Carbon, nitrogen and phosphorus budget in shrimp (*Penaeus monodon*) culture ponds in eastern India. **Aquaculture International**, v. 21, n. 2, p. 453–466, 2013.

SILVEIRA, A. S. et al. An immune-related gene expression atlas of the shrimp digestive system in response to two major pathogens brings insights into the involvement of hemocytes in gut immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 79, p. 44–50, 2018.

SOONTHORNCHAI, W. et al. Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, n. 1, p. 19–28, 2010.

SOONTHORNCHAI, W. et al. Interaction of vibrio spp. with the inner surface of the digestive tract of *penaeus monodon*. **PLoS ONE**, 2015.

TASSANAKAJON, A. et al. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 34, n. 4, p. 954–967, 2013.

TAW, N. Biofloc Technology Expanding At White Shrimp Farms. **Global Advocate** 10, n. June, p. 20–22, 2010.

VERBRUGGEN, B. et al. Molecular mechanisms of white spot syndrome virus infection and

perspectives on treatments. **Viruses**, v. 8, n. 1, p. 1–29, 2016.

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

WANG, Y. G. et al. Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 39, n. 1, p. 1–11, 1999.

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

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq : a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature reviews. Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57–63, 2009.