



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR,  
EMBRIOLOGIA E GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA  
CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO

**EXPRESSÃO DE GENES IMUNOLÓGICOS  
ASSOCIADOS À DEFESA ANTIFÚNGICA EM *Litopenaeus  
vannamei* INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM  
*Fusarium solani***

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

Orientadora: Luciane Maria Perazzolo

**PRISCILA GONÇALVES**

Florianópolis/SC  
2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

G635e Gonçalves, Priscila

Expressão de genes imunológicos associados à defesa antifúngica em *litopenaeus vannamei* infectados experimentalmente com *fusarium solani* [dissertação] / Priscila Gonçalves ; orientadora, Luciane Maria Perazzolo. - Florianópolis, SC, 2011.

106 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Biologia celular. 2. *Litopenaeus vannamei*. 3. Crustáceo - Imunologia. 4. *Fusarium*. 5. Genética - Expressão. I. Perazzolo, Luciane Maria. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

CDU 576

**Expressão de genes imunológicos associados à defesa antifúngica  
em *Litopenaeus vannamei* infectados experimentalmente com  
*Fusarium solani***

Por

PRISCILA GONÇALVES

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

**MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E DO  
DESENVOLVIMENTO**

e aprovada em sua forma final pelo Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

---

Profa. Ilíada Rainha de Souza, Dra.  
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

---

Dra. Luciane Maria Perazzolo – *Orientadora*

---

Dra. Margherita Anna Barracco

---

Dra. Sirlei Daffre

---

Dra. Silvia Visoni



Aos meus queridos e saudosos avós, por toda luz e amor em meu  
caminho.



## AGRADECIMENTOS

À professora Luciane Maria Perazzolo, pelos momentos dedicados à orientação não só deste trabalho, mas de diversas atividades desenvolvidas ao longo de seis anos de experiência científica. Pelo constante incentivo, seriedade e confiança. Por todas as oportunidades concedidas, pela amizade e convívio. Acima de tudo, obrigada por abrir as portas da Ciência para mim e assim me permitir realizar um sonho.

À professora Margherita Barracco, pelas lições de profissionalismo transmitidas durante os seis anos de convivência, por valorizar minhas ideias e pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional. Exemplo de pessoa vocacionada para o ensino, obrigada por despertar em mim o fascínio e a paixão pela docência.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura Cris, Pedro, Dani, Scheila, Ana, Renato, Eliza e Erik que encheram de alegria meus dias e que deixaram muitas marcas que levo com carinho. Agradeço especialmente à Scheila pelo auxílio nas infecções (aos 35 min da prorrogação) e à Cris, pela ajuda e pela companhia, ensinando metodologias e auxiliando nas coletas e infecções, na parte prática e teórica. Obrigada pelas tantas reflexões. Foi muito bom pensar e fazer Ciência juntas. Muitos abraços afetuosos, sobretudo para a Liegilda, Paulinha e Marion, eternas companheiras de laboratório e de vida. Obrigada pela amizade e pelos vários momentos de angústias e de descontração que passamos juntas. Saudades!

Ao profissional e amigo Rafael Diego da Rosa e à Dra. Evelyne Bachère por surgirem na hora exata e pela disponibilidade e atenção em contribuir imensamente para esse trabalho.

Ao Felipe do Nascimento Vieira, José Luiz Pedreira Mouriño e aos demais funcionários e alunos do Laboratório de Camarões Marinhos – UFSC pelo sempre solícito fornecimento de camarões.

Ao Leandro Aristides da Fazenda de Cultivo Quality Camarões, pela agradável recepção e pelo fornecimento de parte dos camarões utilizados. E ao Frank Beletini, por viabilizar a coleta dos animais e pelo auxílio.

À professora Cláudia Regina Batista de Souza pelo fornecimento do fungo e das técnicas que viabilizaram seu cultivo e permitiram a padronização da infecção dos camarões.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos, e à FINEP pelo financiamento dos experimentos.

Às minhas amigas Su, Dai, Nana, Elis e Lu. Meninas iluminadas, que fazem minha vida mais colorida e radiante e que, definitivamente, não permaneceram nela por acaso. À minha “roomie” Camila pela companhia e por acalmar as minhas angústias (à base de muito chocolate e/ou sorvete). Às amigas de sempre, Miri e Amanda, que cultivam um cantinho especial aqui dentro, repleto de risadas e conversas sinceras, lembranças divertidas e histórias construídas em cada encontro (“Quinta-feira?”). E aos amigos “Só alegria” Carlos (?), Alê, Japa, André e Kenny.

*“A amizade é um meio de nos isolarmos da humanidade cultivando algumas pessoas.”* Carlos Drummond de Andrade

Ao Diego, por sempre acreditar – e me convencer – que tudo vai dar certo.

*“As estrelas são todas iluminadas. Não será para que cada um possa um dia encontrar a sua?”* Antoine de Saint-Exupéry

Aos meus protetores divinos, presentes nas situações mais difíceis, concedendo-me luz e serenidade para superar as inseguranças e prosseguir com coerência. Pelas inúmeras oportunidades que me foram concedidas e por me fazer perseverar na busca pelos meus ideais.

Agradeço sobretudo aos meus pais e meu irmão, por terem construído as sólidas bases que me sustentam hoje. Vocês são parte do que me faz forte. Meu carinho e minha eterna gratidão. Amo muito vocês!

*“Crescer custa, demora, esfola, mas compensa. É uma vitória secreta, sem testemunhas. O adversário somos nós mesmos.”*  
Martha Medeiros

## RESUMO

A modulação da expressão gênica de proteínas envolvidas nas respostas antifúngicas em camarões *Litopenaeus vannamei* e *Farfantepenaeus paulensis* foi avaliada após infecção experimental com esporos de *Fusarium solani*. Camarões *F. paulensis* foram desafiados com uma dose não-letal de esporos ( $6 \times 10^6$  esporos/ml) e a expressão da proteína de reconhecimento de fungos  $\beta$ GBP não foi alterada em resposta a essa infecção branda. Já camarões *L. vannamei* desafiados com dose letal de esporos ( $10^8$  esporos/ml) de *F. solani* apresentaram uma queda significativa na expressão da  $\beta$ GBP, da pró-fenoxidase (proPO), dos subgrupos 2, 3 e 4 da peneidina (PEN 2, PEN 3, PEN 4) e da stylicina, indicando o envolvimento do fungo na depleção do nível de transcritos dessas moléculas de defesa. Uma superexpressão gênica da proteína que reconhece LPS e  $\beta$ -1,3-glicanas (LGBP) e do fator antilipopolisacarídeo (ALF) foi também encontrada nesses animais, sugerindo o envolvimento destas proteínas na fase aguda da infecção por *F. solani*. Paralelamente, camarões *L. vannamei* injetados com dsRNA específico para a LGBP apresentaram silenciamento de 18% a 95% em 2 e 3 dias, respectivamente, após a injeção de duas doses sequenciais de dsRNA. Esses resultados, no entanto, não foram reproduzidos em animais provenientes de uma fazenda de cultivo, sugerindo que exista uma resposta diferenciada associada à ativação prévia do sistema imunológico de acordo com as condições ambientais. Os resultados deste estudo apontam para um potencial envolvimento das moléculas imunofetoras proPO, PEN 2, PEN 3, PEN 4, ALF e stylicina na defesa antifúngica de camarões *L. vannamei*, e representam uma contribuição pioneira para um maior conhecimento das respostas moleculares desencadeadas por camarões frente a uma infecção por *F. solani*, um reconhecido patógeno oportunista dos peneídeos.

**Palavras-chave:** *Litopenaeus vannamei*, imunologia de crustáceos, *Fusarium solani*, expressão gênica, defesa antifúngica, RNA de interferência.

## ABSTRACT

Expression of genes related to antifungal defense in shrimp *Litopenaeus vannamei* and *Farfantepenaeus paulensis* was analysed upon an experimental infection with *Fusarium solani*. Shrimp *F. paulensis* were challenged with a nonlethal dose of spores ( $6 \times 10^6$  spores/ml) and the expression of the fungal recognition protein  $\beta$ GBP was not significantly modulated in response to this mild infection. Shrimp *L. vannamei* challenged with a lethal dose ( $10^8$  spores/ml) of *F. solani* spores showed a significant decrease in expression of  $\beta$ GBP, prophenoloxidase (proPO), penaeidin subgroups 2, 3 and 4 (PEN 2, PEN 3, PEN 4) and stylicin, indicating the involvement of the fungus in the down-regulation of these defense molecules. An overexpression of the protein that recognizes LPS and  $\beta$ -1,3-glucans (LGBP) and the anti-lipopopolysaccharide factor (ALF) was observed in these animals, suggesting the involvement of these proteins in the acute phase of infection by *F. solani*. In parallel, shrimp *L. vannamei* injected with dsRNA specific to LGBP showed silencing of 18% to 95% in 2 and 3 days, respectively, after the injection of two sequential doses of dsRNA. These results, however, were not reproduced in animals from a shrimp farm, suggesting a differential response due to a prior activation of the immune system according to the environmental conditions. The results of this study indicate a potential involvement of the immune effector molecules proPO, PEN 2, PEN 3, PEN 4, ALF and stylicin in antifungal defense in shrimp *L. vannamei*, and represent a contribution to a better understanding of molecular responses triggered by shrimp against *Fusarium solani* infection, a recognized penaeid opportunistic pathogen.

**Keywords:** *Litopenaeus vannamei*, crustacean immunology, *Fusarium solani*, gene expression, antifungal defense, RNA interference.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismos de defesa envolvidos na neutralização e destruição dos patógenos em invertebrados. 5
- Figura 2.** Esquema explicativo do desenho experimental. 18
- Figura 3.** Mortalidade cumulativa dos camarões infectados com  $6 \times 10^6$  (dose não-letal; 0% mortalidade),  $10^7$  (dose subletal; 43% mortalidade) e  $10^8$  (dose letal; 100% mortalidade) esporos/ml do fungo filamentosso *Fusarium solani*. 22
- Figura 4.** Sinais clínicos decorrentes da infecção experimental de camarões *L. vannamei* com  $10^7$  esporos/ml de *F. solani*. 23
- Figura 5.** Perfil eletroforético em gel de agarose do fragmento amplificado (550 pb) correspondente à região do espaço transcrito interno do rDNA de *Fusarium solani* (ITS). 24
- Figura 6.** Expressão relativa da proteína que se liga a  $\beta$ -1,3-glicanas ( $\beta$ GBP) no hepatopâncreas de camarões infectados com *F. solani*. 25
- Figura 7.** Expressão relativa da proteína que se liga a LPS e  $\beta$ -1,3-glicanas (LGBP) no hepatopâncreas e hemócitos de camarões *L. vannamei* infectados com dose letal de *F. solani*. 26
- Figura 8.** Expressão relativa da pró-fenoloxidase (proPO) nos hemócitos de camarões *L. vannamei* infectados com dose letal de *F. solani*. 27
- Figura 9.** Expressão relativa da peneidina 2 (PEN 2) nos hemócitos de camarões *L. vannamei* infectados com dose letal de *F. solani*. 28
- Figura 10.** Expressão relativa da peneidina 3 (PEN 3) nos hemócitos de camarões *L. vannamei* infectados com dose letal de *F. solani*. 29
- Figura 11.** Expressão relativa da peneidina 4 (PEN 4) nos hemócitos de camarões *L. vannamei* infectados com dose letal de *F. solani*. 30

- Figura 12.** Expressão relativa do fator antilipopolissacarídeo (ALF) nos hemócitos de camarões *L. vannamei* infectados com dose letal de *F. solani*. 31
- Figura 13.** Expressão relativa da stylicina nos hemócitos de camarões *L. vannamei* infectados com dose letal de *F. solani*. 32
- Figura 14.** Esquema explicativo do desenho experimental do silenciamento gênico. 52
- Figura 15.** Perfil eletroforético em gel de agarose do fragmento amplificado correspondente à LGBP (399 pb) e ao gene de referência  $\beta$ -actina (800 pb) do hepatopâncreas de *L. vannamei*. 55
- Figura 16.** Perfil eletroforético em gel de agarose do fragmento amplificado correspondente à  $\beta$ -actina (800 pb) e LGBP (399 pb) do hepatopâncreas de *L. vannamei*. 55
- Figura 17.** Mortalidade cumulativa dos camarões *L. vannamei* nos grupos **G1**: injetados apenas com SSP; **G2**: injetados com SSP e infectados com esporos de *F. solani*; **G3**: injetados com dsRNA LGBP de *L. vannamei* (dsRNA LGBP); **G4**: injetados com dsRNA LGBP e infectados com esporos de *F. solani*. 56

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Propriedades antimicrobianas das diferentes famílias de peptídeos antimicrobianos (AMPs) encontradas em crustáceos. 12

**Tabela 2.** Pares de iniciadores utilizados nas análises de expressão em qPCR de genes relacionados ao sistema imune em *Litopenaeus vannamei*. 20

**Tabela 3.** Pares de iniciadores utilizados na síntese dos dsRNAs  $\beta$ GBP e LGBP e na confirmação do silenciamento gênico específico. 50

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALF – Fator antilipopolissacarídeo

AMP – Proteínas/peptídeos antimicrobianos (do inglês, *antimicrobial proteins/peptides*)

$\beta$ GBP – Proteína que se liga a  $\beta$ -1,3-glicanas (do inglês,  *$\beta$ -1,3-glucan binding protein*)

dsRNA – RNA dupla fita (do inglês, *double-stranded RNA*)

dsRNA  $\beta$ GBP – RNA dupla fita correspondente a uma sequência parcial do gene codificante para a  $\beta$ GBP/HDL de *L. vannamei*

dsRNA LGBP – RNA dupla fita correspondente a uma sequência parcial do gene codificante para a LGBP de *L. vannamei*

EST – Do inglês, *expressed sequence tag*

GBP – Proteína que se liga a glicanas (do inglês, *glucan binding protein*)

HDL – Lipoproteína de alta densidade (do inglês, *high density lipoprotein*)

hRNA – Fita de RNA em forma de grampo (do inglês, *hairpin RNA*)

IHHNV – Vírus da Necrose Hipodérmica e Hematopoiética (do inglês, *Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus*)

IMNV – Vírus da Mionecrose Infeciosa Muscular (do inglês, *Infectious Myonecrosis Virus*)

ITS – Espaço transcrito interno do rDNA (do inglês, *internal transcribed spacer*)

LBP – Proteína que se liga a lipopolissacarídeos (do inglês, *lipopolysaccharide binding protein*)

LGBP – Proteína que se liga a lipopolissacarídeos e  $\beta$ -1,3-glicanas (do inglês, *lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-glucan binding protein*)

LPS – Lipopolissacarídeos

LTA – Ácido lipoteicoico (do inglês, *lipoteichoic acid*)

MAS – Solução anticoagulante Alsever modificada

miRNA – MicroRNA

PAMPs – Padrões moleculares associados aos patógenos (do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PEN – peneídina

PGN – Peptidoglicanas

PO – Fenoloxidase

proPO – Pró-fenoloxidase

PRPs – Proteínas de reconhecimento de padrão (do inglês, *pattern-recognition proteins*)

PRRs – Receptores de reconhecimento de padrão (do inglês, *pattern-recognition receptors*)

PTGS – Silenciamento gênico pós-transcricional (do inglês, *post-transcriptional gene silencing*)  
RISC – Complexo multiproteico de silenciamento induzido por RNA (do inglês, *RNA-induced silencing complex RNA*)  
ROIS – Espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen intermediates*)  
RNAi – RNA de interferência  
RNAm – RNA mensageiro  
RNIs – Espécies reativas de nitrogênio (do inglês, *reactive nitrogen intermediates*)  
SID-1 – Do inglês, *systemic interference defective 1*  
siRNA – Pequeno RNA interferente (do inglês, *short interfering RNA*)  
SPF – Livres de patógenos específicos (do inglês, *specific pathogen free*)  
SSP – Solução tampão estéril para peneídeos  
ssRNA – RNA de fita simples (do inglês, *single-strand RNA*)  
TGS – Silenciamento gênico transcricional (do inglês, *transcriptional gene silencing*)  
TSV – Vírus da Síndrome de Taura (do inglês, *Taura Syndrome Virus*)  
viRNA – RNA viral (do inglês, *viral RNA*)  
WSSV – Vírus da Síndrome da Mancha Branca (do inglês, *White Spot Syndrome Virus*)  
YHV – Vírus da Cabeça Amarela (do inglês, *Yellow Head Virus*)



## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
------------------	---

### CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Animais	15
3.2 Cultura de <i>Fusarium solani</i> e preparo do inóculo	16
3.3 Infecção experimental dos camarões com <i>Fusarium solani</i>	16
3.4 Coleta de tecidos	17
3.5 Extração de RNA e síntese de cDNA	18
3.6 Análise da expressão de genes relacionados com a defesa antifúngica, após desafio com <i>Fusarium solani</i>	19
3.7 Análises estatísticas	21
4. RESULTADOS	21
4.1 Infecção experimental de <i>L. vannamei</i> por <i>Fusarium solani</i>	21
4.2 Expressão de genes imunológicos	24
4.2.1 Proteína que se liga a $\beta$ -1,3-glicanas ( $\beta$ GBP)	24
4.2.2 Proteína que se liga a LPS e $\beta$ -1,3-glicanas (LGBP)	26
4.2.3 Pró-fenoloxidase (proPO)	27
4.2.4 Peneidina 2 (PEN 2)	28
4.2.5 Peneidina 3 (PEN 3)	29
4.2.6 Peneidina 4 (PEN 4)	30
4.2.7 Fator antilipopolissacarídeo (ALF)	31
4.2.8 Stylicina	31
5. DISCUSSÃO	33

### CAPÍTULO 2

1. INTRODUÇÃO	45
2. OBJETIVOS	49
2.1 Objetivo geral	49
2.2 Objetivos específicos	49
3. MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 Animais	49

3.2 Síntese do dsRNA homólogo à sequência da $\beta$ GBP/HDL e LGBP	49
3.3 Silenciamento da expressão da $\beta$ GBP/HDL e LGBP por RNA de interferência	50
3.4 Infecção experimental dos camarões com <i>Fusarium solani</i>	52
3.5 Coleta de tecidos, extração de RNA e síntese de cDNA	53
3.6 Verificação do silenciamento gênico das proteínas de reconhecimento de fungos: $\beta$ GBP/HDL e LGBP	53
4. RESULTADOS	54
5. DISCUSSÃO	56
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	65
REFERÊNCIAS	68

## INTRODUÇÃO GERAL

Os crustáceos constituem um grupo zoológico antigo e bem sucedido, composto por mais de 42.000 espécies, sendo a maioria aquática. Dentre eles, destacam-se os representantes da Ordem Decapoda, como as lagostas, lagostins, caranguejos, siris e camarões, cujo interesse particular está na alimentação humana (Barracco et al., 2008).

Atualmente cerca de 50% dos camarões consumidos no mundo são provenientes da carcinicultura e seu cultivo representa uma alternativa de produção rápida e em alta escala para alimentação humana, contribuindo ainda para a conservação dos estoques naturais de camarões, atualmente comprometidos pela pesca indiscriminada e destruição dos ecossistemas aquáticos (FAO, 2008).

Dentre os camarões marinhos atualmente cultivados, destacam-se os peneídeos *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon* e *Fenneropenaeus chinensis* (FAO, 2010). Devido às suas notáveis características zootécnicas, *L. vannamei* se tornou a espécie mais cultivada mundialmente na atualidade. Essa espécie, conhecida como camarão branco do Pacífico, distribui-se naturalmente no Oceano Pacífico ocidental desde a província de Sonora, México, até o sul de Tumbes, Peru (Perez-Farfante; Kensley, 1997).

No Brasil, *L. vannamei* foi introduzido na década de 80 na região Nordeste, porém seu cultivo foi consolidado somente na década seguinte. O cultivo dessa espécie exótica foi também estabelecido nas regiões de clima subtropical do Brasil, como o Sul e o Sudeste, em substituição ao cultivo das espécies nativas *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus schmitti*, o qual não se mostrou competitivo, em função da baixa produtividade e rendimento econômico (Seiffert, comunicação pessoal). *L. vannamei*, por sua vez, apresenta características zootécnicas propícias para o cativeiro, como um elevado grau de rusticidade no manejo, taxa de crescimento uniforme, fácil adaptabilidade e reprodução satisfatória em laboratório (FAO, 2007).

A produção de camarões marinhos em escala comercial requer a intensificação dos sistemas de cultivo, necessitando de maiores investimentos e cuidados no manejo. As restrições mais frequentemente observadas em relação a essa prática são de ordem ambiental (degradação do ambiente e água imprópria), nutricional e sanitária (Kautsky et al., 2000). Atualmente, as doenças infecciosas são consideradas o principal fator limitante para o sucesso da carcinicultura

a nível mundial, sendo capazes de ameaçar sua sustentabilidade e expansão (Lightner, 2011).

Os animais em cativeiro, não raro, são acometidos por enfermidades causadas por protozoários, bactérias, fungos e vírus, as quais podem dizimar populações inteiras e causar sérias perdas econômicas. A exemplo disso tem-se o recente episódio ocorrido em nosso estado, onde o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV; do inglês, *white spot syndrome virus*) dizimou em 2005 cerca de 75% do cultivo catarinense de *L. vannamei* (Winckler da Costa, comunicação pessoal). No Nordeste brasileiro, onde se concentra 95% da produção nacional de camarões marinhos, outro vírus, denominado vírus da mionecrose infecciosa (IMNV; do inglês, *infectious myonecrosis virus*) também causou sérios prejuízos ao setor desde a sua detecção, em 2002 (Nunes et al., 2004). Em 2004, quando a ação do IMNV se expandiu por vários estados produtores do Nordeste, a perda na produção atingiu 40% (Nunes et al., 2011).

Além dos vírus, bactérias e protozoários, os camarões marinhos podem também ser vulneráveis às infecções fúngicas, especialmente aquelas causadas pelo fungo filamentosso *Fusarium solani*. Esse fungo possui distribuição mundial sendo comumente encontrado no solo, em plantas, na água doce e também em ambientes marinhos (Lightner, 1996).

*F. solani* é considerado um patógeno oportunista e, como tal, infecta com maior facilidade camarões que se encontram debilitados por outra enfermidade, ou ainda que estejam submetidos a diferentes fatores de estresse, como altas densidades populacionais, baixa qualidade da água e nutrição inadequada (Pantoja; Lightner, 2008). Além de infectar camarões cultivados e ser encontrado em ambiente natural, *F. solani* é também um patógeno comum de plantas e ocasionalmente de animais terrestres (Lightner, 1996).

Uma vez estabelecida a infecção por *Fusarium* spp., conhecida por fusariose ou “doença das brânquias negras”, observa-se nos camarões o rápido estabelecimento de lesões melanizadas sobre a cutícula, apêndices e/ou brânquias, decorrentes de uma resposta inflamatória intensa nesses locais. A infecção compromete a transferência de gases nas brânquias, dificultando a locomoção, a alimentação e a reprodução dos animais (Morales Covarrubias, 2004). Tais lesões servem ainda como porta de entrada para outros patógenos oportunistas secundários, como as bactérias do gênero *Vibrio*, fato que agrava o quadro sintomatológico da doença (Pantoja; Lightner, 2008).

Os crustáceos, assim como os demais invertebrados, apresentam apenas o sistema imune inato ou natural, sendo, portanto, desprovidos do sistema imune adaptativo altamente específico, composto por células linfocíticas (linfócitos T e B), receptores, anticorpos e memória imunológica a longo prazo, existentes nos vertebrados. A falta de um sistema imune adaptativo resulta na impossibilidade de se desenvolver vacinas, diminuindo de forma substancial os meios de prevenção e controle de doenças nesses animais. Essa limitação crucial faz com que as infecções por micro-organismos patogênicos sejam particularmente ameaçadoras para esses animais (Barracco et al., 2008).

Apesar de contarem apenas com o sistema imune inato, os mecanismos imunológicos desencadeados pelos crustáceos são extremamente rápidos e eficientes, o que lhes permite resistir e eliminar, na maioria dos casos, uma grande variedade de micro-organismos e parasitas de seu organismo (Söderhäll; Cerenius, 1998; Barracco et al., 2008).

O sistema imune dos crustáceos está intimamente ligado ao seu sangue ou hemolinfa, o qual consiste de uma fração celular (hemócitos) e de uma fração líquida (plasma), onde estão dissolvidos os fatores humorais. As respostas imunes celulares e humorais atuam em sinergismo, protegendo-os de invasões e infecções microbianas e parasitárias.

A hemolinfa dos crustáceos contém moléculas capazes de discriminar eficientemente o próprio do não-próprio e, assim, desencadear mecanismos que resultem na neutralização e/ou destruição dos micro-organismos e parasitas invasores. As respostas de defesa são desencadeadas a partir do contato e reconhecimento do patógeno ou dos seus componentes por proteínas/receptores de reconhecimento de padrão (PRPs; do inglês, *pattern recognition proteins*).

As PRPs são moléculas produzidas pelo hospedeiro que reconhecem e interagem com padrões moleculares expressos exclusivamente na superfície dos micro-organismos e que estão ausentes no hospedeiro (PAMPs; do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*). Essas proteínas podem ser secretadas para o plasma ou estarem localizadas na membrana ou citosol das células imunocompetentes. Quando associadas às membranas, as PRPs são usualmente chamadas de PRRs (do inglês, *pattern-recognition receptors*) (Lee; Söderhäll, 2002; Barracco et al., 2008).

Em invertebrados, os principais PAMPs reconhecidos por PRPs são: lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular de bactérias Gram-negativas, peptidoglicanas (PGN) de bactérias Gram-positivas,  $\beta$ -

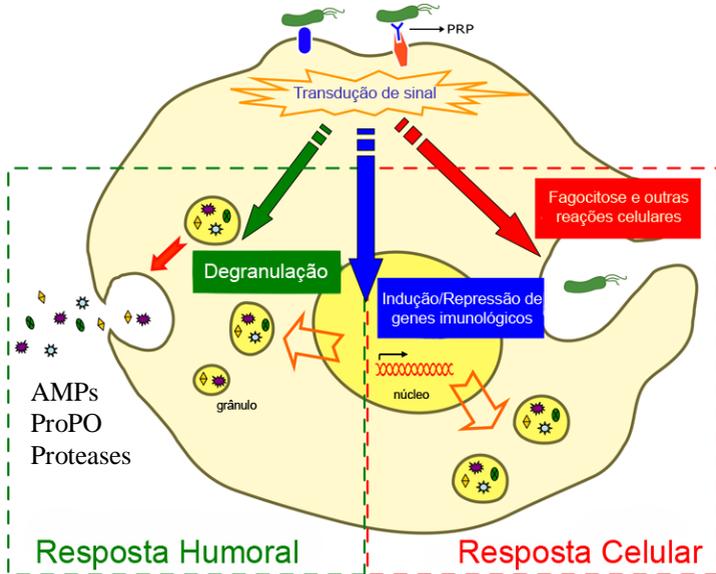
1,3-glicanas de fungos, RNA de dupla fita (dsRNA; do inglês, *double-stranded RNA*) produzido durante a replicação de vários vírus, RNA de fita simples (ssRNA; do inglês, *single-strand RNA*) e motivos CpG (DNA não-metilado) de micro-organismos (Loker et al., 2004).

Dentre as PRPs identificadas e caracterizadas nos crustáceos, destacam-se as lectinas, que reconhecem açúcares específicos da superfície de diferentes micro-organismos, a LBP (do inglês, *lipopolysaccharide binding protein*) que interage com lipopolissacarídeos (LPS) da parede de bactérias Gram-negativas, as  $\beta$ GBP (do inglês,  *$\beta$ -1,3-glucan binding protein*) e GBP (do inglês, *glucan binding protein*) que se ligam a  $\beta$ -1,3-glicanas da parede de fungos, a LGBP (do inglês, *lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-glucan binding protein*) e a mas-like (*masquerade-like protein*) que reconhece tanto LPS como  $\beta$ -1,3-glicanas (Jiravanichpaisal et al., 2006).

Uma vez dentro do hospedeiro, os padrões moleculares dos patógenos são reconhecidos pelas suas respectivas PRPs. Em crustáceos, tal interação promove a ativação dos hemócitos, que migram para os sítios de infecção onde são desencadeadas diferentes respostas imunocelulares, além da modulação da expressão de genes imunológicos específicos (Figura 1).

Conforme dito anteriormente, durante as infecções, LPS e peptidoglicanas de bactérias, e  $\beta$ -1,3-glicanas da parede de fungos se ligam a receptores dos hemócitos granulares, diretamente ou através de PRPs, e induzem uma degranulação ou exocitose regulada, com liberação de várias moléculas imunoefetoras, entre as quais estão as proteínas e/ou peptídeos antimicrobianos (AMPs; do inglês, *antimicrobial proteins/peptides*) e moléculas componentes do sistema pró-fenoxidase (proPO).

O sistema proPO é tido como um importante mecanismo de reconhecimento do não-próprio, uma vez que é ativado por componentes da superfície de micro-organismos, e representa, assim, uma das principais respostas imunoefetoras dos crustáceos (Cerenius; Söderhäll, 2004; Barracco et al., 2008).



**Figura 1.** Mecanismos de defesa envolvidos na neutralização e destruição dos patógenos em invertebrados. Adaptado de Barracco et al., 2008.

Uma vez ocorrida a ativação do sistema proPO, inicia-se uma cascata proteolítica, a qual gera transitoriamente moléculas altamente tóxicas, como as quinonas, hemiquinonas e radicais livres sendo a melanina o produto final dessa via. A melanina, por sua vez, corresponde a um pigmento escuro e insolúvel comumente observado em injúrias após o desencadeamento do processo inflamatório, como no caso das lesões negras encontradas em tecidos de camarões infectados por *F. solani*. Esse pigmento parece ter uma atividade fungistática (Cerenius; Söderhäll, 2004), podendo ainda funcionar como *scavenger* de radicais livres gerados no sistema (Nappi; Vass, 1993; Nappi; Ottaviani, 2000).

Dentre os mecanismos envolvidos na neutralização e destruição dos patógenos, destacam-se: (1) sistema fagocítico e de encapsulamento; (2) ativação dos componentes do sistema proPO; (3) produção de compostos líticos e microbicidas, como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROIs e RNIs; do inglês, *reactive oxygen intermediates* e *reactive nitrogen intermediates*, respectivamente); (4) produção de moléculas imunoefetoras, como as proteínas e/ou peptídeos antimicrobianos (AMPs) que apresentam geralmente uma atividade microbicida rápida e potente contra um amplo espectro de micro-

organismos; (5) sistema de coagulação da hemolinfa; (6) sistema de reconhecimento mediado por proteínas de reconhecimento de padrão; (7) sistemas antivirais mediados por RNA de interferência, citocinas análogas a *interferons* e apoptose; e (8) modulação da expressão de genes imunológicos específicos (Perazzolo et al., in press).

O presente trabalho aborda a resposta imunológica de camarões frente à infecção pelo fungo *F. solani*. Os resultados desse estudo serão apresentados e discutidos em dois capítulos. No Capítulo 1 serão apresentados os dados de modulação da expressão dos genes codificantes para as principais moléculas imunológicas relacionadas com a defesa antifúngica em crustáceos. No Capítulo 2 serão apresentados os resultados da tentativa de silenciamento das proteínas de reconhecimento de fungos,  $\beta$ GBP e LGBP, através da técnica de RNA de interferência.

## **CAPÍTULO 1**

---

**Análise da expressão de genes imunológicos envolvidos na defesa antifúngica**



## 1. INTRODUÇÃO

O reconhecimento de fungos em crustáceos é realizado por duas PRPs capazes de se ligar a  $\beta$ -1,3-glicanas, carboidratos encontrados na sua parede celular:  $\beta$ GBP (do inglês,  *$\beta$ -1,3-glucan binding protein*) e LGBP (do inglês, *lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-glucan binding protein*). A  $\beta$ GBP é uma lipoproteína de alta densidade (HDL; do inglês, *high density lipoprotein*) bifuncional, envolvida simultaneamente no transporte de lipídeos e no reconhecimento de fungos ( $\beta$ GBP/HDL) (Yépez-Placencia et al., 1998; Vargas-Albores; Yépez-Placencia, 2000).

No lagostim *Pacifastacus leniusculus*, a interação da  $\beta$ GBP com  $\beta$ -glicanas leva à formação de um complexo ( $\beta$ GBP-glicanas) que se liga a receptores encontrados na membrana dos hemócitos (Duvic; Söderhäll, 1990; 1992). A partir dessa ligação observa-se o processo de ativação celular, que resulta no espraiamento e degranulação parcial dos hemócitos granulares (Barracco et al., 1991), liberando várias moléculas imunológicas, dentre elas as componentes do sistema proPO (Cerenius et al., 1994; Vargas-Albores et al., 1996).

A  $\beta$ GBP já foi identificada em vários crustáceos, entre eles, nos lagostins *P. leniusculus* (Duvic; Söderhäll, 1990; Cerenius et al., 1994), *Astacus astacus* e *Procambarus clarkii* (Duvic; Söderhäll, 1993), no caranguejo *Carcinus maenas* (Thörnqvist et al., 1994) e nos camarões marinhos *Farfantepenaeus californiensis* (Vargas-Albores et al., 1996), *Litopenaeus stylirostris* (Vargas-Albores et al., 1997), *L. vannamei* (Vargas-Albores et al., 1997; Yépez-Plascencia et al., 1998; Jimenez-Vega et al., 2002; Romo-Figueroa et al., 2004), *P. monodon* (Sritunyalucksana et al., 2002) e *F. chinensis* (Lai et al., 2011). Mais recentemente, a  $\beta$ GBP dos camarões nativos *F. paulensis* e *L. schmitti* foi purificada e caracterizada bioquimicamente, em nosso laboratório, como uma proteína homóloga à  $\beta$ GBP de *L. vannamei* (Goncalves et al., em preparação).

Nos primeiros estudos, a  $\beta$ GBP de crustáceos foi caracterizada como sendo uma proteína plasmática sintetizada pelo hepatopâncreas (Cerenius et al., 1994a; Yépez-Plascencia et al., 2000). No entanto, estudos posteriores revelaram que os transcritos da  $\beta$ GBP de *L. vannamei* podem também ser encontrados nos hemócitos, órgão linfoide, brânquias, coração, estômago, epitélio do intestino, gânglios neurais e músculos (Romo-Figueroa et al., 2004; Wang et al., 2007). Por outro lado, uma outra proteína que se liga a  $\beta$ -1,3-glicanas em *P. monodon*, a GBP, foi identificada apenas nos hemócitos (Sritunyalucksana et al., 2002). Já uma  $\beta$ GBP de *F. chinensis* foi

encontrada sendo expressa em vários tecidos além do hepatopâncreas, como músculo, intestino, brânquias e hemócitos (Lai et al., 2011).

Diferenças no peso molecular e nos tecidos onde as  $\beta$ GBPs são expressas sugerem que as proteínas isoladas de *P. monodon* e *F. chinensis* pertençam a outras classes de PRPs específicas para  $\beta$ -1,3-glicanas, diferentes nos aspectos bioquímicos e moleculares das  $\beta$ GBPs/HDL inicialmente identificadas nos crustáceos. Dessa forma, pode-se inferir que os crustáceos devam possuir pelo menos três diferentes classes de  $\beta$ GBPs: (1) GBP: proteína de 32 kDa expressa exclusivamente nos hemócitos; (2)  $\beta$ GBP/HDL: proteína de 95-110 kDa expressa predominantemente no hepatopâncreas; (3)  $\beta$ GBP: proteína de 241 kDa detectada principalmente no músculo (Goncalves et al., em preparação).

Assim como as  $\beta$ GBP/HDLs, as LGBPs também participam da ativação do sistema proPO no lagostim *P. leniusculus* (Lee et al., 2000) e no camarão *L. stylirostris* (Roux et al., 2002), a partir da ligação dessa PRP aos PAMPs LPS e/ou  $\beta$ -1,3-glicanas. As LGBPs dos crustáceos são proteínas pequenas (36-46 kDa) produzidas nos hemócitos (Liu et al., 2009) e no hepatopâncreas destes animais (Roux et al., 2002; Cheng et al., 2005). Essa PRP já foi isolada por abordagem genômica em algumas espécies de camarões peneídeos: *L. stylirostris* (Roux et al., 2002), *L. vannamei* (Cheng et al., 2005) e *F. chinensis* (Du et al., 2007; Liu et al., 2009).

A partir do reconhecimento dos diferentes PAMPs, diversas moléculas imunoefetoras são ativadas e agem sobre o patógeno a fim de neutralizá-lo e/ou destruí-lo. Dentre as principais moléculas imunoefetoras envolvidas na destruição de micro-organismos estão as proteínas e/ou peptídeos antimicrobianos (AMPs).

Os AMPs são componentes essenciais do sistema imune inato e podem apresentar atividade microbicida rápida e potente contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos filamentosos, leveduras e, em alguns casos, também contra protozoários e vírus envelopado (Reddy et al., 2004; Brogden, 2005). Essas moléculas são expressas constitutivamente nos hemócitos granulares e/ou semigranulares dos crustáceos, sendo armazenadas em seus grânulos. Quando os camarões sofrem alguma injúria ou são expostos a desafios microbianos, os hemócitos granulares e/ou semigranulares migram para o sítio de infecção, onde os AMPs são liberados para destruir ou evitar a entrada dos micro-organismos (Rosa; Barracco, 2010).

Tais efetores imunológicos são classicamente descritos como moléculas anfipáticas, apresentando uma região altamente catiônica e

uma região hidrofóbica, e de baixo peso molecular (<10 kDa, entre 15-100 resíduos de aminoácidos) (Brogden, 2005; Yount et al., 2006).

O mecanismo de ação dos AMPs se manifesta geralmente sobre as membranas dos micro-organismos, provocando a sua desestabilização, seja por uma atividade detergente ou formadora de poros. O caráter anfipático de muitos AMPs facilita a interação eletrostática dessas moléculas com os fosfolipídeos aniônicos e inserção nas membranas dos micro-organismos, levando ao desequilíbrio de suas funções. A inserção dos AMPs na bicamada lipídica dos micro-organismos forma grandes poros, resultando no extravasamento do conteúdo citoplasmático e culminando na destruição do micro-organismo (Bulet et al., 2004; Brogden, 2005; Yount et al., 2006). Outras classes de AMPs podem ser interiorizadas e interferir nas diferentes vias metabólicas essenciais ao ciclo de vida dos micro-organismos, como a síntese de macromoléculas importantes (Kamysz et al., 2003; Brogden, 2005; Yount et al., 2006).

Diferentes famílias de AMPs tem sido caracterizadas em crustáceos, como apresentado pela Tabela 1. Dentre essas, as principais famílias de AMPs com atividade antifúngica são as peneidinas (Destoumieux et al., 1997), os fatores anti-lipopolissacarídeos (ALF; do inglês, *anti-lipopolysaccharide factor*) (Gross et al., 2001; Supungul et al., 2002) e as stylicinas (Rolland et al., 2010). Uma vez que o presente trabalho trata da expressão de AMPs durante uma infecção fúngica, abaixo serão fornecidas características dessas três famílias.

As peneidinas são AMPs encontrados exclusivamente em camarões marinhos da família Penaeidae e correspondem à maior família de AMPs encontrados em camarões (Tassanakajon et al., 2010). As peneidinas estão subdivididas em quatro subgrupos (PEN 2, PEN 3, PEN 4 e PEN 5) de acordo com a sua sequência aminoacídica primária e com a posição específica de 8 resíduos conservados de aminoácidos (Gueguen et al., 2006; Kang et al., 2007).

Esses AMPs apresentam um amplo espectro de atividade antimicrobiana, sendo potentes contra bactérias Gram-positivas (Destoumieux et al., 1997) e fungos filamentosos (Destoumieux et al., 1999), e possuindo também atividade moderada contra bactérias Gram-negativas (Li et al., 2005).

**Tabela 1.** Propriedades antimicrobianas das diferentes famílias de peptídeos antimicrobianos (AMPs) encontradas em crustáceos. Adaptado de Rosa; Barracco, 2010.

Famílias de AMPs	Bactérias		Fungos	
	Gram-positivas	Gram-negativas	Filamentosos	Leveduras
Bac-like	***	**	NT	NT
Callinectina	NT	***	NT	NT
Astacidina 2	***	***	NT	NT
Armadilidina	***	NA	NT	NT
Homarina	NA	**	NT	NT
Defensina	NT	NT	NT	NT
<b>ALF</b>	***	***	***	NA
Scygonadina	**	NA	NA	NA
<b>Peneidina</b>				
<b>Subgrupo 2 (PEN 2)</b>	***	NA	***	NA
<b>Subgrupo 3 (PEN 3)</b>	***	NA	***	***
<b>Subgrupo 4 (PEN 4)</b>	***	NA	***	***
Subgrupo 5 (PEN 5)	***	**	***	NT
Crustina				
Tipo I	***	NA	NA	*
Tipo II	***	*	*	NT
Tipo III	***	***	**	**
Hyastatina	***	**	NA	**
Arasina	***	**	NT	NT
<b>Stylicina</b>	NA	*	***	NA
Histonas e fragmentos derivados	***	NT	NT	NT
Peptídeos derivados da hemocianina				
Astacidina 1	**	**	NT	NT
PvHCt/PsHCt1/PsHCt2	NA	NA	***	NT

Concentração inibitória mínima (MIC): \*\*\* até 10  $\mu\text{M}$ ; \*\* 10-20  $\mu\text{M}$ ; \* 20-40  $\mu\text{M}$ .

NT: não testado.

NA: não ativo (MIC > 40  $\mu\text{M}$ ).

Peneidinas foram clonadas e caracterizadas em inúmeras espécies de peneídeos: *L. vannamei* (Destoumieux et al., 1997; Cuthbertson et al., 2002), *Litopenaeus setiferus* (Bartlett et al., 2002; Cuthbertson et al., 2004), *Marsupenaeus japonicus* (Rojtinnakorn et al., 2002), *P. monodon* (Supungul et al., 2002; Chen et al., 2004; Ho et al., 2004; Chiou et al., 2005), *L. stylirostris* (Muñoz et al., 2004), *F. chinensis* (Kang et al., 2004), *L. schmitti* (Barracco et al., 2005), *F. paulensis* (Barracco et al., 2005) e *Fenneropenaeus indicus* (Shanthi; Vaseeharan, 2011).

No camarão *L. vannamei* e *L. setiferus* foram identificadas os subgrupos PEN 2, PEN 3 e PEN 4 (Gross et al., 2001), sugerindo que os subgrupos podem apresentar diferentes funções biológicas. Análises de EST (do inglês, *expressed sequence tag*) a partir do cDNA de hemócitos revelaram que 10,7% das sequências isoladas de *L. vannamei* correspondem a peneidinas, sendo o subgrupo PEN 3 o mais abundante, representando mais de 90% dos transcritos codificantes para as peneidinas (Destoumieux et al., 1997; Cuthbertson et al., 2002). Todos os três subgrupos de peneidina encontradas em *L. vannamei* apresentaram forte atividade contra bactérias Gram-positivas, levedura *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* e os fungos filamentosos *Nectria haematococca*, *Neurospora crassa*, *Alternaria brassicola*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Aspergillus fumigatus* (Destoumieux et al., 1999) (Tabela 1).

A atividade antifúngica das peneidinas contra diferentes espécies de fungos parece estar associada à inibição da germinação dos esporos e do crescimento do fungo (Destoumieux et al., 1999). Tal atividade pode estar relacionada a um domínio localizado na porção C-terminal das peneidinas, o qual permite a ligação desse AMP à quitina, polissacarídeo também encontrado na parede celular de fungos (Raikhel et al., 1993; Destoumieux et al., 2000). A habilidade de se ligar à quitina, além de estar envolvida na defesa antifúngica, também pode permitir a ligação das peneidinas à cutícula do próprio animal, a fim de conter as infecções e injúrias na superfície corporal, ou durante os episódios de ecdise (Bachère et al., 2004).

Outro importante grupo de AMPs dos crustáceos são os ALFs. Esses AMPs foram inicialmente identificados em quelicerados (*Limulus polyphemus* e *Tachypleus tridentatus*) e posteriormente também foram encontrados em decápodas. Em camarões peneídeos, os ALFs foram identificados em *L. setiferus* (Gross et al., 2001), *P. monodon* (Supungul et al., 2004; Somboonwiwat et al., 2005; Tharntada et al., 2009), *F. chinensis* (Liu et al., 2005), *M. japonicus* (Nagoshi et al., 2006), *L.*

*vannamei* (de la Vega et al., 2008), *F. paulensis*, *L. schmitti* (Rosa et al., 2007) e *L. stylirostris* (Tassanakajon et al., 2010).

Os ALFs são considerados peptídeos antimicrobianos de amplo espectro e, nos crustáceos, atuam contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Somboonwiwat et al., 2008), além de apresentam atividade contra alguns vírus humanos envelopados (Carriel-Gomes et al., 2007) e fungos filamentosos, tais como *Botrytis cinerea*, *Penicillium crustosum* e *F. oxysporum* (Somboonwiwat et al., 2005; Tassanakajon et al., 2010). Os ALFs também possuem a propriedade de se unir a lipopolissacarídeos (LPS) e ao ácido lipoteicoico (LTA), componentes da superfície de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente (Somboonwiwat et al., 2008).

E, por fim, uma nova classe de peptídeos aniônicos foi recentemente identificada e descrita em camarões: as stylicinas (Rolland et al., 2010). Esses AMPs apresentam uma potente atividade contra bactérias Gram-negativas e fungos filamentosos da espécie *F. oxysporum* e foram caracterizados pela capacidade de se ligar tanto a LPS quanto a  $\beta$ -1,3-glicanas.

Como dito anteriormente, os camarões nos cultivos estão sujeitos a infecções por diferentes micro-organismos. Durante um processo infeccioso, a modulação da expressão gênica de suas moléculas imunológicas pode indicar o envolvimento de imunofetores e/ou imunoreguladores no combate ao agente patogênico. Dessa forma, a quantificação da expressão de genes codificantes para tais moléculas pode representar uma ferramenta relevante para avaliar a saúde dos camarões tanto em condições de cultivo, como em seu ambiente natural, além de auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na interação patógeno-hospedeiro.

O conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvendo o sistema de defesa dos crustáceos cultivados tem criado uma necessidade por parte dos imunologistas em compreender a modulação da expressão de genes imunológicos durante os processos infecciosos. Essa ferramenta pode ser muito importante para compreender os mecanismos de resistência/susceptibilidade dos crustáceos frente a diferentes patógenos, como também para auxiliar no desenvolvimento de metodologias, técnicas e produtos que aumentem a resistência e a sobrevivência dos camarões nos cultivos.

Embora existam muitos estudos a nível mundial sobre expressão gênica de proteínas imunológicas em *L. vannamei*, ainda são raras as informações a respeito das respostas a nível celular e molecular dirigida contra fungos, uma vez que os estudos existentes são concentrados nas

infecções virais e bacterianas. Nesse sentido, o presente trabalho apresenta resultados da avaliação da expressão gênica de algumas das principais moléculas associadas à defesa antifúngica em crustáceos, utilizando como modelo experimental camarões cultivados em Santa Catarina (*L. vannamei*) e camarões nativos (*F. paulensis*), que foram experimentalmente infectados com o fungo oportunista *Fusarium solani*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Analisar a modulação da expressão gênica de moléculas envolvidas nas respostas antifúngicas de camarões *Litopenaeus vannamei* e *Farfantepenaeus paulensis* mediante infecção experimental com *Fusarium solani*.

### 2.2 Objetivos específicos

**2.2.1** Definir doses de inóculos de *F. solani* capazes de provocar a mortalidade de 0% (não-letal), 50% (subletal) e 100% (letal) dos camarões em um período de 15 dias.

**2.2.2** Avaliar o perfil de expressão gênica de oito moléculas imunológicas associadas ao reconhecimento ( $\beta$ GBP e LGBP) e às respostas imunoefetoras (proPO, peneidina 2, peneidina 3, peneidina 4, ALF e stylicina) contra fungos, durante o desafio com *F. solani*.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Animais

Foram utilizados nesse estudo camarões nativos da espécie *Farfantepenaeus paulensis* (n = 60, peso = 6-8 g) coletados na região de Laguna/SC e camarões originalmente livres de patógenos específicos (SPF; do inglês, *specific pathogen free*) da espécie *Litopenaeus vannamei* (n = 150, peso = 10-12 g) provenientes do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM, AQI, UFSC).

Os animais foram acondicionados em aquários no Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA, BEG, UFSC), a uma taxa de estocagem de 10-12 animais por tanque (40 litros), sob aeração constante (23  $\pm$  4°C; salinidade 32-34‰) e sendo alimentados uma vez ao dia com ração comercial. Somente animais aparentemente saudáveis e na fase de intermuda foram utilizados nos experimentos.

### 3.2 Cultura do fungo filamentosso *Fusarium solani*, preparo do inóculo e determinação da dose letal

Culturas puras de *F. solani* foram gentilmente cedidas pela Dra. Cláudia Regina Batista de Souza, do Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Pará. A cultura de *F. solani* bem como a infecção experimental dos camarões foi realizada segundo protocolo adaptado de Shockey e colaboradores (2009). Os fungos foram mantidos em meio PDA (do inglês, *potato dextrose agar*) por 10 dias a 30°C, protegidos da luz. Os esporos foram isolados a partir da adição de água ultrapura e raspagem da superfície das colônias. A suspensão de esporos resultante foi filtrada com gaze dupla esterilizada para remoção do micélio do patógeno, e então centrifugada a 500 *xg* por 10 min. O precipitado de esporos foi lavado duas vezes com solução tampão estéril para peneídeos (SSP; Tris 10 mM, NaCl 0,33 M, pH 7,4) (500 *xg* por 5 min), e sua concentração ajustada para  $6 \times 10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  esporos/ml, a fim de determinar as doses não-letal, subletal e letal capazes de causar a mortalidade de 0%, 50% e 100%, respectivamente, em um período de 15 dias. Para tal, 50  $\mu$ l de cada diluição (inóculo) foram injetados intramuscularmente em 7 animais, entre o primeiro e segundo segmento abdominal, sendo a mortalidade monitorada durante 15 dias.

### 3.3 Infecção experimental dos camarões com *Fusarium solani*

Inicialmente foi realizado o desafio de camarões *F. paulensis* com uma dose não-letal de esporos de *F. solani*, capaz de estimular as defesas antifúngicas dos camarões sem causar mortalidade. Após o desafio, foi realizada apenas a análise da expressão gênica da PRP específica para fungos, a  $\beta$ GBP, a fim de verificar se a dose escolhida era capaz de modular essa PRP no camarão nativo. A partir dos resultados obtidos, a espécie exótica *L. vannamei* foi empregada para avaliar a modulação de oito moléculas imunológicas (PRPs e imunofetores, incluindo a  $\beta$ GBP) envolvidas com a defesa antifúngica, a partir do desafio dos animais com uma dose letal do fungo.

Dessa forma, uma vez determinadas as doses não-letal (0%), subletal (~50%) e letal (100%), camarões nativos da espécie *F. paulensis* (n = 60) foram desafiados com a dose não-letal de fungo ( $6 \times 10^6$  esporos/ml), através de injeções (50  $\mu$ l) de uma suspensão contendo  $3 \times 10^5$  esporos, entre o primeiro e o segundo esternito abdominais utilizando uma seringa estéril (1 ml). Animais não-estimulados (i.e. coleta dos tecidos no tempo 0 h) e camarões injetados com o mesmo volume de tampão (SSP) foram utilizados como controles.

Posteriormente, camarões *L. vannamei* foram injetados com o mesmo volume da suspensão contendo  $5 \times 10^6$  esporos ( $10^8$  esporos/ml), correspondente à dose letal. Como controle, foram utilizados animais não estimulados (i.e. coleta dos tecidos no tempo 0 h) e camarões injetados com o mesmo volume de tampão.

A infecção dos camarões por *F. solani* foi confirmada a partir de uma reação de PCR com DNA extraído das brânquias dos camarões mortos. O DNA foi extraído segundo o protocolo do kit comercial DNAzol<sup>®</sup> (Invitrogen) e para a PCR foram utilizados iniciadores específicos para a região do espaço transcrito interno do rDNA de *F. solani* (ITS; do inglês, *internal transcribed spacer*) (ITS1/ITS4; ITS-Fw e ITS-Rv; Tabela 2) (Lee et al., 2000), que constituem um fragmento de 550 pb. Para a reação da PCR realizada em um volume de 10  $\mu$ L, foram adicionados 1  $\mu$ l de DNA, 10  $\mu$ M de cada iniciador, 1 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Fermentas), dNTP 2 mM e MgCl<sub>2</sub> 50 mM, em termociclador (Biocycler - MJ96+/MJ96G) programado para 1 ciclo inicial de 94°C por 10 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 1 min e 72°C por 1 min e um último ciclo de extensão a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR amplificados foram analisados em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio (0,01% v/v) e registrados em fotodocumentador. Como controle positivo da reação, foi utilizado DNA extraído do micélio de *F. solani*.

### 3.4 Coleta de tecidos

A hemolinfa dos camarões *F. paulensis* infectados com a dose não-letal e dos grupos controle (3 *pools* de 3 animais cada) foi coletada nos tempos 0, 24 e 48 h pós-injeção (Figura 2), a partir da região ventral do abdômen utilizando uma seringa estéril (1 ml), contendo solução anticoagulante MAS estéril (solução de Alsever modificada: citrato de sódio 27 mM, NaCl 336 mM, glicose 115 mM, EDTA 9 mM, pH 7,0) (diluição 3x).

Já a hemolinfa dos camarões *L. vannamei* infectados com a dose letal e dos respectivos grupos controle (3 *pools* de 3 animais cada) foi coletada nos tempos 0, 6, 24, 48 e 72 h pós-injeção (Figura 2).

Os hemócitos foram recuperados por centrifugação (600 *xg* por 10 min a 4 °C) e ressuspensos em TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen) para a posterior extração dos RNAs totais.

Após a coleta de hemolinfa em cada período, os animais foram sacrificados e o hepatopâncreas e as brânquias extraídos (3 *pools* de 3 animais cada). Amostras de hepatopâncreas foram homogeneizadas com auxílio de um pistilo e 100 mg do tecido macerado foram imediatamente



### 3.6 Análise da expressão de genes relacionados com a defesa antifúngica, após desafio com *Fusarium solani*

Os cDNAs dos hemócitos e dos hepatopâncreas dos camarões foram empregados na reação de amplificação das sequências correspondentes às moléculas imunológicas de interesse. No caso de *F. paulensis*, desafiado com dose estimulatória não-letal de *F. solani*, foi analisado apenas a modulação da expressão gênica da proteína de reconhecimento de padrão fúngico  $\beta$ GBP, a partir dos cDNAs dos hepatopâncreas. No caso de *L. vannamei*, desafiado com dose letal, foi analisada a expressão de todas as oito moléculas imunológicas. As sequências correspondentes à  $\beta$ GBP e LGBP foram amplificadas a partir dos cDNAs de hepatopâncreas, enquanto que as sequências da LGBP, proPO e dos AMPs peneidina 2, peneidina 3, peneidina 4, ALF e stylicina foram amplificadas a partir dos cDNAs dos hemócitos.

Todos os iniciadores foram desenhados a partir das sequências de *L. vannamei* (Wang et al., 2007; Wang et al., 2010; Yao et al., 2010), exceto os iniciadores específicos para o gene da stylicina que foram desenhados com base em sequências do banco de EST de *L. vannamei* (Tabela 2).

A amplificação de sequências gênicas da  $\beta$ GBP e LGBP de hepatopâncreas foi realizada por PCR em tempo real (qPCR) em um equipamento Applied Biosystems 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), na presença de 1  $\mu$ l de cDNA 0,5  $\mu$ M de cada iniciador e 5  $\mu$ l de Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (Fermentas) (volume final de 10  $\mu$ l).

Já a amplificação de sequências gênicas das proteínas hemocitárias LGBP, proPO, peneidina 2, peneidina 3, peneidina 4, ALF e stylicina foi realizada em colaboração com o *Institut Français de Recherche pour l'exploitation de la Mer* (IFREMER, França), utilizando um equipamento LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche), na presença de 1  $\mu$ l de cDNA (diluído 1:9), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5  $\mu$ M de cada iniciador e 3  $\mu$ l de LightCycler® 480 SYBR Green I Master 2X (volume final de 6  $\mu$ l).

As reações foram realizadas em triplicata de acordo com as seguintes condições: desnaturação a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 s, anelamento dos iniciadores a 57°C por 20 s e extensão a 72°C por 25 s. Ao término dos ciclos, as amostras foram submetidas a uma curva de dissociação a fim de confirmar que apenas um único produto de PCR foi amplificado e detectado. Como gene de referência de expressão constitutiva em *L. vannamei* foram utilizados iniciadores correspondentes ao gene do fator

de alongação 1-alfa (EF1 $\alpha$ ) (Yao et al., 2010) (Tabela 2), sob as mesmas condições estabelecidas para os demais genes.

**Tabela 2.** Pares de iniciadores utilizados nas análises de expressão em qPCR de genes relacionados ao sistema imune em *Litopenaeus vannamei*.

<b>Iniciador</b>	<b>Sequência 5' – 3' (Fw/Rv)</b>	<b>Número de acesso</b>
<b><math>\beta</math>GBP</b>	ACGAGAACGGACAAGAAGTG TTCAGCATAGAAGCCATCAGG	AY249858
<b>LGBP</b>	ACCGCAGCATCAGTTATACC GTCATCGCCCTTCCAGTTG	AY723297
<b>proPO</b>	CGGTGACAAAGTTCCTCTTC GCAGGTCGCCCGTAGTAAG	AY723296
<b>PEN 2</b>	TCGTGGTCTGCCTGGTCTT CAGGTCTGAACGGTGGTCTTC	Y14925
<b>PEN 3</b>	CACCCTTCGTGAGACCTTTG AATATCCCTTTCCACGTGAC	AF390144
<b>PEN 4</b>	GCCCGTTACCCAAACCATC CCGTATCTGAAGCAGCAAAGTC	DQ211701
<b>ALF</b>	CTGTGGAGGAACGAGGAGAC CCACCGCTTAGCATCTTGTT	GQ227486
<b>Stylicina</b>	CACAAGAGTGCCCACCGTG CACACAGGCTGCCGACATAA	CK591498
<b>EF1<math>\alpha</math></b>	TGGCTGTGAACAAGATGGACA TTGTAGCCACCTTCTTGACG	GU136229
<b>ITS<sup>1</sup></b>	TCCGTTGGTGAACCAGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	AF129104

<sup>1</sup> Iniciadores para o gene da região ITS de *Fusarium solani* utilizados para a confirmação da infecção.

Inicialmente, a eficiência da reação de amplificação de cada gene alvo foi avaliada a partir de diluições seriadas de cDNA que foram submetidas à amplificação nas mesmas condições acima citadas.

Posteriormente, procedeu-se as análises de expressão de cada gene que gerou valores de Cq para cada período analisado (6, 24, 48, 72 h pós-injeção) e que foram normalizados com relação à expressão gene de referência (EF1 $\alpha$ ), de modo que os resultados são apresentados como expressão relativa do gene alvo nos camarões infectados em comparação aos não-estimulados (tempo 0 h), segundo o método de Livak e Schmittgen (Livak; Schmittgen, 2001).

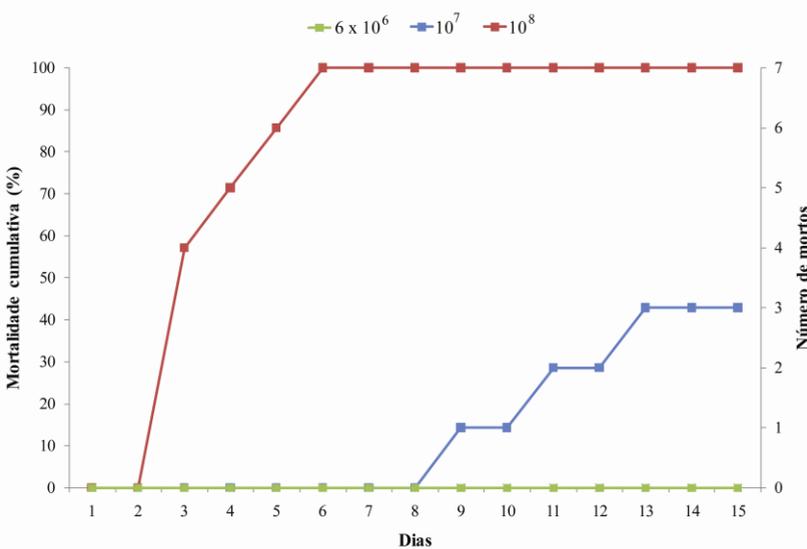
### **3.7 Análises estatísticas**

Significâncias estatísticas ( $p < 0,05$ ) foram determinadas pelo teste t de Student e pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey. O teste t de Student foi empregado para analisar as diferenças estatísticas entre os animais não-estimulados e os que receberam injeção de tampão ou de esporos, e dentro do mesmo período (h) entre os animais injetados com tampão ou esporos (tratamento dentro de cada tempo). Já na análise de variância (ANOVA), o fator principal foi o tratamento (tampão ou *F. solani*) ao longo do período analisado.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Infecção experimental dos camarões por *Fusarium solani***

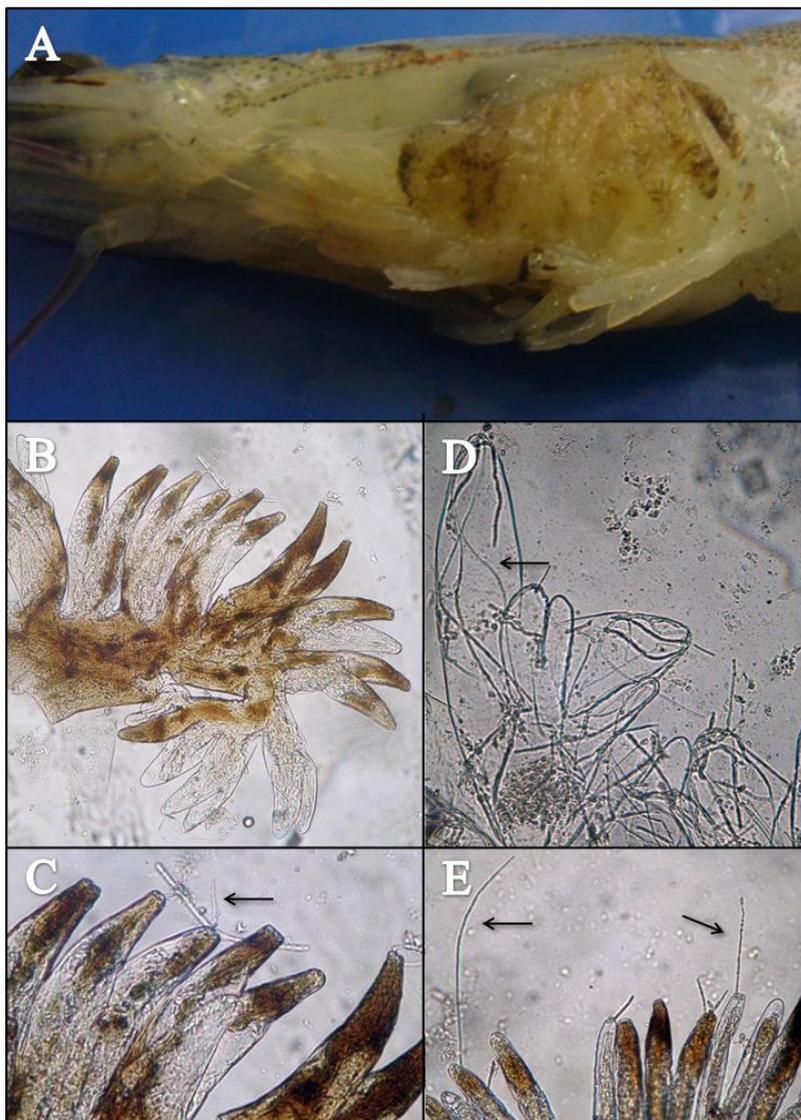
A injeção dos camarões *L. vannamei* com  $6 \times 10^6$  esporos/ml não causou a morte dos animais em um período de 15 dias. Essa dose foi definida como não-letal, sendo empregada para estimular o sistema imunológico dos camarões nativos da espécie *F. paulensis*. A dose de  $10^7$  esporos/ml resultou na mortalidade de 43% dos camarões em 15 dias, sendo classificada como subletal, enquanto a mortalidade de 100% (dose letal) foi atingida em 6 dias quando os animais foram infectados com  $10^8$  esporos/ml (Figura 3).



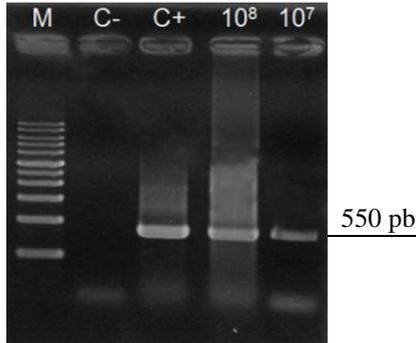
**Figura 3.** Mortalidade cumulativa dos camarões infectados com  $6 \times 10^6$  (dose não-letal; 0% mortalidade),  $10^7$  (dose subletal; 43% mortalidade) e  $10^8$  (dose letal; 100% mortalidade) esporos/ml do fungo filamentosso *Fusarium solani*.

Sinais clínicos da infecção foram observados nos animais injetados com a dose subletal de *F. solani* ( $10^7$  esporos/ml). Os camarões foram mantidos em aquários por 27 dias, onde 100% da mortalidade foi atingida e, a partir do 15º dia pós-desafio, foram observados os sinais clínicos característicos da fusariose, como o estabelecimento de lesões melanizadas sobre os apêndices e brânquias, passíveis de serem vistos a olho nu (Figura 4A). Tais lesões, decorrentes de uma resposta inflamatória intensa nas brânquias (Figura 4B), foram observadas durante o processo infeccioso quando hifas de *F. solani* foram detectadas na região (Figura 4C-E).

A infecção dos camarões por *F. solani* foi confirmada por PCR, onde o produto gênico correspondente à região do espaço transcrito interno do rDNA de *F. solani* (ITS) foi amplificado a partir do DNA extraído das brânquias de animais infectados com  $10^8$  e  $10^7$  esporos/ml (Figura 5).



**Figura 4.** Sinais clínicos decorrentes da infecção experimental de camarões *L. vannamei* com  $10^7$  esporos/ml de *F. solani*. (A) Melanização de apêndices e brânquias; (B) Detalhe da deposição de melanina nas brânquias (aumento 100x); (C-E) Estabelecimento de hifas (**setas**) nas brânquias (aumento 400x).



**Figura 5.** Perfil eletroforético em gel de agarose do fragmento amplificado (550 pb) correspondente à região do espaço transcrito interno do rDNA de *Fusarium solani* (ITS). **M:** marcador de peso molecular (1 kb); **C-:** controle negativo; **C+:** controle positivo (micélio de *F. solani*); *Litopenaeus vannamei* infectados com dose letal ( $10^8$ ) ou subletal ( $10^7$ ) de esporos/ml de *F. solani*.

## 4.2 Expressão de genes imunológicos

A expressão relativa dos genes codificantes para as oito proteínas imunológicas relacionadas à defesa antifúngica ( $\beta$ GBP, LGBP, proPO, PEN2, PEN3, PEN4, ALF e stylicina) foi realizada através da técnica da PCR em tempo real. As análises dos níveis de expressão gênica foram feitas antes das injeções (0 h: animais não-estimulados) e 6, 24, 48 e 72 h após o desafio dos animais com o fungo *F. solani*.

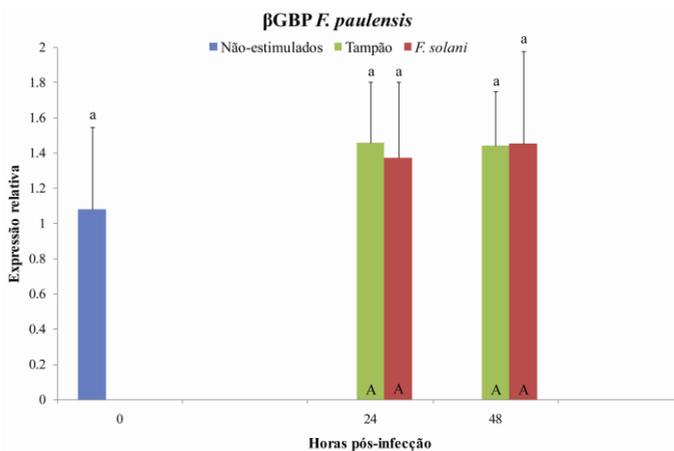
### 4.2.1 Proteína que se liga a $\beta$ -1,3-glicanas ( $\beta$ GBP)

A infecção dos camarões *F. paulensis* com uma dose estimulatória e não-letal de *F. solani* não foi capaz de modular significativamente a expressão da  $\beta$ GBP nos tempos analisados nesse estudo (24 e 48 h pós-infecção) (Figura 6A).

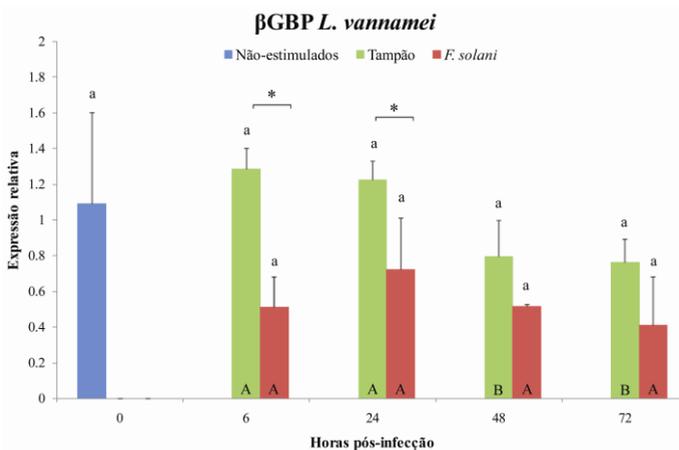
Já a dose letal desse fungo alterou significativamente a expressão dessa PRP em camarões *L. vannamei*, onde a quantidade de transcritos foi reduzida em 6 h (2,5x) e 24 h (1,7x) após a injeção dos esporos (Figura 6B). Passado esse período, a expressão da  $\beta$ GBP retornou ao nível basal, de modo semelhante aos animais controle (animais não-estimulados e injetados com tampão).

Considerando o perfil de expressão da  $\beta$ GBP durante os 3 dias de análise, pode-se observar que a expressão da  $\beta$ GBP nos animais injetados com tampão diminuiu em 48 e 72 h, enquanto nos animais infectados o número de transcritos dessa PRP é mantido estatisticamente constante ao longo do período estudado (Figura 6B).

(A)



(B)

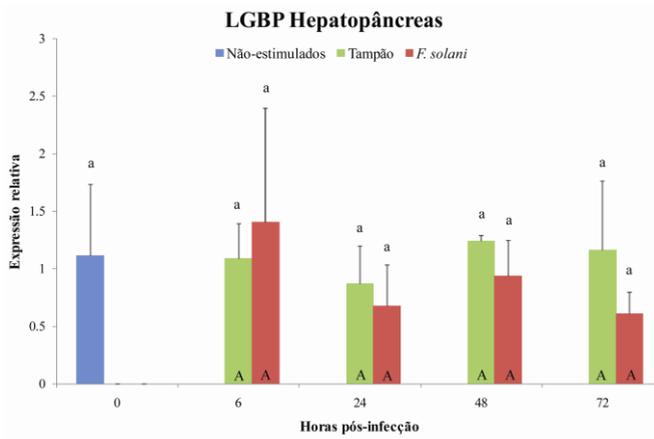


**Figura 6.** Expressão relativa da proteína que se liga a  $\beta$ -1,3-glicanas ( $\beta$ GBP) no hepatopâncreas de camarões infectados com *F. solani*. (A) *F. paulensis* infectados com dose não-letal de *F. solani* ( $6 \times 10^6$  esporos/ml). (B) *L. vannamei* infectados com dose letal de *F. solani* ( $10^8$  esporos/ml). As barras representam média  $\pm$  desvio padrão (DP) (3 pools de 3 animais). Letras minúsculas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais não-estimulados (0 h). Letras maiúsculas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) dentro de cada grupo (tampão ou *F. solani*) entre os períodos analisados. Asteriscos representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) dentro do mesmo período, entre os animais desafiados e os injetados com tampão.

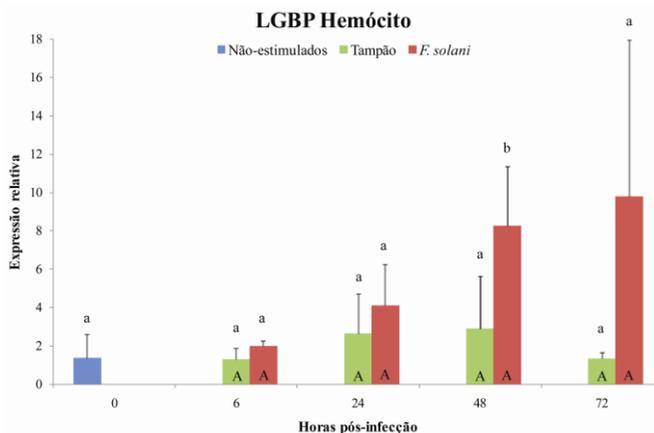
#### 4.2.2 Proteína que se liga a LPS e $\beta$ -1,3-glicanas (LGBP)

A análise do perfil de expressão da LGBP expressa tanto no hepatopâncreas quanto nos hemócitos foi muito semelhante nos camarões injetados com tampão (controle) (Figura 7).

(A)



(B)

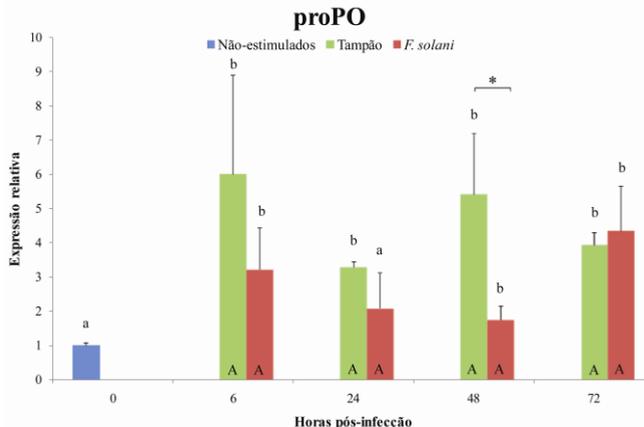


**Figura 7.** Expressão relativa da proteína que se liga a LPS e  $\beta$ -1,3-glicanas (LGBP) no hepatopâncreas (A) e hemócitos (B) de camarões *L. vannamei* infectados com dose letal de *F. solani*. As barras representam média  $\pm$  desvio padrão (DP) (3 pools de 3 animais). Letras minúsculas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais não-estimulados (0 h). Letras maiúsculas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) dentro de cada grupo (tampão ou *F. solani*) entre os períodos analisados.

Já nos animais desafiados, a expressão da LGBP de hepatopâncreas não foi modulada em *L. vannamei* em resposta à infecção por *F. solani* (Figura 7A). A LGBP presente nos hemócitos, por sua vez, teve sua expressão fortemente induzida (6x) 48 h após o desafio, quando comparada apenas aos animais não-estimulados (Figura 7B). Esse aumento na expressão da LGBP parece ser mantido até o 3° dia (72 h) após o desafio, apesar da alta variação encontrada entre as amostras analisadas.

#### 4.2.3 Pró-fenoloxidase (proPO)

O desafio dos camarões com *F. solani* resultou em um aumento de 3,2x na expressão do zimógeno proPO a partir de 6 h após a injeção (Figura 8). Curiosamente, apenas o estímulo provocado pela injeção foi capaz de aumentar a expressão da proPO em todos os períodos analisados comparado aos animais não-estimulados (0 h). Os animais injetados apenas com tampão tiveram a expressão desse zimógeno fortemente induzida principalmente em 6 h (6x) e 48 h (5,4x) após a injeção, enquanto o desafio com fungo resultou em um aumento menor (6 h: 3,2x; 48 h: 1,8x; 72 h: 4,3x), porém ainda significativo (Figura 8).



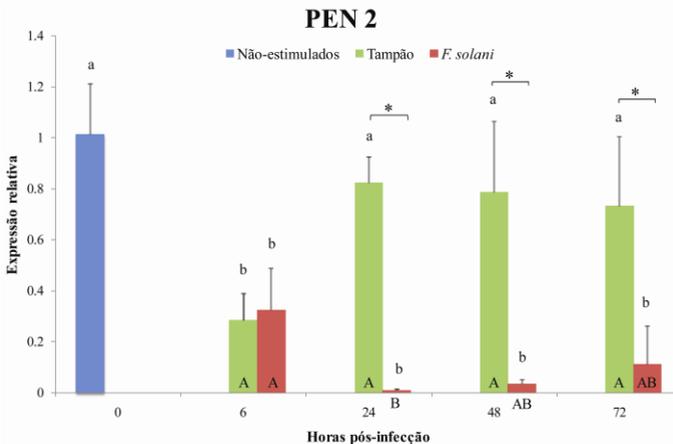
**Figura 8.** Expressão relativa da pró-fenoloxidase (proPO) nos hemócitos de camarões *L. vannamei* infectados com dose letal de *F. solani*. As barras representam média  $\pm$  desvio padrão (DP) (3 pools de 3 animais). Letras minúsculas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais não-estimulados (0 h). Letras maiúsculas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) dentro de cada grupo (tampão ou *F. solani*) entre os períodos analisados. Asteriscos representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) dentro do mesmo período, entre os animais desafiados e os injetados com tampão.

Contudo, o processo infeccioso causado por *F. solani* nos camarões reduziu drasticamente (3x) o nível de transcritos da proPO em 48 h após o desafio, quando comparado aos animais injetados apenas com tampão (Figura 8), retornando a níveis maiores e equivalentes ao controle apenas em 72 h.

Considerando o perfil de expressão da proPO durante os 3 dias analisados, pode-se observar uma manutenção na expressão da proPO nos animais injetados com tampão e infectados com esporos de *F. solani*, a qual não foi modulada ao longo desse período (Figura 8).

#### 4.2.4 Peneidina 2 (PEN 2)

O desafio de *L. vannamei* com uma dose letal de *F. solani* resultou na redução da expressão da PEN 2 em todos os períodos analisados, sendo a inibição máxima, superior a 100x, observada 24 h após a infecção experimental (Figura 9). Decorrido esse forte declínio na quantidade de transcritos, o padrão de expressão da PEN 2 se manteve reduzido até o 3º dia de análise (48 h: 29x; 72 h: 9x).



**Figura 9.** Expressão relativa da peneidina 2 (PEN 2) nos hemócitos de camarões *L. vannamei* infectados com dose letal de *F. solani*. As barras representam média  $\pm$  desvio padrão (DP) (3 pools de 3 animais). Letras minúsculas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais não-estimulados (0 h). Letras maiúsculas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) dentro de cada grupo (tampão ou *F. solani*) entre os períodos analisados. Asteriscos representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) dentro do mesmo período, entre os animais desafiados e os injetados com tampão.

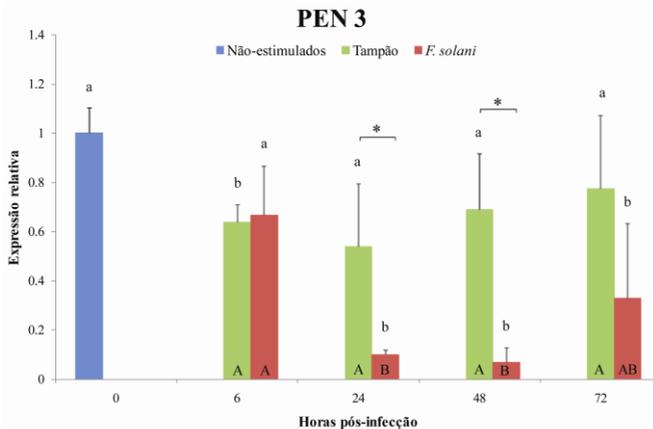
De maneira contrária à resposta observada para o zimógeno proPO, a injeção por si só (tampão ou esporos de fungo) reduziu cerca de 3,5x os níveis de expressão da PEN 2 em 6 h após a injeção.

Quando comparada aos animais injetados apenas com tampão (controle), a infecção com *F. solani* inibiu drasticamente a expressão da PEN 2 em 24 h (84,6x), 48 h (22,4x) e 72 h (6,6x) após a injeção, enquanto que o grupo controle teve o nível de transcritos da PEN 2 inalterados a partir de 24 h (Figura 9).

#### 4.2.5 Peneidina 3 (PEN 3)

Os níveis de expressão gênica referentes à PEN 3 foram também reduzidos nos camarões após 6 h (1,6x) da injeção com tampão, e, em 24 h (10x), 48 h (14,6x) e 72 h (3x) após a injeção dos esporos de *F. solani* (Figura 10).

De maneira interessante, o número de transcritos da PEN 3 foi fortemente diminuído em 24 h (5,3x) e 48 h (10x) após a infecção com a dose letal de *F. solani*, em comparação aos animais injetados com tampão (Figura 10), sendo que um leve aumento no período seguinte igualou os níveis de expressão desse AMP entre estes dois grupos.

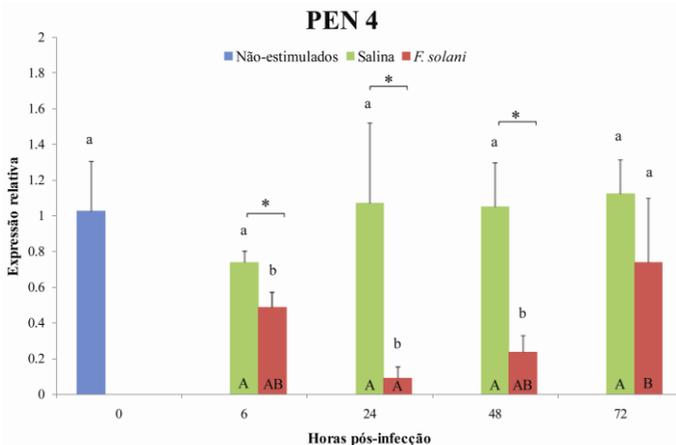


**Figura 10.** Expressão relativa da peneidina 3 (PEN 3) nos hemócitos de camarões *L. vannamei* infectados com dose letal de *F. solani*. As barras representam média  $\pm$  desvio padrão (DP) (3 pools de 3 animais). Letras minúsculas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais não-estimulados (0 h). Letras maiúsculas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) dentro de cada grupo (tampão ou *F. solani*) entre os períodos analisados. Asteriscos representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) dentro do mesmo período, entre os animais desafiados e os injetados com tampão.

#### 4.2.6 Peneidina 4 (PEN 4)

A infecção dos camarões por *F. solani* inibiu também de maneira significativa a expressão do subgrupo da peneidina PEN 4, em todos os períodos analisados até 48 h. A repressão mais drástica em sua expressão (11x) foi observada 24 h após o desafio dos animais com o fungo (Figura 11). No entanto, diferentemente do observado para as outros subgrupos da peneidina analisadas, o nível de transcritos da PEN 4 não foi reduzido 6 h após a injeção com tampão.

De maneira semelhante, a injeção dos esporos levou a uma inibição nos níveis de expressão da PEN 4 até 48 h (6 h: 1,5x; 24 h: 11,5x; 48 h: 4,4x;), quando comparado aos camarões que receberam apenas a injeção de tampão (Figura 11), seguido por um aumento na expressão em 72 h que igualou o número de transcritos da PEN 4 entre os grupos.



**Figura 11.** Expressão relativa da peneidina 4 (PEN 4) nos hemócitos de camarões *L. vannamei* infectados com dose letal de *F. solani*. As barras representam média  $\pm$  desvio padrão (DP) (3 pools de 3 animais). Letras minúsculas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais não-estimulados (0 h). Letras maiúsculas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) dentro de cada grupo (tampão ou *F. solani*) entre os períodos analisados. Asteriscos representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) dentro do mesmo período, entre os animais desafiados e os injetados com tampão.

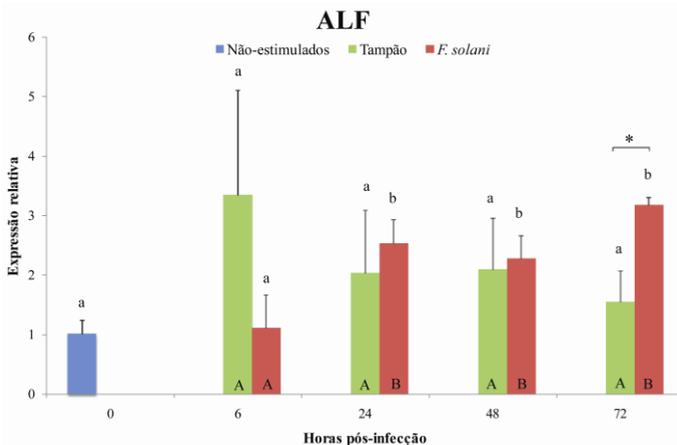
Considerando o perfil de expressão da PEN 4 durante os 3 dias analisados, pode-se observar nos animais infectados com *F. solani* uma redução da expressão da PEN 4 em 24 h, seguida de um leve aumento,

até atingir níveis mais altos, equivalentes aos níveis basais em 72 h (Figura 11).

#### 4.2.7 Fator antilipopolisacarídeo (ALF)

O desafio por *F. solani* induziu um leve aumento na expressão do ALF após 24 h (2,5x), 48 h (2,2x) e 72 h (3,1x) da injeção dos esporos, comparado aos animais não-estimulados (0 h). Quando comparado aos animais injetados apenas com tampão, um aumento significativo (2x) na expressão do ALF foi observado 72 h após a injeção dos esporos (Figura 12).

Ao longo dos períodos analisados, o perfil de expressão do ALF em camarões infectados se manteve constante, com exceção de um leve declínio em 6 h após o desafio (Figura 12).



**Figura 12.** Expressão relativa do fator antilipopolisacarídeo (ALF) nos hemócitos de camarões *L. vannamei* infectados com dose letal de *F. solani*. As barras representam média  $\pm$  desvio padrão (DP) (3 pools de 3 animais). Letras minúsculas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais não-estimulados (0 h). Letras maiúsculas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) dentro de cada grupo (tampão ou *F. solani*) entre os períodos analisados. Asteriscos representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) dentro do mesmo período, entre os animais desafiados e os injetados com tampão.

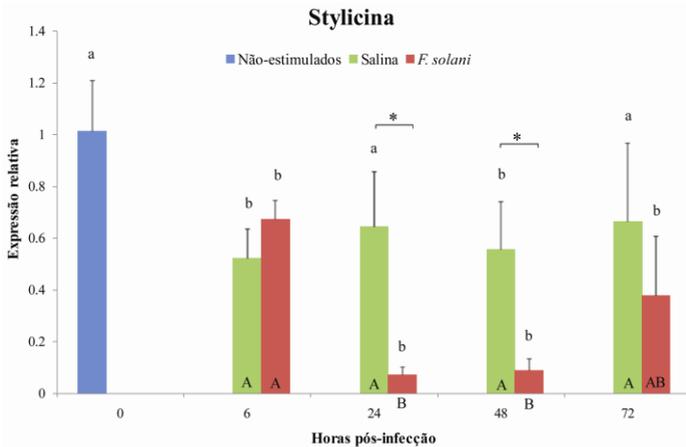
#### 4.2.8 Stylicina

Os camarões desafiados com *F. solani* também apresentaram baixos níveis de expressão do AMP stylicina em todos os períodos analisados, semelhante ao encontrado para as penidinas, quando

comparados aos animais não-estimulados (0 h). A expressão da stylicina se manteve reduzida até 72 h, de forma que o maior declínio na expressão foi observado em 24 h (14,1x) e 48 h (11,2x) após a injeção dos esporos de *F. solani* (Figura 13).

Quando comparado aos animais injetados com tampão, a expressão da stylicina em camarões infectados experimentalmente com *F. solani* foi fortemente reprimida 24 h (9x) e 48 h (6,2x) após a infecção (Figura 13). Esse perfil de supressão foi também observado nos animais desafiados ao longo do período, onde em 24 e 48 h após a infecção foram registrados os menores níveis de transcritos da stylicina.

De maneira semelhante ao observado com os subgrupos PEN 2 e PEN 3, o estímulo provocado pela injeção com tampão foi capaz de reprimir a expressão da stylicina em 6 h (1,9x) e 48 h (1,8x) após a injeção.



**Figura 13.** Expressão relativa da stylicina nos hemócitos de camarões *L. vannamei* infectados com dose letal de *F. solani*. As barras representam média  $\pm$  desvio padrão (DP) (3 pools de 3 animais). Letras minúsculas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais não-estimulados (0 h). Letras maiúsculas indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) dentro de cada grupo (tampão ou *F. solani*) entre os períodos analisados. Asteriscos representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) dentro do mesmo período, entre os animais desafiados e os injetados com tampão.

## 5. DISCUSSÃO

Os crustáceos aquáticos habitam ambientes ricos em uma grande variedade de micro-organismos, incluindo protozoários, microalgas, fungos, leveduras, bactérias e vírus. A fim de manter os episódios de infecções sob controle, esses animais desenvolveram um sistema imunológico eficiente e capaz de detectar e discriminar os micro-organismos benéficos e que podem contribuir para a sua sobrevivência, daqueles potencialmente patogênicos e prejudiciais à sua saúde (Bachère et al., 2004).

Tendo em vista que a problemática sanitária atual da carcinicultura está mundialmente voltada para as perdas econômicas decorrentes de viroses e bacterioses, os estudos abordando infecções fúngicas em camarões não são prioritários, ainda que esses patógenos oportunistas estejam comumente associados às infecções causadas por vírus e bactérias e contribuem, assim, por debilitar ainda mais os animais nos cultivos.

Os relatos atualmente disponíveis abordando os mecanismos moleculares dos peneídeos frente às infecções microbianas envolvem a expressão relativa de genes imunológicos em resposta a infecções especialmente por bactérias do gênero *Vibrio* (Liu et al., 2007a; 2007b; Amparyup et al., 2008; Gao et al., 2008; Yang et al., 2008; Shockey et al., 2009; Wang et al., 2010) e em resposta ao vírus WSSV (Leu et al., 2007; Robalino et al., 2007; Wang et al., 2008; Guertler, 2010; James et al., 2010). Por outro lado, o fato de fungos oportunistas não representarem, *a priori*, uma real ameaça aos cultivos resultou em uma escassez quase completa na literatura de relatos sobre estudos moleculares envolvendo doenças fúngicas. Essa lacuna literária se faz ainda mais pronunciada se considerarmos a modulação da expressão de genes imunológicos dos peneídeos associados à defesa contra as fusarioses, doenças causadas pelos fungos do gênero *Fusarium*.

Nesse sentido, o presente estudo analisou o perfil da expressão dos genes codificantes para as principais moléculas de reconhecimento de fungos (as PRPs  $\beta$ GBP e LGBP) e imunoefetoras associadas a infecções fúngicas em crustáceos (proPO, PEN 2, PEN 3, PEN 4, ALF e stylicina), mediante desafio experimental dos camarões *Litopenaeus vannamei* e *Farfantepenaeus paulensis* com o fungo filamentosso *Fusarium solani*.

O reconhecimento de fungos como patógenos invasores ocorre a partir da ligação das  $\beta$ -1,3-glicanas presentes em sua parede celular pelas PRPs  $\beta$ GBP e LGBP produzidas pelo hospedeiro (Vargas-Albores;

Yépez-Placencia, 2000; Roux et al., 2002). A  $\beta$ GBP é amplamente reconhecida por sua propriedade de reconhecer especificamente um tipo de carboidrato ( $\beta$ -1,3-glicanas) encontrado na parede de fungos e ativar o sistema proPO (Duvic; Söderhäll, 1990; Barracco et al., 1991; Cerenius et al., 1994; Vargas-Albores et al., 1996; Goncalves et al., em preparação). Baseado nessa propriedade de reconhecimento da  $\beta$ GBP, o presente estudo investigou a modulação da sua expressão em resposta a uma infecção branda (não-letal) e uma infecção severa (letal) pelo fungo filamentosso *F. solani* em duas espécies diferentes de peneídeos, *F. paulensis* e *L. vannamei*, respectivamente.

A expressão da  $\beta$ GBP foi somente modulada mediante desafio dos camarões com alta dose de esporos de *F. solani*. A injeção dos camarões com uma dose estimulatória de fungo, mas não-letal, não alterou a expressão da PRP nos camarões nativos da espécie *F. paulensis*, em nenhum dos tempos analisados. O número de transcritos dos camarões desafiados apresentou um padrão de expressão similar aos animais não-estimulados ou injetados com tampão, indicando que essa PRP não foi modulada em resposta a uma baixa dose de *F. solani*, apesar do seu importante papel no reconhecimento de fungos. Por outro lado, outra proteína associada ao sistema imune desse mesmo peneídeo, o inibidor de proteases  $\alpha$ 2-macroglobulina ( $\alpha$ 2M), teve a sua expressão modulada positivamente durante uma infecção branda por *F. solani* (Perazzolo et al., 2011).

A  $\beta$ GBP/HDL corresponde a cerca de 1% das proteínas totais encontradas no plasma de camarões marinhos (Ruiz-Verdugo et al., 1997). Sabendo que somente a hemocianina perfaz mais de 95% das proteínas plasmáticas (Sellos et al., 1997), a concentração relativa da  $\beta$ GBP no plasma pode ser considerada relativamente alta. Dessa forma, a quantidade de  $\beta$ GBP encontrada no plasma dos camarões no momento do desafio pode ter sido suficiente para o reconhecimento da quantidade de esporos injetada, sem a necessidade do aumento da expressão desse gene no período inicial do desafio (até 48 h). Além disso, a infecção parece ter sido controlada pelo hospedeiro, uma vez que não houve registro de mortalidade dos animais durante o período do experimento (30 dias). A sobrevivência dos animais, portanto, deve estar diretamente relacionada com o reconhecimento imediato do fungo pela  $\beta$ GBP disponível no plasma com conseqüente controle da infecção, uma vez que a dose ministrada era baixa.

Por outro lado, a injeção dos camarões com uma dose de esporos 20x superior (dose letal) levou a uma redução de cerca de 60% e 40% no nível de transcritos da  $\beta$ GBP em *L. vannamei* em 6 e 24 h após o

desafio, respectivamente, quando comparado aos animais injetados apenas com tampão. A diminuição da expressão da  $\beta$ GBP até o período de 24 h sugere que o fungo *F. solani* module negativamente a expressão dessa PRP já na fase inicial do processo infeccioso, uma vez que o nível de transcritos se mantém baixo até 72 h após o desafio. Tal cenário poderia então propiciar a multiplicação do patógeno no organismo, com o consequente estabelecimento da infecção, que levaria à morte dos animais após 6 dias do desafio, como observado. Além disso, a diminuição de transcritos da  $\beta$ GBP poderia levar a uma redução na ativação do sistema proPO, onde são geradas moléculas transitórias altamente tóxicas e o pigmento melanina, que parece possuir atividade fungistática (Cerenius; Söderhäll, 2004).

Considerando que a  $\beta$ GBP atua no reconhecimento do patógeno, ou seja, na etapa inicial da resposta imunológica contra fungos, não se pode descartar a hipótese de que tenha ocorrido uma modulação positiva da expressão dessa PRP em um período anterior ao analisado, ou seja, antes de 6 h após o desafio. Em um período imediatamente posterior à injeção dos esporos poder-se-ia esperar um aumento na expressão dessa PRP, em vista do contato primário com o patógeno. A grande quantidade de patógenos seria então capaz de provocar uma subsequente repressão na expressão da  $\beta$ GBP (a partir de 6 h do desafio), com o intuito de vencer o sistema imunológico do camarão e viabilizar o processo infeccioso.

Diferentemente da  $\beta$ GBP, a LGBP, proteína também expressa no hepatopâncreas, não foi modulada em resposta à infecção severa por *F. solani*. E, de maneira semelhante, a LGBP hemocitária também não apresentou alteração no nível de transcritos, comparado aos animais não-desafiados (injeção com tampão). No entanto, os níveis de transcritos dessa PRP aumentaram 48 h após o desafio, em comparação apenas aos animais não-estimulados (0 h). Esta tendência de aumento no nível de transcritos da LGBP se manteve até 72 h, sugerindo que a LGBP expressa nos hemócitos seja possivelmente uma proteína induzível de fase aguda da infecção por *F. solani*.

De maneira semelhante à hipótese para a  $\beta$ GBP, a modulação no nível de transcritos das LGBPs pode ter ocorrido ainda em um período anterior a 6 h (primeiro período analisado), logo após o contato inicial com o patógeno. Essa hipótese é sustentada uma vez que as LGBPs correspondem a proteínas clássicas de reconhecimento de fungos e bactérias Gram-negativas, produzidas tanto pelos hemócitos (Lee et al., 2000; Cheng et al., 2005; Du et al., 2007; Wang et al., 2007) quanto

pelo hepatopâncreas dos crustáceos (Roux et al., 2002; Cheng et al., 2005; Wang et al., 2007).

A modulação da LGBP presente nos hemócitos parece ser diferente de acordo com o patógeno utilizado no desafio dos camarões. No caso de um desafio viral, uma intensa modulação dessa PRP foi observada em camarões em resposta à infecção por WSSV. Um aumento acentuado na expressão da LGBP foi relatado em *Litopenaeus stylirostris* (Roux et al., 2002; Dhar et al., 2003) e *L. vannamei* (Yeh et al., 2009; Guetler, 2010) durante a fase aguda de uma infecção pelo WSSV, cerca de 48 h após o desafio. Estes resultados sugerem um possível envolvimento da LGBP na fase aguda de infecções virais e, segundo os dados do presente estudo, também de infecções fúngicas.

De modo contrário ao encontrado para as expressões das PRPs  $\beta$ GBP e LGBP, o número de transcritos do zimógeno proPO foi fortemente modulado em resposta ao desafio dos camarões com *F. solani*. De maneira interessante, o estímulo da injeção tanto de tampão quanto de esporos induziu um aumento na expressão da proPO em todos os períodos analisados (exceção de 24 h), quando comparado aos animais não-estimulados. A injeção, por si só, foi responsável por causar dano na cutícula e no tecido do animal desencadeando um aumento na expressão da proPO, independente do conteúdo da solução injetada (resposta inespecífica).

No entanto, o nível de expressão da proPO foi fortemente reduzido 48 h após o desafio, em relação aos animais injetados com tampão, indicando que o fungo pode modular negativamente a expressão desse zimógeno. De modo semelhante, a infecção viral pelo WSSV também induziu uma redução na expressão gênica da proPO em camarões (Roux et al., 2002; Ai et al., 2008; Yeh et al., 2009; Guetler, 2010).

No caso dos fungos, ainda não há relatos sobre expressão de moléculas do sistema proPO mediante desafios fúngicos, com exceção dos trabalhos recentes desenvolvidos pelo nosso grupo (Perazzolo et al., 2011). O inibidor de proteases  $\alpha$ 2M foi modulado positivamente em camarões *F. paulensis* infectados com *F. solani* (Perazzolo et al., 2011), enquanto o zimógeno proPO teve a expressão reprimida após o desafio com o mesmo patógeno. Dessa forma, a modulação da expressão das moléculas envolvidas com o sistema proPO em resposta à infecção fúngica parece seguir o mesmo padrão observado para as infecções virais. Além disso, a baixa síntese de proPO poderia levar a uma depleção na ativação do sistema correspondente, propiciando a infecção fúngica.

No caso dos desafios bacterianos, observa-se geralmente uma indução na expressão da proPO de peneídeos. A infecção de *L. vannamei* pela bactéria Gram-negativa *Vibrio harveyi* causou um aumento nos níveis de transcritos da proPO, especialmente nas fases agudas da infecção (a partir de 24 h após o desafio) (Wang et al., 2010). Gao e colaboradores (2008) também mostraram que o nível de expressão da proPO aumentou em *Fenneropenaeus chinensis* após infecção com *Vibrio anguillarum*. Contudo, a infecção de camarões *Penaeus monodon* com *V. harveyi* não alterou os níveis transcricionais do zimógeno (Supungul et al., 2004).

Com relação aos peptídeos antimicrobianos (AMPs), a expressão dos subgrupos de peneidina (PEN 2, PEN 3 e PEN 4), bem como da stylicina foi fortemente reprimida nos animais desafiados com altas doses *F. solani* na maioria dos períodos analisados. A injeção dos esporos de *F. solani* provocou uma redução surpreendentemente drástica do subgrupo PEN 2 em todos os períodos analisados, especialmente 24 h após o desafio, cuja expressão chegou a ser 100x inferior a dos animais não-estimulados (0 h) e 84,6x inferior a dos animais injetados com tampão. Um padrão semelhante de expressão foi também observado para os subgrupos PEN 3 e PEN 4, onde no caso da PEN 3 os níveis de transcritos foram drasticamente reduzidos a partir de 24 h, enquanto que a redução dos da PEN 4 ocorreu a partir de 6 e até 48 h após o desafio, retornando em seguida aos níveis basais. Tal redução indica o forte envolvimento desse fungo modulando negativamente a expressão das peneidinas.

A maioria dos trabalhos sobre a expressão de peneidinas em camarões se refere a desafios bacterianos e os resultados obtidos são diversos. O desafio microbiano de juvenis *L. vannamei* com um inóculo contendo simultaneamente bactérias (*Aerococcus viridans* e *Vibrio alginolyticus*) e fungos (*Fusarium oxysporum*) mortos por calor resultou em um decréscimo importante nos níveis transcricionais da PEN 3 em 6 h após a injeção (Destoumieux et al., 2000). No entanto, no período de 12 h após o desafio, a expressão dessa peneidina retornou aos níveis basais, seguido de um aumento no número de transcritos em 72 h.

A bactéria Gram negativa *V. harveyi*, por sua vez, pode tanto modular negativamente a expressão de uma peneidina (subgrupo não determinado) em *P. monodon*, até 12 h após o desafio, e aumentar em seguida o nível de transcritos (Supungul et al., 2004), quanto não alterar a expressão da PEN 3 em *L. vannamei* (Wang et al., 2010). Por outro lado, o mesmo desafio estimula a expressão dos subgrupos PEN 2 e PEN 4 de *L. vannamei*, mostrando que esses AMPs podem estar

envolvidos na limitação da infecção por *V. harveyi* (Wang et al., 2010). Resultados similares de modulação negativa dos subgrupos PEN 2, PEN 3 e PEN 4 foram encontrados em infecções experimentais empregando outras bactérias do gênero *Vibrio* (*Vibrio penaeicida* e *V. alginolyticus*) ou injeções com LPS (Destoumieux et al., 2000; de Lorgeril et al., 2005; Okumura, 2007).

No presente estudo o número de transcritos dos diferentes subgrupos de peneidina foi mantido baixo até o 3º dia de análise, sendo a queda máxima da expressão em 24 h no caso das PEN 2 e PEN 4, e em 48 h no caso da PEN 3. Acredita-se que a redução da expressão das peneidinas seja decorrente especialmente da migração dos hemócitos granulares para a liberação dos AMPs nos sítios de infecção (Bachère et al., 2004). A indução da degranulação a partir do estímulo microbiano é uma das reações celulares mais imediatas em crustáceos (Smith; Söderhäll, 1983; Johansson; Söderhäll, 1985; Johansson; Söderhäll, 1989) e promovem a liberação de diversos imunofatores que participam da neutralização e/ou destruição do patógeno invasor (Barracco et al., 2008).

Assim, pode-se sugerir que a infecção severa pelo fungo *F. solani* nos camarões promoveu uma migração dos hemócitos granulares para o sítio de infecção, culminando em uma degranulação intensa na fase aguda da infecção, com o intuito de neutralizar e destruir o parasita, de modo que o tecido hematopoiético dos animais não foi capaz de sintetizar novos hemócitos em número suficiente para retornar à circulação e manter o nível basal de expressão das peneidinas, após o período de maior repressão (24 ou 48 h).

Em outro estudo, a infecção natural de camarões *Marsupenaeus japonicus* com fungo do gênero *Fusarium* resultou em um aumento expressivo (6x) na proliferação dos hemócitos (Sequeira et al., 1996). A proliferação celular é necessária para repor os hemócitos lisados ou mortos em decorrência do desafio microbiano, a fim de reestabelecer a homeostase do organismo. Além disso, sabe-se que infecções pelo fungo *Fusarium* desencadeiam o estabelecimento de lesões melanizadas nos apêndices e nas brânquias, principalmente, e que tais lesões envolvem a ativação do sistema proPO e possível lise celular. O aumento no número de hemócitos pode resultar, por consequência, no aumento no número de transcritos das moléculas intracelulares, como os AMPs, proPO e LGBP.

No entanto, em função da alta dose de esporos utilizada na infecção do presente estudo, os animais podem não ter sido capazes de estimular a síntese de novos hemócitos, em função do estado

imunologicamente debilitado em que se encontravam ou, ainda, o fungo pode ter inibido as respostas de defesa dos camarões. Além disso, outro fato importante a ser considerado é que os camarões severamente infectados estavam imunodeprimidos e impedidos assim de acionar mecanismos específicos para conter a infecção brutal, que resultou na mortalidade de 100% dos animais em 6 dias.

Curiosamente, diferente do observado para a proPO, o estímulo da injeção de tampão provocou a redução do número de transcritos da PEN 2 e PEN 3. Alterações na expressão de alguns genes imunológicos, tais como a proPO, caspase e AMPs, já foram relatadas em outros trabalhos onde os camarões foram injetados apenas com solução tampão (Okumura, 2007; Guertler, 2010). A injeção de tampão é conhecida por reduzir o número de hemócitos circulantes em *L. vannamei* (Liu et al., 2005) em decorrência da migração dos mesmos para o local da injúria, o que resultaria, conseqüentemente, na diminuição dos níveis de transcritos das moléculas intracelulares.

Em relação ao peptídeo antimicrobiano ALF, os resultados do presente estudo sugerem uma cinética de expressão contrária a das outras famílias de AMPs analisadas. O desafio dos camarões com *F. solani* levou a uma forte indução na expressão do ALF a partir de 24 h, sugerindo a participação do ALF na defesa contra o fungo e/ou o envolvimento do fungo em estimular a produção desse AMP de *L. vannamei*.

No caso de desafios bacterianos, os níveis de expressão dos ALFs aumentam em diferentes peneídeos nas primeiras 12 h após infecção com *Vibrio* (primeira fase das reações imunológicas) e voltam a seus níveis basais cerca de 48 h depois do início do processo inflamatório (Supungul et al., 2004; Liu et al., 2005; de Lorgeteril et al., 2008). No caso de uma infecção fúngica, o aumento na expressão desse AMP se manteve até o último período analisado (72 h), mostrando uma resposta diferenciada daquela encontrada para bactérias.

Em outro estudo, o desafio de *P. monodon* com *V. harveyi* modulou positivamente os níveis de expressão do ALF especialmente em 6 h após a infecção, seguido por um retorno aos níveis basais em 48 h (Supungul et al., 2004). De maneira semelhante, em *L. vannamei* infectados com *V. harveyi* os níveis de expressão do ALF foram significativamente maiores em vários pontos após a infecção (1, 12, 18, 24 e 36 h após o desafio) (Wang et al., 2010).

Não existem relatos de modulação gênica do ALF mediante infecções fúngicas, no entanto, sabe-se que as infecções virais podem modular a expressão desse AMP de maneira diferenciada de acordo com

o grau de infecção. Infecções brandas pelo WSSV não promovem a modulação da expressão do ALF em *L. vannamei* (de la Vega et al., 2008), enquanto que infecções severas por esse mesmo vírus levam à diminuição da expressão desse AMP (Guertler, 2010). Já no lagostim *Pacifastacus leniusculus* severamente infectados por WSSV foi observada uma superexpressão desse AMP (Liu et al., 2005).

Além do grau de severidade da infecção, esse padrão de expressão diferenciado poderia ser ainda explicado pelo fato que existem diferentes famílias de ALFs e que os trabalhos não apresentam essa distinção. Além disso, esse AMP pode ser expresso em diferentes subpopulações de hemócitos granulares e/ou a regulação da transcrição desse AMP pode ocorrer também durante a fase tardia da infecção (após 72 h) (de Lorgetil et al., 2008).

Um ponto a ser considerado é que vários estudos mostraram que os ALFs possuem algum tipo de um efeito inibitório *in vitro* sobre o crescimento e a replicação tanto de vírus, quanto de bactérias e fungos (Iwanaga et al., 2002; Liu et al., 2006; de la Vega et al., 2008; Tharntada et al., 2009). Os relatos mais recentes envolvem o silenciamento gênico pós-transcricional do ALF via RNA de interferência (RNAi), onde o camarão *L. vannamei* ALF-silenciado apresentou uma maior susceptibilidade a infecções bacterianas (*V. penaeicida*) e fúngicas (*F. oxysporum*) (de la Vega et al., 2008). Liu e colaboradores (2005) demonstraram ainda que o silenciamento desse AMP leva a um aumento na taxa de replicação do WSSV em *P. leniusculus*, sugerindo que o ALF possua também um papel antiviral nos crustáceos, hipótese essa ainda controversa se considerarmos os relatos de expressão gênica existentes.

A análise de expressão da stylicina, outro AMP com atividade antifúngica, mostrou que esse AMP foi afetado pelo desafio com *F. solani* de forma semelhante às peneidinas, onde os níveis de transcritos foram fortemente reduzidos em todos os períodos estudados. A redução máxima ocorreu 24 h após o desafio, de maneira similar às PEN 2 e PEN 4. Além disso, diferentemente da expressão da proPO, mas de maneira semelhante àquela das PEN 2 e PEN 4, a injeção de tampão reduziu a expressão da stylicina em 6 e 48 h após o estímulo da injeção.

A atividade antifúngica da stylicina de *L. stylirostris* está relacionada não somente à sua capacidade de se ligar a moléculas da parede celular de *F. oxysporum* (como as  $\beta$ -1,3-glicanas), mas especialmente por afetar o crescimento *in vitro* desse fungo (Rolland et al., 2010). Paralelamente, as stylicinas parecem facilitar a eliminação intracelular dos patógenos através da fagocitose, uma vez que apresentam também um potencial efeito opsonizante (Rolland et al.,

2010). Embora no presente estudo não tenha sido examinada a taxa de *clearance* dos esporos no organismo dos camarões, tais propriedades biológicas da stylicina poderiam justificar a redução da expressão desse AMP após o severo desafio fúngico realizado. Os hemócitos, local de síntese das stylicinas, a partir da infecção experimental, estariam sendo desviados para processos celulares de defesa, como a fagocitose, a formação de nódulos (esporos) e cápsulas (hifas) e também lise celular, liberando imunofatores como os AMPs para a eliminação do patógeno em questão. A redução dos hemócitos granulares da circulação resultaria, por consequência, na detecção de um baixo número de transcritos da stylicina, assim como observado para os subgrupos de peneidinas.

As respostas imunológicas desencadeadas por uma infecção microbiana podem ser caracterizadas em duas fases distintas (Bachère et al., 2004). A primeira fase, observada nas primeiras 12 h após o desafio microbiano, é caracterizada pela migração dos hemócitos em direção ao local da infecção. Nesse período, ocorre uma redução no número de hemócitos expressando AMPs. Além disso, as peneidinas e os peptídeos derivados da hemocianina, os quais também apresentam atividade antifúngica, são normalmente encontrados livres na circulação (Bachère et al., 2004). O recrutamento massivo de hemócitos para os sítios de infecção culmina na liberação do conteúdo intragranular (Muñoz et al., 2004) e desaparecimento destes da circulação. Nesses locais, os AMPs, juntamente com outros imunofatores celulares, são liberados e participam da eliminação dos patógenos infecciosos.

Segundo Bachère (2004), durante a segunda fase da infecção, que ocorre entre 48 e 72 h após o desafio, observa-se um forte acúmulo das peneidinas próximo ao local da injeção ou na superfície subcuticular, onde esses AMPs demonstram sua propriedade de se ligar à quitina. Paralelamente, essa fase também é caracterizada pelo aumento do número de transcritos de alguns AMPs, resultado da reabilitação do sistema de defesa do animal e ativação da hematopoiese.

Efetivamente, as duas fases das respostas imunológicas foram claramente observadas em camarões injetados com micro-organismos mortos por calor (bactérias *A. viridans* e *V. alginolyticus* e fungo *F. oxysporum*) (Destoumieux et al., 2000) ou com bactérias do gênero *V. penaeicida* (de Lorgeril et al., 2005; 2008). Durante infecções causadas por esses patógenos, ocorre a modulação da expressão de diferentes famílias de AMPs, tais como PEN 2, PEN 3, ALF, stylicina, crustina e lisozima (de Lorgeril et al., 2008). Com exceção do ALF, todos os genes testados apresentaram uma queda no número de transcritos durante as

primeiras horas após o desafio (12 h), seguido por um aumento na fase tardia da infecção após 24 h. Esse perfil de expressão é semelhante ao encontrado em um estudo prévio com a PEN 3 em *L. stylirostris* (Muñoz et al., 2004), e crustinas em *L. vannamei* (Burge et al., 2007) e também ao observado no presente estudo com fungo *F. solani*, no caso das peneidinas e stylicina. Camarões *L. vannamei* severamente infectados com *F. solani* apresentaram uma redução na expressão de PEN 2, PEN 3, PEN 4 e stylicina, sendo que o ALF, apresentou um aumento no nível de transcritos, como observado nas infecções bacterianas.

No período de 24 h após o desafio microbiano (segunda fase das respostas imunológicas), por sua vez, o número de transcritos para PEN 2, PEN 3, lisozima, crustina e stylicina voltam a aumentar nos hemócitos circulantes, possivelmente em função dos eventos de hematopoiese (reações sistêmicas) (Muñoz et al., 2004; de Lorgeteril et al., 2008). No entanto, no caso da infecção severa com *F. solani* o número de transcritos das peneidinas e stylicina se manteve reduzido até o período de 72 h, exceto para o subgrupo PEN 4.

Em conclusão, os resultados obtidos no presente estudo indicam que a infecção severa pelo patógeno oportunista *F. solani* modula negativamente diversos efetores imunológicos de *L. vannamei*, como o zimógeno proPO, os subgrupos de peneidina PEN 2, PEN 3 e PEN 4 e a stylicina, especialmente até 48 h após o desafio, enquanto induz um aumento na expressão do ALF a partir de 24 h da injeção.

Embora a resposta das proteínas de reconhecimento de fungos,  $\beta$ GBP e LGBP, não tenha sido fortemente modulada por *F. solani*, a infecção severa pelo fungo reduziu a expressão da  $\beta$ GBP até 24 h após o desafio. Apesar do estabelecimento prévio do papel dessas PRPs no reconhecimento de fungos, a participação direta dessas proteínas nos mecanismos antifúngicos permanece ainda não elucidada. Já a proPO e os AMPs analisados parecem estar diretamente envolvidos na limitação de infecções fúngicas, em função da forte modulação gênica dessas moléculas em resposta à infecção experimental por *F. solani*. No entanto, estudos complementares são necessários para melhor compreender a participação dessas moléculas na defesa antifúngica.

## **CAPÍTULO 2**

---

**Tentativa de silenciamento das proteínas de reconhecimento de fungos,  $\beta$ GBP e LGBP, por RNA de interferência**



## 1. INTRODUÇÃO

O sistema de RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo antigo e conservado, envolvido tanto na eliminação de RNAs mensageiros (RNAm) anômalos eventualmente produzidos pela célula, como também participa da defesa natural do organismo contra parasitas moleculares como transposons e vírus. Esse mecanismo foi observado e descrito nos mais diferentes seres vivos, como plantas, fungos, nematódeos, artrópodes e mamíferos. A proteção baseada na via de RNAi é sequência-específica, onde o RNA de fita dupla (dsRNA; do inglês, *double-stranded RNA*) desencadeia a destruição do RNAm homólogo à sua própria sequência (Hannon et al., 2002).

Nos animais, este mecanismo foi primeiramente descrito no nemátodo *Caenorhabditis elegans*, onde foi demonstrado que injeções de dsRNAs ou de uma mistura de fitas simples de RNAs senso e antisenso poderiam silenciar especificamente determinados genes endógenos do verme, desde que as fitas do RNA introduzido fossem complementares às sequências transcritas dos genes de interesse (Fire et al., 1998). No entanto, os autores verificaram que injeções de dsRNAs são mais eficazes no que se refere ao nível de silenciamento induzido do que injeções de fitas simples de RNA (Fire et al., 1998).

A ativação do sistema RNAi ocorre no citosol da célula, a partir do reconhecimento de sequências longas de dsRNA ou fitas de RNA em forma de grampo (hRNA; do inglês, *hairpin RNA*) pela endoribonuclease Dicer (RNase III), a qual cliva os longos dsRNA em pequenos RNAs duplex (21-25 nucleotídeos), denominados siRNAs (do inglês, *short interfering RNA*) e miRNAs (do inglês, *microRNAs*), respectivamente (Aliyari; Ding, 2009; Castanotto; Rossi, 2009). No caso de uma infecção viral, os siRNAs são também denominados viRNA (do inglês, *viral RNA*). Convém lembrar que os dsRNA são considerados PAMPs virais, e portanto a Dicer se comporta, nesse caso, como uma PRP para vírus (Aliyari; Ding, 2009).

Os siRNAs e miRNAs resultantes da clivagem pela Dicer são incorporados ao complexo multiproteico de silenciamento induzido por RNA ou RISC (do inglês, *RNA-induced silencing complex*), que levará à degradação específica ou à repressão da tradução de RNAm com regiões complementares à sequência do dsRNA/hRNA desencadeante (Castanotto; Rossi, 2009). Brevemente, após a associação dos siRNAs ao RISC citosólico, as duas fitas serão separadas e a fita antisenso (ou sequência-guia) será utilizada como molde pelo RISC para encontrar e degradar o RNAm alvo de sequência complementar. O núcleo catalítico

do RISC é membro de uma família altamente conservada de proteínas, denominada argonauta (AGO) (Liu et al., 2004).

O silenciamento gênico dirigido pelos siRNAs pode ocorrer sob duas formas: (a) repressão da tradução no citosol, mecanismo conhecido por *silenciamento gênico pós-transcricional* ou PTGS (do inglês, *post-transcriptional gene silencing*), ou (b) repressão da transcrição no núcleo, conhecido por *silenciamento gênico transcricional* ou TGS (do inglês, *transcriptional gene silencing*) (Castanotto; Rossi, 2009; Moazed, 2009).

O PTGS é decorrente de uma clivagem direta da sequência específica do RNAm alvo ou da repressão da tradução e degradação do RNAm (Castanotto; Rossi, 2009). Clivagens diretas de sequências específicas ocorrem quando o RNAm alvo é perfeitamente complementar ao siRNA/miRNA, sendo degradado logo após a clivagem pelo RISC. Já a repressão da tradução e a degradação do RNAm ocorre quando a sequência-guia possui apenas uma complementariedade *parcial* ao RNAm alvo. Assim sendo, no PTGS, o gene é normalmente transcrito dentro da célula, mas não consegue ser traduzido, pois o RNAm é antes degradado.

O TGS é um mecanismo de silenciamento ainda pouco compreendido, mas, diferentemente do PTGS, age em nível nuclear e não diretamente sobre a molécula de RNAm. O TGS promove alterações na estrutura da cromatina inibindo a transcrição de genes específicos. Esse mecanismo foi inicialmente descoberto em plantas, onde pequenos RNAs produzidos de transgenes promoviam a metilação de sequências homólogas de DNA endógeno e de histonas (Alló; Kornblihtt, 2010). Posteriormente, o TGS foi também detectado em leveduras, células de mamíferos (Alló; Kornblihtt, 2010), *Drosophila melanogaster* e *C. elegans* (Moazed, 2009).

A incorporação do dsRNA pela célula e o fenômeno de propagação sistêmica de silenciamento, observado em alguns estudos com *C. elegans* e *D. melanogaster*, parece estar ligado a dois mecanismos distintos: (a) transferência do dsRNA ao citosol por um canal protéico transmembrana, denominado SID-1 (do inglês, *systemic interference defective*); e (b) endocitose, utilizando receptores *scavenger* de reconhecimento de padrão (Huvette; Smaghe, 2010). Efetivamente, sabe-se que os siRNAs não podem atravessar facilmente a membrana celular devido ao seu tamanho e carga negativa (Castanotto; Rossi, 2009).

A propagação sistêmica do efeito RNAi em camarões é ainda um fenômeno não compreendido. No entanto, recentemente, um homólogo

da SID-1 foi identificado em *Litopenaeus vannamei* (Lv-Sid1), cuja expressão aumentou substancialmente após injeções de dsRNA de sequência não-específica (Labreuche et al., 2010). Esses resultados indicam que o dsRNA ativa a transcrição do gene Lv-Sid1 e sugerem um potencial papel dessa SID-1 na captação dos dsRNAs pelas células dos camarões. Além disso, alguns genes das principais proteínas envolvidas na via de RNAi, como Dicer e argonauta já foram clonados em camarões *Penaeus monodon* (Unajak et al., 2006; Dechklar et al., 2008; Su et al., 2008) e *L. vannamei* (Labreuche et al., 2010; Yao et al., 2010; Chen et al., 2011).

A primeira evidência da existência tanto do mecanismo de RNAi como do seu papel na defesa antiviral específica em camarões *L. vannamei* foi demonstrada por Robalino e colaboradores (2005). Nesse trabalho ficou evidenciado que injeções de dsRNA específicos para proteínas de certos vírus (WSSV ou TSV; do inglês, *taura syndrome virus*) resultaram em uma proteção antiviral específica e praticamente completa contra infecções por estes vírus não relacionados. De forma semelhante, sequências específicas de dsRNA foram também capazes de suprimir a replicação do vírus YHV (do inglês, *yellow head virus*) em *P. monodon* (Tirasophon et al., 2005; Yodmuang et al., 2006).

Além do papel antiviral do RNAi, esse sistema pode ainda levar ao silenciamento de genes endógenos, como detalhado anteriormente. Pelo fato do RNAi interferir em pontos críticos do processo de síntese de proteínas, a utilização biotecnológica desse sistema (técnica do RNAi) possibilita o silenciamento temporário de genes de interesse. Assim, injeções no animal de sequências específicas de dsRNA podem suprimir *in vivo* a expressão de um gene alvo, tornando possível a avaliação da atividade biológica do produto gênico de interesse (Grishok, 2005). Dessa forma, o RNAi vem sendo empregado como uma ferramenta poderosa para a análise sistemática de função gênica de várias classes de moléculas.

Nos últimos anos vem crescendo a utilização da técnica de RNAi para elucidar a função de genes e proteínas correspondentes em vários organismos, como vermes (Mori et al., 2008; Palakodeti et al. 2008), insetos (Cruz et al., 2008; McGregor et al., 2008), plantas (Sappl et al., 2008; Bhuiyan et al., 2008) e também em vertebrados (Golding et al., 2006) e invertebrados (Hirono et al., 2010).

Considerando a relevância do cultivo de camarões para a aquicultura mundial, estudos que visam compreender o sistema imunológico desses animais para aumentar a resistência a infecções microbianas são importantes e urgentes. O mecanismo de RNAi

corresponde a uma ferramenta efetiva para viabilizar estudos dessa natureza, uma vez que permite o estudo funcional de moléculas envolvidas com a resposta imunológica dos camarões frente a infecções bacterianas, virais e fúngicas.

Em camarões, estudos dessa natureza são recentes e envolvem na maioria dos casos proteínas imunológicas, tais como a proteína de coagulação e a transglutaminase que estão envolvidas no sistema de coagulação (Maningas et al., 2008), os peptídeos antimicrobianos ALF (de la Vega et al., 2008) e crustina (Shockey et al., 2008), o zimógeno pró-fenoxidase (proPO) (Amparyup et al., 2009; Fagutao et al., 2009), a enzima de ativação da proPO (PPAE) (Charoensapsri et al., 2009; 2011), um receptor Toll-like (Wang et al., 2010), um efetor de apoptose caspase 3 (Rijiravanich et al., 2008), a endoribonuclease Dicer-1 (Su et al., 2008) e uma argonata (Dechklar et al., 2008). Com exceção das proteínas envolvidas na coagulação da hemolinfa, todas essas moléculas são consideradas imunoeletoras e, na literatura atual não estão disponíveis estudos descrevendo o silenciamento de proteínas de reconhecimento de padrão (PRPs) em camarões.

Como mencionado anteriormente, os fungos filamentosos são patógenos oportunista de camarões e o seu reconhecimento pelo organismo ocorre através de duas PRPs capazes de se ligar a  $\beta$ -1,3-glicanas:  $\beta$ GBP e LGBP. Essas PRPs apresentam, assim, um importante papel nas respostas imune inatas, através do reconhecimento de patógenos e consequente ativação do sistema porfir em crustáceos (Duvic; Söderhäll, 1990; Barracco et al., 1991; Cerenius et al., 1994; Vargas-Albores et al., 1996; Lee et al., 2000; Roux et al., 2002).

Até o presente momento, a participação da  $\beta$ GBP/HDL e da LGBP na defesa contra infecções fúngicas em crustáceos foi apenas demonstrada *in vitro* através da interação das proteínas com  $\beta$ -1,3-glicanas e LPS (Lee et al., 2000, Roux et al., 2002). Dessa forma, além do seu isolamento e caracterização não existem na literatura informações a respeito da atividade biológica *in vivo* dessas PRPs, mostrando, por exemplo, a participação das mesmas no combate às infecções fúngicas em crustáceos de interesse econômico.

Sendo assim, o presente estudo utilizou a técnica do RNAi para induzir o silenciamento dos transcritos da  $\beta$ GBP/HDL e LGBP em camarões *L. vannamei* desafiados com o fungo *Fusarium solani*, a fim de avaliar a implicação da ausência dessas PRPs no sistema de defesa dos camarões frente a infecções fúngicas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a implicação de duas proteínas de reconhecimento de  $\beta$ -1,3-glicanas na defesa de *Litopenaeus vannamei* contra a infecção pelo fungo *Fusarium solani*, através do silenciamento gênico pós-transcricional por RNAi.

### 2.2 Objetivos específicos

**2.2.1** Produzir dsRNAs específicos para silenciar o gene da  $\beta$ GBP/HDL (dsRNA  $\beta$ GBP) e da LGBP (dsRNA LGBP) de *L. vannamei*.

**2.2.2** Avaliar o silenciamento da  $\beta$ GBP e LGBP em camarões mediante a injeção de diferentes concentrações de dsRNA, bem como o período de maior silenciamento para os respectivos genes.

**2.2.3** Avaliar o envolvimento da  $\beta$ GBP/HDL e LGBP nas respostas antifúngicas em camarões desafiados com *F. solani* e tratados previamente com dsRNA específico, a partir da mortalidade cumulativa dos animais.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Animais

No presente estudo foram utilizados camarões livres de patógenos específicos (SPF) da espécie *Litopenaeus vannamei* (n = 120, peso = 6-8 g), gentilmente fornecidos pela Fazenda de Cultivo Quality Camarões (São Francisco do Sul/SC). No estudo preliminar, contudo, foram utilizados animais (n = 30, peso = 10-12g) *L. vannamei* SPF provenientes do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM, AQI, UFSC).

O condicionamento e alimentação dos animais foram realizados conforme descrito no item 3.1 do Capítulo 1.

### 3.2 Síntese do dsRNA homólogo à sequência da $\beta$ GBP/HDL e LGBP

O RNA dupla fita correspondente a uma sequência parcial do gene codificante para a  $\beta$ GBP/HDL e LGBP de *L. vannamei* (dsRNA  $\beta$ GBP e dsRNA LGBP, respectivamente) foi sintetizado conforme protocolo preconizado pelo kit de transcrição TranscriptAid™ T7 High Yield (Fermentas) utilizando os promotores T7 fornecidos pelo kit BLOCK-iT™ RNAi TOPO® (Invitrogen). Para tal, fragmentos de 535 pb e 399 pb correspondentes à  $\beta$ GBP/HDL e LGBP de *L. vannamei*, respectivamente, foram amplificados a partir do cDNA do

hepatopâncreas por PCR, utilizando os iniciadores BGBP-Fw/BGBP-Rv e LGBP-Fw/LGBP-Rv (Tabela 3) (Wang et al., 2007).

**Tabela 3.** Pares de iniciadores utilizados na síntese dos dsRNAs  $\beta$ GBP e LGBP e na confirmação do silenciamento gênico específico.

Iniciador	Sequência 5' – 3' (Fw/Rv)	Produto (pb)	Número de acesso
<b>BGBP</b>	CTTCAGTCTTCACGGCTTCC	535	AY249858
	GCGAGCCTTGATACCTTCTG		
<b>LGBP</b>	CTGGCTCTAGCAGCAACCTC	399	AY723297
	CCTCGTCCACGTAGAACTCC		
<b><math>\beta</math>-actina</b>	TAATCCACATCTGCTGGAAGGTGG	800	AF300705
	TCACCAACTGGGATGACATGG		

Em seguida, o produto amplificado foi ligado ao promotor T7 durante 15 min a 37°C, e após foi realizada a amplificação deste produto para produzir separadamente as fitas senso (iniciadores BLOCK-It T7 e BGBP-Rv ou LGBP-Rv) e antisense (iniciadores BLOCK-It T7 e BGBP-Fw ou LGBP-Fw) do DNA complementar. Essas amostras foram, então, submetidas a uma reação de transcrição para produção das sequências do RNA senso e antisense correspondente, utilizando NTPs (15 mM) e a enzima TranscriptAid™ Mix. Após tratamento das amostras com DNase (1 U/ $\mu$ l), foi realizada a purificação por precipitação com etanol 100% (2:1) e quantificação por espectrofotometria ( $A_{260\text{ nm}}$ ; GE Healthcare NanoVue™) das amostras. Em seguida, quantidades equimolares de RNA senso e antisense foram hibridizadas (1 h a uma temperatura decrescente de 95°C a 25°C) para formar o dsRNA. A qualidade do dsRNA  $\beta$ GBP e dsRNA LGBP formado foi então avaliada por análise em gel de agarose (1%) e a concentração mensurada espectrofotometricamente ( $A_{260\text{ nm}}$ ) (GE Healthcare NanoVue™).

### 3.3 Silenciamento da expressão da $\beta$ GBP/HDL e LGBP por RNA de interferência

A fim de verificar a eficiência do dsRNA específico para as PRPs  $\beta$ GBP/HDL e LGBP, bem como o período de maior silenciamento gênico, foram testadas diferentes concentrações de dsRNA,

administradas nos animais via sistêmica em doses única ou sequenciais, como detalhado a seguir. Inicialmente, foi testado o efeito de uma dose única de 1 ou 2,5 µg de dsRNA para cada 1 g de peso vivo do animal (µg/g) (n = 2 para cada concentração e gene), ou seja, 10-12 µg/animal ou 25-30 µg/animal, respectivamente. Posteriormente, foram testadas duas doses sequenciais, com intervalo de 24 h entre as injeções, de 2,5 µg/g (n = 2 para cada gene), ou seja, total de 50-60 µg/animal.

A fim de verificar o período de maior silenciamento gênico, os animais foram sacrificados em 48 h (2 dias) e 72 h (3 dias) após a injeção de uma dose única ou das doses sequenciais (n = 2 para cada tempo, condição e gene), sendo que a expressão do gene foi avaliada por PCR convencional. Dessa análise foi possível inferir que o silenciamento máximo da LGBP ocorreu 72 h após a injeção de *duas doses sequenciais de 2,5 µg/g de dsRNA LGBP*. O experimento empregando as doses de dsRNA βGBP não resultou em nenhum silenciamento gênico, sendo então esse gene descartado das análises posteriores. Dessa forma, no experimento definitivo foi utilizado *apenas o dsRNA LGBP na maior concentração testada e em doses sequenciais*, como detalhado a seguir.

Os camarões (n = 120) foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, em triplicata (n = 30/grupo; 10 animais/réplica/grupo), para avaliar a supressão específica da expressão do gene codificante para a LGBP e a taxa de mortalidade após desafio com *F. solani*. Os grupos experimentais consistiram nos grupos com animais: **G1**: injetados apenas com solução tampão estéril para peneídeos (SSP; Tris 10 mM, NaCl 0,33 M, pH 7,4) (controle experimental); **G2**: injetados com SSP e infectados com esporos de *F. solani* (controle positivo da infecção); **G3**: injetados com dsRNA LGBP de *L. vannamei* (dsRNA LGBP) e não infectados (controle da técnica); **G4**: injetados com dsRNA LGBP e infectados com esporos de *F. solani*.

Os animais dos grupos G3 e G4 foram injetados com 2,5 µg de dsRNA (100 µl) para cada 1 g de peso vivo (dsRNA1), entre o primeiro e segundo segmento abdominal. Já os dos grupos G1 e G2 foram injetados com o mesmo volume de SSP. Após 24 h, os camarões receberam a dose-reforço de dsRNA, na mesma concentração anterior (dsRNA2 – G3 e G4; enquanto G1 e G2 foram novamente injetados com SSP) (Figura 14).

		24 h	72 h
Grupos	G1	SSP	SSP
	G2	SSP	SSP
	G3	dsRNA1	dsRNA2
	G4	dsRNA1	dsRNA2

**Figura 14.** Esquema explicativo do desenho experimental do silenciamento gênico. No período de pré-infecção, camarões *L. vannamei* foram injetados com duas doses de dsRNA LGBP com intervalo de 24 h (dsRNA1 e dsRNA2) nos grupos G3 e G4 ou SSP (G1 e G2). Após a injeção da dose-reforço (72 h) os animais foram desafiados (G2 e G4) ou não (G1 e G3) com o fungo *Fusarium solani* ( $1,5 \times 10^7$  esporos). A confirmação do silenciamento foi verificada mediante coleta de tecidos (hemolinfa e hepatopâncreas) imediatamente antes do desafio.

O silenciamento gênico específico foi avaliado individualmente através de análises de densitometria de bandas (item 3.6) através da redução na amplificação do produto gênico correspondente a LGBP nos animais tratados com dsRNA (G3 e G4), em relação aos animais controle (G1 e G2) após 72 h da administração da dose-reforço, imediatamente antes da infecção (n = 5 por grupo) (Figura 14).

### 3.4 Infecção experimental dos camarões com *Fusarium solani*

A cultura do fungo filamentosso *F. solani*, bem como o preparo do inóculo fúngico e a confirmação da infecção foram realizados como descrito nos itens 3.2 e 3.3 do Capítulo 1. O desafio fúngico dos animais dos grupos G2 e G4 foi feito a partir de injeções com 100  $\mu$ l da suspensão fúngica contendo  $1,5 \times 10^7$  esporos, 72 h após o tratamento dos animais com dsRNA LGBP (G4) ou SSP (G2). Tal dose foi determinada previamente (item 3.3, Capítulo 1) como sendo responsável pela mortalidade de 100% dos animais em 6 dias (dose letal). Os camarões dos grupos controle G1 e G3 foram injetados com o mesmo volume de SSP.

A fim de avaliar a participação da LGBP na defesa/resistência do camarão frente à infecção fúngica, a mortalidade cumulativa dos animais tratados ou não com dsRNA foi monitorada por 7 dias, a partir do desafio fúngico.

Ao final do experimento, todos os animais utilizados foram autoclavados antes do descarte como medida de contenção da

contaminação, sendo que todo material utilizado, assim como a água dos aquários, foram desinfetados por hipocloração (30 mg/l de hipoclorito de sódio), segundo normas contidas no Manual de Diagnósticos de Patologias de Animais Aquáticos da OIE (2009).

### **3.5 Coleta de tecidos, extração de RNA e síntese de cDNA**

A hemolinfa e hepatopâncreas dos camarões ( $n = 5$  por grupo) foram coletados e analisados individualmente, conforme descrito no item 3.4 do Capítulo 1. Os RNAs totais foram extraídos dos tecidos e a transcrição reversa dos mesmos foi realizada conforme descrito no item 3.5 do Capítulo 1.

### **3.6 Verificação do silenciamento gênico das proteínas de reconhecimento de fungos: $\beta$ GBP/HDL e LGBP**

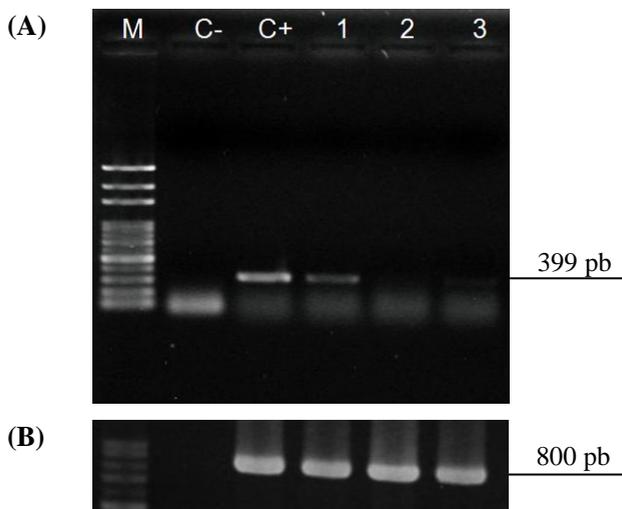
A verificação do silenciamento gênico da  $\beta$ GBP/HDL e LGBP foi realizada a partir de uma reação de PCR com cDNA sintetizado dos hemócitos e hepatopâncreas de animais injetados com dsRNA  $\beta$ GBP, dsRNA LGBP ou SSP (controle). Foram utilizados iniciadores específicos para a  $\beta$ GBP/HDL e LGBP de *L. vannamei*, os mesmos utilizados para a síntese de dsRNA (Tabela 3). Para a reação de PCR realizada em um volume de 10  $\mu$ L, foram adicionados 1  $\mu$ l de DNA, 10  $\mu$ M de cada iniciador, 1 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Fermentas), dNTP 2 mM e MgCl<sub>2</sub> 50 mM, em termociclador (Biocycler - MJ96+/MJ96G) programado para 1 ciclo inicial de 94°C por 10 min, seguido de 24 ciclos de 94°C por 1 min, 63°C ( $\beta$ GBP/HDL) ou 55°C (LGBP e  $\beta$ -actina) por 1 min e 72°C por 1 min, e um último ciclo de extensão a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR amplificados foram analisados em gel de agarose (1%) e corados em uma solução de brometo de etídio (0,01% v/v) e registrados em fotodocumentador.

O nível de silenciamento da  $\beta$ GBP/HDL e LGBP foi determinado de forma semiquantitativa utilizando o programa ImageJ, de modo que a expressão do gene de interesse (quantidade relativa de RNAm) foi calculada através da razão entre o gene alvo e o gene de referência ( $\beta$ -actina), em relação à amostra controle (G1 e G2: camarões não tratados com dsRNA) a partir dos valores de densitometria das bandas amplificadas. Foram realizadas 3 reações de PCR para cada amostra e os dados apresentados correspondem a uma média dos valores obtidos na análise de densitometria das bandas dos géis destas reações.

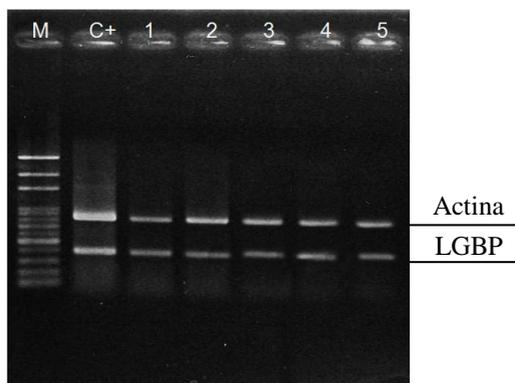
#### 4. RESULTADOS

A injeção de uma dose única de dsRNA nas concentrações de 1 ou 2,5 µg/g de peso vivo não foi suficiente para induzir o silenciamento específico da  $\beta$ GBP/HDL nem da LGBP em *L. vannamei*. No entanto, a injeção dos animais com duas doses sequenciais do dsRNA LGBP (dose-reforço 24h após a 1ª dose) permitiu o silenciamento específico dessa PRP no 2º e 3º dias (48 e 72 h, respectivamente) após a administração da última dose (Figura 15), nos experimentos preliminares feitos com 2 animais em cada período. Esses camarões, provenientes do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM, AQI, UFSC), tiveram a LGBP silenciada no segundo período analisado (72 h). As análises densitométricas revelaram que no período de 2 dias após a dose-reforço, o silenciamento da LGBP foi de 18%, aumentando para 72% e 95% o nível de silenciamento no 3º dia após a segunda dose (Figura 15). No caso da  $\beta$ GBP/HDL não foi observado nenhum nível de silenciamento (1, 2 ou 3 dias após a 2ª injeção), mesmo após a administração de duas doses de dsRNA nos animais.

A partir desses resultados preliminares, realizou-se então o experimento definitivo, empregando um maior número de camarões, visando avaliar a implicação do silenciamento da LGBP na progressão da infecção pelo fungo *F. solani*. No entanto, apesar da otimização prévia da técnica de silenciamento específico da LGBP, no experimento definitivo, feito com camarões provenientes da Fazenda de Cultivo Quality Camarões, os animais não apresentaram a mesma redução significativa na expressão gênica da LGBP, 3 dias após a injeção da dose-reforço (Figura 16). Cabe ressaltar que dos 30 animais tratados com dsRNA LGBP (G4) apenas 1/6 deles (n = 5) foram sacrificados para avaliar o silenciamento, sendo que os demais foram mantidos no sistema para acompanhar a mortalidade advinda da infecção.

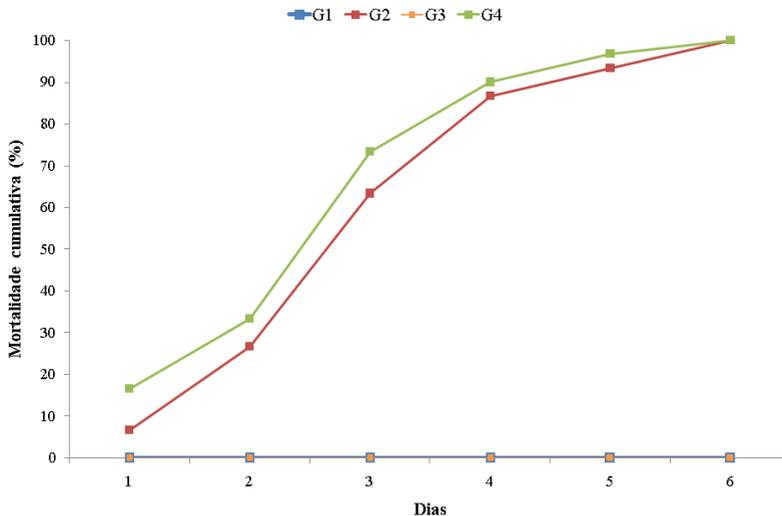


**Figura 15.** Perfil eletroforético em gel de agarose do fragmento amplificado correspondente à LGBP (399 pb) (A) e ao gene de referência  $\beta$ -actina (800 pb) (B) do hepatopâncreas de *L. vannamei*. M: marcador de peso molecular (100 pb); C-: controle negativo; C+: *L. vannamei* injetado com SSP; Níveis de silenciamento da LGBP em 3 camarões: de 18% (1) após 2 dias; de 95% (2) e 75% (3) após 3 dias da injeção com doses sequenciais de dsRNA LGBP.



**Figura 16.** Perfil eletroforético em gel de agarose do fragmento amplificado correspondente à  $\beta$ -actina (800 pb) e LGBP (399 pb) do hepatopâncreas de *L. vannamei*. M: marcador de peso molecular (100 pb); C+: *L. vannamei* injetado com SSP; 1 a 5: Após 3 dias da injeção da dose-reforço de dsRNA LGBP (análise individual, camarões 1 a 5).

Em relação à taxa de mortalidade, tanto os animais tratados como os não tratados com dsRNA LGBP que foram infectados com o fungo (confirmação por PCR) morreram em 6 dias (100%) após o desafio com a dose letal, mostrando que a mortalidade foi dependente da infecção e independente das injeções prévias com dsRNA LGBP (Figura 17). No entanto, não foi observada nenhuma mortalidade nos animais não desafiados durante o período experimental.



**Figura 17.** Mortalidade cumulativa dos camarões *L. vannamei* nos grupos G1: injetados apenas com SSP; G2: injetados com SSP e infectados com esporos de *F. solani*; G3: injetados com dsRNA LGBP de *L. vannamei* (dsRNA LGBP); G4: injetados com dsRNA LGBP e infectados com esporos de *F. solani*.

## 5. DISCUSSÃO

O silenciamento gênico via RNA de interferência, mediado por fitas de dsRNA, tem se mostrado uma ferramenta poderosa para investigar a função de vários genes em crustáceos (Hirono et al., 2010). Apesar de haver relatos de trabalhos utilizando essa técnica para a repressão da expressão pós-transcricional de algumas moléculas imunológicas em camarões, não há, todavia, estudos com crustáceos abordando o silenciamento de proteínas de reconhecimento de padrão de patógenos. Em vista disso, o presente trabalho propôs pela primeira vez um estudo sobre a implicação do silenciamento de duas PRPs de fungos

( $\beta$ GBP/HDL e LGBP) na contenção da infecção pelo patógeno *Fusarium solani* em camarões *Litopenaeus vannamei*.

Para tal, fitas longas de dsRNA específicos para os genes de interesse foram sintetizadas e utilizadas nos experimentos, a partir de protocolos previamente estabelecidos em nosso laboratório (Guertler, 2010). Em função da alta variabilidade na ativação do sistema de RNAi a partir de injeções de dsRNAs, a escolha da região da sequência gênica, bem como a identificação da quantidade adequada de dsRNA a ser administrada foram fatores prévios fundamentais considerados a fim de garantir o sucesso da técnica.

Estudos prévios em camarões indicam que sequências longas de dsRNA são mais eficientes para silenciar proteínas endógenas que sequências curtas (siRNAs) (Laubreche et al., 2010). Além disso, a concentração de dsRNA necessária para desencadear o silenciamento gênico específico é, *a priori*, diretamente proporcional à abundância do RNAm alvo e também varia de acordo com o tecido analisado (Tirasophon et al., 2005; Maningas et al., 2008). Considerando esses pressupostos, no presente estudo foram realizados testes preliminares para determinar tanto a quantidade adequada de dsRNA capaz de induzir o silenciamento (dose-resposta), quanto o período de silenciamento máximo das PRPs alvo, onde o nível de expressão dos genes foi analisado em três diferentes períodos (1, 2 e 3 dias após a injeção de dose única ou sequencial de dsRNA).

A injeção de uma única dose de dsRNA  $\beta$ GBP ou LGBP, independente da quantidade testada (1 ou 2,5  $\mu$ g/g), não foi capaz de induzir um silenciamento significativo das PRPs de *L. vannamei*. No entanto, outros estudos administrando uma única dose de dsRNA levaram ao silenciamento de proteínas imunológicas de camarões. Por exemplo, a proteína de coagulação e a enzima transglutaminase de *Marsupenaeus japonicus* foram silenciadas com injeções de 0,5  $\mu$ g/g e 3,5  $\mu$ g/g do dsRNA correspondente, 1 e 7 dias após a injeção (Manning et al., 2008).

De maneira interessante, a inibição da expressão dessas proteínas foi observada mesmo quando a dosagem mínima foi utilizada (0,5  $\mu$ g/g), demonstrando que mesmo pequenas quantidades de dsRNA foram suficientes para desencadear o silenciamento específico das duas principais proteínas envolvidas na coagulação dos crustáceos (Manning et al., 2008). Convém ressaltar que os animais utilizados deste estudo possuíam um peso corporal médio de 2-3 g, enquanto que os camarões empregados em nosso estudo eram maiores (10-12 g). Esses resultados indicam que essas diferenças no silenciamento podem estar relacionadas

ao estágio de desenvolvimento do animal e/ou a peculiaridades da expressão da própria proteína.

A susceptibilidade dos animais a infecções microbianas pode estar também vinculada ao seu estágio de desenvolvimento (larvas, juvenis e adultos). Até o momento, pouco é conhecido a respeito da ontogenia do sistema imune em camarões peneídeos em desenvolvimento. Em função disso, grande parte dos trabalhos envolvendo a imunidade emprega animais juvenis ou adultos e consideram os hemócitos como as células imunocompetentes, local de síntese da maioria das moléculas com propriedade de neutralizar e/ou destruir micro-organismos (Bachère et al., 2004).

Outro trabalho relatando silenciamento com dose única e baixa de dsRNA refere-se ao receptor Toll de *L. vannamei* que foi silenciado a partir de injeções com 1 µg/g de dsRNA, sendo que o número mínimo de transcritos foi detectado 72 h após a injeção (Wang et al., 2010). De maneira semelhante, a expressão da RNase Dicer de *Penaeus monodon* e da proPO de *M. japonicus* também foram reprimidas após a injeção com 1,7 µg/g e 1,5 µg/g de dsRNA, respectivamente, sendo a expressão mínima observada 48 e 72 h após o tratamento (Su et al., 2008; Fagutao et al., 2009).

Esses resultados em conjunto, demonstram que doses únicas e baixas de dsRNA específicos podem levar ao silenciamento de determinadas proteínas endógenas do camarão, apesar de outros trabalhos fazerem inferência a tratamentos com doses maiores e/ou múltiplas de dsRNA. Como exemplo, o silenciamento dos transcritos dos AMPs ALF e crustina, e da caspase-3 de *L. vannamei* foi obtido 48 h após uma única injeção de 5 µg/g de dsRNA (de la Vega et al., 2008; Rijiravanich et al., 2008; Shockey et al., 2009). No caso da crustina, o silenciamento se manteve por 7 dias após a injeção do dsRNA. Em *P. monodon*, os subgrupos ALF 3 e ALF 6 foram silenciadas 85% e 73% após 24 h da injeção única de 4 µg/g e 2,5 µg/g de dsRNA, respectivamente, confirmando que para o silenciamento desse AMP é necessário o tratamento dos animais com uma alta concentração de dsRNA (Ponprateep et al., 2011).

No presente estudo, em função da inalteração dos níveis de transcritos da βGBP/HDL e LGBP após a injeção de uma dose única de dsRNA nos animais, foi realizado um segundo teste empregando duas doses sequenciais em concentração mais alta (2,5 µg/g), com intervalo de 24 h entre as injeções. O silenciamento foi investigado 1, 2 e 3 dias após a injeção da dose-reforço.

Os níveis de expressão da  $\beta$ GBP/HDL não foram alterados em nenhum dos períodos analisados, mesmo após a administração de duas doses sequenciais de dsRNA. A falha nas tentativas de silenciamento dessa PRP pode estar relacionada com a sequência de nucleotídeos do dsRNA selecionada para o silenciamento. Ainda que a sequência escolhida apresente um tamanho adequado para uma fita de dsRNA (535 pb) e esteja localizada no interior da sequência completa da molécula nativa (afastada por mais de 100 pb das extremidades), a mesma pode não ter sido adequada para ativar o sistema de RNAi, visto a complexidade envolvida no reconhecimento de sequências, pareamento perfeito entre as sequências de RNA senso-alvo e antisenso gerada no sistema, bem como a degradação subsequente do RNAm alvo.

Uma vez que houve um insucesso nas tentativas de silenciamento da  $\beta$ GBP/HDL, os estudos foram focados no silenciamento da outra PRP que também se liga a  $\beta$ -1,3-glicanas, a LGBP. Os ensaios iniciais utilizando camarões SPF mantidos no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM, AQI, UFSC) resultaram no silenciamento da LGBP de 18% a 95% em 2 e 3 dias, respectivamente, após a injeção das doses sequenciais de 2,5  $\mu$ g/g de dsRNA LGBP. Convém ressaltar que estes animais eram mantidos em sistema laboratorial, não de campo, e pesavam em média 10-12 g.

O silenciamento gênico de proteínas imunológicas através da injeção de duas doses de dsRNA (intervalo de 24 h entre as doses) já foi relatado em diversos outros trabalhos. Por exemplo, os subgrupos PPAE1 e PPAE2 (enzima de ativação da proPO) do peneídeo *P. monodon* também foram silenciadas 48 h após duas injeções sequenciais de 2,5  $\mu$ g/g de dsRNA (Charoensapsri et al., 2009; 2011), semelhante ao obtido no presente estudo.

No entanto, em outros estudos o silenciamento parece somente ocorrer mediante tratamento dos animais com concentrações muito mais altas de dsRNA. Exemplos disso são os estudos com o peptídeo antimicrobiano ALF e com a proPO e a pacifastina (inibidor de serino proteases), moléculas estas envolvidas com a ativação e controle do sistema proPO, e que foram silenciados no lagostim *Pacifastacus leniusculus* a partir de duas injeções sequenciais de 7,5-10  $\mu$ g/g de dsRNA específico, 24 h após a dose-reforço (Liu et al., 2006; 2007c).

Também no camarão *P. monodon*, os subgrupos proPO1 e proPO2 tiveram a expressão silenciada após a injeção intramuscular de duas doses de 5  $\mu$ g/g de dsRNA, 48 h após a segunda injeção (Amparyup et al., 2009). O silenciamento desses zimógenos, portanto, foi atingido empregando o dobro da quantidade de dsRNA (5  $\mu$ g/g)

utilizada no presente estudo, além do tempo de silenciamento máximo no lagostim (48 h) ter sido também diferente daquele encontrado para a LGBP de camarão (72 h).

A partir dos resultados positivos de silenciamento da LGBP de *L. vannamei*, camarões provenientes de uma fazenda de cultivo foram submetidos às mesmas condições de silenciamento previamente empregadas. Nesse experimento esperava-se conhecer a implicação da ausência da LGBP na evolução do processo infeccioso pelo fungo nos camarões. No entanto, apesar da otimização prévia da técnica de silenciamento da LGBP, o silenciamento não foi detectado por análises de PCR a partir do cDNA dos animais tratados com dsRNA específico (1/6 dos animais do grupo experimental). Além disso, todos os animais do grupo experimental morreram em 6 dias, assim como os do grupo controle (não tratado com dsRNA LGBP), demonstrando que a mortalidade observada foi decorrente do estabelecimento da infecção letal por *F. solani*.

Algumas hipóteses podem ser consideradas a fim de justificar o fenômeno de não repetição dos resultados prévios no experimento definitivo. A primeira delas seria que os animais utilizados nos experimentos (prévio e definitivo) foram cultivados sob condições ambientais diferentes, embora ambos pertencessem a linhagens SPF produzidas pela mesma empresa (Aquatec Industrial Pecuária Ltda, Natal, RN). Ainda, ambos os animais foram cultivados em bioflocos, que consiste em um sistema eutrofizado, baseado na formação de flocos microbianos constituídos por microalgas, fezes, exoesqueletos, restos de organismos, bactérias, protozoários e pequenos invertebrados (Burford et al., 2003).

No entanto, enquanto os primeiros animais foram cultivados em laboratório, em tanques de concreto e sob condições ambientais controladas, os últimos foram criados em viveiros de terra com fundo revestido por geomembrana e sob rústicas condições ambientais e de manejo, típicas das fazendas de cultivo. Talvez os animais da fazenda estivessem estimulados a um nível imunológico tal que mantivesse elevada a expressão de alguns genes como o da LGBP, onde, por consequência, seria necessário a nível experimental uma concentração maior de dsRNA que 2,5 µg/g para promover o mesmo silenciamento observado com os camarões de laboratório.

Além dessa hipótese de que tenha havido um comportamento diferencial do sistema imune dos camarões segundo o ambiente de cultivo, pode-se considerar ainda que o silenciamento da LGBP nos animais de viveiro tenha ocorrido em um período *anterior* ou *posterior*

ao analisado (72 h), previamente estabelecido como o de silenciamento máximo. No entanto, por uma questão logística e de delineamento estatístico não foi possível analisar o silenciamento nos animais em vários períodos, considerando que os camarões necessitavam ser sacrificados para a coleta do hepatopâncreas e os demais deveriam permanecer no sistema para a determinação da taxa de mortalidade.

Por outro lado, variações na eficiência do dsRNA construído, assim como silenciamentos incompletos não são raros, podendo estar relacionados com a complexidade do reconhecimento de sequências específicas e dos mecanismos de processamento desencadeados pelo dsRNA (Amparyup et al., 2009). Alguns estudos demonstram ainda que o silenciamento gênico via RNAi é dose-dependente, de modo que quanto maior à concentração de dsRNA, menor deva ser o número de transcritos observados em um determinado período (Fagutao et al., 2009). Além disso, o tempo de silenciamento pode ser muito curto para determinados genes, devido à abundância de sua expressão, o que em alguns casos demanda análises de algumas poucas horas. Outros trabalhos relatam ainda que a concentração de dsRNA injetado é fundamental para manter o silenciamento de uma proteína por um período mais longo. Em camarões *M. japonicus* a injeção de 0,5 µg/g de dsRNA específico é capaz de reprimir a expressão da proPO somente em 24 h e não em 72 h após a injeção. Já aumentando a dose de dsRNA para 2,5 µg/g, esse zimógeno permanece silenciado por 7 dias, com silenciamento máximo ocorrendo em 72 h após o tratamento (Fagutao et al., 2009).

Muitos estudos relatam a ocorrência de silenciamento apenas *parcial* dos genes pela técnica de RNAi. É o caso do silenciamento dos subgrupos proPO1 e proPO2 de *P. monodon* (nível não informado pelos autores) (Amparyup et al., 2009), e das proteínas superóxido dismutase (cMnSOD) e de uma seleno-proteína M (SelM) de *L. vannamei*, cujo silenciamento de 85% e 79%, respectivamente, foi observado 24 h após a injeção de 0,7 µg/g de dsRNA. No entanto, o aumento da concentração de dsRNA para 2,7 µg/g resultou também no aumento do nível de silenciamento para 100% e 90% das respectivas proteínas cMnSOD e SelM (Garcia-Triana et al., 2010a; 2010b).

Curiosamente, alguns genes imunológicos de crustáceos parecem ser silenciados apenas a níveis inferiores de 50%, segundo relatos da literatura. A redução dos níveis de expressão da proPO e da pacifastina de *P. leniusculus* foi de apenas 57% e 44%, respectivamente, após 24 h da segunda injeção com uma quantidade extremamente alta de dsRNA, 10 µg/g (Liu et al., 2007c). Isso indica novamente que de acordo com a

molécula alvo, mesmo injeções de dsRNA em alta concentração não são suficientes para induzir um silenciamento adequado, superior a 80% pelo menos.

Salvo algumas moléculas cujo silenciamento foi obtido com pequenas doses de dsRNA, como foi o caso da proteína de coagulação e transglutaminase de *M. japonicus* (Maningas et al., 2008), Dicer de *P. monodon* (Su et al., 2008), proPO de *M. japonicus* (Fagutao et al., 2009) e Toll de *L. vannamei* (Wang et al., 2010), a utilização de doses relativamente altas ( $\geq 5$   $\mu\text{g}$  dsRNA/g peso vivo) parece necessária para a obtenção de, no mínimo, um silenciamento parcial da molécula alvo em camarões. Em função disso, a hipótese de que a quantidade utilizada no presente estudo tenha sido insuficiente para desencadear o silenciamento dos RNAm da LGBP de *L. vannamei* de cultivo (especialmente) parece ser a mais fundamentada. Além disso, a maioria dos estudos emprega camarões de pequeno porte (2 g) e não animais juvenis como os utilizados nesse estudo. No entanto, em função da indisponibilidade de animais desse porte, nossos experimentos foram realizados com animais de 6 a 12 g de peso vivo.

Um fator importante a ser considerado é o alto custo da técnica de RNAi no que se refere à síntese de dsRNA, e provavelmente esse seja o motivo para a maioria dos estudos utilizarem camarões de pequeno porte. Contudo, quanto menor o tamanho dos animais maior é a dificuldade na coleta de hemolinfa em quantidade suficiente para as análises de expressão. Sendo assim, em função do tamanho dos camarões disponíveis e do grande número de animais necessários para um experimento de desafio, não foi viável aumentar a concentração do dsRNA LGBP e realizar um novo experimento de silenciamento e infecção em tempo hábil.

Além da alta concentração de dsRNA necessária para induzir o sistema de RNAi nos camarões, curiosamente, o efeito do silenciamento gênico pós-transcricional se mostra diferente entre os tecidos dos camarões que expressam a molécula estudada. Em camarões *P. monodon*, os transcritos da proteína de coagulação (classicamente expressa no hepatopâncreas) foram silenciados em outros órgãos, como brânquias e coração, 1 dia após a injeção do dsRNA (0,5  $\mu\text{g/g}$ ), sem nenhuma alteração na sua expressão em hemócitos, hepatopâncreas, intestino e órgão linfóide. A redução na expressão da proteína de coagulação nesses últimos órgãos só foi detectada 7 dias após o tratamento com dsRNA (Maningas et al., 2008). Isso poderia também estar ocorrendo com os transcritos da LGBP de *L. vannamei*, cuja

expressão foi investigada somente em 72 h após o tratamento com dsRNA.

Resposta diferenciada entre órgãos também foi observada para o silenciamento das proteínas cMnSOD e SelM, onde a repressão da expressão de ambas ocorreu de forma mais acentuada nas brânquias do que no hepatopâncreas, utilizando a mesma concentração de dsRNA (Garcia-Triana et al., 2010a; b). Esses resultados comprovam que quanto maior a abundância do RNAm alvo, maior a quantidade de dsRNA necessária para desencadear o silenciamento gênico específico.

A proteína alvo do presente estudo de silenciamento, a LGBP, é uma PRP expressa tanto no hepatopâncreas quanto nos hemócitos de camarões e sabe-se que a sua expressão é muito mais acentuada no hepatopâncreas (Wang et al., 2007). Sendo assim, espera-se que uma quantidade ainda maior de dsRNA seja necessária para silenciar a LGBP de hepatopâncreas. Apesar de terem sido realizadas análises de silenciamento gênico de ambas LGBPs no presente estudo, nenhuma alteração na expressão dessa PRP no hepatopâncreas e hemócitos foi observada.

Em grande parte dos experimentos de silenciamento gênico a administração do dsRNA é realizada através de injeções sistêmicas, via intramuscular, em função de seu baixo custo comparada às outras formas de *delivery*. No entanto, alguns estudos em crustáceos mostram formas alternativas para a administração dessa molécula. A argonauta de *P. monodon* foi silenciada através de transfecção de 2 µg de dsRNA em células do órgão linfoide, em 24 h e 48 h após a transfecção (Dechklar et al., 2008). No lagostim *P. leniusculus* a injeção de 7,5 µg/g do dsRNA ALF resultou apenas na redução parcial dos níveis de transcritos desse AMP, enquanto o tratamento da cultura de células do tecido hematopoiético com 1 µg de dsRNA permitiu o desaparecimento quase completo dos transcritos cognatos, demonstrando que o silenciamento específico via RNAi é também viável em um sistema *in vitro* (células em cultura) (Liu et al., 2006).

Relatos do uso potencial de dsRNA para bloquear a progressão de infecções virais em peneídeos mostraram uma redução nos índices de mortalidade e uma importante limitação na replicação viral após o tratamento com dsRNAs correspondentes a proteínas virais (Robalino et al., 2005; Tirasophon et al., 2005; Yodmuang et al., 2006; Kim et al., 2007; Xu et al., 2007; Assavalapsakul et al., 2009; Guertler, 2010; Mejía-Ruiz et al., 2011). Quanto à forma de administração do dsRNA para esta finalidade, um dos métodos mais utilizados é também a injeção intramuscular, assim como a realizada no presente estudo. No entanto,

métodos alternativos estão sendo empregados, como a administração oral de bactérias produzindo o dsRNA (bactérias transformadas, deficientes em RNase III). Sarathi e colaboradores (2008) investigaram a possibilidade de proteger camarões contra WSSV pela administração oral de ração coberta com bactérias produzindo dsRNA vp28 ou com nanopartículas de quitosana contendo dsRNA da vp28. Contudo, cabe salientar que a ativação do sistema RNAi depende da entrada do dsRNA/siRNA na célula do hospedeiro e, portanto, a administração via oral deve garantir que os constructos atravessem de fato o trato digestório do camarão sem serem degradados e atinjam os tecidos do animal. Tais alternativas visam uma aplicação mais prática e menos onerosa da técnica de silenciamento via RNAi, o que viabilizaria a sua utilização futura em larga escala na carcinicultura.

Apesar do insucesso nas tentativas de silenciamento da  $\beta$ GBP/HDL e LGBP nas condições estabelecidas no presente trabalho, propostas alternativas estão sendo consideradas para estudos futuros em nosso laboratório, a fim de reverter este cenário. Dentre as possibilidades levantadas, estaria: (1) a administração de duas doses sequenciais, com intervalo de 24 h, de dsRNA em uma concentração mais alta, até 7,5  $\mu$ g/g; (2) análise do possível silenciamento no período anterior a 24 h e até 72 h após a injeção, no mínimo; (3) realizar análises da expressão apenas da LGBP hemocitária, o que reduz o número de camarões empregados no teste, uma vez que descarta a necessidade do sacrifício dos animais.

O estudo da atividade biológica *in vivo* dessas PRPs, a partir da indução do silenciamento dos seus transcritos pode evidenciar a participação destas proteínas no combate às infecções fúngicas em crustáceos de interesse econômico e contribuir para um conhecimento mais amplo do sistema de defesa desses animais.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

1. A injeção de  $10^8$  esporos/ml de *Fusarium solani* em camarões *Litopenaeus vannamei* provocou a mortalidade de 100% dos animais 6 dias após o desafio (dose letal), enquanto a dose 20x menor ( $6 \times 10^6$  esporos/ml) não resultou em mortes (sobrevivência 100%) no período de 30 dias (dose não-letal).
2. A infecção branda de camarões nativos *Farfantepenaeus paulensis* pelo fungo *F. solani* não modulou a expressão da proteína de reconhecimento padrão de fungos, a  $\beta$ GBP. No entanto, uma infecção fúngica severa de *L. vannamei* foi capaz de reduzir 2,5x o nível de transcritos da  $\beta$ GBP até 24 h após o desafio, indicando que a alta concentração de esporos reprime a expressão dessa PRP.
3. Em *L. vannamei*, a proteína de reconhecimento de fungo LGBP (hemocitária e de hepatopâncreas) não foi significativamente modulada em resposta à infecção severa por *F. solani*, com exceção da LGBP hemocitária cuja expressão aumentou 6x em 48 h após o desafio.
4. Os efetores imunológicos proPO, PEN 2, PEN 3, PEN 4, ALF e stylicina foram fortemente modulados após o desafio com *F. solani*. Com exceção do ALF, cuja expressão foi induzida com o estímulo microbiano (2 a 3x), todas as moléculas acima tiveram sua expressão reprimida após a infecção experimental.
5. Dentre as moléculas analisadas, as mais fortemente moduladas pela infecção letal foram as peneidinas, cuja repressão da expressão atingiu 100x em relação aos animais controle, sugerindo que estes AMPs estão envolvidos com a defesa antifúngica dos crustáceos.
6. O dsRNA  $\beta$ GBP, sintetizado para induzir o silenciamento gênico específico da  $\beta$ GBP/HDL, não se mostrou eficaz em nenhuma das doses e períodos testados.
7. Doses sequenciais de dsRNA LGBP injetadas em *L. vannamei* (2 doses de 2,5  $\mu$ g/g) induziu o silenciamento gênico específico da LGBP em dois indivíduos cultivados em laboratório, após 3 dias da injeção. No entanto, esse silenciamento não foi reproduzido em camarões provenientes de outro ambiente (fazenda de cultivo), submetidos às

mesmas condições experimentais. Esses resultados podem estar relacionados à quantidade insuficiente de dsRNA injetada, ao período de silenciamento analisado e/ou às diferenças no comportamento do sistema imunológico dos animais testados.

**8.** A dose letal de *F. solani* provocou mortalidade de 100% dos camarões em 6 dias, tanto nos animais tratados como nos não tratados com dsRNA LGBP.

**9.** Em estudos posteriores, pretende-se realizar a análise da expressão dos mesmos genes (LGBP, proPO, PEN 2, PEN 3, PEN 4, ALF e styticina) em camarões nativos *F. paulensis* infectados com a dose não-letal de esporos de *F. solani*, a fim de verificar o perfil de modulação desses genes em resposta a uma infecção branda.

**10.** Ampliar a análise de expressão de genes pertencentes a outras classes funcionais (além do sistema imune), que podem estar envolvidos com a defesa antifúngica em crustáceos. Tais análises já foram iniciadas em colaboração com o *Institut Français de Recherche pour l'exploitation de la Mer* (IFREMER, França), utilizando o mesmo material biológico (cDNAs) deste estudo, onde 68 genes foram analisados segundo a sua categoria funcional: (a) Proteínas/petídeos imunológicos; (b) Antioxidantes, Citocinas e moléculas de sinalização celular; (c) Homeostase e coagulação; e (d) Apoptose, Autofagia e estresse celular. Na fase atual, os dados de expressão estão sendo analisados e, possivelmente, novas informações sobre as respostas moleculares dos camarões frente a infecções por fungos serão fornecidas.

**11.** Realizar o silenciamento via RNAi de uma proteína de *L. vannamei* (receptor Toll ou ALF, por exemplo), cuja técnica esteja publicada, a fim de comprovar a eficiência da técnica de silenciamento empregada em nosso laboratório.

**12.** Avaliar o silenciamento gênico específico em um período anterior a 24 h e até 72 h, pelo menos, verificando a expressão da LGBP hemocitária em diferentes períodos, evitando o sacrifício dos animais. Além disso, pretende-se avaliar o efeito de concentrações maiores de dsRNA LGBP, até 7,5 µg/g, em um número maior de animais.

**13.** Verificar a ocorrência de um padrão diferenciado na expressão da LGBP em animais cultivados em ambientes potencialmente ricos em micro-organismos (fazenda de cultivo) e em ambientes com condições controladas (laboratório).

**14.** Analisar o padrão de expressão do gene codificante para a LGBP em camarões de tamanhos diferentes, a fim de verificar uma possível expressão diferencial da proteína segundo o estágio de desenvolvimento do animal.

## REFERÊNCIAS

Ai H.S., Liao J.X., Huang X.D., Yin Z.X., Weng S.P., Zhao Z.Y., Li S.D., Yu X.Q., He J.G. A novel prophenoloxidase 2 exists in shrimp hemocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, p. 59-68, 2009.

Aliyari R., Ding S.W. RNA-based viral immunity initiated by the Dicer family of host immune receptors. **Immunological Reviews**, v. 227, p. 176-188, 2009.

Alló M., Kornblihtt A.R. Gene silencing: small RNAs control RNA polymerase II elongation. **Current Biology**, v. 20, p. 704-707, 2010.

Amparyup P., Kondo H., Hirono I., Aoki T., Tassanakajon A. Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Molecular Immunology**, v. 45, p. 1085–1093, 2008.

Amparyup P., Charoensapsri W., Tassanakajon A. Two prophenoloxidases are important for the survival of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, p. 247–256, 2009.

Assavalapsakul W., Chinnirunvong W., Panyim S. Application of YHV-protease dsRNA for protection and therapeutic treatment against yellow head virus infection in *Litopenaeus vannamei*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 84,p. 167-171, 2009.

Bachère E., Gueguen Y., Gonzalez M., de Lorgeril J., Garnier J., Romestand B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 149-168, 2004.

Bartlett T.C., Cuthbertson B.J., Shepard E.F., Chapman R.W., Gross P.S., Warr G.W., Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial

peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. **Marine Biotechnology**, v. 4, p. 278-293, 2002.

Barracco M.A., Duvic B., Söderhäll K. The beta-1,3-glucan-binding protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, when reacted with a beta-1,3-glucan, induces spreading and degranulation of crayfish granular cells. **Cell and tissue research**, v. 266, p. 491-497, 1991.

Barracco M.A., de Lorgeril J., Gueguen Y., Bachère E. Molecular characterization of penaeidins from Atlantic Brazilian shrimp species, *Farfantepenaeus paulensis* and *Litopenaeus schmitti*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 250, p. 117–120, 2005.

Barracco M.A., Perazzolo L.M., Rosa R.D. Inmunología del camarón. In: Vielka M.Q., Cuéllar-Anjel J. **Guía técnica - Patología y Inmunología de camarones**. Panamá: Ed. CYTED, p. 169-224, 2008.

Bhuiyan N.H., Selvaraj G., Wei Y., King J. Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 509–521, 2008.

Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 238-250, 2005.

Bulet P., Stöcklin R., Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 169-184, 2004.

Burford M.A., Thompson P.J., McIntosh P.R., Bauman R.H., Pearson D.C. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zeroexchange system. **Aquaculture**, v. 232, p. 525–537, 2004.

Burge E.J., Madigan D.J., Burnett L.E., Burnett K.G. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus*

*vannamei*, after injection with *Vibrio*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 22, p. 327-339, 2007.

Carriel-Gomes M.C., Kratz J.M., Barracco M.A., Bachère E., Barardi C.R., Simões C.M. In vitro antiviral activity of antimicrobial peptides against herpes simplex virus 1, adenovirus, and rotavirus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 469-472, 2007.

Cerenius L., Liang Z., Duvic B., Keyser P., Hellmany U., Tapio-Palvall E., Iwanaga S., Söderhäll K. Structure and biological activity of a beta-1,3-D-glucan-binding protein in crustacean blood. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 29462-29467, 1994.

Cerenius L., Söderhäll K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 116-126, 2004.

Charoensapsri W., Amparyup P., Hirono I., Aoki T., Tassanakajon A. Gene silencing of a prophenoloxidase activating enzyme in the shrimp, *Penaeus monodon*, increases susceptibility to *Vibrio harveyi* infection. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, p. 811–820, 2009.

Charoensapsri W., Amparyup P., Hirono I., Aoki T., Tassanakajon A. PmPPAE2, a new class of crustacean prophenoloxidase (proPO)-activating enzyme and its role in PO activation. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, p. 115–124, 2011.

Chen J.Y., Pan C.Y., Kuo C.M. Molecular cloning and sequencing of shrimp (*Penaeus monodon*) penaeidin-5 cDNA. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 16, p. 665-670, 2004.

Chen Y.H., Jia X.T., Zhao L., Li C.Z., Zhang S., Chen Y.G., Weng S.P., He J.G. Identification and functional characterization of Dicer2 and five single VWC domain proteins of *Litopenaeus vannamei*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, p. 661-671, 2011.

Cheng W., Liu C.H., Tsai C.H., Chen J.C. Molecular cloning and characterization of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and b-1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 18, p. 297–310, 2005.

Chiou T.T., Wu J.L., Chen T.T., Lu J.K. Molecular cloning and characterization of cDNA of penaeidin-like antimicrobial peptide from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Marine Biotechnology**, v. 7, p. 119–127, 2005.

Castanotto D., Rossi J.J. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. **Nature**, v. 457, p. 426–33, 2009.

Cruz J., Nieva C., Mane-Padros D., Martin D., Belles X. Nuclear receptor BgFTZ-F1 regulates molting and the timing of ecdysteroid production during nymphal development in the hemimetabolous insect *Blattella germanica*. **Developmental Dynamics**, v. 237, p. 3179–3191, 2008.

Cuthbertson B.J., Shepard E.F., Chapman R.W., Gross P.S. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. **Immunogenetics**, v. 54, p. 442–445, 2002.

Cuthbertson B.J., Bullesbach E.E., Fievet J., Bachère E., Gross P.S. A new (penaeidin class 4) of antimicrobial peptides from the Atlantic white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) exhibits target specificity and an independent proline-rich-domain function. **Biochemical Journal**, v. 381, p. 79–86, 2004.

Dechklar M., Udomkit A., Panyim S. Characterization of Argonaute cDNA from *Penaeus monodon* and implication of its role in RNA interference. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 367, p. 768–774, 2008.

Dhar A.K., Dettori A., Roux M.M., Klimpel K.R., Read B. Identification of differentially expressed genes in shrimp (*Penaeus*

*stylirostris*) infected with white spot syndrome virus by cDNA microarrays. **Archives of Virology**, v. 148, p. 2381–2396, 2003.

de la Vega E., O’Leary N.A., Shockey J.E., Robalino J., Payne C., Browdy C.L., Warr G.W., Gross P.S. Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (LvALF): A broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection. **Molecular Immunology**, v. 45, p. 1916–1925, 2008.

de Lorgeril J., Saulnier D., Janech M.G., Gueguen Y., Bachère E. Identification of genes that are differentially expressed in hemocytes of the Pacific blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) surviving an infection with *Vibrio penaeicida*. **Physiological Genomics**, v. 21, p. 174-183, 2005.

de Lorgeril J., Gueguen Y., Goarant C., Goyard E., Mugnier C., Fievet J., Piquemal D., Bachère E. A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. **Molecular Immunology**, v. 45, p. 3438–3445, 2008.

Destoumieux D., Bulet P., Loew D., Van Doresselaer A., Rodriguez J., Bachère E. Penaeidins: a new family of antimicrobial peptides in the shrimp, *Penaeus vannamei* (Decapoda). **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 28398–28406, 1997.

Destoumieux D., Bulet P., Strub J.M., Van Dorsselaer A., Bachère E. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. **European Journal of Biochemistry**, v. 266, p. 335-346, 1999.

Destoumieux D., Muñoz M., Cosseau C., Rodriguez J., Bulet P., Comps M., Bachère E. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 461–469, 2000.

Du X.J., Zhao X.F., Wang J.X. Molecular cloning and characterization of a lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-glucan binding protein from fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*). **Molecular Immunology**, v. 44, p. 1085-1094, 2007.

Duvic B., Söderhäll K. Purification and characterization of a beta-1,3-glucan binding-protein from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 9327-9332, 1990.

Duvic B., Söderhäll K. Purification and partial characterization of a beta-1,3-glucan-binding-protein membrane receptor from blood cells of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 207, p. 223-228, 1992.

Duvic B., Söderhäll K. Beta-1,3-glucan-binding proteins from plasma of the fresh-water crayfishes *Astacus astacus* and *Procambarus clarkii*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 13, p. 403-408, 1993.

Fagutao F.F., Koyama T., Kaizu A., Saito-Taki T., Kondo H., Aoki T., Hirono I. Increased bacterial load in shrimp hemolymph in the absence of prophenoloxidase. **FEBS Journal**, v. 276, p. 5298–5306, 2009.

FAO – **Food and Agriculture Organization**. Fisheries and Aquaculture Department, Aquaculture Newsletter, 2007.

FAO – **Food and Agriculture Organization**. Fisheries and Aquaculture Department, Aquaculture Newsletter, 2008.

FAO – **Food and Agriculture Organization**. Fisheries and Aquaculture Department, Aquaculture Newsletter, 2010.

Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.

Gao H., Li F., Dong B., Zhang Q., Xiang J. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase (ProPO) cDNA from *Fenneropenaeus chinensis* and its transcription injected by *Vibrio anguillarum*. **Molecular Biology Reports**, v. 36, p. 1159–1166, 2008.

Garcia-Triana A., Zenteno-Savin T., Peregrino-Uriarte A.B., Yépez-Plascencia G. Hypoxia, reoxygenation and cytosolic manganese superoxide dismutase (cMnSOD) silencing in *Litopenaeus vannamei*: Effects on cMnSOD transcripts, superoxide dismutase activity and superoxide anion production capacity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, p. 1230–1235, 2010.

Garcia-Triana A., Gómez-Jiménez S., Peregrino-Uriarte A.B., López-Zavala A., González-Aguilar G., Sotelo-Mundo R.R., Valenzuela-Soto E.M., Yépez-Plascencia G. Expression and silencing of Selenoprotein M (SelM) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: effect on peroxidase activity and hydrogen peroxide concentration in gills and hepatopancreas. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 155, p. 200-204, 2010.

Golding M.C., Long C.R., Carmell M.A., Hannon G.J., Westhusin M.E. Suppression of prion protein in livestock by RNA interference. **PNAS**, v. 103, p. 5285–5290, 2006.

Goncalves P., Vernal J. Rosa R.D., Yépez-Plascencia G., Souza C.R.B., Barracco M.A., Perazzolo L.M.  **$\beta$ -1,3-glucan binding protein and its role in two Atlantic shrimp immune system.** Em preparação.

Gueguen Y., Garnier J., Robert L., Lefranc M.P., Mougenot I., de Lorgeril J., Janech M., Gross P.S., Warr G.W., Cuthbertson B., Barracco M.A., Bulet P., Aumelas A., Yang Y., Bo D., Xiang J., Tassanakajon A., Piquemal D., Bachère E. PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: sequence-based classification and recommended nomenclature. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 30, p. 283–288, 2006.

Guertler C. 2010. **Defesa antiviral em *Litopenaeus vannamei* contra o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), induzida via RNA**

**de interferência, e sua influência na expressão de alguns genes imunológicos.** Universidade Federal de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado em Aquicultura: p. 103.

Grishok A. RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. **FEBS Letters**, v. 579, p. 5932-5939, 2005.

Gross P.S., Bartlett T.C., Browdy C.L., Chapman R.W., Warr G.W., Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, p. 565-577, 2001.

Hannon G.J. RNA interference. **Nature**, v. 418, p. 244-251, 2002.

Hirono I., Fagutao F.F., Kondo H., Aoki T. Uncovering the mechanisms of shrimp innate immune response by RNA interference. **Marine Biotechnology**, v. 13, p. 622-628, 2010.

Ho S.H., Chao Y.C., Tsao H.W., Sakai M., Chou H.N., Song Y.L. Molecular cloning and recombinant expression of tiger shrimp *Penaeus monodon* penaeidin. **Fish Pathology**, v. 39, p. 15-23, 2004. 2011

Huvenne H., Smagghe G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, p. 227-235, 2010.

Iwanaga S. The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, p. 87-95, 2002.

James R., Thampuran N., Lalitha K.V., Rajan L.A., Joseph T.C. Differential gene expression profile of the hepatopancreas of white spot syndrome virus infected *Fenneropenaeus indicus* by suppression subtractive hybridization. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 29, p. 884-889, 2010.

Jimenez-Vega F., Sotelo-Mundo R.R., Ascencio F., Vargas-Albores F. Beta-1,3-D glucan binding protein (BGBP) from the white shrimp, *Penaeus vannamei*, is also a heparin binding protein. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 13, p. 171-181, 2002.

Jiravanichpaisal P., Lee B.L., Söderhäll K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**, v. 211, p. 213-236, 2006.

Johansson M.W., Söderhäll K. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 156, p. 175-181, 1985.

Johansson M.W., Söderhäll K. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. **Parasitology Today**, v. 5, p. 171-176, 1989.

Kamysz W., Okroj M., Lukasiak J. Novel properties of antimicrobial peptides. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, p. 461-469, 2003.

Kang C.J., Wang J.X., Zhao X.F., Yang X.M., Shao H.L., Xiang J.H. Molecular cloning and expression analysis of the *ch*-penaedin, an antimicrobial peptide from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 16, p. 513–525, 2004.

Kang C.J., Xue J.F., Liu N., Zhao X.F., Wang J.X. Characterization and expression of a new subfamily member of penaeidin antimicrobial peptides (penaeidin 5) from *Fenneropenaeus chinensis*. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 1546–1554, 2007.

Kautsky N., Ronnback P., Tedengren M., Troell M. Ecosystem perspectives of management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, v. 191, p. 145-161, 2000.

Kim C.S., Kosuke Z., Nam Y.K., Kim S.K., Kim K.H. Protection of shrimp (*Penaeus chinensis*) against white spot syndrome virus (WSSV) challenge by doublestranded RNA. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, p. 242-246, 2007.

Labreuche Y., Veloso A., de la Vega E., Gross P.S., Chapman R.W., Browdy C.L., Warr G.W. Non-specific activation of antiviral immunity and induction of RNA interference may engage the same pathway in the Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, p. 1209-1218, 2010.

Lai X., Kong J., Wang Q., Wang W., Meng X. Cloning and characterization of a  $\beta$ -1,3-glucan-binding protein from shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. **Molecular Biology Reports**, v. 38, p. 4527-35, 2011.

Lee S.Y., Wang R., Söderhäll K. A lipopolysaccharide- and  $\beta$ -1,3-glucan binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. Purification, characterization and cDNA cloning. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 1337-1343, 2000.

Lee Y.M., Choi Y.K., Min B.R. PCR-RFLP and Sequence Analysis of the rDNA ITS Region in the *Fusarium* spp. **The Journal of Microbiology**, v.38, p. 66-73, 2000.

Lee, S.Y.; Söderhäll, K. Early events in crustacean innate immunity. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 12, p. 421-437, 2002.

Leu J.H., Chang C.C., Wu J.L., Hsu C.W., Hirono I., Aoki T., Juan H.F., Lo C.F., Kou G.H., Huang H.C. Comparative analysis of differentially expressed genes in normal and white spot syndrome virus infected *Penaeus monodon*. **BMC Genomics**. v. 8, p. 120-133, 2007.

Li L., Wang J.X., Zhao X.F., Kang C.J., Liu N., Xiang J.H., Li F.H., Sueda S., Kondo H. High level expression, purification, and characterization of the shrimp antimicrobial peptide, Ch-penaeidin, in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 39, p. 144-151, 2005.

Lightner D.V. Handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. **World Aquaculture Society**, Baton Rouge, Louisiana, USA, 1996.

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

Liu J., Carmell, M.A., Rivas F.V., Marsden C.G., Thomson J.M., Song J-J., Hammond S.M., Joshua-Tor L., Hannon G.J. Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. **Science**, v. 305, p. 1437-1441, 2004.

Liu C.H., Cheng W., Chen J.C. The peroxinectin of white shrimp *Litopenaeus vannamei* is synthesised in the semi-granular and granular cells, and its transcription is up-regulated with *Vibrio alginolyticus* infection. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 18, p. 431-444, 2005.

Liu H., Jiravanichpaisal P., Soderhall I., Cerenius L., Soderhall K. Antilipopolysaccharide factor interferes with white spot syndrome virus replication *in vitro* and *in vivo* in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Journal of Virology**, v. 80, p. 80:10365–10371, 2006.

Liu Y.C., Li F.H., Wang B., Dong B., Zhang Q.L., Luan W., Zhang X-J., Xiang J-H. A transglutaminase from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*), full-length cDNA cloning, tissue localization and expression profile after challenge. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 22, p. 576–588, 2007a.

Liu C.H., Tseng M.C., Cheng W. Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its expression following *Vibrio alginolyticus* infection. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, p. 34–45, 2007b.

Liu H., Jiravanichpaisal P., Cerenius L., Lee B.L., Söderhäll I., Söderhäll K. Phenoloxidase is an important component of the defense against *Aeromonas hydrophila* infection in a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 33593–33598, 2007c.

Liu H., Söderhäll K., Jiravanichpaisal P. Antiviral immunity in crustaceans. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 27, p. 79-88, 2009.

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, p. 402-408, 2001.

Loker E.S., Adema C.M., Zhang S.M., Kepler T.B. Invertebrate immune systems--not homogeneous, not simple, not well understood. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 10-24, 2004.

Maningas M.B.B., Kondo H., Hirono I., Saito-Taki T., Aoki T. Essential function of transglutaminase and clotting protein in shrimp immunity. **Molecular Immunology**, v. 45, p. 1269–1275, 2008.

Mcgregor A.P., Pechmann M., Schwager E.E., Feitosa N.M., Kruck S., Aranda M., Damen W.G. Wnt8 is required for growth-zone establishment and development of opisthosomal segments in a spider. **Current Biology**, v. 18, p. 1619–1623, 2008.

Mejía-Ruíz C.H., Vega-Peña S., Alvarez-Ruiz P., Escobedo-Bonilla C.M. Double-stranded RNA against white spot syndrome virus (WSSV) vp28 or vp26 reduced susceptibility of *Litopenaeus vannamei* to WSSV, and survivors exhibited decreased susceptibility in subsequent re-infections. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.107, p. 65-68, 2011.

Moazed D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. **Nature**, v. 457, p. 413-420, 2009.

Morales Covarrubias, M. S. **Enfermedades del camarón: detección mediante análisis em fresco e histopatología**. México: Trillas, 2004. 122 p.

Mori C., Takunami T., Higashitani A. Maintenance of mitochondrial DNA by the *Caenorhabditis elegans* ATR checkpoint protein ATL-1. **Genetics**, v. 180, p. 681–686, 2008.

Muñoz M., Vandenbulcke F., Garnier J., Gueguen Y., Bulet P., Saulnier D., Bachère, E. Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic vibrio. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 961–972, 2004.

Nagoshi H., Inagawa H., Morii K., Harada H., Kohchi C., Nishizawa T., Taniguchi Y., Uenobe M., Honda T., Kondoh M., Takahashi Y., Soma G. Cloning and characterization of a LPS-regulatory gene having an LPS binding domain in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. **Molecular Immunology**, v. 43, p. 2061-2069, 2006.

Nappi A.J., Vass E. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune-reactions. **Pigment Cell Research**, v. 6, p. 117-126, 1993.

Nappi A.J., Ottaviani E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. **Bioassays**, v. 22, p. 469-480, 2000.

Nunes A.J.P., Martins P.C.C., Gesteira T.C.V. Carcinicultura ameaçada: Produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do Vírus da Mionecrose Infecçiosa (IMNV). **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 14, p. 37-51, 2004.

OIE – World organisation for animal health. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2009**. Disponível em: <[http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A\\_summry.htm](http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_summry.htm)>. Acesso em: março de 2011.

Okumura T. Effects of lipopolysaccharide on gene expression of antimicrobial peptides (penaeidins and crustin), serine proteinase and prophenoloxidase in haemocytes of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 22, p. 68–76, 2007.

Nunes A.J.P., Martins P.C., Gesteira T.C. Carcinicultura ameaçada. Produtores sofrem com mortalidade decorrentes do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV). **Panorama da Aqüicultura**, v. 83, p. 37-51, 2004.

Nunes A.J.P., Madrid R.M., Andrade T.P. Carcinicultura Marinha no Brasil: passado, presente e futuro. **Panorama da Aqüicultura**, v. 21, p. 26-33, 2011.

Palakodeti D., Smielewska M., Lu Y.C., Yeo G.W., Graveley B.R. The PIWI proteins SMEDWI-2 and SMEDWI-3 are required for stem cell function and piRNA expression in planarians. **RNA**, v. 14, p. 1174–1186, 2008.

Pantoja C.R., Lightner D.V. Enfermedades causadas por hongos. In: Vielka M.Q., Cuéllar-Anjel J. **Guía técnica - Patología y Inmunología de camarones**, Ed. CYTED, Panamá, 2008. p. 159-168.

Perazzolo L.M., Bachère E., Rosa R.D., Goncalves P., Andreatta E.R., Daffre S., Barracco M.A. Alpha2-macroglobulin from an Atlantic shrimp: biochemical characterization, sub-cellular localization and gene expression upon fungal challenge. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 31, p. 938-943, 2011.

Perazzolo L.M., Rosa R.D., Barracco M.A. Defesas antivirais em crustáceos: Estado da Arte. In: Silva-Souza A.T. **Mecanismos de defesa em animais aquáticos**, Maringá, PR: Abrapoa, in press.

Perez-Farfante I., Kensley B. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world: Keys and diagnoses for the families and genera. **Memories du Museum National D'Historie Naturelle**, v. 175, p. 1-233, 1997.

Ponprateep S., Tharntada S., Somboonwiwat K., Tassanakajon A. Gene silencing reveals a crucial role for anti-lipopolysaccharide factors from *Penaeus monodon* in the protection against microbial infections. **Fish and Shellfish Immunology** (2011), doi:10.1016/j.fsi.2011.10.010

Raikhel N.V., Lee H-I., Broekaert W.F. Structure and functions of chitin-binding proteins. **Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, v. 44, p. 591–615, 1993.

Reddy K.V., Yedery R.D., Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 536-547, 2004.

Rijiravanich A., Browdy C.L., Withyachumnarnkul B. Knocking down caspase-3 by RNAi reduces mortality in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* challenged with a low dose of white-spot syndrome virus. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 24, p. 308-313, 2008.

Robalino J., Bartlett T., Shepard E., Prior S., Jaramillo G., Scura E., Chapman R.W., Gross P.S., Browdy C.L., Warr G.W. Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? **Journal of Virology**, v. 79, p. 13561-13571, 2005.

Robalino J., Almeida J.S., McKillen D., Colglazier J., Trent H.F.III, Chen Y.A., Peck M.E.T., Browdy C.L., Chapman R.W., Warr G.W., Gross P.S. Insights into the immune transcriptome of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: tissue-specific expression profiles and transcriptomic responses to immune challenge. **Physiological Genomics**, v. 29, p. 44-56, 2007.

Rojtinnakorn J., Hirono I., Itami T., Takahashi Y., Aoki T. Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 13, p. 69–83, 2002.

Rolland J.L., Abdelouahab M., Dupont J., Lefevre F., Bachère E., Romestand B. Stylicins, a new family of antimicrobial peptides from the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. **Molecular Immunology**, v. 47, p. 1269-1277, 2010.

Romo-Figueroa M.G., Vargas-Requena C., Sotelo-Mundo R.R., Vargas-Albores F., Higuera-Ciapara I., Söderhäll K., Yépez-Plascencia G. Molecular cloning of a beta-glucan pattern-recognition lipoprotein from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: correlations between

the deduced amino acid sequence and the native protein structure. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, p. 713-726, 2004.

Rosa R.D., Bandeira P.T., Barracco M.A. Molecular cloning of crustins from the hemocytes of Brazilian penaeid shrimps. **FEMS Microbiology Letters**, v. 274, p. 287-290, 2007.

Rosa R.D., Barracco M.A. Antimicrobial peptides in crustaceans. **Invertebrate Survival Journal**, v. 7, p. 262-284, 2010.

Roux M.M., Pain A., Klimper K.R., Dhar A.Y. The lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). **Journal of Virology**, v. 76, p. 7140-7149, 2002.

Ruiz-Verdugo L.M., García-Bañuelos M., Vargas-Albores F., Higuera-Parra I., Yépez-Plascencia G.M. Amino acids and lipids of the plasma HDL from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 118, p. 91-96, 1997.

Sappl P.G., Carroll A.J., Clifton R., Lister R., Whelan J., Harvey Millar A., Singh K. The Arabidopsis glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. **The Plant Journal**, v. 58, p. 53-68, 2008.

Sarathi M., Simon M.C., Venkatesan C., Hameed A.S. Oral administration of bacterially expressed VP28dsRNA to protect *Penaeus monodon* from white spot syndrome virus. **Marine Biotechnology**, v. 10, p. 242-249, 2008.

Sellos D., Lemoine S., Van Wormhoudt A. Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): structure, evolution and physiological aspects. **FEBS Letters**, v. 407, p. 153-158, 1997.

Sequeira T., Tavares D., Arala-Chaves M. Evidence for circulating hemocyte proliferation in the shrimp *Penaeus japonicus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 20, p. 97–104, 1996.

Shanthy S., Vaseeharan B. cDNA cloning, characterization and expression analysis of a novel antimicrobial peptide gene penaeidin-3 (Fi-Pen3) from the haemocytes of Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. **Microbiology Research**, in press.

Shockey J.E., O'Leary N.A., de la Vega E., Browdy C.L., Baatz J.E., Gross P.S. The role of crustins in *Litopenaeus vannamei* in response to infection with shrimp pathogens: An in vivo approach. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, p. 668-673, 2009.

Smith V.J., Söderhäll K. Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. **Cell and Tissue Research**, v. 233, p. 295-303, 1983.

Söderhäll K., Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, p. 23-28, 1998.

Somboonwiwat K., Marcos M., Tassanakajon A., Klinbunga S., Aumelas A., Romestand B., Gueguen Y., Boze H., Moulin G., Bachère E. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 29, p. 841-851, 2005.

Somboonwiwat K., Bachère E., Rimphanitchayakit V., Tassanakajon A. Localization of anti-lipopolysaccharide factor (ALFPm3) in tissues of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and characterization of its binding properties. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, p. 1170-1176, 2008.

Sritunyalucksana K., Lee S.Y., Söderhäll K. A beta-1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 26, p. 237-245, 2002.

Su J., Oanh D.T.H., Lyons R.E., Leeton L., van Hulten M.C.W., Tan S., Song L., Rajendran K.V., Walker P.J. A key gene of the RNA interference pathway in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*: Identification and functional characterisation of Dicer-1. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 24, p. 223-233, 2008.

Supungul P., Klinbunga S., Pichyangkura R., Jitrapakdee S., Hirono I., Aoki T., Tassanakajon A. Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Marine Biotechnology**, v. 4, p. 487–494, 2002.

Supungul P., Klinbunga S., Pichyangkura R., Hirono I., Aoki T., Tassanakajon A. Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 61, p. 123-135, 2004.

Tassanakajon A., Amparyup P., Somboonwiwat K., Supungul P. Cationic Antimicrobial Peptides in Penaeid Shrimp. **Marine Biotechnology**, v. 13, p. 639-657, 2010.

Tharntada S., Ponprateep S., Somboonwiwat K., Liu H., Söderhäll I., Söderhäll K., Tassanakajon A. Role of antilipopolsaccharide factor from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, in protection from white spot syndrome virus infection. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 1491–1498, 2009.

Thörnqvist P.O., Johansson M.W., Söderhäll K. Opsonic activity of cell adhesion proteins and  $\beta$ -1,3-glucan-binding proteins from two crustaceans. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 18, p. 3-12, 1994.

Tirasophon W., Roshorm Y., Panyim S. Silencing of yellow head virus replication in penaeid shrimp cells by dsRNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 334, p. 102–107, 2005.

Unajak S., Boonsaeng V., Jitrapakdee S. Isolation and characterization of cDNA encoding Argonaute, a component of RNA silencing in shrimp (*Penaeus monodon*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 145, p. 179-187, 2006.

Vargas-Albores F., Jimenez-Vega F., Söderhäll K. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) which enhances the activation of prophenoloxidase system by  $\beta$ -1,3-glucan. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 20, p. 299-306, 1996.

Vargas-Albores F., Jimenez-Vega F., Yépez-Plascencia G. Purification and comparison of beta-1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 116B, p. 453-458, 1997.

Vargas-Albores F., Yépez-Plascencia G. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. **Aquaculture**, v. 191, p. 13-21, 2000.

Xu J., Han F., Zhang X. Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. **Antiviral Research**, v. 73, p. 126-131, 2007.

Wang Y.C., Chang P.S., Chen H.Y. Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, p. 1161-1177, 2007.

Wang B., Li F., Luan W., Xie Y., Zhang C., Luo Z., Gui L., Yan H., Xiang J. Comparison of gene expression profiles of *Fenneropenaeus chinensis* challenged with WSSV and *Vibrio*. **Marine Biotechnology**, v. 10, p. 664-75, 2008.

Wang K.C.H-C., Tseng C-W., Lin H-Y., Chen I-T., Chen Y-H., Chen Y-M., Chen T-Y., Yang H-L. RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (LvToll) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, p. 49–58, 2010.

Yang C., Zhang J., Li F., Ma H., Zhang Q., Jose Priya T.A., Zhang X., Xiang J. A Toll receptor from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to *Vibrio anguillarum* infection. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 24, p. 564–574, 2008.

Yao X., Wang L., Song L., Zhang H., Dong C., Zhang Y., Qiu L., Shi Y., Zhao J., Bi Y. A Dicer-1 gene from white shrimp *Litopenaeus vannamei*: expression pattern in the processes of immune response and larval development. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 29, p. 565–70, 2010.

Yeh S., Chen Y., Hsieh S., Cheng W., Liu C. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 26, p. 582–588, 2009.

Yépiz-Plascencia G., Vargas-Albores F., Jimenez-Vega F. Shrimp plasma HDL and beta-glucan binding protein (BGBP): comparison of biochemical characteristics. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 309–314, 1998.

Yépiz-Plascencia G., Galván T.G., Vargas-Albores F., García-Bañuelos M. Synthesis of hemolymph high-density lipoprotein  $\beta$ -glucan binding protein by *Penaeus vannamei* shrimp hepatopancreas. **Marine Biotechnology**, v. 2, p. 485–492, 2000.

Yodmuang S., Tirasophon W., Roshorm Y., Chinnirunvong W., Panyim S. YHV-protease dsRNA inhibits YHV replication in *Penaeus monodon* and prevents mortality. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 341, p. 351–356, 2006.

Yount N.Y., Bayer A.S., Xiong Y.Q., Yeaman M.R. Advances in antimicrobial peptide immunobiology. **Biopolymers**, v. 84, p. 435-458, 2006.