

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ISABEL CRISTINA MÜLLER

GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM CAMARÕES
DE CULTIVO *Litopenaeus vannamei* INFECTADOS PELO VÍRUS
DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA E GENOTIPAGEM DE
ISOLADOS GEOGRÁFICOS BRASILEIROS DO VÍRUS

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA RISOLETA FREIRE MARQUES

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutora em Biotecnologia

FLORIANÓPOLIS, OUTUBRO DE 2009.

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

M958g Müller, Isabel Cristina
Genes diferencialmente expressos em camarões de cultivo
Litopennaeus vannamei infectados pelo vírus da Síndrome
da Mancha Branca e genotipagem de isolados geográficos
brasileiros do vírus [tese] / Isabel Cristina Müller
; orientadora, Maria Risoleta Freire Marques. -
Florianópolis, SC, 2009.
150 f.: il., graf., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia.

Inclui referências

1. Biotecnologia. 2. Camarão. 3. Vírus da síndrome
da mancha branca. 4. Vírus. 5. Genotipagem. 6. PCR em Tempo
Real. 7. SSH. I. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. II. Título.

CDU 577.23

“Genes diferencialmente expressos em camarões de cultivo *Litopenaeus vannamei* infectados pelo vírus da Síndrome da Mancha Branca e genotipagem de isolados geográficos brasileiros do vírus”

POR
ISABEL CRISTINA MÜLLER

Tese julgada e aprovada em sua forma final, pelo
Orientador e membros da Comissão Examinadora

Orientador:

Prof. Dr. Maria Risoleta Freire Marques
BQA/CCB/UFSC

Comissão examinadora:

Prof. Dr. Luis Alberto Romano
Universidade Federal de Rio Grande

Prof. Dr. Alitiane Moura Lemos Pereira
Embrapa

Prof. Dr. Walter Quadros Seiffert
AQI/CCA/UFSC

Prof. Dr. Hernán Francisco Terenzi
BQA/CCB/UFSC

Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard – MIP/CCB/UFSC
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC

Florianópolis, Outubro de 2009.

Sumário	
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABELAS	VII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
INTRODUÇÃO	1
1. Cultivo de camarões	1
2. Doenças de camarões peneídeos.....	3
3. O Vírus da Síndrome da Mancha Branca – WSSV	6
4. Sistema imune de crustáceos	10
5. Diagnóstico	11
6. PCR em Tempo Real.....	12
7. Hibridização supressiva subtrativa (SSH)	17
8. Isolados geográficos.....	20
CAPÍTULO 1	
Padronização da metodologia de PCR em Tempo Real para a detecção do WSSV	23
INTRODUÇÃO.....	24
OBJETIVO GERAL.....	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
MATERIAL E MÉTODOS	29
1 – Coleta de amostras.....	29
2 - Extração de DNA.....	29
3 – Quantificação e determinação da integridade do DNA	30
4 - Padronização da metodologia de Nested PCR para a detecção de WSSV	31
5 – PCR para a detecção de IHHNV	31
6 – Clonagem	33
7 – Confirmação da presença do fragmento	34
8 – Extração do plasmídeo para sequenciamento	34
9 – Sequenciamento e análise das seqüências	34
10 – Padronização da PCR em Tempo Real para detecção do WSSV.....	35
RESULTADOS	38
1 – Nested PCR para a detecção do WSSV e PCR para detecção do IHHNV	38
2 – Clonagem e seqüenciamento.....	40
3 – Padronização da metodologia de RT - PCR	44
DISCUSSÃO.....	49
CAPÍTULO 2	
Genotipagem de isolados geográficos de WSSV do Brasil e comparação com outros isolados da América	55
INTRODUÇÃO.....	56
OBJETIVO GERAL.....	59

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
MATERIAL E MÉTODOS	60
1 - Coleta dos animais	60
2 - Desafio com WSSV	61
3 - Extração de DNA	61
4 - PCR Nested para a detecção do WSSV	61
5 - Análise das VNTRs	64
6 - Análise da região variável ORF 23/24	64
7 - Amplificação da seqüência de uma transposase	64
8 - Determinação do numero de repetições	64
9 - Seqüenciamento dos produtos de PCR e análise das seqüências	64
10 - Comparação com amostras de outros países na América	64
RESULTADOS	64
1 - ORF 94	64
2 - ORF 125	65
3 - ORF 75	71
4 - Região variável ORF 23/24	72
5 - Transposase	72
DISCUSSÃO	74
CAPÍTULO 3	
Genes diferencialmente expressos em camarões de cultivo <i>Litopenaeus vannamei</i>	79
INTRODUÇÃO	80
OBJETIVO GERAL	83
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	83
MATERIAL E MÉTODOS	84
1 – Coleta de amostras	84
2 - Coleta de hemolinfa, brânquias e pleópodes	84
3 – Extração de RNA total	84
4 – Quantificação e determinação da integridade do RNA	85
5 – Extração de mRNA	85
6 – Subtração de cDNA (SSH)	86
7 - Clonagem	88
8 – Confirmação da presença do fragmento	89
9 - Extração do plasmídeo para sequenciamento	89
10 – Seqüenciamento e análise das seqüências	90
11 – PCR em Tempo Real para confirmação da expressão diferencial	91
12 – Análise Estatística	94

RESULTADOS	94
1 - Integridade do RNA total	94
2 – Subtração de cDNA	95
3 – PCR em Tempo Real.....	107
DISCUSSÃO.....	112
CONCLUSÕES.....	130
BIBLIOGRAFIA.....	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> .	2
Figura 2: Ilustração do conceito de interação hospedeiro, patógeno e ambiente. A) Quando o tamanho de um dos componentes é aumentado, a severidade da doença aumenta. B) Efeito de um patógeno altamente virulento. C) Efeito de um patógeno pouco virulento. D) Exclusão do patógeno. Fonte: Lightner e Redman, 1998.	5
Figura 3: Micrografias eletrônicas de vírus. As setas indicam o apêndice na forma de flagelo. Fonte: Escobedo-Bonilla et al., 2008.	7
Figura 4: Manchas brancas na carapaça de um camarão infectado com WSSV. Fonte: Lightner, 1996.	9
Figura 5: Esquema indicando o Cycle Threshold (Ct). Fonte: http://www.rt-pcr.com/ .	14
Figura 6: Uso do SYBR Green I para detectar produtos em PCR em Tempo Real. O SYBR Green I apresenta um aumento de fluorescência quando se liga ao DNA dupla-fita. Fonte: SUDGEN; WINTER, 2008.	16
Figura 7: Ilustração da detecção de dímeros de iniciadores utilizando a curva de dissociação. No exemplo existem picos a ~75.5 °C e ~79.5 °C. Fonte: SUDGEN e WINTER, 2008.	17
Figura 8: Esquema das etapas principais da SSH. Fonte: WINSTANLEY, 2008.	19
Figura 9: Gel de agarose 2% de produtos de PCR obtidos da amplificação do DNA genômico de pleópodes de <i>L. vannamei</i> . A-F: Amostras de campo. POS: controle positivo da reação. Marcador de peso molecular 1 kb.	39
Figura 10: Gel de agarose 2% de produtos de PCR obtidos da amplificação do DNA genômico de pleópodes de <i>L. vannamei</i> . A-H: Amostras de campo. POS: controle positivo da reação. M: marcador de peso molecular.	39
Figura 11: Seqüência do fragmento de 1025 pb.	40
Figura 12: Alinhamento do fragmento de 1025 pb com a seqüência genômica do WSSV.	41
Figura 13: Seqüência do fragmento de 942 pb.	41
Figura 14: Alinhamento do fragmento de 942 pb (WSSV) com a seqüência genômica do WSSV.	42

Figura 15: Seqüência do fragmento de 510 pb.	43
Figura 16: Alinhamento do fragmento de 510 pb com parte do genoma do IHHNV.	43
Figura 17: Curva de dissociação de amostras de pleópodes de camarão.	48
Figura 18: Representação esquemática da ORF 23/24 no WSSV-TH, WSSV-CN e WSSV-TW (MARKS et al., 2004).	57
Figura 19: Representação esquemática de um gene com repetições em tandem. Fonte: http://www-nmr.cabm.rutgers.edu/photogallery/proteins/gif/BRCT-fam.jpg .	58
Figura 20: Produtos de PCR da ORF 94. M) Marcador de 1 kb, 1) Brasil - Santa Catarina, 2008; 2) Brasil - Santa Catarina, 2007, 3) Brasil - Santa Catarina, 2005, 4) Brasil - Bahia, 5) Panamá, 6) Honduras, 7) EUA - Texas, 8) EUA - Carolina do Sul, 9) México, 10) EUA - Havaí, 11) Nicarágua.	66
Figura 21: Produtos de PCR da ORF 125. M) Marcador de 1 kb, 1) Brasil - Santa Catarina, 2008; 2) Brasil - Santa Catarina, 2007, 3) Brasil - Santa Catarina, 2005, 4) Brasil - Bahia, 5) Panamá, 6) Honduras, 7) EUA-Texas, 8) EUA - Carolina do Sul, 9) México, 10) Nicarágua, 11) EUA - Havaí.	67
Figura 22: Produtos de PCR da ORF 75. M) Marcador de 1 kb, 1) EUA - Havaí, 2) Brasil - Santa Catarina, 2008; 3) Brasil - Santa Catarina, 2007, 4) Brasil - Santa Catarina, 2005, 5) Brasil - Bahia, 6) Panamá, 7) Honduras, 8) EUA - Texas, 9) México, 10) Nicarágua.	71
Figura 23: Produtos de PCR para a ORF 23/24. 1) Brasil - Santa Catarina, 2008; 2) Brasil - Santa Catarina, 2007, 3) Brasil - Santa Catarina, 2005, 4) Brasil - Bahia, M) Marcador de 1 kb.	72
Figura 24: Produtos de PCR para a transposase. 1) Brasil - Santa Catarina, 2008; 2) Brasil - Santa Catarina, 2007, 3) Brasil - Santa Catarina, 2005, 4) Brasil - Bahia, M) Marcador de 1 kb.	73
Figura 25: Gel de agarose 1% de RNA total de <i>L. vannamei</i> . A e B: brânquias. C e D: hemolinfa.	94
Figura 26: Gel de agarose 1% de DNA plasmidial de clones obtidos na subtração. A-E: clones da Biblioteca 1; F-J: clones da Biblioteca 2.	95
Figura 27: Genes identificados na Biblioteca 1, classificados de acordo com sua função.	105

- Figura 28: Genes identificados na Biblioteca 2, classificados de acordo com sua função. 106
- Figura 29: Perfis das curvas de dissociação dos genes constitutivos. A) RNA 18S. B) Ciclofilina. 109
- Figura 30: Perfis das curvas de dissociação dos genes constitutivos. A) Ubiquitina. B) Receptor para proteína quinase. C) Proteína calcificada de cutícula. D) Oncoproteína nm23. 110
- Figura 31: Expressão relativa nos animais positivos e negativos para WSSV. Dados mostrados como média \pm desvio padrão. * representa diferença significativa conforme o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com $p < 0,05$. 111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Localização das fazendas e número de indivíduos positivos para WSSV.	38
Tabela 2: Coeficiente de correlação (R^2), inclinação da reta (M), fator de amplificação e eficiência da reação da curva de concentração de WSSV.	44
Tabela 3: Comparação dos Cts das amostras purificadas através do Protocolo 1 e do Protocolo 2.	45
Tabela 4: Quantificação das amostras de pleópodes de <i>L. vannamei</i> através de RT-PCR.	46
Tabela 5: Quantificação das amostras de pleópodes de <i>L. vannamei</i> através de RT-PCR.	47
Tabela 6: Diferentes classificações de carga viral baseadas na quantificação por PCR ou RT-PCR.	52
Tabela 7: Origem e data de coleta das amostras de <i>L. vannamei</i> infectadas com WSSV utilizadas neste estudo.	60
Tabela 8: Condições de PCR.	63
Tabela 9: Número de repetições encontrados para a ORF 94, 125 e 75 em camarões infectados com WSSV do Brasil e de outros países da América.	68
Tabela 10: Número e posição das unidades de repetição (URs) localizadas na ORF 75.	69
Tabela 11: Genótipo de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) na posição 48 de cada unidade de repetição (UR) na ORF 94.	70
Tabela 12: Iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR.	93
Tabela 13: Genes encontrados na Biblioteca 1, divididos em categorias de acordo com a sua função.	97
Tabela 14: Genes encontrados na Biblioteca 2, divididos em categorias de acordo com a sua função.	102
Tabela 15: Coeficiente de correlação (R^2), inclinação da reta (M), fator de amplificação e eficiência da reação da curva de dissociação dos iniciadores utilizados.	107
Tabela 16: Variação da expressão gênica nos camarões infectados, em relação aos animais	

não-infectados. Em negrito, as expressões relativas com significância estatística.

RESUMO

O vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) é uma doença que afeta várias espécies de crustáceos, causando grandes mortalidades e perdas econômicas em regiões produtoras de camarão. Este trabalho teve como objetivo padronizar a metodologia de PCR em Tempo Real para a detecção do WSSV, genotipar isolados geográficos do vírus e isolar genes diferencialmente expressos em camarões de cultivo infectados com WSSV. Amostras positivas e negativas por PCR *nested* foram analisadas através de PCR em Tempo Real. A carga viral das amostras foi determinada e algumas amostras negativas por PCR *nested* foram positivas por PCR em Tempo Real, com baixa carga viral. Vírus isolados de camarões coletados em Santa Catarina e na Bahia foram comparados quanto ao padrão de três minissatélites, à presença de uma grande deleção e uma transposase. Todas as amostras de Santa Catarina tiveram o mesmo padrão para os minissatélites analisados. As amostras da Bahia apresentaram um padrão diferente para os *loci* analisados, indicando que existem dois genótipos de WSSV diferentes no Brasil. Os isolados brasileiros tem uma deleção de 10,780 bp na ORF 23/24 e não possuem a seqüência da transposase. O padrão de repetições para os três minissatélites analisados foi diferente entre os isolados brasileiros e de outros países da América. Entretanto, ao analisar apenas a ORF 94, Santa Catarina, México, Nicarágua, Honduras e Panamá têm mais de nove repetições, enquanto a Bahia e os EUA têm menos de nove repetições. Esta similaridade pode estar relacionada a uma similaridade em virulência. Aparentemente, os WSSVs encontrados na Bahia e em Santa Catarina originaram-se de diferentes fontes de contaminação ou o vírus sofreu mutações ao longo do tempo. mRNA foi extraído das brânquias de camarões infectados e não-infectados com o WSSV, reversamente transcrito e uma hibridização subtrativa (SSH) foi realizada. A Biblioteca 1 (genes induzidos) tem 300 clones dos quais foram formados 36 *contigs* e 36 *singlets*. Destas seqüências, 69 (88,4%) são similares a seqüências no GeneBank. Na Biblioteca 2 (genes reprimidos), de 403 clones, foram formados 23 *contigs* e 36 *singlets* e 40 (75,5%) são similares a seqüências conhecidas. Estes genes foram organizados em grupos, de acordo com a sua função. Dentre os genes induzidos há genes envolvidos na síntese de ATP, citoesqueleto, adesão celular, metabolismo e transporte de moléculas. Dentre os genes reprimidos, há genes envolvidos na defesa contra bactérias, transdução de sinal e biossíntese de ácidos nucléicos. A infecção pelo WSSV parece alterar várias rotas metabólicas diferentes.

ABSTRACT

White Spot Syndrome Virus (WSSV) is a disease that affects several species of crustaceans, causing high mortality rates, which has been causing great economical losses in shrimp farming regions. The aims of this study were to standardize the Real Time PCR methodology for WSSV detection, to genotype geographical isolates of the virus and to isolate differentially expressed genes in farmed shrimps infected with WSSV. Samples positives and negatives by nested PCR were analyzed by Real Time PCR. The viral load of the samples was determined and some samples negative by nested PCR were positive by Real Time PCR, with low viral load. The pattern of three minisatellite regions, the presence of a deletion and a transposase were compared in virus isolated from shrimp collected in Santa Catarina and Bahia. All Santa Catarina samples had the same pattern for the minisatellites analyzed. Bahia samples showed a different pattern for the loci, indicating that there are two different WSSV genotypes in Brazil. Brazilian isolates have a 10,780 bp deletion in ORF 23/24 and do not have a transposase sequence. The repeat number pattern for the three minisatellite analyzed was different between the Brazilian isolates and isolates from America's countries. However, when analyzing only ORF 94, South Brazil, Mexico, Nicaragua, Honduras and Panama have all more than nine repeats, while Northeast Brazil and USA samples have less than nine repeats. This similarity of repeats could be related to a similarity in virulence. Our results show that WSSV found in Bahia and Santa Catarina States have originated from different sources of contamination or the virus have undergone mutations during time. mRNA was extracted from gills of shrimps infected and non-infected with WSSV, reverse transcribed and a suppression subtractive hybridization (SSH) was performed. Library 1 (induced genes) has 300 clones, which formed 36 contigs and 36 singlets. Of these sequences, 69 (88,4%) are similar to sequences in GeneBank. Library 2 (repressed genes), has 403 clones, which formed 23 contigs and 36 singlets, and 40 sequences (75,5%) are similar to known sequences. These genes were organized in groups, according to their functions. Among the induced genes there are genes involved in ATP synthesis, cytoskeleton, cell adhesion, metabolism and molecule transport. Among the repressed genes, there are genes involved in antibacterial defence, signal transduction and nucleic acids biosynthesis. WSSV infection seems to alter several metabolic routes.

INTRODUÇÃO

1. Cultivo de camarões

Segundo Subasinghe (2005), a aqüicultura é o setor produtor de alimentos que mais cresce no mundo e cerca de 90% desta produção vem de países em desenvolvimento.

A atividade da aqüicultura estuarina ou maricultura vem demonstrando ser a única alternativa viável, do ponto de vista socioeconômico, para a manutenção das comunidades de pescadores artesanais e rurais adjacentes, evitando-se o êxodo dessas populações para os centros urbanos. (ROCHA; ROCHA; FREITAS, 1998).

No agronegócio aqüicultura, o cultivo de camarão é um dos segmentos que apresenta importância socioeconômica para muitos países (MACIEL, 2002). Este segmento vem expandindo-se de forma bastante acelerada em diversos países litorâneos do Ocidente e Oriente (SEIFFERT, 2004). Na última década, os camarões cultivados representaram cerca de 30% do total de camarões comercializados mundialmente (BACHÈRE, 2000).

Segundo registros da FAO (2007), a produção mundial de camarões foi de 2.733.134 toneladas em 2005. A Ásia contribuiu com 81% da produção mundial segundo registros da FAO (2007), destacando-se a Tailândia, Indonésia, China, Índia, Vietnã, Bangladesh e Filipinas. Na América, a produção de camarões em 2005 foi de 309.198 toneladas. O Equador liderou a produção, contribuindo com cerca de 42% do camarão cultivado. O Brasil, em 2005, produziu 65.000 toneladas de camarão cultivado.

De acordo com a Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC), a

década de 70 representou o marco na tentativa de produção de camarão marinho em cativeiro. Na década de 80, iniciou-se a atividade empresarial com a espécie exótica *Penaeus japonicus*, a qual, no entanto, não apresentou os resultados esperados. Como alternativa, os produtores tentaram o cultivo de outras espécies, inclusive espécies nativas, tais como o *Farfantepenaeus paulensis* e o *Litopenaeus schmitti*. Estas espécies apresentavam baixa produtividade, o que inviabilizou o cultivo das mesmas. Em 1993, a introdução do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Figura 1), revolucionou a atividade. Esta espécie detritívora apresentou alta adaptação ao cativeiro. O *L. vannamei* é proveniente da costa leste do Pacífico, desde o extremo norte do Golfo da Califórnia, no México, até Tumbes, no Peru. É uma espécie bentônica, localizando-se em profundidades entre 5 a 72 metros (PÉREZ FARFANTE; KENSLEY, 1997).



Figura 1: Camarão *Litopenaeus vannamei*.

Em 1997, o Brasil produziu apenas 4.059 toneladas de camarão, equivalente a 0,5% da produção mundial. No entanto, em 2003, segundo dados da ABCC, foram produzidas 90.190 toneladas de camarões no Brasil. Ou seja, a produção no país aumentou cerca de 22 vezes, em um período de seis anos, passando a contribuir com cerca de 3% da produção mundial. Esta produção, entretanto, apresentou uma

queda à partir de 2004, chegando a 65.000 toneladas em 2006.

O cultivo de camarões no país vem apresentando uma extraordinária expansão, em especial na região nordeste, devido aos parâmetros naturais equiparáveis ou mesmo superiores aos das demais regiões produtoras do mundo (ROCHA, 2001).

A região Nordeste tem a maior área cultivada e a maior produção de camarões, seguida pela região Sul. Santa Catarina é responsável por grande parte da produção da região. A carcinicultura em Santa Catarina desenvolveu-se à partir de 1998, com a introdução do *L. vannamei* e a criação do Programa Estadual de Cultivo de Camarões Marinhos. A produção foi de 50 toneladas em 1998 para 4.267 toneladas em 2004. Nesta época, existiam cerca de 108 fazendas na principal região produtora (Laguna), ocupando uma área de mais de 1500 hectares (GELINSKI, 2005; FREITAS; VINATEA; NETO, 2009).

Este crescimento na carcinicultura brasileira ocorreu até 2004. A partir deste ano, vários fatores contribuíram para uma queda na produção, entre eles o baixo valor de comercialização do camarão, os elevados custos de produção, a ação *antidumping* promovida pelos EUA e a ocorrência de enfermidades virais – o vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) no Nordeste e o vírus da Síndrome da Mancha Branca no Sul (WSSV) (OSTRENSKY; BOEGER, 2008). De 2005 a 2007, a produção brasileira de camarão caiu para 65.000 toneladas, uma queda de cerca de 28% (ABCC, 2009). Em Santa Catarina, entre 2006 e 2007, apenas 100 toneladas foram produzidas.

2. Doenças de camarões peneídeos

Apesar do rápido crescimento da produção de alimentos de origem aquícola, as doenças representam o maior empecilho para este setor em muitas partes do

mundo (SUBASINGHE, 2005), devendo-se destacar em particular a carcinicultura (HOSSAIN et al., 2001). A rápida expansão mundial do cultivo de camarões foi acompanhada pela ocorrência de doenças que prejudicaram o ritmo do desenvolvimento desta atividade (LIGHTNER; REDMAN, 1998; HOSSAIN et al., 2001). O problema se intensificou devido ao crescimento dos cultivos, baseado em progressos zootécnicos, mas com pouco conhecimento da fisiologia dos peneídeos e geralmente sem considerar aspectos ecológicos (BACHÈRE, 2000).

As doenças infecciosas de camarões podem ser causadas por vírus, riquetsias, bactérias, fungos, protozoários e metazoários. Doenças não-infecciosas podem ser causadas por desequilíbrios nutricionais, contaminantes ambientais e fatores genéticos (LIGHTNER, 1996; LIGHTNER; REDMAN, 1998).

Segundo Snieszko (1973), as doenças são resultado de uma interação entre o hospedeiro, o ambiente e o patógeno. Segundo este conceito, a co-existência do patógeno e seu hospedeiro sem o surgimento da doença pode ser possível (Figura 2). Alguns microrganismos epicomensais dos camarões, normalmente inócuos, podem causar doenças em populações mantidas em alta densidade ou submetidas a condições estressantes (LIGHTNER; REDMAN, 1998). Animais em sistemas de cultivo apresentam maior contato entre si, restrição de movimento, podendo estar sujeitos, muitas vezes, a baixa qualidade da água, mudanças repentinas das condições em que são mantidos, manipulação e transporte; fatores estes que promovem o estresse dos animais, favorecendo a ação dos agentes patogênicos (MISCIATELLI; JONES; LATCHFORD, 1999).

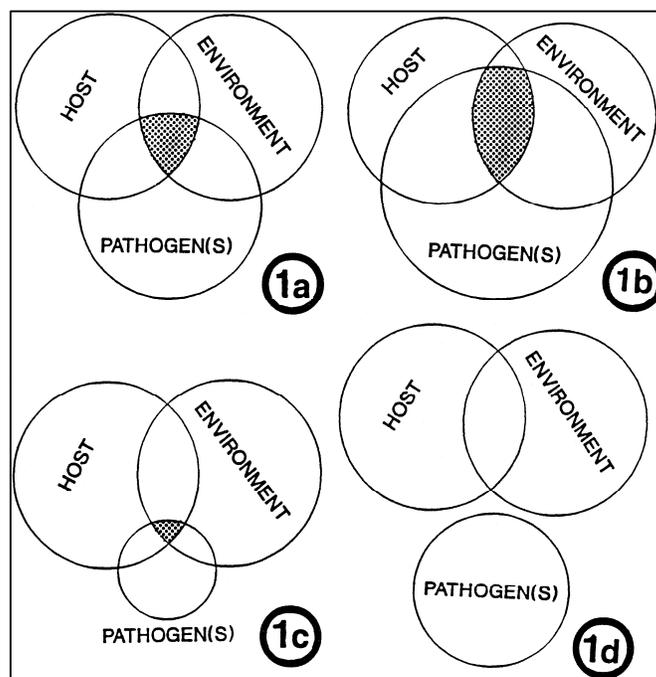


Figura 2: Ilustração do conceito de interação hospedeiro, patógeno e ambiente. 1a) Quando o tamanho de um dos componentes é aumentado, a severidade da doença aumenta. 1b) Efeito de um patógeno altamente virulento. 1c) Efeito de um patógeno pouco virulento. 1d) Exclusão do patógeno. Fonte: Lightner e Redman, 1998.

Dentre as doenças que podem afetar camarões, podemos destacar várias causadas por vírus, tais como o vírus da Síndrome da Mancha Branca, vírus da Necrose Hipodermal e Hematopoiética Infecciosa, vírus da Síndrome de Taura e o vírus da Mionecrose Infecciosa. Segundo Fegan & Clifford III (2001), as doenças provocadas por vírus têm sido a causa mais importante de perdas econômicas associadas aos cultivos na maioria dos países. Os mesmos autores relatam ainda

que, enquanto, no ano de 1990, o número de vírus patogênicos conhecidos para camarões era igual a seis, este número duplicou em 1992 e atingiu um total de 16 em 2001.

3. O Vírus da Síndrome da Mancha Branca – WSSV

Dentre os diferentes agentes etiológicos de doenças em camarões, destaca-se o vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), o agente etiológico de uma doença que tem causado grandes mortalidades de camarão, desde 1993 (LO et al., 1996a; NANHAI; QIN; XU, 2005). O WSSV foi descoberto pela primeira vez na província chinesa de Fujian em 1992, de onde se espalhou rapidamente (CAI et al., 1995; FLEGEL, 1997), para o restante do continente asiático (INOUE et al., 1994; LO et al., 1999). Em 1995, o WSSV foi detectado nos Estados Unidos, em camarões nativos e em fazendas de cultivo no Texas e na Carolina do Sul, tendo sido introduzido através de pescado congelado importado da Ásia (NUNAN; LIGHTNER, 1997; NUNAN; POULOS; LIGHTNER, 1998). Além disso, o WSSV foi encontrado em vários países da América Central (Guatemala, Honduras, Nicarágua, Panamá e Equador) (INFOFISH, 1999). No Equador, por exemplo, a produção de camarões em 1998 foi de 130.000 toneladas e em 2000, quando a doença estava no seu auge, a produção caiu para 37.000 toneladas (PAREDES, 2005).

O WSSV (Figura 3) pertence ao gênero *Whispovirus*, família *Nimaviridae* (MAYO, 2002). Este vírus é baciliforme, envelopado, com um nucleocapsídeo na forma de bastão, contendo um grande genoma (~300 kpb), composto por DNA circular dupla-fita (VAN HULTEN et al., 2001; YANG et al.; 2001; CHEN et al., 2002; VASEEHARAN; JAYAKUMAR; RAMASAMY, 2003). As partículas virais possuem uma cauda ou extensão na forma de flagelo em uma das extremidades (VASEEHARAN; JAYAKUMAR; RAMASAMY, 2003). Até hoje, o WSSV é o maior

vírus animal cujo genoma foi completamente seqüenciado (MARKS et al., 2004). Ele mede entre 210 e 380 nm de comprimento e 70 a 167 nm de largura (CHANG; CHEN; WANG, 1998). O genoma do WSSV codifica cerca de 184 ORFs, sendo a função da maioria delas ainda desconhecida (VAN HULTEN et al., 2001). Cerca de 21-29% destas ORFs codificam proteínas do vírus ou apresentam similaridade com proteínas conhecidas (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008). Dentre as proteínas codificadas podemos destacar uma DNA polimerase, uma ribonucleotídeo redutase, uma proteína similar a colágeno, proteínas envolvidas na latência viral, entre outras (VAN HULTEN et al 2000; CHEN et al. 2002; LI; CHEN; YANG, 2004; KHADIJAH et al., 2003.)

Este vírus é extremamente virulento e infecta tecidos de origem ecto- e mesodérmica (CHANG et al., 1996), como o epitélio cuticular, tecidos conectivos, e tecidos hematopoiéticos (SHI et al., 2005), replicando no núcleo das células infectadas (LEU et al., 2007).

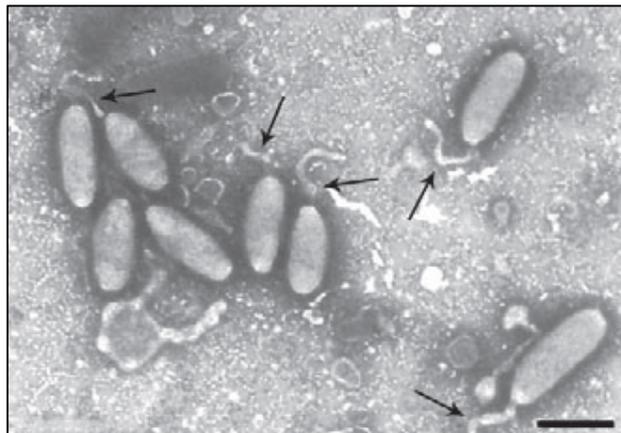


Figura 3: Micrografias eletrônicas de vírus. As setas indicam o apêndice na forma de flagelo.

Fonte: Escobedo-Bonilla et al., 2008.

O WSSV, ao contrário da maioria dos vírus, possui afinidade indiscriminada por um grande número de famílias de crustáceos. Muitas das espécies desenvolvem tolerância ao vírus, após uma alta incidência de mortalidade inicial (SCHUUR, 2003). A morfologia, localização nuclear e a morfogênese são similares a vírus baciliformes de insetos (DURAND et al., 1997). No estágio final de infecção, o núcleo ou até a própria célula desintegram-se, levando a perda da arquitetura celular (LEU et al., 2007).

Segundo Vaseeharan, Jayakumar e Ramasamy (2003), o WSSV pode infectar várias espécies de crustáceos, cultivados ou nativos, apresentando, além disso, infecção vertical. Além de camarões, este vírus já foi identificado em lagostins, lagostas, caranguejos, crustáceos não-decápodos, poliquetas, rotíferos e algumas larvas de insetos (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008). A transmissão do vírus pode se dar pela predação de animais doentes ou por partículas virais liberadas na água (ARTS et al., 2007). A ampla gama de espécies carreadoras do vírus torna difícil o seu controle.

A Síndrome da Mancha Branca é caracterizada pela presença de inclusões brancas na cutícula (Figura 4) e infecta diferentes espécies de peneídeos, como: *Penaeus monodon*, *P. japonicus*, *P. indicus*, *P. chinensis*, *P. merguensis* e *P. setiferus* (LIGHTNER, 1996). Não se sabe exatamente o mecanismo de formação das manchas brancas, provavelmente a infecção causa uma disfunção no integumento, resultando no acúmulo de sais na cutícula (WANG et al., 1999). Camarões infectados apresentam também redução no consumo de alimento, letargia, anorexia, coloração avermelhada nos apêndices ou mesmo no corpo, cutícula mole, aumento e uma coloração amarelada no hepatopâncreas e aumento no tempo de coagulação da hemolinfa (LIGHTNER, 1996, LO et al., 1996a; DURAND et al., 1997; SAHUL - HAMEED et al., 1998; WANG et al., 2000). A taxa de

mortalidade é muito alta, podendo alcançar 100%, após 3 a 10 dias do aparecimento dos sinais clínicos (INOUE et al., 1994; CHOU et al., 1995; VASEEHARAN; JAYAKUMAR; RAMASAMY, 2003). Por histopatologia, a infecção é caracterizada por inclusões intranucleares e cromatina marginalizada (DURAND et al. 1997; WANG et al. 2000). Os núcleos infectados se tornam progressivamente mais basofílicos e aumentados, podendo ocorrer fragmentação e desintegração celular (DURAND et al. 1996; LO et al. 1996b KARUNASAGAR et al. 1997; KASORNCHANDRA et al. 1998).



Figura 4: Manchas brancas na carapaça de um camarão infectado com WSSV. Fonte: Lightner, 1996.

No Brasil, as fronteiras brasileiras foram fechadas para a entrada de crustáceos em 1999 através de uma portaria ministerial, com o objetivo de impedir a entrada de crustáceos possíveis portadores de enfermidades. Entretanto, sintomas da Síndrome da Mancha Branca começaram a ser detectados em novembro de 2004 em fazendas de camarão de Santa Catarina, na região do Complexo Lagunar,

em fazendas da região da Pescaria Brava (Laguna) e Imaruí. O diagnóstico realizado na Universidade do Arizona (UAZ), onde se encontra um dos laboratórios de referência da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), foi positivo para WSSV em 11 de janeiro de 2005. A presença do vírus foi confirmada pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em 15 fazendas nos municípios de Imaruí e Laguna (SC), em uma área de 200 hectares (CIDASC, 2005). As fazendas contaminadas foram interditadas e foi estabelecido vazão sanitário até setembro de 2005 (SEIFFERT, 2005). Medidas sanitárias e estratégicas de proteção para evitar a disseminação da doença foram adotadas, assim como um mecanismo de monitoramento e controle da área afetada (REVISTA DA ABCC, 2005). Do total de 109 fazendas implantadas em Santa Catarina em 2004, apenas 30 continuavam em operação em 2007 (MELLO, 2007).

4. Sistema imune de crustáceos

Os camarões, assim como outros invertebrados, não possuem sistema imune adaptativo, ou seja, seu sistema imune consiste de várias respostas imunes inatas. Este sistema imune inato é baseado em componentes celulares e humorais do sistema circulatório, os quais interagem para detectar e eliminar microrganismos e parasitas estranhos potencialmente perigosos (BACHÈRE, 2000).

Segundo Bachère (2000), a resposta imune em artrópodes ocorre em três etapas ou estágios. O primeiro estágio corresponde ao reconhecimento dos fatores estranhos e ao início da resposta imune, envolvendo a participação de hemócitos e proteínas plasmáticas (MARQUES; BARRACCO, 2000). Várias proteínas envolvidas no reconhecimento de microrganismos já foram identificadas, como por exemplo, proteínas que reconhecem peptidoglicanas, proteínas ligantes a lipopolissacarídeos e proteínas similares a imunoglobulinas (KOPACEK; GRUBHOFFER; SÖDERHALL,

1993; YOSHIDA; KINOSHITA; ASHIDA, 1996; ZHANG; WANG; PENG, 2004). O segundo estágio compreende uma resposta celular e a síntese de efetores. As moléculas de reconhecimento interagem e ativam os hemócitos, os quais têm um papel importante e central na defesa contra microrganismos (BACHÈRE, 2000). Existem três tipos de hemócitos: células hialinas, semigranulares e granulares (MARTIN; GRAVES, 1985). Estas células estão envolvidas, principalmente, com a fagocitose, coagulação e ativação do sistema pró-fenoloxidase (; JOHANSSON; SÖDERHALL, 1985; OMORI; MARTIN; HOSE, 1989; GARGIONI; BARRACCO, 1998). Além disso, os camarões, como a maioria dos artrópodes, produzem peptídeos antimicrobianos que são ativos contra um grande número de patógenos. Atualmente, em camarões peneídeos, dois tipos de peptídeos antimicrobianos foram bem caracterizados, as peneídinas de hemócitos (DESTOUMIEUX et al., 1997) e os peptídeos aniônicos derivados da hemocianina, isolados do plasma de camarões (DESTOUMIEUX-GARZON et al., 2001). Finalmente, o último estágio envolve uma recuperação celular e humoral do organismo.

Alguns genes envolvidos na atividade antimicrobiana foram clonados e seqüenciados, como os dos peptídeos antimicrobianos e do sistema ativador da profenoloxidase (DESTOUMIEUX et al., 1997; SRITUNYALUCKSANA; CERENIUS; SÖDERHALL, 1999; HE; QIN; XU, 2005). Algumas proteínas envolvidas na resposta anti-WSSV foram identificadas recentemente, como por exemplo, actina, calreticulina, fortalina, hemocianina, entre outras (XIE; LUANA et al., 2007; LEI et al., 2008; TONGANUNT et al., 2008).

5. Diagnóstico

O desenvolvimento de ensaios quantitativos para a avaliação e o monitoramento do estado imune de camarões cultivados é crucial para a prevenção

de doenças (BACHÈRE, 2000).

O diagnóstico da Síndrome da Mancha Branca pode ser feito, inicialmente, através da presença dos sinais clínicos descritos anteriormente e do histórico da doença na fazenda ou região de cultivo. Após o diagnóstico clínico, exames a fresco, envolvendo técnicas simples de microscopia óptica, como a análise de esfregaços de tecido epitelial ou conectivo das brânquias ou estômago, podem ser utilizadas para a detecção de núcleos hipertrofiados ou com vacúolos (LIGHTNER, 1996; LIGHTNER; REDMAN, 1998).

A confirmação do diagnóstico deve ser feita com uma das seguintes técnicas: análises histológicas para a detecção de corpos de inclusão intranucleares; hibridização com sondas de DNA e reação em cadeia de polimerase (PCR) (LIGHTNER, 1996; LIGHTNER; REDMAN, 1998).

As sondas utilizadas para o diagnóstico de doenças em camarão podem ser marcadas não-radioativamente, utilizando-se digoxigenina-11-dUTP, e podem ser utilizadas em hibridização *in situ* (ISH) e *dot blotting* (LIGHTNER, 1996; LIGHTNER; REDMAN, 1998; QUÉRÉ et al., 2002; de SOUZA, 2008).

Na PCR, pequenas quantidades de DNA, em geral não-detectáveis podem ser amplificadas, produzindo quantidades detectáveis da seqüência alvo do patógeno (LIGHTNER; REDMAN, 1998). A PCR é uma técnica altamente sensível para a detecção de WSSV, permitindo que o vírus possa ser detectado mesmo quando presente em pequenas quantidades, em animais assintomáticos ou hospedeiros, além de facilitar a análise de um grande número de amostras (HOSSAIN et al., 2001; LU; WANG; LOTZ, 2004).

6. PCR em Tempo Real

Apesar da técnica de PCR ser sensível e amplamente utilizada no diagnóstico de enfermidades, ela não é capaz de detectar a presença de uma cópia

única do genoma viral em um tecido infectado ou quantificar exatamente a expressão de um gene. Uma alternativa é a metodologia de PCR em Tempo Real.

Na PCR em Tempo Real, o acúmulo de produtos da PCR é detectado e monitorado diretamente pela leitura do aumento da fluorescência do composto fluorescente utilizado, enquanto na PCR tradicional os produtos precisam ser posteriormente analisados por eletroforese. O principal fundamento na utilização deste método é o chamado *cycle threshold* (CT) (Figura 5). O CT é definido como o ciclo da reação de PCR no qual o sinal fluorescente do corante sinalizador atravessa uma linha arbitrária denominada *threshold*. O valor numérico do CT é inversamente proporcional a quantidade inicial do transcrito de interesse na reação, ou seja, quanto menor o valor de CT, maior a quantidade inicial do transcrito na amostra (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Além disso, manipulações pós-PCR, como o gel de agarose para observar os produtos de PCR amplificados, são desnecessárias, minimizando o risco de contaminação (BUSTIN, 2000; RIRIE et al., 1997).

A quantificação gênica pode ser feita de duas formas, quantificação absoluta e quantificação relativa. A quantificação absoluta determina o número exato de cópias do gene de interesse, através da comparação com uma curva padrão. Esta metodologia é muito utilizada na quantificação viral.

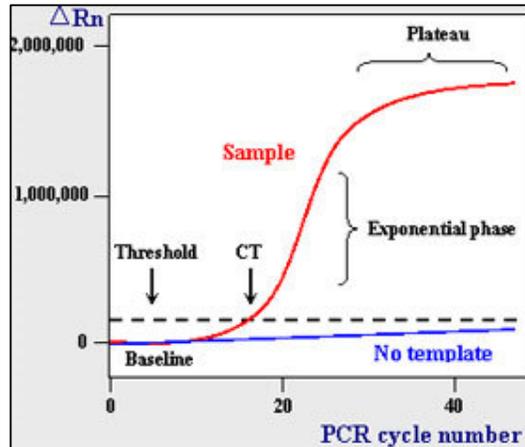


Figura 5: Esquema indicando o Cycle

Threshold (CT). Fonte: <http://www.rt-pcr.com/>

Na quantificação relativa, a expressão gênica é comparada com um grupo referência (um controle não-tratado, por exemplo). A expressão é relativa a um gene controle, como por exemplo, β - actina e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, com o objetivo de normalizar as quantidades de mRNA. Esta metodologia é mais utilizada para comparar a expressão gênica (níveis de mRNA) entre diferentes tratamentos (SUDGEN; WINTER, 2008). Para utilizar o método de CT comparativo é necessária a otimização das reações para que as eficiências fiquem próximas de 100% e também a certificação de que a eficiência da reação do gene de interesse seja similar a do gene controle interno (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Em geral, a eficiência da reação fica abaixo de 100%. A eficiência da reação varia devido a fatores como a seqüência dos iniciadores, o tamanho do produto e seu conteúdo de GC e impurezas na amostra (SUGDEN; WINTER, 2008).

A fórmula para calcular a expressão relativa de uma amostra A (grupo tratado) em relação a uma amostra B (grupo referência), onde cada amostra é relativizada em relação a um controle externo, é a seguinte:

$$2^{-\Delta\Delta CT} = [(CT \text{ gene de interesse} - CT \text{ gene controle}) \text{ amostra A} - (CT \text{ gene de interesse} - CT \text{ gene controle}) \text{ amostra B}]$$

Diferentes métodos de detecção da fluorescência foram desenvolvidos. Muitos métodos baseiam-se na utilização de sondas complementares ao gene de interesse, como por exemplo, as sondas Taqman. A detecção baseada em sondas assegura que o único produto detectado é o produto de interesse, produtos não-específicos e dímeros de iniciadores não podem ser detectados. Vários corantes estão disponíveis, permitindo a distinção entre diferentes corantes, sendo possível a detecção simultânea de múltiplos produtos de PCR (PCR multiplex). Outro método de detecção é a utilização de SYBR Green I (Figura 6), um corante que se liga na volta menor do DNA. Em solução, a sua fluorescência é baixa, aumentando com a ligação ao DNA dupla fita. Das químicas de detecção disponíveis, é a mais barata, não necessitando de sondas específicas e podendo ser usada com qualquer iniciador. Uma das desvantagens do SYBR Green I é a sua inespecificidade, podendo detectar não apenas o produto de interesse, mas também produtos inespecíficos e dímeros de iniciadores. Este problema pode ser evitado desenhando-se iniciadores específicos e através da análise da curva de dissociação dos produtos (*melting curve*). No final da amplificação, a temperatura do instrumento é regulada para 5°C abaixo da temperatura de anelamento, permitindo que todos os produtos dupla-fita se anelem ao SYBR Green I, obtendo um sinal máximo de fluorescência. O aparelho é então programado para aumentar a temperatura lentamente (0.1-1 °C/s) enquanto o sinal de fluorescência é constantemente monitorado. Se somente um produto foi gerado durante a reação de PCR, a fluorescência medida irá cair dramaticamente assim que todos amplicons idênticos desnaturarem, ou seja, quando a temperatura de *melting* dos produtos é atingida. É construído um gráfico

contendo a relação entre a primeira derivada negativa (a taxa de variação da fluorescência em relação a temperatura, $-dF/dT$) e a temperatura, gerando um pico para amplicons idênticos. Se dímeros de iniciadores são formados, estes geralmente produzem o pico de *melting* em uma temperatura mais baixa, já que são de tamanho menor que os produtos verdadeiros (Figura 7) (SUGDEN; WINTER, 2008).

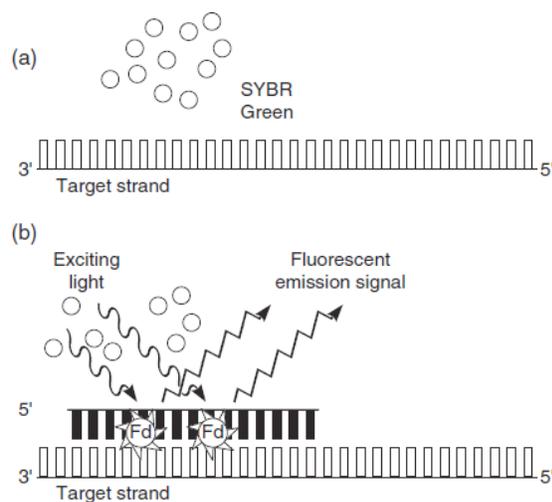


Figura 6: Uso do SYBR Green I para detectar produtos em PCR em Tempo Real. O SYBR Green I apresenta um aumento de fluorescência quando se liga ao DNA dupla-fita. Fonte: SUGDEN; WINTER, 2008.

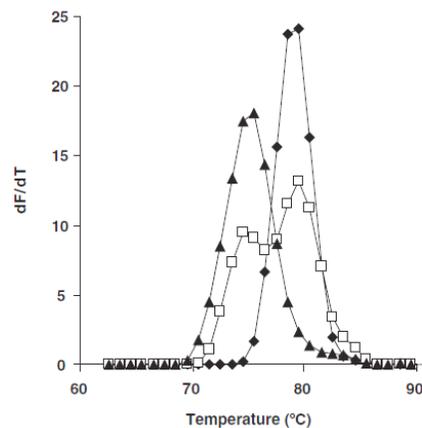


Figura 7: Ilustração da detecção de dímeros de iniciadores utilizando a curva de dissociação. No exemplo existem picos a $\sim 75.5^{\circ}\text{C}$ e $\sim 79.5^{\circ}\text{C}$.

Fonte: SUDGEN e WINTER, 2008.

7. Hibridização supressiva subtrativa (SSH)

Para entender a patogênese de qualquer doença, o conhecimento das interações entre vírus e hospedeiro é crítico. Interações vírus-hospedeiro podem resultar em respostas imunes contra o invasor, levando a mudanças nos níveis de expressão de genes do hospedeiro que favorecem a replicação viral (WANG et al., 2007a).

Informações a respeito dos genes do hospedeiro envolvidos na patogênese do WSSV ainda são escassas. Uma das formas de estudar estas respostas é isolar genes que são diferencialmente expressos após a infecção pelo WSSV.

Apesar de seqüenciamentos globais fornecerem uma visão mais integrada do organismo, o seqüenciamento de cDNA de tecidos específicos e sob condições

patológicas é ideal para identificar novos genes alvo e para obter informações a respeito da natureza da doença (CLAVERO-SALAS et al., 2007). Com este objetivo, uma série de estratégias têm sido utilizadas, entre elas *differential display* (LIANG; PARDEE, 1992; LIANG et al., 1992; ASTROFSKY et al., 2002;), SSH (DIATCHENKO et al. 1996; HE et al., 2005; PAN et al., 2005), *microarrays* de cDNA (CHEE et al. 1996; CHU et al. 1998; DHAR et al., 2003; WANG et al., 2006) e ESTs (ROJTINNAKORN et al., 2002).

A técnica de SSH tem a vantagem de que pode ser realizada sem o conhecimento prévio de seqüências da espécie estudada, permitindo o estudo de novos genes em organismos com genomas pouco estudados. Além disso, ela requer pequenas quantidades de amostras, e possui alta eficácia, especialmente na obtenção de genes pouco abundantes (DIATCHENKO et al., 1996). Ambas populações de mRNA a serem comparadas são convertidas em cDNA. O cDNA que contem as seqüências de interesse (diferencialmente expressas) é denominado *tester*, e o cDNA referência *driver*. Os cDNAs *tester* e *driver* são hibridizados e as seqüências híbridas são removidas. Conseqüentemente, os cDNAs não-hibridizados remanescentes representam genes que são expressos no *tester*, mas estão ausentes do cDNA *driver*. Transcritos raros podem ser enriquecidos em até 1.000 vezes utilizando esta metodologia (WINSTANLEY, 2008). Entretanto, uma das desvantagens deste método é a presença de clones representando cDNAs não diferencialmente expressos nas bibliotecas subtraídas, necessitando de validação dos resultados por métodos mais sensíveis (REBRIKOV et al., 2000). O procedimento de SSH é o seguinte: cDNA é sintetizado à partir das duas populações de mRNA a serem comparadas. Os cDNAs *tester* e *driver* são digeridos com a enzima de restrição *Rsa I*, que gera pontas cegas. O cDNA *tester* é dividido em dois grupos (*tester 1* e *tester 2*), e cada um é ligado com um diferente adaptador na

extremidade 5'. As duas hibridizações são realizadas. Na primeira, um excesso de *driver* é adicionado a cada *tester*. As amostras são então desnaturadas e hibridizadas, gerando estruturas do tipo a, b, c e d (Figura 8). Durante a segunda hibridização, as duas amostras hibridizadas anteriormente são misturadas sem desnaturação. Agora, apenas cDNAs *tester* simples-fita podem anelar. Estes híbridos correspondem a cDNAs *tester* dupla-fita com extremidades diferentes, que correspondem aos dois adaptadores. Estas moléculas (tipo e), tem diferentes sítios de anelamento para os iniciadores nas suas extremidades 3'e 5'. A população de cDNAs é submetida a PCR e apenas as moléculas tipo e, que possuem dois adaptadores diferentes, podem ser amplificadas exponencialmente. Os produtos amplificados podem ser então clonados e seqüenciados.

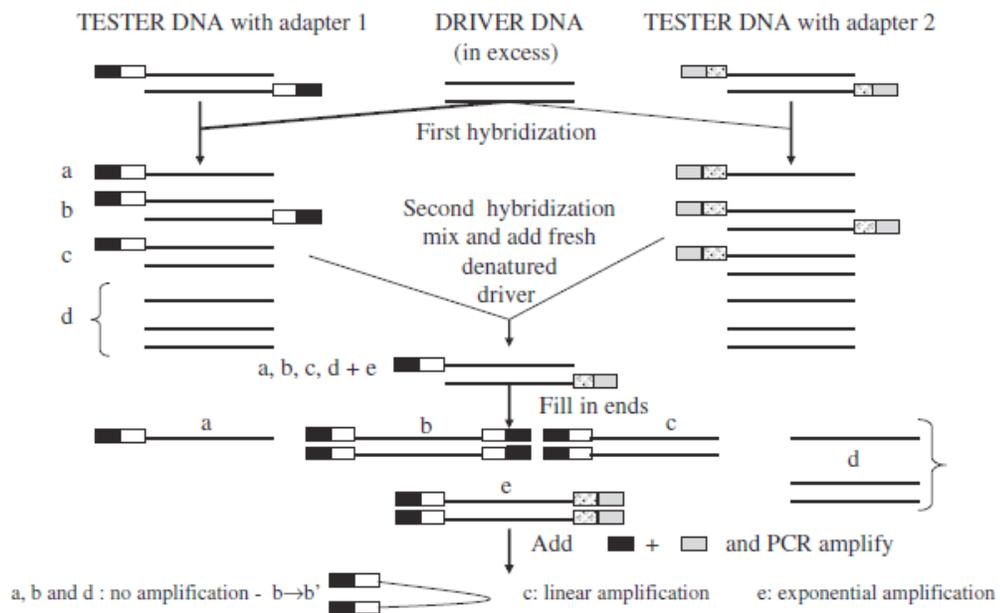


Figura 8: Esquema das etapas principais da SSH. Fonte: WINSTANLEY, 2008.

Com o objetivo de estudar as respostas de camarões ao WSSV, alguns estudos utilizando SSH foram realizados em camarões infectados pelo WSSV em laboratório (HE et al., 2005; PAN et al., 2005; REYES; SALAZAR; GRANJA, 2007). Entretanto, não existem trabalhos com animais de cultivo, naturalmente infectados pelo vírus. Em condições naturais, as respostas ao vírus podem ser diferentes daquelas encontradas em camarões infectados experimentalmente.

8. Isolados geográficos

Apesar do WSSV ter sido identificado em muitas espécies de crustáceos de diferentes regiões geográficas, por um certo tempo era incerto até que ponto os agentes causativos da doença eram idênticos, se existem diferentes linhagens geográficas ou até vírus distintos (LO et al., 1999).

Os vários isolados geográficos de WSSV encontrados até hoje são muito similares quanto à morfologia, proteoma e apresentam pequenas diferenças no padrão de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) (NADALA; LOH, 1998; LO et al., 1999; WANG et al., 2000; MARKS et al., 2004). Segundo Escobedo-Bonilla et al. (2008), os isolados apresentam 99,3% de similaridade na composição de nucleotídeos. Por outro lado, existem regiões do genoma do WSSV que apresentam variações de seqüências significativas, que podem determinar a origem de um determinado isolado de WSSV e sua dispersão geográfica (DIEU et al. 2004). Após o seqüenciamento do genoma de três isolados diferentes, provenientes de Taiwan – WSSV-TW (WANG et al., 1995), China – WSSV-CN (YANG et al., 2001) e Tailândia - WSSV-TH (VAN HULTEN et al., 2001), a variação em vários *loci* sugere que o vírus se propagou à partir de um ancestral comum de Taiwan (MARKS et al., 2004).

O tamanho do genoma do WSSV varia entre os diferentes isolados geográficos: 305.107 pb (China, número de acesso no GenBank: AF332093),

292.967 pb (Tailândia, número de acesso no GenBank: AF369029) e 307.287 pb (Taiwan, número de acesso no GenBank: AF440570). As diferenças de tamanho são devidas principalmente a várias inserções pequenas e uma deleção grande (12 kb) (CHEN et al., 2002). As principais diferenças encontradas são uma região favorável à recombinação (ORF 14/15), uma seqüência de uma transposase presente apenas no WSSV-TW, minissatélites, deleções de base única e polimorfismos de base única (*single nucleotide polymorphisms* – SNPs), e uma região com uma grande deleção (ORF 23/24) de ~13.2 kb no WSSV-TH e ~1.2 kb no genoma do WSSV-CN em comparação com o WSSV-TW (MARKS et al., 2004).

As variações associadas com as ORFs 23/24 e 14/15 foram relatadas como úteis na identificação de mudanças evolutivas no WSSV (MARKS et al. 2004). Os VNTRs associados com três minissatélites (VNTRs), ORF 94, ORF 75 e ORF 125, foram propostos como marcadores em estudos epidemiológicos (WONGTEERASUPAYA et al. 2003; DIEU et al. 2004; MARKS et al. 2004; SHEKAR et al. 2005). Os diferentes isolados geográficos podem ser comparados através de diferentes técnicas: RFLP (LO et al., 1999; DIEU et al., 2004), hibridização com sondas não-radioativas (LO et al., 1999), comparação de genomas (MARKS et al., 2004), PCR e seqüenciamento de determinadas regiões do genoma (WONGTEERASUPAYA et al., 2003; KIATPATHOMCHAI et al., 2005).

Aparentemente, a variabilidade genética que existe entre os isolados geográficos reflete-se em diferentes graus de virulência (WANG et al., 1999). De acordo com Escobedo-Bonilla et al. (2008), diferenças na virulência de cepas do WSSV podem ser devidas também a diferenças no tamanho do genoma. Cepas com o genoma maior parecem ser menos virulentas, devido talvez a uma maior facilidade de replicação viral de vírus com genomas menores (MARKS, 2005). Uma região instável 9,6 kpb do genoma do WSSV isolado na China parece sofrer deleções

espontâneas de tamanhos diferentes, dependendo da espécie hospedeira. Esta observação sugere que essas deleções tenham um papel importante na virulência do WSSV. (LAN; LU; XU, 2002). Diferenças de padrões em VNTRs podem refletir uma diferença na pressão evolutiva em várias partes funcionais do genoma, influenciando a expressão gênica e fornecendo vantagens evolutivas através da adaptação rápida a variações ambientais (SHEKAR; KARUNASAGAR; KARUNASAGAR, 2007).

CAPÍTULO 1

Padronização da metodologia de PCR em Tempo Real para a detecção do WSSV

INTRODUÇÃO

A aqüicultura é o setor produtor de alimentos que mais cresce no mundo. Uma grande proporção (90%) desta produção vem de países em desenvolvimento (SUBASINGHE, 2005). Dentre as diferentes atividades da aqüicultura, pode-se destacar a carcinicultura. Em cerca de 40 anos, a carcinicultura mundial passou dos cultivos experimentais para uma indústria com o ingresso de bilhões de dólares, empregando direta ou indiretamente, centenas de milhares de pessoas (PANTOJA; LIGHTNER, 2008). De acordo com Madrid (2001), a década de 80 representa o auge da produção de camarão no mundo, passando de 97.000 ton. em 1980 para 686.000 ton. em 1990, representando um incremento de 607,2%. Essa explosão da carcinicultura, entretanto, foi acompanhada pela ocorrência de verdadeiras pandemias virais. Dentre os diferentes vírus que afetam camarões de cultivo, pode-se destacar o vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV). Este patógeno causa a doença mais séria para a carcinicultura mundial. Na China, O WSSV causou perdas de 80% na produção, e no Equador o impacto desta doença foi desastroso (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008). Esta doença surgiu no Brasil em 2005, e causou grandes perdas econômicas nos cultivos de Santa Catarina. A produção foi de 4.267 toneladas em 2004 para 100 toneladas entre 2006 e 2007.

O WSSV é um vírus envelopado, baciliforme, com um apêndice similar a um flagelo em uma das extremidades. O sintoma que caracteriza a doença é a presença de manchas brancas no exoesqueleto dos camarões. Além disso, os camarões podem apresentar apêndices avermelhados, redução na taxa de alimentação, cutícula solta e letargia (CHOU et al., 1995; LO et al., 1996b; LIGHTNER et al., 1998;). Após 3 a 10 dias do surgimento dos sintomas, as mortalidades podem atingir 100%. Por histopatologia, a infecção é caracterizada por núcleos hipertrofiados, com

inclusões intranucleares e cromatina marginalizada (DURAND et al., 1997; WANG et al., 2000).

O WSSV infecta um grande número de espécies, ao contrário da maioria dos vírus. Praticamente todas as espécies de peneídeos são suscetíveis ao vírus. Além disso, ele infecta outras famílias de camarões, como lagostins, caranguejos, copépodos e lagostas. Estas espécies em geral não desenvolvem sintomas, tornando-se carreadores assintomáticos do vírus (LIGHTNER, 1996; LO et al., 1996b; WANG et al., 1998; MARQUES, 2008). O WSSV também já foi detectado em microalgas e em amostras de solo dos viveiros de cultivo (LIU et al., 2007; NATIVIDAD et al, 2008). Esta característica torna a erradicação do vírus muito difícil, pois mesmo eliminando os camarões de um tanque infectado, o vírus pode continuar presente no ambiente.

A não detecção de infecções leves com WSSV e sua disseminação é uma das maiores causas de epidemias em camarões, já que estresses ambientais podem levar à evolução de infecções leves para agudas, e assim levar à incidência da doença nos cultivos (PENG et al. 1998; HSU et al. 1999; HE et al. 2000). O desenvolvimento de testes diagnósticos sensíveis é vital para o monitoramento dos cultivos.

Os principais métodos de diagnóstico de WSSV são observações histológicas, coloração rápida de esfregaços de tecido (teste de campo), hibridização *in situ*, *dot blot*, PCR e PCR em Tempo Real (LIGHTNER, 1996; DURAND; LIGHTNER, 2002). As metodologias mais sensíveis são a PCR e a PCR em Tempo Real. Para a detecção do WSSV por PCR, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2006) recomenda o protocolo de PCR *Nested* desenvolvido por Lo et al. (1996a). Na PCR

Nested, são realizadas duas reações de PCR consecutivas, cada uma com um conjunto de iniciadores distintos. A primeira reação ocorre com um par de iniciadores externos, enquanto a segunda usa o produto da primeira reação de PCR como molde e um segundo par de iniciadores, denominados internos, os quais são complementares à região interna do produto amplificado na primeira reação de PCR. Este procedimento possibilita uma sensibilidade maior, permitindo a detecção de até dez cópias do agente infeccioso (MARQUES; MOSER, MÜLLER, 2006). Entretanto, a PCR *Nested* ou a PCR convencional, são métodos mais qualitativos do que quantitativos.

A PCR em Tempo Real (PCR-RT) é uma metodologia mais recente e sensível. Na PCR-RT são utilizados corantes fluorescentes que têm alta afinidade por DNA dupla fita (SYBR Green I, Eva Green, entre outros) ou sondas fluorescentes (TaqMan). O acúmulo do produto é monitorado através do aumento de fluorescência do corante utilizado. Assim, a cada ciclo de PCR a fluorescência da reação é registrada, permitindo a quantificação do número de cópias do gene de interesse (DURAND; LIGHTNER, 2002, MARQUES; MOSER; MÜLLER, 2006). Esta técnica permite a quantificação do número de cópias do genoma viral presentes em uma amostra, e tem sido utilizada no estudo de muitos vírus humanos, como os vírus da Herpes simplex, Epstein-Barr, hepatite B e HIV (CANE et al., 1999; KIMURA et al., 1999; LEWIN et al., 1999; RYNCARZ et al., 1999). Esta técnica também já foi padronizada para a detecção de WSSV em camarões, permitindo determinar a carga viral exata nos animais (DURAND; LIGHTNER, 2002; SRITUNYALUCKSANA et al.; 2006). Como a PCR-RT detecta cópias únicas do genoma viral, ela é muito útil para a detecção do vírus em amostras com grau de infecção leve, que seriam negativas por PCR convencional. Além disso, esta técnica é mais rápida, pois não

necessita de análises pós-PCR e conseqüentemente, por ser um sistema “fechado”, diminui a possibilidade de ocorrência de contaminações (BUSTIN et al., 2005).

No presente trabalho, a metodologia de PCR-RT foi padronizada e comparada com a PCR *Nested* usualmente utilizada em nosso laboratório.

OBJETIVO GERAL

Padronizar a metodologia de PCR-RT para o diagnóstico de WSSV em camarões *L. vannamei*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a metodologia de PCR-RT para a detecção de WSSV em *L. vannamei*;
- Comparar a metodologia de PCR-RT com a de PCR *Nested*, quanto ao seu grau de sensibilidade;
- Quantificar a carga viral de camarões com diferentes graus de infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

1 – Coleta de amostras

Camarões adultos (aproximadamente 20 gramas), machos e fêmeas foram coletados em fazendas de cultivo de Santa Catarina, com o auxílio de técnicos da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri) e da Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC). As coletas foram realizadas em fazendas de Laguna, Governador Celso Ramos, Araquari e Barra do Sul. Os períodos das coletas foram: janeiro de 2005 (primeiro surto de Mancha Branca no estado), e de abril de 2006 a fevereiro de 2008. Os camarões foram coletados com uma tarrafa jogada aleatoriamente em diferentes pontos dos tanques de cultivo e mantidos em baldes com aeração para a retirada dos tecidos. Os pleópodes foram retirados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C para as análises posteriores.

2 - Extração de DNA

A extração de DNA foi feita segundo o protocolo de Maciel (2002) (Protocolo 1), modificado por Moser (2004). As amostras foram digeridas em solução de lise contendo TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0), SDS 1% e proteinase K (1 mg/mL) a 65°C por uma hora. Em seguida, adicionou-se NaCl 5M e CTAB 10% e as amostras foram mantidas a 55°C por 45 minutos. Adicionou-se clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) e as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 8 min para separar o DNA das outras moléculas. Ao sobrenadante obtido foi adicionado

isopropanol, o DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em TE 1X contendo RNase A (1mg/mL). O DNA foi isolado novamente com clorofórmio:álcool isoamílico, precipitado com acetato de sódio 3M (pH 5,2) e etanol 95%, lavado com etanol 70% e ressuspendido em TE 1X.

O DNA de algumas amostras também foi extraído com o sistema High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) (Protocolo 2), de acordo com as condições do fabricante. Aproximadamente 50 mg de tecido foram digeridos com tampão de lise e proteinase K por uma hora a 55°C. Tampão de ligação foi adicionado e as amostras incubadas por 10 min a 70°C, em seguida adicionou-se isopropanol e retirou-se os fragmentos de tecido insolúveis com uma pipeta. A amostra foi transferida para um filtro e centrifugada a 8000 x g por 1 min. O líquido eluído foi descartado, adicionou-se o tampão de remoção de inibidores e centrifugou-se o filtro novamente por 1 min a 8000 x g. O filtro foi lavado duas vezes com tampão de lavagem e centrifugado nas condições anteriores. O filtro foi colocado em um tubo novo, adicionou-se o tampão de eluição e foi realizada outra centrifugação a 8000 x g por 1 min.

3 – Quantificação e determinação da integridade do DNA

As amostras de DNA genômico foram monitoradas quanto ao seu grau de integridade pelo perfil eletroforético em gel de agarose 1% diluído em TBE 1X (Tris base 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0), corado com brometo de etídio. As amostras foram diluídas em tampão da amostra 10 X (Sacarose 20%, Azul de bromofenol 0,1%, TBE 1X) (1:2 v/v), sendo em seguida aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada a 100 V, utilizando-se o tampão TBE 1X. A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro (Ultrospec 3000, Pharmacia), através da leitura da absorbância a 260 nm (AUSUBEL et al., 1995).

4 - Padronização da metodologia de *Nested* PCR para a detecção de WSSV

O WSSV foi identificado nas amostras através de *Nested* PCR (NUNAN et al., 1998). Os iniciadores utilizados para a *Nested* PCR foram os descritos por Lo et al. (1996a):

WS146F1: 5'-ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG-3';

WS146R1: 5'-TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACG-3';

WS146F2: GTAAGTCCCCTTCCATCTCCA-3';

WS146R2: TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT-3'.

No primeiro passo da PCR, as condições de reação foram as seguintes: 94^o C 2 min, seguidos de 39 ciclos de 94^o C 1 min, 55^o C 1min e 30 seg, 72^o C 2 min, com uma extensão final a 72^o C por 5 min. No segundo passo, ou *Nested* PCR, as condições foram as seguintes: 94^o C 2 min, 55^o C 1 min, 72^o C 2 min, seguidos de 35 ciclos de 94^o C 1 min, 55^o C 1 min e 72^o C 1 min, com uma extensão final a 72^o C por 5 min.

As reações foram realizadas com 20 ng de DNA. O produto esperado após a *Nested* PCR corresponde a 941 pb. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2% e o tamanho dos fragmentos obtidos foi comparado com marcador de peso molecular conhecido (Felix Ladder, Appligene).

Além das amostras de campo, foram analisados controles negativos (reação de PCR sem a adição de amostra e amostra sem contaminação pelo vírus) e controles positivos (plasmídeo com DNA do WSSV e amostra positiva para o vírus).

Alguns produtos de PCR foram purificados do gel utilizando-se o sistema Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche) e clonados.

5 – PCR para a detecção de IHNV

O vírus da necrose hematopoiética e hipodermal infecciosa (IHNV) é um

virus de DNA fita simples, que infecta as espécies cultivadas *Litopenaeus vannamei* e *Litopenaeus stylirostris* (BONAMI et al., 1990; MOTTE et al., 2003). O IHHNV não provoca uma infecção letal em *L. vannamei*, apesar de causar redução no crescimento dos camarões infectados e uma variedade de deformações cuticulares no rosto, antenas e nas regiões torácicas e abdominais (DHAR et al., 2001). Moser (2005) encontrou uma alta prevalência natural de IHHNV (54,8%) em uma população de *L. vannamei* assintomáticos.

Devido à alta prevalência do IHHNV, a presença deste vírus também foi avaliada nas amostras, para selecionar amostras que fossem positivas apenas para WSSV e amostras negativas para ambos os vírus.

Os iniciadores foram desenhados a partir de seqüências específicas do genoma viral, depositadas no GenBank utilizando-se o Programa OLIGO 3.0 (MOSER, 2005). As seqüências dos iniciadores utilizados estão mostradas abaixo:

IHHNV-F: 5' TCGGAAACTGAACACTGGCCT 3'

IHHNV-R: 5' CGGCGTGTTCTTCGTCTTCATT 3'

Cada reação de amplificação foi realizada utilizando-se 20 ng de DNA. O fragmento amplificado corresponde a 512 pb. As condições de PCR foram um ciclo de 94° C por 3 min, seguido de 30 ciclos de 94° C por 30 s, 55° C por 45 s e 72° C por 45 s, com uma extensão final a 72° C por 10 min.

Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2% e o tamanho dos fragmentos obtidos foi comparado com marcadores de peso molecular conhecido (Felix Ladder, Appligene).

Assim como realizado na PCR para detecção do WSSV, foram analisados controles negativos (reação de PCR sem a adição de amostra e amostra sem contaminação pelo vírus) e controles positivos (plasmídeo com DNA do IHHNV e amostra positiva para o vírus).

Alguns produtos de PCR positivos para o IHHNV também foram purificados do gel utilizando-se o sistema Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche) e

posteriormente clonados.

6 - Clonagem

Os fragmentos obtidos nos dois passos da PCR *Nested* e o fragmento obtido na PCR para detecção do IHHNV foram ligados ao vetor pGEM-T Easy Vector System I (Promega) que possui no sítio de clonagem uma sequência para clivagem com a enzima de restrição Eco RI. Nesse vetor, há o gene *lacZ*, que codifica a β -galactosidase e o gene que confere resistência a ampicilina. A ligação foi realizada adicionando-se 3 μ l do produto de PCR purificado, tampão da enzima ligase 1X, 50 ng do vetor pGEM-T Easy e 3 unidades da enzima T4 DNA Ligase. As reações foram mantidas a 17^o C durante 18 horas.

O vetor contendo o inserto foi inserido em bactérias JM109 competentes (Promega) através de choque térmico. As bactérias foram mantidas por 2 horas a 37^o C em meio LB (20 g/L) e após este procedimento, foram plaqueadas em meio LB ágar (35 g/L) contendo ampicilina (100mM) , IPTG (0,5mM) e X-GAL (50mM) e mantidas a 37^o C por 12-18 horas.

As bactérias transformadas foram selecionadas positivamente perante a droga de seleção ampicilina. Dentre essas bactérias, as que não apresentaram o plasmídeo ligado ao fragmento de interesse expressaram a enzima β -galactosidase funcional. A enzima β -galactosidase metaboliza o X-GAL presente no meio, originando um produto de cor azul, dando essa cor às colônias. As bactérias que apresentaram os plasmídeos ligados ao fragmento de interesse tiveram o gene da β -galactosidase interrompido e as colônias apresentaram coloração branca.

As colônias brancas foram transferidas para meio LB (20 g/L) contendo 100 mM de ampicilina e cultivadas sob agitação constante (140 rpm) a 37^o C por 8-12 horas.

7 – Confirmação da presença do fragmento

Para a confirmação da presença de insertos nas colônias consideradas positivas, os plasmídeos foram extraídos das bactérias após o período de 18 horas de crescimento em meio LB contendo ampicilina 100 mM.

A extração do plasmídeo foi realizada a partir de 3 mL do meio. As células foram lisadas com o tampão STET (Sacarose 8%, Triton 5%, 50mM de EDTA e 50mM de Tris, pH 8,0) e STET com lisozima (10 mg/ml) e os restos celulares foram precipitados. A precipitação do plasmídeo foi realizada com isopropanol. Os plasmídeos foram digeridos com a enzima EcoRI e a presença do inserto foi conferida através de eletroforese em gel de agarose 1%.

8 - Extração do plasmídeo para sequenciamento

A obtenção dos plasmídeos e os sequenciamentos foram realizados no Laboratório de Protozoologia (UFSC), em colaboração com o Prof. Dr. Edmundo Grisard. Os procedimentos foram realizados conjuntamente com a acadêmica Patrícia Hermes Stocco.

A extração do DNA plasmidial para sequenciamento foi realizada através de lise alcalina das colônias crescidas em 1mL de meio líquido nas condições descritas anteriormente. A lise foi realizada através da adição de tampão GET (20% Glicose, 0,5M EDTA pH 8,0 e 1M Tris-HCl pH 7,4) sobre a colônia, seguida da adição de uma solução contendo 1,8M de NaOH e SDS 10%, finalizando com a adição da solução 0,18 M de NaOH e SDS 1%. A precipitação de restos celulares foi realizada através de centrifugação, seguida da filtragem da solução restante em filtro Millipore (MAGV N22). A precipitação do plasmídeo foi realizada através da adição de isopropanol seguida de centrifugação. O plasmídeo foi ressuscitado em água.

9 – Sequenciamento e análise das seqüências

A reação de amplificação dos fragmentos contidos nos plasmídeos foi

realizada utilizando-se o kit DYEnamic ET Dye Terminator (GE Healthcare). O sequenciamento foi realizado no equipamento MegaBACE 1000 DNA Analysis System (GE Healthcare).

A reação de sequenciamento foi realizada a partir de 5,0 pmol do iniciador pGEM-F ou EXCEL-R e aproximadamente 1.000ng do DNA plasmidial. Para a reação foram utilizadas as seguintes condições: 95°C por 25s, seguidos de 35 ciclos com desnaturação de 95°C por 15s, anelamento de iniciadores a 50°C por 20s e extensão a 60°C por 90s.

Os produtos desta reação foram precipitados com isopropanol 70% e eletroinjetados a 2KV por 100 segundos e eletroeluídos por 140 minutos a 7KV.

A qualidade das sequências foi realizada com o Phred (Phred ≥ 15) do programa Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN,1998). O algoritmo CAP3 foi usado para a montagem dos *contigs* (HUANG; MADAN, 1999), com o objetivo de obter seqüências contínuas formadas pela sobreposição de pelo menos duas ESTs. As seqüências obtidas foram comparadas com a base de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando-se a ferramenta BLASTn.

10 – Padronização da metodologia de PCR em Tempo Real (RT-PCR) para detecção do WSSV

A metodologia de RT-PCR foi padronizada para a detecção e determinação da carga viral do WSSV. Dois pares de iniciadores foram desenhados a partir do produto de PCR *Nested* de 941 pb (Item 5), utilizando-se o programa Primer Quest (Integrated DNA Technology-IDT):

WS1F: 5'-CGTGCTGGCGATGACATTCCAATA-3';

WS1R: 5'-TTGAACCATCAAGACTCGCCCTCT-3';

WS2F: 5'-TGCCCTTGCCGAAATTAGTGTGTG-3';

WS2R: 5'-ACAACATCCAACAATGGTCCCGTG-3'.

O produto amplificado pelos iniciadores WS1 tem 126 pb, enquanto o produto dos iniciadores WS2 tem 81 pb. A reação de PCR foi realizada com o sistema Absolute QPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific), utilizando-se o *mix* contendo ThermoStart™ DNA Polimerase, tampão da reação, dNTPs, MgCl₂ 3 mM e SYBR Green I, na concentração 1X. Os ensaios foram realizados no aparelho Rotor Gene 6000 (Corbett Lifesciences).

Para determinar as concentrações ideais de iniciadores e amostra, foram realizadas curvas de concentração com os dois pares de iniciadores. As concentrações de iniciadores testadas foram de 50, 70, 100 e 120 nM. As concentrações de amostras testadas foram: 300, 150, 100, 50, 10, 1 e 0,1 ng/μl. As condições de reação utilizadas para os dois pares de iniciadores foram: 95° C por 15 min, seguido de 35 ciclos de 95° C 30 s, 55° C 30 s e 72° C por 10 s. Uma curva de dissociação (*melting*), através do aumento de 1° C a cada 5 s, de 72° C a 95° C, também foi realizada.

Uma curva de concentração de um plasmídeo contendo um número de cópias conhecido do fragmento proveniente do segundo passo da PCR *nested* (Item 5) foi realizada. O plasmídeo foi linearizado com Eco RI, purificado com o sistema GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) e quantificado em espectrofotômetro. O número de cópias do plasmídeo foi calculado com a seguinte fórmula:

$$y \text{ (cópias/ml)} = \frac{N_A \text{ (cópias/mol)} \times C \text{ (g/ml)}}{N_b \text{ (pb)} \times 660 \text{ (g/mol pb)}}$$

Onde N_A é o número de Avogrado ($6,022 \times 10^{23}$), C é a concentração do plasmídeo, N_b é o número de bases do plasmídeo (Al et al., 2008). Diluições seriadas do plasmídeo foram feitas, de $3,5 \times 10^7$ a 3,5 cópias/ μ l e foram usadas como curva padrão para a quantificação da carga viral. Amostras positivas e negativas por PCR convencional foram quantificadas através da comparação com esta curva. Todas as amostras foram testadas em duplicata. O software disponível no aparelho Rotor Gene 6000 transformou os valores brutos de fluorescência em uma escala logarítmica, e assim o *threshold* foi delimitado baseando-se no coeficiente de correlação (R^2) e na eficiência da curva. O valor de CT foi determinado como o ciclo em que a amostra cruza o *threshold*. A carga viral das amostras pode ser expressa em nº de cópias/g de tecido (DURAND et al., 2003) ou em cópias/ml (World Health Organization, XIAO et al., 2008). Para calcular o nº de cópias/g foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ cópias/g de tecido} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ cópias por microlitro de DNA total extraído}) (\text{volume total de DNA extraído})}{\text{g de tecido usado para extrair o DNA total}}$$

RESULTADOS

1 – *Nested* PCR para a detecção do WSSV e PCR para detecção do IHNV

Amostras de camarão foram coletadas em 11 fazendas no estado de Santa Catarina, no período de janeiro de 2005 a fevereiro de 2008. De um total de 120 amostras analisadas, 30 foram positivas para o WSSV (Tabela 1). A Figura 9 mostra um gel representativo da amplificação de amostras positivas para o WSSV.

Tabela 1: Localização das fazendas e número de indivíduos positivos para WSSV.

Fazenda	Localização	Positivos	n°
1	Laguna	0	6
2	Laguna	1	5
3	Laguna	<i>pool</i>	<i>pool</i>
4	Laguna	<i>pool</i>	<i>pool</i>
5	Laguna	<i>pool</i>	<i>Pool</i>
6	Barra do Sul	0	36
7	Laguna	0	10
8	Governador Celso ramos	1	15
9	Araquari	1	10
10	Laguna	0	10
11	Laguna	24	25
Total	11 fazendas	30	120

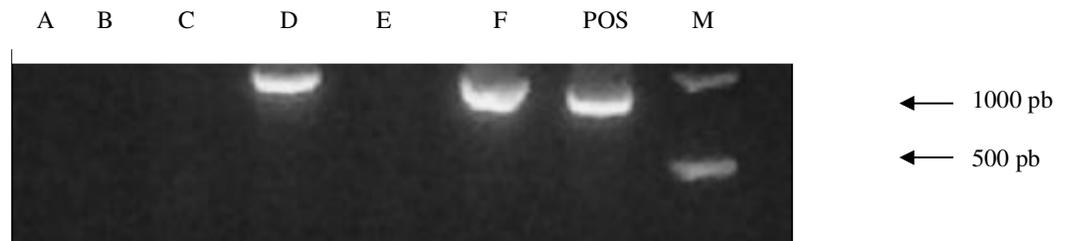


Figura 9: Gel de agarose 2% de produtos de PCR obtidos da amplificação do DNA genômico de pleópodes de *L. vannamei*. A-F: Amostras de campo. POS: controle positivo da reação. M: Marcador de peso molecular 1 kb.

Amostras positivas para WSSV que seriam utilizadas para a subtração de cDNA (Capítulo 3) e algumas amostras negativas para este vírus (fazendas onde todos os animais foram negativos), foram utilizadas para a detecção de IHHNV. As amostras que apresentaram a banda de 515 pb foram consideradas positivas para IHHNV (Figura 10). Apenas uma amostra, negativa para WSSV, foi positiva para o IHHNV e não foi utilizada na subtração de cDNA.

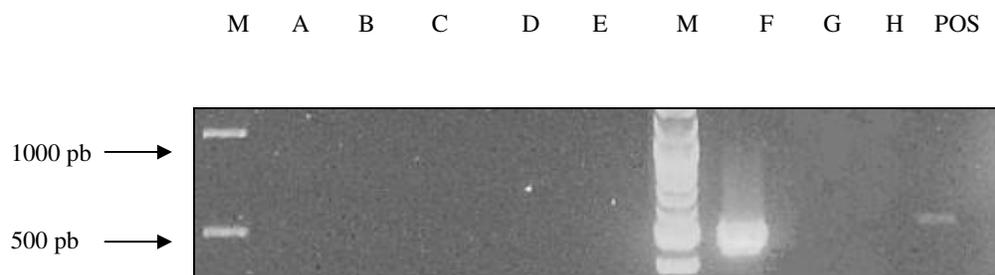


Figura 10: Gel de agarose 2% de produtos de PCR obtidos da amplificação do DNA genômico de pleópodes de *L. vannamei*. A-H: Amostras de campo. POS: controle positivo da reação. M: marcador de peso molecular.

2 – Clonagem e seqüenciamento

Os fragmentos amplificados no primeiro passo da PCR para WSSV (1449 pb), o fragmento amplificado no segundo passo (941pb) e o fragmento amplificado na PCR para IHNV (515 pb) foram clonados e seqüenciados. Após o seqüenciamento do produto do primeiro passo da PCR, obteve-se uma seqüência de 1025 pb (Figura 11). Esta seqüência apresentou 99% da identidade, com um valor de E de 0,0, com parte da seqüência genômica do WSSV (AF332093.1) (Figura 12). O resultado do seqüenciamento do produto de *Nested* PCR foi uma seqüência de 942 pb (Figura 13). Esta seqüência apresentou 98% de similaridade, com um valor de E de 0,0 com parte da seqüência genômica do WSSV (código de acesso: AF332093.1) (Figura 14), confirmando que os dois fragmentos amplificados correspondem ao WSSV.

```

1  TGAGAGAGGAGGAGTATCTCAGCTTGGCTCACCGGGTTAAGCTCTCCTTG
51  GTGACACGGGGCGGTAGCGAATCACTAGTGATTGTAACCTGCCCTTC CAT
101  CTCACCCACACTTTTACTCCCTCAGAT AOCGAGCATCTG-GTATCC TCTTT
151  CGGATTGCCC CGCCC AGAAGTCTCC ATGGAAAGAAATTAAGAGCC AC AC CC
201  TATCAGGCCAAC AAGCTTATTAGTGAC AAACATTACGTGATGAACATGT
251  CC AAGATCGATTCTAGAGTAACAGGATC TTCCC TCTTTAAGAAGGTTAG
301  TGGACTGAAATGAGAATGAACCTCCAACCTTTAATGGAAACATTTGAACCAT
351  CAAGACTCGCCCTCTCCAACCTCGGCATGAC AACGGC AGGAGTCAAACCTC
401  GACGTTATTGTCAAACC AAATAATGCAAGAAGTG-TACTAGGAAT ATTGG
451  AATGTCAATGCCAGCACGTGTGCACCGCCGACGCCAAGGGAACTGTCGCT
501  TCAGCCATGCCAGCCGTCT TCCAGGC AACC GATGGA AACGGTAAC GAATC
551  TGAACCTGATCCAGAATGCTCTGCCAAGGAACAGATACATCC AAAAGAGCA
601  CAATGAAAGCTCAAACCTGTGCTTGTCTAATGTTTTGGAACAAC TTATCG
651  CC GATCTTGAAAGGTTATCGTGAACGAACTGGCCGGCAACC ATC GCTGAAT
701  CTGTACCAGAAAGOGTATATGAAAAC ACCAAGGAAATGAT TGATAGACTA
751  GGCCTGTGACGACCTCTTC AAATCTAATAAT AATGGAGGAGTAGAATCAAT
801  GGATTATGAAGATAGCGAAAC AACATCCAAC AATGGTCCC GTCTCATCT
851  CAGAAGCC ATGGAGAATGCCCTCTATCACACACTAATTTCCGGCAAGGC A
901  GCTGCC CGGAAAATGTACC AITCGCCTCATGCGCCAGCGGCC TCTGGCC
1001  TTTGATTTCCTCTGTCAAAGGGAGATACATTGGAAGAAAAGAAGCCCG
1051  AAC AAGGTGCAGCAGCTCCCGTAA

```

Figura 11: Seqüência do fragmento de 1025 pb.

Query	81	ATTGTAACAGGCCCCCTCCATCTCCACCCACACTTTTACTCCCTCAGATAACGAGCATCTGG	140
Sbjct	224509	ATTGTAACAGGCCCCCTCCATCTCCACCCACACTTTTACTCCCTCAGATAACGAGCATCTGG	224568
Query	141	TATCCTCTTTGGCATTTCGCCCGCCAGAGTCTCCATGGAAGAAATAGAGCCACACCCCT	200
Sbjct	224569	TATCCTCTTTGGCATTTCGCCCGCCAGAGTCTCCATGGAAGAAATAGAGCCACACCCCT	224628
Query	201	ATCAGGCCAACAGCTTATTAGTGACAAACATTACGTGATGAACATGTCACAGATCGATT	260
Sbjct	224629	ATCAGGCCAACAGCTTATTAGTGACAAACATTACGTGATGAACATGTCACAGATCGATT	224688
Query	261	CTAGAGTAACAGGATCTTCCTCTTTAAGAGGTTAGCGAATGGACTGAAATGAGAATGA	320
Sbjct	224689	CTAGAGTAACAGGATCTTCCTCTTTAAGAGGTTAGCGAATGGACTGAAATGAGAATGA	224748
Query	321	ACTCCAACCTTAAATGGAACATTTGAACCATCAAGACTCGCCCTCTCCAACCTTGGCATGA	380
Sbjct	224749	ACTCCAACCTTAAATGGAACATTTGAACCATCAAGACTCGCCCTCTCCAACCTTGGCATGA	224808
Query	381	CAACGGCAGGAGTCAACCTCGACGTTATTGTCAAAACCAATAATCAAGAGGTACTAGT	440
Sbjct	224809	CAACGGCAGGAGTCAACCTCGACGTTATTGTCAAAACCAATAATCAAGAGGTACTAGT	224868
Query	441	GAAATTTGGAATGTCATCGCCAGCAGTGTGCACCCGCCGACGCCAAGGAACTGTGCTT	500
Sbjct	224869	GAAATTTGGAATGTCATCGCCAGCAGTGTGCACCCGCCGACGCCAAGGAACTGTGCTT	224928
Query	501	CAGCCATGCCAGCCGCTCTCCAGGCCAACCGATGGAACGGTAACGAAATCGAACTGATCC	560
Sbjct	224929	CAGCCATGCCAGCCGCTCTCCAGGCCAACCGATGGAACGGTAACGAAATCGAACTGATCC	224988
Query	561	AGAATGCTCTGCCAAGGACAGATACATCCAAAGAGCACAAATGAACGCTCAAACGTGCG	620
Sbjct	224989	AGAATGCTCTGCCAAGGACAGATACATCCAAAGAGCACAAATGAACGCTCAAACGTGCG	225048
Query	621	TGCTTGCCTAATGTTTGGAAACACTTATCGCCGATCTTGGAAAGGTTATCGTGAACGAAAC	680
Sbjct	225049	TGTTTGCCTAATGTTTGGAAACACTTATCGCCGATCTTGGAAAGGTTATCGTGAACGAAAC	225108
Query	681	TGGCCGGCACCCATCGCTGAATCTGTACCCAGAAAGCGTATATGAAAACACCAAGGAAATGA	740
Sbjct	225109	TGGCCGGCACCCATCGCTGAATCTGTACCCAGAAAGCGTATATGAAAACACCAAGGAAATGA	225168
Query	741	TTGATAGACTAGGCTCTGACGACCTCTTCAAAATCTAATAATAATGGAGGAGTAGAATCAA	800
Sbjct	225169	TTGATAGACTAGGCTCTGACGACCTCTTCAAAATCTAATAATAATGGAGGAGTAGAATCAA	225228
Query	801	TGGATTATGAAGATAGCGAAACAACTCCAAACATGGTCCCGTCTCATCTCAGAAAGCCA	860
Sbjct	225229	TGGATTATGAAGATAGCGAAACAACTCCAAACATGGTCCCGTCTCATCTCAGAAAGCCA	225288
Query	861	TGGAGAATGCCGCTATCACAACAATAATTCGGCAAGGCAGCTGGCCGGAAATGTAC	920
Sbjct	225289	TGAAGAATGCCGCTATCACAACAATAATTCGGCAAGGCAGCTGGCCGGAAATGTAC	225348
Query	921	CATTGCGCTCATGCGCCAGCGGCCCTCTCGCCTTTGATTTCCCTCTGTCAAAGGGAGATA	980
Sbjct	225349	CATTGCGCTCATGCGCCAGCGGCCCTCTCGCCTTTGATTTCCCTCTGTCAAAGGGAGATA	225408
Query	981	CATTGCAAGAAAAGAACGCCGACCAAGGTCAGCAGCTGCCGTA	1024
Sbjct	225409	CATTGCAAGAAAAGAACGCCGACCAAGGTCAGCAGCTGCCGTA	225452

Figura 12: Alinhamento do fragmento de 1025 pb com a sequência genômica do WSSV.

```

1   TACGGCAGCTGCTGCACCTTGTTCGGGCTTCTTTTCTCGAATGTAICTC
51  CTTTGTACAGAAAGGAAATCAAAGGCGAGAGGGCCGCTGGCCGATGAGGCG
101 AATGGTACATTTTCCGGGCGAGCTGCCTTGCAGGAAATAGTGTGTGATA
151 GACGGCATTCTTCATGGCTTCTGAGATGAGGACGGGACCATTTGTGGATG
201 TTGTTTCGCTATCTTCATAATCCATTGATTTCTACTCCTCCATATATTA
251 GATTTGAAGAGGTCGTCAGAGCCTAGTCTATCAATCATTTCTTGGTGT
301 TTCATATACGCTTTCTGGTACAGATTCAAGCATGGTGGCCGACAGTTCTGT
351 TCACGATAACCTTTCCAAGATCGGCCGATAGTTGTCCAAACATTAGCA
401 AACACGACAGTTTGGCGTTTCATTTGTGCTCTTTTGGATGATCTGTTCCT
451 TGGCAGAGCATTCTGGATCAGTTCAAGATTGTTTACCCTTCCATTCCGT
501 TCTCTGGAAGTCGGCTGGCATGGCTTGAAGCGACAGTTCCCTTGGCGTCG
551 GCGGTGCACACGTCGCTGGCGATGACATTTCAAATATTTCTAGTACACTTCT
601 TGCAATATTTGGTTTACATATTTACGTGGAGGTTGACTCCTTCCGTTGTCT
651 ATGCCAGAGTTGGAGAGGGCCGATTTCTGATGGTTCAAATGTTCCATTAAA
701 GTTGGAGTTCAATCTCATTTCAAGTCCATTGCTAACCTTCTTAAAGGAGGG
751 AAGTACCTGTACTCTAGATCGATCTTGGACATGTTCAACAGGTAATGT
801 TTGTCACATAAAGCTTGTGGCCGATAGGGTGTGGCTCTAATTTCTTCTC
851 CATGGAGACTTCTGGGCGGGCAATGCGAAGAGGATACCAGATGCTCCT
901 TATCTGAGGGAGTAAAATGTGTGGAGAGGAGGGCAGTCA

```

Figura 13: Sequência do fragmento de 942 pb.

Query	1	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGTTCGGCGTTCCTTTCTTCGAATGTATCTCCCTTTGACAG	60
Sbjct	225452	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGTTCGGCGTTCCTTTCTTCGAATGTATCTCCCTTTGACAG	225393
Query	61	AAGGAAATCAAAGGCGAGAGGGCCGCTGGCGCATGAGGCGAATGGTACATTTTCCGGGCG	120
Sbjct	225392	AAGGAAATCAAAGGCGAGAGGGCCGCTGGCGCATGAGGCGAATGGTACATTTTCCGGGCG	225333
Query	121	AGCTGCCITGCGGAAATAGTGTGTGATAGACGGCATTCTTCATGGCTTCTGAGATGAG	180
Sbjct	225332	AGCTGCCITGCGGAAATAGTGTGTGATAGACGGCATTCTTCATGGCTTCTGAGATGAG	225273
Query	181	GACGGGACCATTGTTGGATGTTGTTTCGCTATCTTCATAATCCATTGATTCTACTCCTCC	240
Sbjct	225272	GACGGGACCATTGTTGGATGTTGTTTCGCTATCTTCATAATCCATTGATTCTACTCCTCC	225213
Query	241	ATTATTATTAGATTTGAAGAGTGTGTCAGAGCCTAGTCTATCAATCATTTCCTTGGTGT	300
Sbjct	225212	ATTATTATTAGATTTGAAGAGTGTGTCAGAGCCTAGTCTATCAATCATTTCCTTGGTGT	225153
Query	301	TTCATATACGCTTCTGGTACAGATTCAGCGATGGTGGCCGACAGTTCGTTCCAGATAAC	360
Sbjct	225152	TTCATATACGCTTCTGGTACAGATTCAGCGATGGTGGCCGACAGTTCGTTCCAGATAAC	225093
Query	361	CTTTCCAAGATCGGCGATAAGTGTTCAAAACATTAGCAAAACGACAGTTTGAGCGTT	420
Sbjct	225092	CTTTCCAAGATCGGCGATAAGTGTTCAAAACATTAGCAAAACGACAGTTTGAGCGTT	225033
Query	421	CATTGTGCTCTTTGGATGTAICTGTTCTTGGCAGAGCATTCTGGATCAGTTCAGATTTC	480
Sbjct	225032	CATTGTGCTCTTTGGATGTAICTGTTCTTGGCAGAGCATTCTGGATCAGTTCAGATTTC	224973
Query	481	GTTTACCGTTTCCATTGCGTT-CTCTGGAAGTCGGCTGGCATGGCTTGAAGCGACAGTTC	539
Sbjct	224972	GTT-ACCGTTTCCAT-CGGTTGC-CTGGAAGACGGCTGGCATGGCT-GAAGCGACAGTTC	224917
Query	540	CCTTGGCGTGGCGGTGCACACGCTGGCGATGACATTCCAATATTCCTAGTACACTTC	599
Sbjct	224916	CCTTGGCGTGGCGGTGCACACGCTGGCGATGACATTCCAATATTCCTAGTACACTTC	224857
Query	600	TTGCATTATTGGTTTGACATAATACGTGGAGGTTGACTCCTTCCGTTGTTCATGCCAGAG	659
Sbjct	224856	TTGCATTATTGGTTTGACA-ATAACGTCGAGGTTGACTCCTTCCGTTGTTCATGCCAGAG	224798
Query	660	TTGGAGGGCGATTCTTGATGGTCAAATGTTCCATTAAAGTTGGAGTTCATTCTCATT	719
Sbjct	224797	TTGGAGGGCGAGTCTTGATGGTCAAATGTTCCATTAAAGTTGGAGTTCATTCTCATT	224738
Query	720	TCAGTCCATTTCGCTAACCTTCTTAAGGAGGGAAGATCCCTGTTACTCTAGAAATCGATCTTG	779
Sbjct	224737	TCAGTCCATTTCGCTAACCTTCTTAAGGAGGGAAGATCCCTGTTACTCTAGAAATCGATCTTG	224678
Query	780	GACATGTTTCATCACGTAATGTTTGTCACTAATAAGCTTGTGGCCTGATAGGGTGTGGCT	839
Sbjct	224677	GACATGTTTCATCACGTAATGTTTGTCACTAATAAGCTTGTGGCCTGATAGGGTGTGGCT	224618
Query	840	CTAATTTCTTCCATGGAGACTTCTGGGCGGGCGAATGCGAAAGAGGATACCAGATGCTCG	899
Sbjct	224617	CTAATTTCTTCCATGGAGACTTCTGGGCGGGCGAATGCGAAAGAGGATACCAGATGCTCG	224558
Query	900	TTATCTGAGGGAGTAAAA-TGTG-TGGAGA-GGAAGGG-CAGTCACA	942
Sbjct	224557	TTATCTGAGGGAGTAAAAAGTGTGTTGGAGATGGAAGGGGCAATTACA	224511

Figura 14: Alinhamento do fragmento de 942 pb (WSSV) com a seqüência genômica do WSSV.

Após o seqüenciamento do fragmento de 515 pb (IHHNV), foi obtida uma seqüência de 510 pb (Figura 15). Esta seqüência apresentou 99% de similaridade e

um valor de E de 0,0, quando comparada à parte do genoma do vírus IHHNV (Figura 16). Esta região codifica 2 proteínas não-estruturais e proteínas do capsídeo viral (código de acesso: AY355308.1). Assim, este fragmento também foi confirmado como correspondente ao genoma do IHHNV.

```

1   TCGGCGTGTTCCTTCGTCCTTCATTATGTGCATCCCTCCTGGATCTTTTCCT
51  TGGGCTTGTCTCTTGTGARTCGGCGCACATGGTTGTCTATGATGTCGTGG
101 ATTTCTTTTTCGTATTCTTGGAGAGTCCCTAGGAAGTCCGTCGCTGGTGTAT
151 CTTGTCTGGTGGAGGGTTGATGTCTACTGGCTGTTCACTCCTGTCTGAGA
201 GGCCTTTTATTGTCTTGTGAGGTGGAAGGTTTTTGTCTTGTGTTGTAGA
251 GCTTTACCATCAGCTGGAGGTACCCAGTAGTCTATATCCTTGTGTTGTA
301 TATGAAGATTGGTATTCGTCCCATAAATTTCTGACTCTTGGTGTGTTTATGT
351 TTAATCTAAGTCTGATCCTTCGAAAAGGAGTTTGAAGTCCGTCCTGTT
401 ATTTGACTGATTCTGGGTTCTTCGAAGAGAGCGTAGGACCTTCCGATGAG
451 GTTTTGTAGATGGAAGGTTTGGAGTCTCCTGTTCTTGTACTAGGCCAG
501 TGTTTCAGTTT

```

Figura 15: Seqüência do fragmento de 510 pb.

Query	1	TCGGCGTGTTCCTTCGTCCTTCATTATGTGCATCCCTCCTGGATCTTTTCCTTGGGCTTGTCT	60
Sbjct	2505	TCGGCGTGTTCCTTCGTCCTTCATTATGTGCATCCCTCCTGGATCTTTTCCTTGGGCTTGTCT	2446
Query	61	CTTGTGAAATCGGCGCACATGGTTGTCTAIGATGTCGTCGATTTCCTTTTCGTATTCTTG	120
Sbjct	2445	CTTGTGAAATCGGCGCACATGGTTGTCTAIGATGTCGTCGATTTCCTTTTCGTATTCTTG	2386
Query	121	GAAGAGTCCCTAGGAAGTCCGTCGCTGGTGAATCTTGTCTGGTGGAGGGTTGATGTCGACTG	180
Sbjct	2385	GAAGAGTCCCTAGGAAGTCCGTCGCTGGTGAATCTTGTCTGGTGGAGGGTTGATGTCGACTG	2326
Query	181	GCTGTTTCATCCTGTCTGAGAGGCCCTTTTATTGTCTTGTGTCAGGTGGAAGGTTTTTGTCT	240
Sbjct	2325	GCTGTTTCATCCTGTCTGAGAGGCCCTTTTATTGTCTTGTGTCAGGTGGAAGGTTTTTGTCT	2266
Query	241	TGTTTGTAGAGCTTTACCATCAGCTGGAGGTACCCAGTAGTCTATATCCTTGTGTTGTTGA	300
Sbjct	2265	TGTTTGTAGAGCTTTACCATCAGCTGGAGGTACCCAGTAGTCTATATCCTTGTGTTGTTGA	2206
Query	301	TATGAAGATTGGTATTCGTCCCATAAATTTCTGACTCTTGGTGTGTTTATGTTTACTTCTAA	360
Sbjct	2205	TATGAAGATTGGTATTCGTCCCATAAATTTCTGACTCTTGGTGTGTTTATGTTTACTTCTAA	2146
Query	361	GTCTGATCCTTCGAAAAGGAGTTTGAAGTCCGTCCTGTTATTTGACTGATTCTGGGTTTC	420
Sbjct	2145	GTCTGATCCTTCGAAAAGGAGTTTGAAGTCCGTCCTGTTATTTGACTGATTCTGGGTTTC	2086
Query	421	TTCGAAGAGAGCGTAGGACCTTCCGATGAGGTTTTGTAGATGGAAGGTTTGTAGTCTCC	480
Sbjct	2085	TTCGAAGAGAGCGTAGGACTTCCGATGAGGTTTTGTAGATGGAAGGTTTGTAGTCTCC	2026
Query	481	TGTTCTTGTACTAGGCCAGTGTTCAGTTT	510
Sbjct	2025	TGTTCTTGTACTAGGCCAGTGTTCAGTTT	1996

Figura 16: Alinhamento do fragmento de 510 pb com parte do genoma do IHHNV.

3 – Padronização da metodologia de RT - PCR

Dois pares de iniciadores foram testados para a detecção do WSSV, WS 1 e WS 2. Inicialmente, para a padronização das condições de PCR e para a construção da curva de concentração, foi utilizado o plasmídeo contendo o produto do segundo passo da PCR *nested*. Dentre as concentrações de iniciador testadas, a que apresentou o melhor perfil de amplificação foi 100 nM, utilizando-se o conjunto de iniciadores WS 2 (resultados não mostrados).

Uma curva de concentração de $3,55 \times 10^7$ a 3,55 cópias de plasmídeo/ μl foi construída. A Tabela 2 mostra os valores de coeficiente de correlação (R^2), inclinação da reta (*slope* ou M), fator de amplificação ($100\%=2$) e eficiência da reação ($100\%=1$) obtidos para o conjunto de iniciadores WS2.

Tabela 2: Coeficiente de correlação (R^2), inclinação da reta (M), fator de amplificação e eficiência da reação da curva de concentração de WSSV.

Iniciador	R^2	Inclinação	Amplificação	Eficiência
WS2	0,95	-3,043	1,75	100%

Após a construção da curva de concentração, amostras de DNA de pleópodes de camarão foram testadas. Foram utilizadas amostras diagnosticadas como positivas e negativas através de PCR *Nested*. Dentre as concentrações de amostras testadas, foi selecionada a concentração de 100 ng/ μl , que apresentou o melhor perfil de amplificação, formando apenas um pico, através da análise do perfil de dissociação.

Foram testados dois protocolos de extração de DNA das amostras. O Protocolo 1 foi desenvolvido no laboratório e baseia-se na separação do DNA através da adição de clorofórmio e álcool isoamílico, enquanto o Protocolo 2 baseia-se na purificação do DNA através de sua passagem por uma coluna de fibra de vidro, onde o DNA se liga e é separado dos outros componentes celulares. As amostras purificadas com o Protocolo 2 tem um valor de CT menor que as mesmas amostras purificadas com o Protocolo 1 (Tabela 3). O Protocolo 2 foi selecionado para a extração do DNA das amostras utilizadas no presente trabalho.

Tabela 3: Comparação dos CTs das amostras purificadas através do Protocolo 1 e do Protocolo 2.

Amostra	Protocolo	CT	Protocolo	CT
A	1	15,875	2	11,92
B	1	13,72	2	13,025
C	1	15,13	2	12,515
D	1	15,335	2	15,265
E	1	27,49	2	25,32

Amostras positivas e negativas por PCR *Nested* foram analisadas por RT-PCR. Na Tabela 4 estão apresentados os valores de CT e o número de cópias determinado através da comparação com a curva padrão. Os camarões utilizados nesta análise eram provenientes de regiões com mortalidade de animais.

Tabela 4: Quantificação das amostras de pleópodes de *L. vannamei* através de RT-PCR. N.D.: não detectado.

Amostra	CT	Cópias/g de tecido	Cópias/ml
1	12,99	1,53x10 ⁶	1,53x10 ¹⁰
2	11,33	5,34 x10 ⁶	5,34 x10 ¹⁰
3	11,05	6,62 x10 ⁶	6,62 x10 ¹⁰
4	32,77	4,84	4,84x x10 ³
5	25,46	3,26 x10 ³	3,26 x10 ⁷
6	14,12	1,73 x10 ⁷	1,73 x10 ¹¹
7	12,75	4,89 x10 ⁷	4,89 x10 ¹¹
8	14,69	1,13 x10 ⁷	1,13 x10 ¹¹
9	15,89	4,54 x10 ⁶	4,54 x10 ¹⁰
10	N.D.	0	0
11	27,76	2,14 x10	2,14 x10 ⁴
12	34	1,90	1,90x10 ³

As amostras de 1-3 e 6-9 podem ser consideradas amostras com a carga viral alta. A amostra 5 é carga moderada, enquanto as amostras 4, 11 e 12 têm a carga viral baixa (SOUZA, 2008). A amostra 10 é negativa. É importante destacar que a amostra 4 é negativa por PCR *Nested*, enquanto a amostra 12 é positiva por *Nested* PCR.

Além disso, a carga viral de camarões coletados durante um surto de Mancha Branca e de camarões da mesma fazenda e do mesmo povoamento (“sobreviventes”) coletados oito meses depois foi comparada (Tabela 5). As amostras 13 e 14 são da primeira coleta (durante o surto) e são positivas por PCR *Nested*. As amostras 15 e 16 foram coletadas oito meses depois e são negativas por PCR *Nested*. Este resultado indica que os animais da segunda coleta são carreadores assintomáticos do WSSV. As amostras 15 e 16 têm a carga viral muito menor que as amostras 13 e 14, indicando tratar-se de uma infecção leve. Através da análise da curva de dissociação, observou-se um pico único em todas as amostras positivas (Figura 17).

Tabela 5: Quantificação das amostras de pleópodes de *L. vannamei* através de RT-PCR.

Amostra	CT	Cópias/g de tecido	Cópias/ml
13	29,15	4,27 x10 ⁶	4,27 x10 ¹⁰
14	26,25	4,08 x10 ⁵	4,08 x10 ⁹
15	31,9	9,31	9,31 x10 ³
16	30,05	3,77	3,77 x10 ³

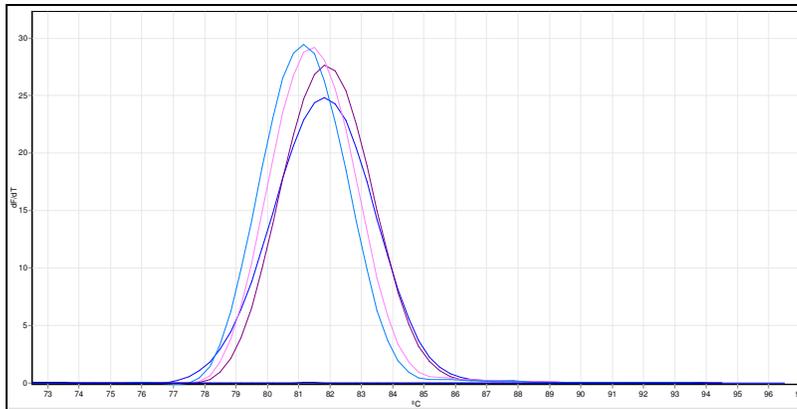


Figura 17: Curva de dissociação de amostras de pleópodes de camarão.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, a metodologia de RT-PCR foi padronizada para a detecção de WSSV em camarões *L. vannamei*. A maioria dos ensaios de PCR convencional permite apenas uma resposta qualitativa. A PCR-RT permite uma verdadeira quantificação dos resultados (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002). Uma das principais características da PCR-RT é a medida da amplificação do DNA a cada ciclo, ao invés da amplificação acumulada ao final dos ciclos. A medida é feita durante a fase exponencial da PCR, o que é mais confiável do que a medida dos produtos finais da reação (TANG; LIGHTNER, 2001). A técnica é sensível o bastante para a detecção de cópias únicas do genoma viral, e útil para a detecção do vírus em animais assintomáticos. Além disso, esse procedimento permite que muitas amostras sejam testadas ao mesmo tempo, de forma mais rápida e menos trabalhosa, com uma drástica diminuição do risco de contaminação (MARQUES; MOSER; MÜLLER, 2006).

Os camarões foram coletados e inicialmente analisados por PCR convencional para a detecção de WSSV. As amostras positivas para WSSV e algumas amostras negativas foram analisadas para determinar também a presença de IHHNV. As amostras positivas apenas para o WSSV e amostras negativas para os dois vírus foram utilizadas no experimento de subtração de cDNA (Capítulo 3). Além disso, os fragmentos amplificados foram clonados e seqüenciados, confirmando a especificidade dos iniciadores utilizados. O plasmídeo contendo o inserto do segundo passo da PCR *nested* foi utilizado para a construção da curva padrão de WSSV.

Inicialmente, uma curva padrão foi construída. Os valores de coeficiente de correlação (R^2), inclinação da reta (M), fator de amplificação e eficiência da reação encontram-se dentro do aceitável. Um valor de inclinação da reta de -3,32 indica uma eficiência de amplificação de 100%. Uma eficiência de -3,043 foi encontrada no presente trabalho, próxima de 90%, sendo considerada aceitável. Os dois pares de iniciadores testados apresentaram amplificação dos produtos esperados, mas o conjunto WS2 foi selecionado por apresentar valores de CT menores (maior eficiência da reação). O limite mínimo de detecção foi de 3,55 cópias virais/ μ l. Este limite está de acordo com o encontrado em outros estudos com WSSV, na faixa de 4 a 10 cópias do genoma viral (DURAND; LIGHTNER, 2002; GRANJA et al., 2006; BAUMGARTNER et al., 2009).

Foram quantificadas amostras de DNA de pleópodes positivas para WSSV através de PCR *Nested* e algumas amostras negativas. Dois protocolos de extração de DNA foram comparados. As amostras extraídas de acordo com o Protocolo 2 apresentam valores de Ct menores que aquelas extraídas de acordo com o Protocolo 1. Uma das etapas do Protocolo 2 envolve a retirada de inibidores de PCR da amostra. Este passo provavelmente aumenta a eficiência da reação. De acordo com Tichopad, Didier e Pfaffl (2004), a presença de hemoglobina, gordura, glicogênio, constituintes celulares, Ca^{2+} , a concentração de DNA ou RNA e proteínas que se ligam ao DNA são importantes fatores inibitórios da reação. Além disso, fatores externos como o pó das luvas e compostos fenólicos usados na extração podem alterar a reação. O Protocolo 2, devido ao menor valor de Ct das amostras, foi utilizado na extração de DNA das amostras utilizadas no presente estudo. Entretanto, o Protocolo 1 também pode ser utilizado, desde que as amostras comparadas sejam sempre extraídas com o mesmo sistema. Em estudos em que é

analisado um grande número de amostras, ou em laboratórios de diagnóstico, o Protocolo 1 apresenta a vantagem de ter um custo menor. O Protocolo 2, por outro lado, é mais rápido, diminuindo o tempo entre a análise e a obtenção dos resultados.

As amostras de *L. vannamei* utilizadas são provenientes de fazendas com sintomas de mortalidade por WSSV e fazendas assintomáticas. Diferentes autores classificam as cargas virais como alta, moderada e baixa em comparação com a quantidade de vírus quantificada nas amostras (Tabela 5).

De Souza (2008), em um estudo realizado em nosso laboratório, determinou como carga viral alta ou infecção severa, amostras com mais de 5×10^5 cópias/ μl , como carga viral moderada aquelas entre 5×10^5 a 1×10^3 cópias/ μl e como carga baixa ou infecção leve aquelas entre 1×10^2 e 10 cópias/ μl . O autor levou em consideração o Esquema de Graduação da Severidade de uma Infecção publicado por Lightner (1996), a análise dos resultados gerados em seu estudo e os dados dos três trabalhos citados na Tabela 5. No presente trabalho, de 12 amostras de coletadas em fazendas com mortalidade, 7 apresentavam um grau de infecção alto, 1 um grau moderado e 3 um grau de infecção baixo. A predominância de animais com um grau de infecção elevado era esperada, já que as amostras foram coletadas em fazendas com sintomas de mortalidade.

Tabela 6: Diferentes classificações de carga viral baseadas na quantificação por PCR ou RT-PCR.

Classificação da carga	Carga viral (cópias virais/reação)		
	viral/infecção		
Alta/Severa	$>2 \times 10^3$	2×10^4	$>10^5$
Moderada	2×10^3	2×10^3	10^3 a 10^5
Baixa/Leve	2×10^2	20 a 2×10^2	10 a 10^2
Muito baixa/leve	$\leq 2 \times 10^1$	-	-
Referência	Peng et al. (2001)	Kiatpathomchai et al. (2001)	Shekhar et al. (2006)

Foram encontrados animais positivos assintomáticos e negativos para PCR *Nested* em uma fazenda oito meses após um surto de WSSV. Sritunyalucksana et al. (2006), encontraram de 500 a 2500 cópias (infecção leve a moderada) do vírus em animais assintomáticos. No presente trabalho, os animais assintomáticos tinham 93 e 377 cópias de vírus/ μ l de amostra. De acordo com Peng et al. (2001), a graduação das infecções é um parâmetro importante para o acompanhamento do vírus da Mancha Branca em sistemas de cultivo, de modo a contribuir para um manejo mais eficaz de pós-larvas e reprodutores. O desenvolvimento de metodologias sensíveis o suficiente para detectar animais com baixa carga viral é de suma importância para o manejo das fazendas e para o fornecimento de pós-larvas certificadas para o povoamento das fazendas. Segundo Sritunyalucksana et al. (2006), em locais com prevalência abaixo de 10%, é possível a ocorrência de resultados falso-negativos nas PCRs. Falsos-negativos podem resultar em grandes mortalidades e perdas econômicas (Powell et al., 2006). A RT-PCR mostra-se uma alternativa para o diagnóstico do WSSV nestes casos.

De Souza (2008) determinou que o limite de detecção da PCR *Nested* utilizada em nosso laboratório é de $3,55 \times 10^5$ cópias virais/reação. Lo et al. (1996a), encontraram até 4 cópias de WSSV/ng de DNA total com os mesmos iniciadores

para PCR *Nested* utilizados no presente trabalho e Sritunyalucksana et al. (2006), encontraram um limite de detecção de 1×10^2 cópias. Esta grande diferença pode ser devida a fatores como a metodologia de extração de DNA e o tipo de DNA polimerase utilizada na reação de PCR. Uma maior eficiência na amplificação aumenta a sensibilidade do método.

No presente trabalho, a metodologia de PCR-RT foi padronizada para a detecção de WSSV em camarões *L. vannamei*, utilizando-se iniciadores específicos para o WSSV encontrado em amostras de Santa Catarina e o corante SYBR Green I. O limite mínimo de detecção da metodologia foi de 3,55 cópias virais/ μ l de amostra.

O limite de sensibilidade da PCR-RT foi comparado com a PCR *Nested* utilizada para o diagnóstico de WSSV. A PCR *Nested* foi capaz de detectar até $3,55 \times 10^5$ cópias do genoma viral, um limite de detecção muito maior que o da PCR-RT. Este limite está acima do determinado para esta técnica em outros estudos.

Amostras positivas e negativas através de PCR *Nested* foram quantificadas através de PCR-RT. Todas as amostras positivas por PCR *Nested* também foram positivas por PCR-RT, entretanto, algumas amostras negativas por PCR *Nested* tratavam-se de positivos fracos. Este resultado mostra a importância do desenvolvimento de técnicas sensíveis o suficiente para identificar indivíduos positivos com baixa carga viral. A identificação de infecções leves é importante principalmente em fazendas produtoras de pós-larvas, onde o ideal é a produção de pós-larvas livres de patógenos. Fazendas povoadas com animais com animais portadores do vírus ("falsos-negativos") podem desenvolver a enfermidade após situações de estresse ambiental

A metodologia de PCR-RT mostrou-se útil para a determinação da carga viral em situações onde há a necessidade de monitorar animais assintomáticos ou isolar animais livres de patógenos, como por exemplo, a produção de pós-larvas e a importação de animais. Por tratar-se de uma metodologia cara, não é recomendada para análises rotineiras, onde se pode utilizar a PCR *Nested*.

CAPÍTULO 2

Genotipagem de isolados geográficos de WSSV do Brasil e comparação com outros isolados da América

INTRODUÇÃO

O vírus da Mancha Branca (WSSV) é um patógeno viral que tem causado grandes perdas na carcinicultura, desde 1993 (LO et al. 1996a, NANHAI et al. 2005). Após sua primeira ocorrência em Fujian na China, entre 1991 a 1992 (CAI et al. 1995; FLEGEL 1997), o vírus se espalhou rapidamente pelo continente asiático (INOUE et al. 1994; LO et al. 1999). O vírus foi encontrado no continente americano pela primeira vez nos EUA em 1995 (NUNAN; LIGHTNER 1997), e após isso foi identificado em vários países do continente (México, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Panamá, Equador e Colômbia) (INFOFISH 1999).

O WSSV também foi identificado em fazendas de camarão no Sul (Santa Catarina) e no Nordeste (Ceará e Bahia) do Brasil (OIE 2005ab; LIGHTNER relatório não publicado). Antes do aparecimento da doença em Santa Catarina, aproximadamente 100 fazendas produziam 4.100 tons de camarão, mas em 2006 e 2007 apenas trinta fazendas produziram 100 tons (MELLO; FARIAS 2007). Um surto de Mancha Branca também foi relatado em uma fazenda no Ceará (março de 2005), entretanto, não foram observados outros surtos no Ceará. Em novembro de 2008, um surto de WSSV foi confirmado em fazendas na Bahia, onde uma taxa de sobrevivência de 5% foi observada. Não há informação a respeito da origem da doença no país, já que a importação de crustáceos no Brasil está proibida desde 1999.

O WSSV é um vírus baciliforme, com um nucleocapsídeo envolto por um envelope trilaminar e tem um apêndice similar a um flagelo em uma das extremidades (DURAND et al. 1997; NADALA et al. 1998). O vírus tem um genoma circular dupla fita grande, com cerca de 300 kb (VAN HULTEN et al. 2001; YANG et

al. 2001). O genoma do WSSV codifica 184 ORFs (seqüências de DNA que podem codificar proteínas), a maioria delas com funções desconhecidas. Cerca de 11 ORFs têm homólogos em bases de dados, a maioria representando genes que codificam enzimas para o metabolismo de nucleotídeos, replicação de DNA e modificação de proteínas (VAN HULTEN et al. 2001).

Alguns isolados geográficos de WSSV da Ásia e da América que foram comparados são muitos similares em morfologia, perfil de proteínas e possuem pequenas diferenças no padrão de polimorfismos de comprimentos de fragmentos de restrição (*restriction fragment length polymorphism* – RFLP) (NADALA; LOH 1998; LO et al. 1999; WANG et al. 2000; MARKS et al. 2004). Marks et al. (2004), compararam três isolados de WSSV completamente seqüenciados (Tailândia, China e Taiwan) e encontraram uma similaridade de 99,2%. As diferenças encontradas por estes autores incluem uma deleção grande (ORF 23/24) com cerca de 13.2 kb no WSSV-TH e 1.2 kb no WSSV-CN em relação ao WSSV-TW (Figura 18), uma região variável propensa a recombinação (ORF 14/15), uma variação no número de repetições em tandem (Figura 19), mutações de nucleotídeos únicos envolvendo deleção, inserção e polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) e uma seqüência de uma transposase presente apenas no WSSV-TW.

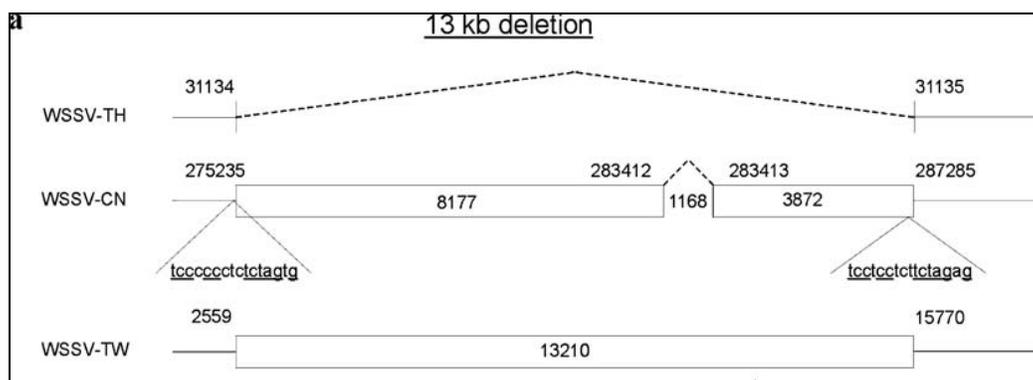


Figura 18: Representação esquemática da ORF 23/24 no WSSV-TH, WSSV-CN e WSSV-TW. Fonte: MARKS et al., 2004.

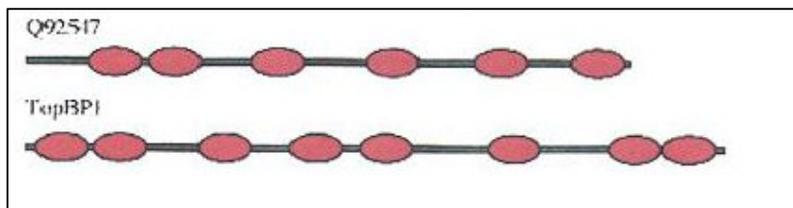


Figura 19: Representação esquemática de um gene com repetições em tandem. Fonte: <http://www-nmr.cabm.rutgers.edu/photogallery/proteins/gif/BRCT-fam.jpg>.

As variações associadas com as ORF ORF 23/24 e ORF 14/15 são utilizadas na identificação de mudanças evolutivas no WSSV (MARKS et al. 2005). As variações no número de repetições em tandem (VNTRs) associada com três minissatélites (unidades de repetição de 7 a 100 pb), ORF 94, ORF 75 e ORF 125, foram sugeridas como potenciais marcadores para estudos epidemiológicos (WONGTEERASUPAYA et al. 2003; DIEU et al. 2004; MARKS et al. 2004; SHEKAR et al. 2005).

Alguns estudos de genotipagem foram realizados para testar a eficácia destes marcadores (WONGTEERASUPAYA et al. 2003; MARKS et al. 2005; PRADEEP et al. 2008). A maioria dos estudos foi realizada em países asiáticos, como Vietnã, Índia e Tailândia. Até onde sabemos, os únicos estudos realizados com isolados americanos utilizaram RFLP (LO et al. 1999; WANG et al. 2000) para comparar amostras de regiões diferentes, mas os autores encontraram poucas diferenças.

A genotipagem do WSSV de isolados brasileiros permitirá uma melhor compreensão da origem dos surtos que ocorreram no Brasil, e se existe apenas um genótipo ou vários genótipos de WSSV no Brasil e nos outros países da América.

OBJETIVOS

Genotipar o WSSV de isolados brasileiros e comparar os resultados com isolados de outros países na América.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a metodologia de PCR para a detecção das ORFs 75, 94 e 125 em WSSV proveniente de camarões *L. vannamei*;
- Padronizar a metodologia de PCR para a detecção da ORFs 23/24 nas mesmas amostras;
- Identificar a presença do gene de uma transposase;
- Seqüenciar os fragmentos obtidos para identificar mutações, como deleções e SNPs;
- Comparar o genoma do WSSV de amostras brasileiras com isolados geográficos de outros países na América.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - Coleta dos animais

Os camarões (*Litopenaeus vannamei*) foram coletados em duas regiões do Brasil em diferentes períodos (Tabela 7). Santa Catarina foi o primeiro estado onde o WSSV foi detectado (OIE 2005a) e localiza-se na região Sul, enquanto a Bahia está localizada a cerca de 2.600 km, na região Nordeste. Os camarões foram coletados de janeiro de 2005 a novembro de 2008 nas fazendas afetadas. Os tecidos foram coletados, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e estocados a -80°C ou preservados em etanol 95%.

Tabela 7: Origem e data de coleta das amostras de *L. vannamei* infectadas com WSSV utilizadas neste estudo.

País	Região	Ano
EUA	Texas	1997
EUA	Carolina do Sul	1997
Panamá	Costa Oeste	1999
Honduras	Golfo de Fonseca	1999
EUA	Havaí	2004
Brasil	Santa Catarina	2005
Brasil	Santa Catarina	2007
Brasil	Santa Catarina	2008
Brasil	Bahia	2008
Nicarágua	Golfo de Fonseca	2008
México	Sonora	2008

2 - Desafio com WSSV

Com o objetivo de gerar amostras positivas para WSSV com carga viral alta, um inóculo de WSSV foi gerado à partir de tecidos congelados (amostras de Santa Catarina) e foi utilizado para desafiar os animais. Os animais utilizados para a inoculação do vírus foram *L. vannamei* SPF (*specific pathogen-free*) (cerca de 3 g) (LIGHTNER, 2005), obtidos do Oceanic Institute, Oahu, Hawaii, EUA. Pleópodes congelados foram homogeneizados em tampão TN (20 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, pH 7,4). O homogenato foi centrifugado a 2500 rpm por 20 min, o sobrenadante obtido foi centrifugado novamente a 5000 rpm por 20 min e o sobrenadante resultante foi diluído 1:20 em NaCl 2%. A infecção experimental foi realizada através da injeção de 0,1 ml da suspensão no abdômen no terceiro segmento abdominal. Os camarões infectados eram examinados diariamente e todos os animais mortos e moribundos eram removidos e congelados. O experimento foi terminado 72 horas após a injeção.

3 - Extração de DNA

O DNA foi extraído de 25-50 mg de pleópodes com o sistema High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) de acordo com as condições do fabricante.

4 - PCR *Nested* para a detecção do WSSV

O WSSV foi identificado por PCR *Nested* utilizando-se os iniciadores descritos por Lo et al. (1996a). Todas as reações foram realizadas com amostras individuais. Cada reação consistiu de tampão 1 X, 200 µM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 200 pmol de cada iniciador e 0,63 U da enzima Taq (Fermentas). As duas etapas de amplificação consistiram de 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s, 62°C por 30 s, e 72°C por 30 s, com uma extensão final a 72°C por 2 min. Todos os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% contendo 0.5

$\mu\text{g l}^{-1}$ de brometo de etídeo. Foi utilizado o marcador de DNA 1 kb.

Tabela 8: Condições de PCR.

Iniciadores	Seqüência	Concentração dos iniciadores	Desnaturação inicial	Desnaturação	Condições de ciclagem Anelamento	Extensão	No. de ciclos	Tamanho do produto
ORF 94	F 5' TCTACTCGAGGAGGTGACGAC 3' R 5' AGCAGGTGTGTACACATTTATTG 3'	25 pmol	95°C 5 min	95°C 20 s	60°C 20 s	72°C 1 min 15 s	40	Variável
ORF 75	F 5' GAAGCAGTAATCTCTAACAC 3' R 5' GAAGCAGTATCTCTAAACAC 3'	25 pmol	95°C 1 min	95°C 30 s	49°C 20 s	72°C 1 min 20 s	36	Variável
ORF 125	F 5' CGAAATCTTGATATGTTGTGC 3' R 5' CCATATCCATTGCCCTTCTC 3'	25 pmol	95°C 1 min	95°C 30 s	52°C 20 s	72°C 1 min 40 s	40	Variável
Transposase	F 5' GTGGATAATATTCGTCTTCAAC 3' R 5' CTCAAAGACAACGACTTAG 3'	25 pmol	95°C 1 min	95°C 30 s	55°C 1 min	72°C 4 min	35	1489 (WSSV-TW) 151 (WSSV-CH)
23/24 ext	F 5' CGACTCGTGGAAAGAAAGAGC 3' R 5' CTTTCTCCCCAACTTCTCC 3'	30 pmol	95°C 15 min	94°C 20 s	50°C 1 min	72°C 8 min	35	Variável
Seq 2324	F 5' TGGGCCGATACGCAAATTGCCACGTT 3' R 5' ATAGAGAACTGCCGAAAGGGCAAA 3'	25 pmol						Variável

5 - Análise das VNTRs

Três regiões minissatélite foram analisadas por PCR: ORF 94 (repetições de 54 bp), ORF 125 (repetições de 69 bp) e ORF 75 (repetições de 45 e 102 pb). Iniciadores específicos para cada gene foram usados e as condições de reação estão na Tabela 8.

6 - Análise da região variável ORF 23/24

As amostras foram analisadas para a presença de uma deleção na região ORF 23/24 utilizando os iniciadores e de acordo com as condições da Tabela 8. Para o seqüenciamento das amostras, como se tratava de um produto muito grande, foram utilizados iniciadores internos à seqüência, construídos à partir da seqüência parcial obtida após o primeiro seqüenciamento.

7 - Amplificação da seqüência de uma transposase

A presença de um gene de uma transposase foi analisada por PCR com os iniciadores e as condições descritas na Tabela 8.

8 - Determinação do numero de repetições

O numero de repetições (unidades de repetição - URs) presentes na ORF 94 foi calculado com a fórmula: $[\text{tamanho do produto de PCR} - (171 + 12)]/54$ e da ORF 125 com a fórmula: $(\text{tamanho do produto de PCR} + 35 - 92)/69$ (Pradeep et al. 2008). No caso da ORF 75, que tem repetições de diferentes tamanhos, o tamanho do produto de PCR foi utilizado para a comparação.

9 - Seqüenciamento dos produtos de PCR e análise das seqüências

Os produtos de PCR foram purificados com o sistema QIAquick PCR purification kit (Qiagen) e seqüenciados no laboratório de seqüenciamento da Universidade do Arizona utilizando um seqüenciador automático (3730xl DNA Analyzer, Applied Biosystems). As seqüências obtidas foram comparadas com genomas do WSSV depositados no banco de dados GenBank e foram analisadas

com o programa BioEdit versao 7.0.9.0 (HALL, 1999). A presença e o número de repetições em tandem foram analisadas com o programa Tandem Repeats Finder (TRF) (BENSON, 1999).

10 - Comparação com amostras de outros países na América

Após a genotipagem dos isolados de WSSV brasileiros, eles foram comparados com isolados de outros países da América (Tabela 7). Foram utilizados isolados da coleção da Universidade do Arizona. As VNTRs (ORF 94, 75 e 125) foram utilizadas na comparação dos isolados.

RESULTADOS

1 - ORF 94

As amostras analisadas apresentaram de 4 a 19 repetições (Tabela 9). Todas as amostras analisadas apresentaram amplificação dos produtos esperados (Figura 20). As amostras de Santa Catarina tiveram produtos de tamanhos similares (cerca de 1000 pb), enquanto as amostras da Bahia produziram um produto menor (417 pb). As amostras foram seqüenciadas e confirmadas como ORF 94, com 99% de similaridade com o isolado TH-96-II ORF94 (Código de acesso no GenBank: AY864669.1). Nas amostras de Santa Catarina foram encontradas 16 repetições de 54 pb, enquanto as amostras da Bahia tinham 4 repetições (Tabela 9). As amostras do Texas e da Carolina do Sul tiveram 5 repetições, Havaí 8, Panamá 12, Honduras 13, Nicarágua 14 e México 19.

Os SNPs dos isolados brasileiros também foram analisados. Apesar das amostras de Santa Catarina terem o mesmo número de repetições, elas diferem quanto ao padrão de nucleotídeos na posição 48 de cada repetição (Tabela 11).

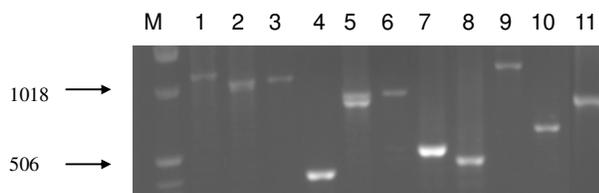


Figura 20: Produtos de PCR da ORF 94.

M) Marcador de 1 kb, 1) Brasil - Santa Catarina, 2008; 2) Brasil - Santa Catarina, 2007, 3) Brasil - Santa Catarina, 2005, 4) Brasil - Bahia, 5) Panamá, 6) Honduras, 7) EUA - Texas, 8) EUA - Carolina do Sul, 9) México, 10) EUA - Havaí, 11) Nicarágua.

2 - ORF 125

O produto esperado foi amplificado em todas as amostras (Figura 21). O número de repetições variou de 7 a 11 (Tabela 9). As amostras de Santa Catarina tinham produtos na faixa de 659 e 684 pb, enquanto a amostra da Bahia tinha um produto de 728 pb. Após o seqüenciamento, os produtos foram confirmados como ORF 125, com 99% de similaridade com o isolado TH-96-II ORF125 (Código de acesso no GenBank: AY864770.1). Todas as amostras de Santa Catarina apresentaram 8 repetições, enquanto as amostras da Bahia tinham 9 repetições (Tabela 9). O México tem 7 repetições, Nicarágua 8, Texas e Carolina do Sul 10 e Panamá, Honduras e Havaí 11.

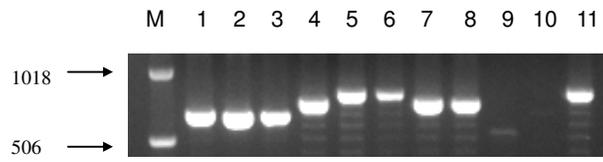


Figura 21: Produtos de PCR da ORF 125. M) Marcador de 1 kb, 1) Brasil - Santa Catarina, 2008; 2) Brasil - Santa Catarina, 2007, 3) Brasil - Santa Catarina, 2005, 4) Brasil - Bahia, 5) Panamá, 6) Honduras, 7) EUA-Texas, 8) EUA - Carolina do Sul, 9) México, 10) Nicarágua, 11) EUA - Havaí.

Tabela 9: Número de repetições encontrados para a ORF 94, 125 e 75 em camarões infectados com WSSV do Brasil e de outros países da América. N.D.: não determinado.

Região	ORF 94		ORF 125		ORF 75	
	Tamanho do produto	No. repetições	Tamanho do produto	No. repetições	Tamanho do produto	No. repetições
EUA - Texas	480	5	767	10	1171	14
EUA - Carolina do Sul	460	5	767	10	N.D.	N.D.
Panamá	847	12	853	11	1112	15
Honduras	896	13	871	11	1171	15
EUA - Havaí	627	8	826	11	489	6
Brasil - Santa Catarina 2005	1100	16	684	8	786	10
Brasil - Santa Catarina 2007	1002	16	659	8	783	10
Brasil - Santa Catarina 2008	1015	16	659	8	784	10
Brasil - Bahia	417	4	728	9	828	11
Nicarágua	967	14	662	8	663	8
México	1242	19	559	7	1084	14

Tabela 10: Número e posição das unidades de repetição (URs) localizadas na ORF 75.

Região	No. URs	Posição das URs de 45 e 102 pb								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
EUA - Texas	14	45	102	45*4	102	45*4	102	45*2		
Panamá	15	45	102	45*4	102	45*2	102	45*2	102	45*2
Honduras	15	45	102	45*4	102	45*2	102	45*2	102	45*2
EUA – Havaí	6	45*3	102	45*2						
Brasil – Santa Catarina	10	45	102	45*2	102	45*2	102	45*2		
Brasil – Bahia	11	45	102	45*3	102	45*2	102	45*2		
Nicarágua	8	45	102	45*2	102	45*3				
México	14	45	102	45*6	102	45*2	102	45*2		

3 - ORF 75

O tamanho dos produtos de PCR para ORF 75 foi de 489 a 1171 pb (Figura 22) e o número de repetições foi de 6 a 15 (Tabela 9). Os produtos de PCR das amostras de Santa Catarina tiveram tamanhos similares (cerca de 780 pb) e após o seqüenciamento dos fragmentos, foram encontradas 10 repetições (Tabela 9). Dois tamanhos de repetições foram encontrados, de 45 e 102 pb (Tabela 10) e o padrão das repetições foi 45, 102, 45x2, 102, 45x2, 102, 45x2. O produto de PCR das amostras da Bahia é maior (828 pb) e após o seqüenciamento e análise, 11 repetições foram encontradas. O padrão das repetições foi 45, 102, 45x3, 102, 45x2, 102, 45x2. Os fragmentos têm 100% de similaridade com o isolado TH-96-II ORF75 (Código de acesso no GenBank: AY864668.1). As amostras do Texas e do México têm 14 repetições. O Havaí tem 6 repetições, Panamá e Honduras têm 15 e a Nicarágua tem 8 repetições. Apenas as amostras da Carolina do Sul não apresentaram produto para esta região. Panamá e Honduras têm o mesmo padrão de repetições, enquanto o Texas e o México têm padrões diferentes.

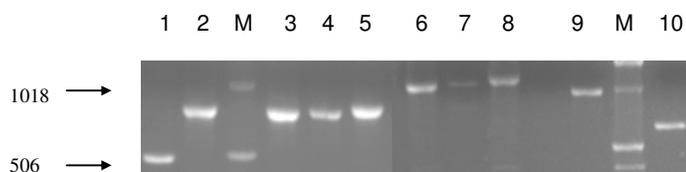


Figura 22: Produtos de PCR da ORF 75. M) Marcador de 1 kb, 1) EUA - Havaí, 2) Brasil - Santa Catarina, 2008; 3) Brasil - Santa Catarina, 2007, 4) Brasil - Santa Catarina, 2005, 5) Brasil - Bahia, 6) Panamá, 7) Honduras, 8) EUA - Texas, 9) México, 10) Nicarágua.

4 - Região variável ORF 23/24.

Após o seqüenciamento, os produtos foram confirmados como parte da ORF 23/24. O alinhamento da seqüência com WSSV-TW foi das posições 2.110 a 2.719 e após esta região uma deleção de 11.453 pb foi observada, seguida de um alinhamento das posições 14.172 a 15.990. A deleção tem o mesmo tamanho nas amostras de Santa Catarina e da Bahia.

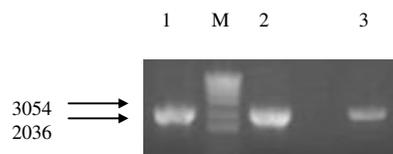


Figura 23: Produtos de PCR para a ORF 23/24. 1) Brasil - Santa Catarina, 2008; 2) Brasil - Santa Catarina, 2007, 3) Brasil - Bahia, M) Marcador de 1 kb.

5 - Transposase

O WSSV-TW codifica um transposase, entretanto, este gene não é encontrado no WSSV-CN ou WSSV-TH. Quando a transposase está presente, os iniciadores utilizados no presente estudo amplificam um produto de cerca de 1330 pb e quando a seqüência está ausente, o produto de PCR tem 150 pb. Todas as amostras analisadas produziram um produto de 150 pb (Figura 24), indicando que os isolados brasileiros não possuem esta transposase.

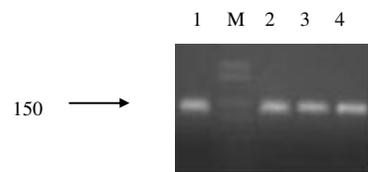


Figura 24: Produtos de PCR para a transposase.1) Brasil - Santa Catarina, 2008; 2) Brasil - Santa Catarina, 2007, 3) Brasil - Santa Catarina, 2005, 4) Brasil - Bahia, M) Marcador de 1 kb.

DISCUSSÃO

Amostras de duas regiões do Brasil foram analisadas e comparadas com outros países da América utilizando marcadores genéticos propostos para o WSSV. Todas as amostras de Santa Catarina mostraram o mesmo padrão para as regiões de minissatélite analisadas. As amostras de Santa Catarina utilizadas neste estudo são do primeiro surto de 2005 e de surtos mais recentes (2007 e 2008). Diferenças em um SNP na posição 48 das repetições da ORF 94 foram encontradas. Em todos os isolados de WSSV caracterizados até hoje, a ORF 94 tem um SNP na posição 48 (guanina ou timina) (DIEU et al. 2004). Esta diferença em SNPs foi encontrada também em isolados de WSSV do Vietnã, Índia, e Tailândia (WONGTEERASUPAYA et al. 2003; DIEU et al. 2004; PRADEEP et al. 2008). Aparentemente, os camarões foram infectados pelo mesmo tipo de WSSV, porém mudanças ocorreram no vírus após sua introdução em Santa Catarina. Segundo Waikhom et al. (2006), a passagem do vírus através de diferentes hospedeiros pode induzir uma alteração genômica e alterar a patogenicidade do vírus.

A amostra da Bahia mostrou um padrão completamente diferente para os três marcadores genéticos analisados, indicando que este WSSV é diferente do WSSV de Santa Catarina. Esta diferença pode ser explicada de várias maneiras. Os vírus encontrados na Bahia e em Santa Catarina podem ter entrado no Brasil por diferentes rotas. Não está claro até hoje, como o vírus foi introduzido no Brasil e se esta introdução foi um fato isolado ou se ocorreram introduções múltiplas. De acordo com Seiffert, Winckler e Maggioni (2005), o vírus pode ter sido introduzido antes da proibição da importação de crustáceos e estava latente até a ocorrência dos surtos. Por exemplo, a doença pode ter se manifestado após uma alteração ambiental que tenha causado um estresse nos animais. De acordo com o mesmo autor, outra forma

possível de introdução do WSSV seriam correntes marinhas vindo do Uruguai, já que este país processa pescado do Equador; ou através de PLs vindas de outros estados, onde a doença não se manifesta. O vírus também pode ter sido introduzido através de água de lastro ou importação ilegal de PL's, camarões ou crustáceos congelados. Outra explicação possível para as diferenças encontradas entre as duas regiões brasileiras são mutações no genoma do WSSV devidas, por exemplo, à adaptação viral a diferentes condições ambientais encontradas em Santa Catarina e na Bahia.

Após caracterizar as amostras brasileiras, elas foram comparadas com amostras de WSSV de países da América. O número de repetições encontradas para a ORF 94 foi de 4 a 19. Este resultado está de acordo com estudos anteriores, onde o menor número de repetições encontrado foi 4 (HOA et al., 2005) e o maior foi 20 (WONGTEERASUPAYA et al., 2003).

No presente trabalho, não foi encontrada a dominância de um tipo particular de repetição, entretanto, houve a dominância de amostras com mais de 9 repetições. Todas as amostras das Américas, com exceção das amostras dos EUA, têm mais de 9 repetições na ORF 94. Este é o mesmo padrão encontrado nas amostras de Santa Catarina (16 repetições). Entretanto, nenhuma das amostras analisadas tinha o mesmo número de repetições das amostras brasileiras. O número de repetições encontradas nas amostras dos EUA estava próximo das amostras da Bahia. Estudos anteriores encontraram uma dominância de 2 a 9 repetições em tanques onde ocorreram surtos da doença (WONGTEERASUPAYA et al. 2003; MUSTHAQ et al. 2006; PADREEP et al. 2008). Entretanto, as amostras de Santa Catarina originavam-se de fazendas com surtos de WSSV e têm 16 repetições. Uma explicação possível é que condições ambientais (baixas temperaturas e/ou qualidade pobre da água) possam ter conferido uma maior virulência à cepa de Santa Catarina, já que o WSSV parece replicar melhor em baixas temperaturas (VIDAL et al. 2001) e Santa Catarina

tem temperaturas de água menores quando comparada à Bahia. Além disso, camarões vivendo em ambientes estressantes são mais suscetíveis a doenças.

O número de repetições encontrado para a ORF 125 foi entre 7 e 11. Estudos anteriores encontraram entre 5 e 8 repetições (DIEU et al. 2004) e 2 a 14 (PRADEEP et al. 2008). As amostras de Santa Catarina têm o mesmo número de repetições (8) das amostras da Nicarágua.

Foram encontradas de 6 a 15 repetições da ORF 75. Texas e México têm o mesmo número de repetições para a ORF 75, entretanto, o padrão das repetições é diferente. Pradeep et al. (2008), encontraram produtos de PCR entre 320 e 778 bp, com uma predominância de produtos de 525 bp. Dieu et al. (2004) encontraram uma variação de 5 a 21 repetições para esta região.

Amostras que têm o mesmo padrão de repetições para um determinado minissatélite podem não ter para os outros minissatélites analisados. Por exemplo, Santa Catarina e Nicarágua têm o mesmo número de repetições para a ORF 125 (8), mas não para a ORF 94 (14 Nicarágua e 16 Santa Catarina) e ORF 75 (8 Nicarágua e 14 Santa Catarina). Esta variação também foi observada em outros estudos (DIEU et al. 2004; PRADEEP et al. 2008).

A ORF 23/24 também foi analisada. Um produto de 3000 bp foi obtido em todas as amostras brasileiras. Após seqüenciamento e comparação com o WSSV-TW, uma deleção de 11.453 pb foi encontrada. Marks et al. (2004), estudaram esta região em três isolados de WSSV, WSSV-TW (Taiwan), WSSV-CN (China) e WSSV-TH (Thailand). O WSSV-TW não tem esta deleção, enquanto o WSSV-CN tem uma deleção de 1.168 pb e o WSSV-TH de 13.210 pb. Os mesmos autores sugerem que esta deleção pode ser devida à recombinação homóloga ou a uma pressão genômica no vírus para descartar seqüências redundantes. Dieu et al. (2004), sugeriram que o WSSV-TH separou-se do WSSV-TW e WSSV-CN e entrou no Vietnã através de

múltiplas introduções. Pradeep et al. (2008), encontraram um produto de 2400 pb para esta região ao analisar amostras da Índia. Após comparar a seqüência deste fragmento com o WSSV-TW, eles encontraram uma deleção de 10.970 pb nas amostras indianas em relação ao WSSV-TW.

O genoma do WSSV-TW codifica uma transposase que não está presente no WSSV-CN, WSSV-TH ou WSSV-VN (DIEU et al. 2004; MARKS et al. 2004). O produto de PCR para esta região tem 150 pb quando a transposase está ausente, um resultado também encontrado no Brasil.

Apesar do pequeno número de amostras analisadas, foi possível encontrar um padrão de repetições, o qual está relacionado à localização geográfica das amostras. Estes resultados indicam que as três ORFs analisadas (ORF 94, 125 e 75) têm um potencial de uso em estudos epidemiológicos com o WSSV, em particular a ORF 94, que tem uma variação maior no número de repetições. As variações nos minissatélites podem ser úteis em estudos epidemiológicos entre regiões, enquanto os SNPs observados nas repetições podem ser úteis no rastreamento do movimento do vírus em regiões geográficas mais localizadas. (entre diferentes fazendas, por exemplo). A origem das PLs das fazendas analisadas no presente trabalho poderia ser estudada com a ORF 94, com o objetivo de determinar se elas têm o mesmo padrão de repetições encontrado nos camarões. As diferenças encontradas entre as regiões brasileiras podem ser devidas a múltiplas introduções do WSSV no país ou a mutações no genoma viral. Estas hipóteses precisam ser testadas em estudos posteriores.

Este é o primeiro estudo onde isolados de WSSV de países da América são comparados. Após comparar os isolados brasileiros com outros países da América, não foi possível encontrar um padrão para as três ORFs nos países analisados. Isto pode ser devido a mutações no genoma do WSSV após sua introdução nos diferentes

países. Entretanto, analisando a ORF 94 isoladamente, Santa Catarina, México, Nicarágua, Honduras e Panamá possuem mais de 9 repetições, enquanto a Bahia e os EUA têm menos de 9 repetições. Esta similaridade no número de repetições talvez possa estar relacionada a uma similaridade de virulência. Seria necessário analisar mais amostras de regiões diferentes e obter informações a respeito da origem das PLs e da importação de camarões para rastrear as rotas possíveis de contaminação.

CAPÍTULO 3

Genes diferencialmente expressos em camarões de cultivo *Litopenaeus*

vannamei

INTRODUÇÃO

As doenças são um dos principais problemas na aquicultura mundial (SUBASINGHE, 2005), particularmente no cultivo de camarões (HOSSAIN et al., 2001). Animais de cultivo podem estar submetidos a baixa qualidade de água e mudanças bruscas, envolvendo, por exemplo, manipulação e transporte. Estes fatores podem estressar os animais e favorecer a ação de agentes patogênicos (MISCIATELLI; JONES; LATCHFORD, 1999). A saúde das espécies aquáticas é dependente da interação entre o ambiente, patógenos e o hospedeiro. Em sistemas de produção de aquicultura, os animais cultivados podem coexistir com patógenos potenciais em um estado de infecção crônica com pouco ou nenhum impacto na produção. Entretanto, sob condições de cultivo intensivas encontradas particularmente no cultivo de camarões, os animais podem estar expostos a condições ambientais desfavoráveis, como temperatura da água elevada, baixa concentração de oxigênio dissolvido e redução significativa nos níveis de salinidade; fatores que podem alterar a homeostase e causar estresse (LEE et al., 1992). O estresse resultante tem sido identificado como um dos gatilhos para a transição de infecções virais crônicas para infecções agudas em populações de camarão (DE LA VEGA et al., 2004; LIU et al., 2006a), resultado da redução na capacidade imunológica do camarão (HALL et al., 1998; LE MOULLAC; HAFFNER, 2000).

O vírus da Mancha Branca (WSSV) é a doença mais séria de camarões de cultivo no mundo (LIGHTNER, 1996). O WSSV tem sido encontrado desde 1993 na maioria das regiões de cultivo no sudoeste da Ásia, América, Europa e Austrália, e tem causado perdas econômicas catastróficas. A mortalidade cumulativa pode atingir 100% após 3–10 dias do surgimento dos primeiros sintomas (LIGHTNER, 1996; VASEEHARAN; JAYAKUMAR; RAMASAMY, 2003). O WSSV é um vírus envelopado que contém um DNA dupla-fita circular de cerca de 300 kb. Os vírus são baciliformes,

com um apêndice similar a um flagelo em uma das extremidades e têm um nucleocapsídeo na forma de bastão (VAN HULTEN et al., 2001; YANG et al., 2001; CHEN et al., 2002; VASEEHARAN; JAYAKUMAR; RAMASAMY, 2003). Existem cerca de 184 ORFs no genoma do WSSV, a maioria com função desconhecida (VAN HULTEN et al., 2001). Este vírus infecta uma grande variedade de hospedeiros, não apenas camarões, mas outros decápodes (LO et al., 1996a; VASEEHARAN; JAYAKUMAR; RAMASAMY, 2003).

Apesar de significativo progresso ter sido feito na detecção e caracterização do WSSV em anos recentes, ainda existem poucas informações a respeito das atividades antivirais dos camarões e das interações vírus-hospedeiro.

Camarões, assim como outros invertebrados, não possuem um sistema imune adaptativo. Seu sistema imune é baseado em várias respostas imunes inatas. O conhecimento a respeito das defesas moleculares do camarão tem aumentado nos últimos anos. Vários genes envolvidos na atividade antimicrobiana foram clonados e caracterizados, como o sistema de ativação da profenoloxidase (proPO) (SÖDERHÄLL et al., 1994; SRITUNYALUCKSANA et al., 1999) e peptídeos antimicrobianos (DESTOUMIEUX et al., 1997, 2001). Apesar destes progressos, informações a respeito das respostas antivirais ainda são escassas (LIU et al., 2009). Recentemente algumas proteínas antivirais têm sido caracterizadas, como por exemplo o fator anti-lipopolissacarídeo (LIU et al., 2006b), a lectina tipo-C (ZHAO et al., 2008), a beta-integrina (LI et al., 2007) e a própria hemocianina (ZHANG et al., 2004).

Uma forma de identificar potenciais proteínas envolvidas na resposta contra o WSSV é isolar genes diferencialmente expressos após a infecção pelo vírus. Com este objetivo, uma série de diferentes técnicas têm sido usadas, incluindo *differential display* de mRNA (ASTROSKY et al., 2002), hibridização subtrativa (SSH) (PAN et al., 2005), SSH e hibridização diferencial (HE et al., 2005), *microarrays* de cDNA (DHAR et

al., 2003; WANG et al., 2006) and ESTs (ROJTINNAKORN et al., 2002).

A técnica de SSH tem a vantagem de poder ser realizada sem o conhecimento prévio de seqüências da espécie estudada, permitindo o estudo de novos genes em organismos com genomas pouco estudados. Além disso, ela requer pequenas quantidades de amostras, e possui alta eficácia, especialmente na obtenção de genes pouco abundantes (DIATCHENKO et al., 1996).

Com o objetivo de estudar as respostas de camarões ao WSSV, alguns estudos utilizando SSH foram realizados em camarões infectados pelo WSSV em laboratório (HE et al., 2005; PAN et al., 2005). Entretanto, não existem trabalhos com animais de cultivo, naturalmente infectados pelo vírus. Em condições naturais, as respostas ao vírus podem ser diferentes daquelas encontradas em camarões infectados experimentalmente, já que as condições ambientais influenciam a resposta imune dos animais.

OBJETIVO GERAL

Avaliar as respostas moleculares de camarões de cultivo *Litopenaeus vannamei* infectados pelo vírus da Mancha Branca, visando identificar genes relacionados à infecção viral e suas relações com os mecanismos de defesa e resistência ao vírus.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Isolar cDNAs de genes diferencialmente expressos de brânquias de camarões de cultivo infectados pelo WSSV
- Clonar e seqüenciar os cDNAs diferencialmente expressos;
- Comparar as seqüências obtidas com seqüências depositadas no GeneBank;
- Confirmar a expressão diferencial de alguns genes através de PCR em Tempo Real.

MATERIAL E MÉTODOS

1 – Coleta de amostras

Camarões adultos na fase inter-mudas (aproximadamente 20 gramas), machos e fêmeas foram coletados em fazendas de cultivo de Santa Catarina, com o auxílio de técnicos da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri) e da Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC). As coletas foram realizadas em fazendas de Laguna, Governador Celso Ramos, Araquari e Barra do Sul. Os períodos das coletas foram: janeiro de 2005 (primeiro surto de Mancha Branca no estado), e de abril de 2006 a fevereiro de 2008. Os camarões foram coletados em tanques com sintomas de mortalidade, com uma tarrafa jogada aleatoriamente em diferentes pontos dos tanques de cultivo e mantidos em baldes com aeração para a retirada dos tecidos.

2 - Coleta de hemolinfa, brânquias e pleópodes

A hemolinfa foi coletada por punção ventral direta entre o último esternito cefalotorácico e o primeiro abdominal, utilizando-se uma seringa com agulha hipodérmica de 30X8 mm, na presença de solução isotônica para camarões com EDTA (1:1) (HERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2003). As amostras de hemolinfa foram congeladas a -80° C.

As brânquias e pleópodes foram retirados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80° C para as análises posteriores.

3 – Extração de RNA total

O RNA total das amostras de brânquia e hemolinfa (indivíduos positivos apenas

para WSSV ou negativos para WSSV e IHHNV – Cap.1) foi extraído utilizando-se o reagente TRIzol (Invitrogen). Adicionou-se 1 ml de Trizol aos tecidos (1 ml/200 mg de brânquias e 1 ml/500 µl de hemolinfa) e estes foram incubados por uma hora. Após a adição de clorofórmio o material foi incubado a temperatura ambiente por 3 minutos. Os tubos foram centrifugados a 14000xg por 30 minutos a 4° C e o sobrenadante resultante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo. A este tubo foi adicionado álcool isopropílico e após incubação por 10 minutos a temperatura ambiente, o material foi centrifugado a 1000xg por 40 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e os precipitados obtidos foram lavados com etanol 75% e centrifugados a 7500xg por 5 minutos a 4° C . Os sobrenadantes foram descartados, os precipitados foram secos a temperatura ambiente, ressuspensos em água MilliQ estéril tratada com DEPC e armazenados a -80° C.

4 – Quantificação e determinação da integridade do RNA

A concentração do RNA obtido foi determinada através da absorbância a 260 nm (AUSUBEL et al., 1995), utilizando um espectrofotômetro Ultrospec 3000 (Pharmacia).

A integridade das amostras foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1% em tampão MOPS 1 X (MOPS 20 mM, Acetato de Sódio 5 mM, EDTA 1 mM; pH 7,0), sob condições desnaturantes . A cuba de eletroforese e os demais acessórios foram tratados previamente com H₂O₂ 10% e água MilliQ estéril tratada com DEPC. As amostras foram diluídas em tampão de desnaturação (AUSUBEL et al., 1995) e aquecidas a 55-60° C por 10 minutos, sendo, em seguida, aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada a 70 V utilizando-se tampão MOPS 1 X.

5 – Extração de mRNA

O mRNA foi extraído utilizando-se o sistema Oligotex mRNA Spin-column (Qiagen) à partir de um *pool* de amostras totalizando 250 µg de RNA total.

Este sistema baseia-se no fato de que a maioria dos mRNAs eucarióticos e alguns RNAs virais terminam em uma cauda poli-A de 20 a 250 adenosinas. As amostras de RNA total são incubadas com uma suspensão composta de partículas de látex-poliestireno ligadas covalentemente a oligonucleotídeos dC₁₀T₃₀. O mRNA liga-se às partículas através da sua cauda poli-A, enquanto as moléculas de rRNA e tRNA, que não possuem cauda poli-A, são facilmente lavadas. Como a hibridização requer alta concentração de sais, o mRNA poli-A é facilmente liberado diminuindo a força iônica e desestabilizando os híbridos dT-A (Oligotex Handbook, 2002).

O mRNA extraído foi precipitado com acetato de sódio 3 M pH 5,2 e etanol 100%, lavado com etanol 75% e ressuspenso em H₂O.

6 – Subtração de cDNA (SSH)

O mRNA (1 µg) foi reversamente transcrito utilizando-se o sistema Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech). Foram utilizados mRNAs de animais não-infectados e infectados pelo WSSV, assim como um RNA poli-A controle, fornecido pelo fabricante. As condições para a transcrição reversa foram realizadas conforme as instruções do fabricante. O cDNA que contém os transcritos diferencialmente expressos (animais positivos) é denominado *tester* e o cDNA referência (animais negativos) é denominado *driver*. Os cDNAs obtidos foram digeridos com a enzima Rsa I que gera fragmentos com pontas cegas.

O cDNA *tester* foi separado em dois grupos diferentes, através da ligação a diferentes oligonucleotídeos adaptadores (Adaptador 1 ou Adaptador 2R, fornecidos pelo fabricante). As extremidades dos adaptadores não possuem o grupamento fosfato, assim apenas uma fita de cada adaptador liga-se à extremidade 5' do cDNA. Cada grupo de cDNA foi denominado de Tester 1-1 (ligado ao Adaptador 1) e Tester 1-2 (ligado ao Adaptador 2R), respectivamente. Uma terceira reação foi realizada misturando o cDNA *Tester* 1-1 e o *Tester* 1-2, este grupo corresponde ao controle

Unsubtracted.

Após a obtenção das amostras ligadas aos adaptadores, foram realizadas duas hibridizações. Na primeira hibridização, cDNA sem adaptadores (*driver*) em excesso foi adicionado a cada cDNA *tester*, as amostras foram desnaturadas e em seguida, foi realizada a hibridização. Os cDNAs de fita simples remanescentes, após a primeira hibridização, contém uma grande quantidade de seqüências diferencialmente expressas, enquanto as seqüências de dupla-fita formadas correspondem a cDNAs não-diferencialmente expressos.

Os cDNAs obtidos após a primeira hibridização e o cDNA sem adaptador foram misturados no mesmo tubo, para a segunda hibridização, ou seja, cDNA *Tester* 1-1, 1-2 e *driver* foram adicionados ao mesmo tubo. Nesta segunda hibridização, apenas o cDNA *driver* foi desnaturado. Parte dos híbridos obtidos consiste de cDNAs diferencialmente expressos com diferentes adaptadores em cada lado. Estes cDNAs diferencialmente expressos, com diferentes adaptadores em cada lado, foram amplificados através de *Nested* PCR utilizando-se iniciadores específicos para os adaptadores e os produtos foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 2%.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o sistema Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare).

A confirmação da ligação dos adaptadores aos cDNAs foi realizada através de PCR. Este teste foi realizado apenas com o cDNA controle, pois os iniciadores fornecidos para o teste funcionam apenas para genes de humanos, ratos e camundongos. Uma PCR foi realizada utilizando-se iniciadores para um gene constitutivo (G3PDH) e um iniciador que se liga ao adaptador (PCR *Primer* 1). Para cada cDNA (*Tester* 1-1 e *Tester* 1-2), foram realizadas duas reações, com diferentes combinações de iniciadores. Na primeira, foram utilizados os iniciadores G3PDH 3' e

G3PDH 5' e na segunda, G3PDH 3' e PCR *Primer* 1. O produto esperado para a G3PDH tem 500 pb e para a combinação dos iniciadores G3PDH 3' e PCR *Primer* 1 cerca de 750 pb. As condições da PCR foram: 94° C 30 seg, seguidos de 20 ciclos de 94° C 10 seg, 65° C 30 seg e 68° C 2,5 min. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2% e comparados com marcador de peso molecular conhecido (Felix Ladder, Appligene).

7 - Clonagem

Os fragmentos obtidos os fragmentos obtidos através de subtração foram ligados ao vetor pGEM-T Easy Vector System I (Promega) que possui no sítio de clonagem uma sequência para clivagem com a enzima de restrição Eco RI. Nesse vetor, há o gene *lacZ*, que codifica a β -galactosidase e o gene que confere resistência a ampicilina. A ligação foi realizada adicionando-se 3 μ l do produto de PCR purificado, tampão da enzima ligase 1X, 50 ng do vetor pGEM-T Easy e 3 unidades da enzima T4 DNA Ligase. As reações foram mantidas a 17° C durante 18 horas.

O vetor contendo o inserto foi inserido em bactérias JM109 competentes (Promega) através de choque térmico. As bactérias foram mantidas por 2 horas a 37° C em meio LB (20 g/L) e após este procedimento, foram plaqueadas em meio LB ágar (35 g/L) contendo ampicilina (100mM) , IPTG (0,5mM) e X-GAL (50mM) e mantidas a 37° C por 12-18 horas.

As bactérias transformadas foram selecionadas positivamente perante a droga de seleção ampicilina. Dentre essas bactérias, as que não apresentaram o plasmídeo ligado ao fragmento de interesse expressaram a enzima β -galactosidase funcional. A enzima β -galactosidase metaboliza o X-GAL presente no meio, originando um produto de cor azul, dando essa cor às colônias. As bactérias que apresentaram os plasmídeos ligados ao fragmento de interesse tiveram o gene da β -galactosidase interrompido e as colônias apresentaram coloração branca.

As colônias brancas foram transferidas para meio LB (20 g/L) contendo 100 mM de ampicilina e cultivadas sob agitação constante (140 rpm) a 37° C por 8-12 horas.

8 – Confirmação da presença do fragmento

Para a confirmação da presença de insertos nas colônias consideradas positivas, os plasmídeos foram extraídos das bactérias após o período de 18 horas de crescimento em meio LB contendo ampicilina 100 mM. Este procedimento foi realizado para todas as colônias positivas, no caso do WSSV e IHHNV e para algumas colônias selecionadas aleatoriamente, no caso da subtração.

A extração do plasmídeo foi realizada a partir de 3 mL do meio. As células foram lisadas com o tampão STET (Sacarose 8%, Triton 5%, 50mM de EDTA e 50mM de Tris, pH 8,0) e STET com lisozima (10 mg/ml) e os restos celulares foram precipitados. A precipitação do plasmídeo foi realizada com isopropanol. Os plasmídeos foram digeridos com a enzima EcoRI e a presença do inserto foi conferida através de eletroforese em gel de agarose 1%.

9 - Extração do plasmídeo para sequenciamento

A obtenção dos plasmídeos e os sequenciamentos foram realizados no Laboratório de Protozoologia (UFSC), em colaboração com o Prof. Dr. Edmundo Grisard. Os procedimentos foram realizados conjuntamente com a acadêmica Patrícia Hermes Stocco.

A extração do DNA plasmidial para sequenciamento foi realizada através de lise alcalina das colônias crescidas em 1mL de meio líquido nas condições descritas anteriormente. A lise foi realizada através da adição de tampão GET (20% Glicose, 0,5M EDTA pH 8,0 e 1M Tris-HCl pH 7,4) sobre a colônia, seguida da adição de uma solução contendo 1,8M de NaOH e SDS 10%, finalizando com a adição da solução 0,18 M de NaOH e SDS 1%. A precipitação de restos celulares foi realizada através de

centrifugação, seguida da filtração da solução restante em filtro Millipore (MAGV N22). A precipitação do plasmídeo foi realizada através da adição de isopropanol seguida de centrifugação. O plasmídeo foi ressuscitado em água.

10 – Sequenciamento e análise das seqüências

A reação de amplificação dos fragmentos contidos nos plasmídeos foi realizada utilizando-se o kit DYEnamic ET Dye Terminator (GE Healthcare). O sequenciamento foi realizado no equipamento MegaBACE 1000 DNA Analysis System (GE Healthcare).

A reação de sequenciamento foi realizada a partir de 5,0 pmol do iniciador pGEM-F ou EXCEL-R e aproximadamente 1.000ng do DNA plasmidial. Para a reação foram utilizadas as seguintes condições: 95°C por 25s, seguidos de 35 ciclos com desnaturação de 95°C por 15s, anelamento de iniciadores a 50°C por 20s e extensão a 60°C por 90s.

Os produtos desta reação foram precipitados com isopropanol 70% e eletroinjetados a 2KV por 100 segundos e eletroeluídos por 140 minutos a 7KV.

A qualidade das seqüências foi realizada com o Phred (Phred ≥ 15) do programa Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN,1998). O algoritmo CAP3 (HUANG; MADAN, 1999) foi usado para a montagem dos *contigs* (seqüências contíguas de DNA criadas pela montagem de fragmentos justapostos de um cromossomo), com o objetivo de obter seqüências contínuas formadas pela sobreposição de pelo menos duas ESTs. Os *singlets* são as seqüências que não se sobrepuseram com nenhuma outra seqüência, ou seja, clones com seqüências únicas. As seqüências específicas do vetor e dos adaptadores foram retiradas utilizando-se o programa FastPCR. As seqüências obtidas foram comparadas com a base de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando-se as ferramentas BLASTn ,BLASTx e tBLASTx, através do programa BLAST2GO (CONESA et al., 2005). Valores de E $< 1 \times 10^{-5}$ e similaridades maiores que dez aminoácidos foram considerados relevantes.

Os genes foram agrupados em classes de acordo com sua função, baseado no Genbank e no GeneOnthology.

11 – PCR em Tempo Real para confirmação da expressão diferencial

Os iniciadores foram desenhados com o programa Primer Quest (Integrated DNA Technology-IDT), com base em genes identificados na biblioteca de cDNA. Os genes selecionados foram ubiquitina, proteína calcificada de cutícula, proteína quinase e oncoproteína nm 23 (Tabela 12). Além disso, foram desenhados iniciadores específicos para genes constitutivos, utilizados como referência. Os genes referência utilizados foram RNA ribossomal 18S, baseado em uma seqüência de *Penaeus merguensis* e ciclofilina, baseada em uma seqüência de *Penaeus monodon*.

Para a padronização das condições de PCR, foi utilizado o RNA total das amostras utilizadas na subtração. O RNA foi reversamente transcrito utilizando-se o sistema Omniscript cDNA Synthesis Kit (Qiagen). Os cDNAs obtidos foram precipitados com isopropanol e etanol 75%, quantificados em um espectrofotômetro Nanodrop (Thermoscientific) e diluídos na concentração de 100 ng/μl.

As amplificações foram realizadas com o sistema Absolute QPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific), utilizando-se o *mix* contendo Thermo-Start™ DNA Polimerase, tampão da reação, dNTPs, MgCl₂ 3 mM e SYBR Green I, na concentração 1X. Os programas de ciclagem de cada gene incluíam uma fase de ativação da enzima a 95°C por 15 min, em seguida 40 ciclos de 20 s de desnaturação a 95°C, 20 s de anelamento com a temperatura conforme Tabela 12, e 15 s de extensão a 72°C, fase onde ocorreu a aquisição de fluorescência. Uma curva de dissociação foi realizada posteriormente, 1°C a cada 5 s, partindo de 62°C e terminando a 99°C, para analisar o perfil dos produtos formados. Uma curva de concentração de iniciadores, nas concentrações de 70, 100, 150, 200 e 220 nM foi testada. A concentração utilizada foi aquela na qual foi obtido o menor valor de CT. Além disso, a curva de dissociação

também foi utilizada na seleção da melhor concentração. Curvas de concentração com diluições seriadas de cDNA foram construídas para a determinação da eficiência da reação.

Após a padronização das reações, amostras de camarões infectados e não infectados com WSSV (n=7 por grupo) coletados em fazendas de Santa Catarina foram usadas para a validação em campo dos genes selecionados. O RNA total foi tratado com DNase (Sigma), reversamente transcrito e diluído conforme descrito anteriormente.

Tabela 12: Iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR

Gene	Espécie	Sequência dos iniciadores		Produto (nt)	T _A (°C)	Concentração iniciadores
		Forward	Reverse			
Ubiquitina		5'-AAGAAGGCCAAGATCCAGGATAAGGAG-3'	5'-AGTCAGACAGAGTGCGACCATCTT-3'	97	50°C	170 nM
Proteína calcificada de cutícula		5'-GACAGCAGTCCTGTAGACAAGAAG-3'	5'-GTTAGGGAAAGTTGGACTCACC-3'	81	55°C	220 nM
Receptor para proteína quinase		5'-GTGTCCTGTGTAAGGTTCTC-3'	5'-CCATAGTGGTTGGTCTTGAG-3'	119	47°C	200 nM
Oncoproteína nm 23		5'-CTAGGTCTTGTGCCACTAATCCAC-3'	5'-GAGAGCTGGATCTACAGATAAG-3'	94	50°C	200 nM
rRNA 18S	<i>P. merguensis</i>	5'-GGCCTCGCAATTGGAATGAGTACA-3'	5'-TACGAGCGTTTCAACCGCAACAAC-3'	134	57°C	150 nM
Ciclofilina	<i>P. monodon</i>	5'-ACGAGAACTTCGCACTGAAGCACA-3'	5'-TGAAGAATTGCGACCCGTTGGTGT-3'	124	51°C	200 nM

12 – Análise Estatística

O cálculo da expressão gênica relativa foi feito utilizando-se o método do $\Delta\Delta CT$ comparativo. Os valores de CT gerados foram transformados em 2^{-CT} , seguida de normalização pelos genes constitutivos. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar se os dados apresentavam uma distribuição normal. Os dados paramétricos foram analisados através do teste t de Student, enquanto que os não-paramétricos foram analisados através do teste de Mann-Whitney, todos com um nível de significância ≤ 0.05 . As análises foram realizadas utilizando-se os softwares Statistica 6 (Statsoft) e GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software).

RESULTADOS

1 - Integridade do RNA total

Indivíduos negativos para o WSSV e o IHHNV e indivíduos positivos apenas para WSSV foram utilizados para a subtração de cDNA. RNA total foi extraído de brânquias e hemolinfas destes animais, e a integridade do RNA foi verificada através gel de agarose 1% (Figura 25). As hemolinfas apresentaram um rendimento muito baixo, quando comparadas às brânquias. O mRNA foi extraído apenas das brânquias, já que este tecido forneceu uma maior quantidade de RNA.

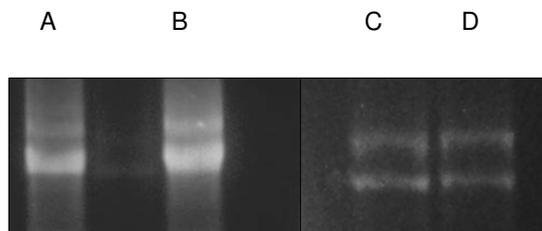


Figura 25: Gel de agarose 1% de RNA total de *L. vannamei*. A e B: brânquias. C e D: hemolinfa.

2 - Subtração do cDNA

Os cDNAs foram digeridos com a enzima de restrição Rsa I, gerando fragmentos menores com pontas não-coesivas. Estes cDNAs digeridos foram ligados a adaptadores. A eficiência da ligação do cDNA aos adaptadores foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 2% (resultado não-mostrado). Conforme esperado, a PCR utilizando o par de iniciadores específicos para um gene constitutivo (G3PDH), gerou um produto de cerca 500 pb, enquanto o produto gerado utilizando o iniciador G3PDH 3' e o iniciador PCR Primer 1 tem cerca de 750 pb. Algumas colônias foram selecionadas aleatoriamente e utilizadas para confirmar se possuíam inserto (Figura 26). Como pode-se observar na figura, 9 clones em 10 analisados apresentavam inserto. O tamanho destes insertos variou de cerca de 150 a 700 pb.

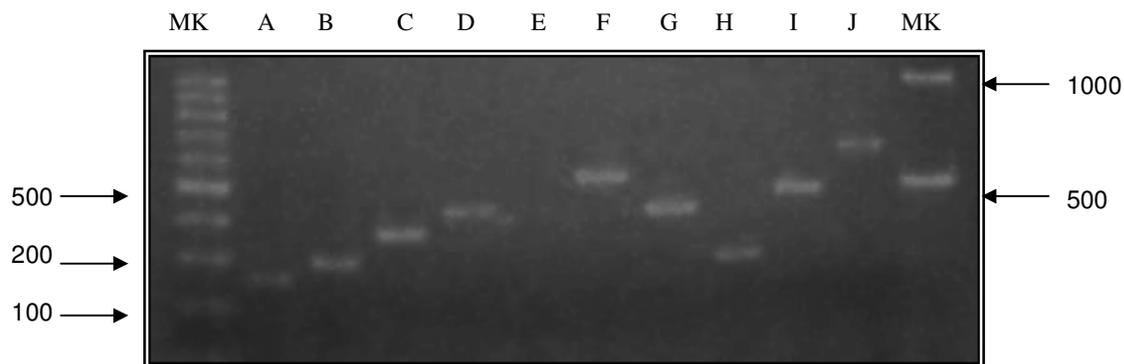


Figura 26: Gel de agarose 1% de DNA plasmidial de clones obtidos na subtração. A-E: clones da Biblioteca 1; F-J: clones da Biblioteca 2.

Duas bibliotecas de cDNA foram geradas neste estudo. A Biblioteca 1 (*forward*), que consiste de mRNAs induzidos em animais infectados com WSSV, e a Biblioteca 2 (*reverse*), composta de cDNAs inibidos nos animais infectados. Um total de 703 clones foram sequenciados, 300 de biblioteca *forward* e 403 da biblioteca *reverse*. Foram

identificados 62 *contigs* e 69 *singlets* com o programa CAP3. Na biblioteca *forward*, 36 *contigs* foram formados e 36 seqüências eram *singlets*, enquanto na biblioteca *reverse*, 23 *contigs* foram formados e 36 seqüências eram *singlets*. O tamanho das seqüências obtidas foi de 98 a 1137 pb, com um tamanho médio de 365 pb.

As seqüências foram submetidas a pesquisa na base de dados do NCBI, e 109 ESTs eram similares a outras seqüências, enquanto 22 (16,8%) ESTs não apresentaram similaridade com seqüências conhecidas. Foi encontrada uma redundância de 18,6% nas seqüências. Na Biblioteca 1, das 78 seqüências analisadas, 69 (88,4%) apresentaram similaridade com seqüências conhecidas. Na Biblioteca 2, de um total de 53 seqüências, 40 (75,5%) apresentaram similaridade com seqüências depositadas no GeneBank.

Na Biblioteca 1, foram encontrados genes pertencentes a 28 categorias (Tabela 13, Figura 27) e na Biblioteca 2 (Tabela 14, Figura 28), genes correspondentes a 8 categorias, organizados com base em suas funções. As categorias foram definidas de acordo com a ferramenta Gene Ontology (www.geneontology.org/index.shtml). Os genes encontrados pertencem a várias categorias, dentre elas metabolismo, adesão celular, síntese de ATP, entre outras.

Tabela 13: Genes encontrados na Biblioteca 1, divididos em categorias de acordo com a sua função.

<i>Categoria</i>	<i>Gene</i>	<i>Espécie mais similar</i>	<i>Valor de E</i>	<i>Identidade %</i>	<i>Nº de seqüências</i>
Término do ciclo celular	Regulador do crescimento celular com domínio EF-hand d 1	<i>Homo sapiens</i>	3,64 E-01	87%	2
Síntese de ATP	ATP sintase subunidade 9	<i>L. vannamei</i>	1,06 E-129	98%	2
	Citocromo oxidase subunidade I	<i>L. vannamei</i>	1,27 -100	98%	1
	Citocromo b	<i>P. monodon</i>	2,3 E-68	74%	1
Citoesqueleto	Beta-actina	<i>L. vannamei</i>	1,05 E-88	100%	1
	Beta tubulina	<i>Callinectes sapidus</i>	2,01 E-38	86%	2
Adesão celular	Neuropilina 2b	<i>Danio rerio</i>	5.5E-6	86%	1
	Fator 5 de crescimento de fibroblastos	<i>M. musculus</i>	5.60141E-22	93%	1

		Glicoproteína	dos	<i>M. musculus</i>	1,23E-11	89%	1
		trofoblastos					
Metabolismo		Carboxiquinase	do	<i>L. vannamei</i>	7.0 E-48	94%	2
		fosfoenolpiruvato					
		Hidroxiesteróide		<i>M. musculus</i>	1,15E-11	90%	1
		desidrogenase					
		Carboxiquinase	do	<i>D. rerio</i>	1,06E-06	89%	1
		fosfoenolpiruvato					
Modelagem nucleossomo	do	Histona H2B		<i>Paramecium caudatum</i>	1.32 E-6	94%	1
Transporte		SEC61 gama		<i>Harpagifer antarcticus</i>	3.46 E-19	71%	1
		Synaptoporin		<i>H. sapiens</i>	3,05E-07	91%	1
		solute carrier family 25		<i>Homo sapiens</i>	1,34E-07	83%	1
		(mitochondrial carrier, Aralar)					
Processamento de RNA	de	Proteína associada	ao	<i>Mus musculus</i>	8.88 E-17	96%	2
		espliceossomo					
Proteína apoptótica		Proteína QM		<i>Marsupenaeus japonicus</i>	8.11 E-55	91%	1

Cascata de sinalização intracelular	Receptor para proteína quinase C ativada	<i>P. monodon</i>	3,82 E-65	94%	1
	Quinase de fosfatidilinositol 3	<i>Plasmodium falciparum</i>	5,86E-08	89%	1
Formação da cutícula de crustáceos	Proteína calcificada de cutícula	<i>C. sapidus</i>	4,82E-25	72%	1
Proteína de ligação a aminoácidos	Fator de alongação – 1 alfa	<i>M. japonicus</i>	8,87E-81	94%	1
Processo de modificação de proteínas	Ubiquitina	<i>M. japonicus</i>	1.52723E-85	94%	1
	Subunidade 1 da enzima ativadora de SUMO1	<i>H. sapiens</i>	3,71E-03	90%	1
Inibidor da metástase	Oncoproteína nm23	<i>L. vannamei</i>	3,80E-64	98%	1
Outros	Proteína secretada putativa	<i>Ixodes ricinus</i>	1,55 E-09	86%	2
	Proteína hipotética	<i>Trichomonas vaginalis</i>	1,17 E-06	71%	1
	EST I vannamei3 1761	<i>L. vannamei</i>	1,0 e-101		1
	EST I vannamei16952	<i>L. vannamei</i>	6,00E-86		1
	Clone GK14392	<i>Drosophila willistoni</i>	3,88E-24	76%	1

LvG <i>Litopenaeus vannamei</i>	<i>L. vannamei</i>	2,00E-69		1
cDNA				
EST IB0AAA27BE09FM1	<i>Platynereis dumerilii</i>	1,15E-14	88%	1
EST_I_vannamei7996	<i>L. vannamei</i>	1,00E-31		1
LV_NC_RA38D18f Est	<i>L. vannamei</i>	6,00E-53		1
LV_GL_RA47P21f	<i>L. vannamei</i>	3,00E-60		1
Extremidade de um clone de	<i>Anopheles gambiae</i>	7,35E-30	73%	1
cDNA do cromossomo 1				
Clone RP23-184B11	<i>M. musculus</i>	3,17E-08	88%	1
Clone CH211-114C9	<i>D. rerio</i>	1,80E-16	87%	1
Clone CH73-226D12	<i>D. rerio</i>	1,65E-07	72%	1
Clone RP23-32C12	<i>M. musculus</i>	4,99E-13	89%	1
EST LV_LO_RA009O19r	<i>L. vannamei</i>	4,00E-58		1
LV_NC_RA36I23r	<i>L. vannamei</i>	2,00E-14		1
LV_GL_RA53K20f	<i>L. vannamei</i>	6,00E-42		1

Proteínas ribossomais	Proteína ribossomal L27	<i>Drosophila melanogaster</i>	1,117070E-25	66%	1
	Proteína ribossomal S23	<i>L. vannamei</i>	8,764880E-70	100%	2
	Proteína ribossomal L35A	<i>L. vannamei</i>	1,26455E-54	98%	1
	Proteína ribossomal L27	<i>L. vannamei</i>	5,00E-61		1
	Proteína ribossomal L36	<i>Branchiostoma belcheri</i>	6,51E-37	74%	3
	Proteína ribossomal L6e	<i>Carabus granulatus</i>	1,49E-17	72%	3
	Proteína ribossomal S10	<i>Caligus clemensi</i>	4,56E-10	63%	3
	Proteína ribossomal L13	<i>Lepeophtheirus salmonis</i>	3,16E-16	66%	1
	Proteína ribossomal S4	<i>Culicoides sonorensis</i>	4,56E-10	63%	1
	Proteína ribossomal L19	<i>Macaca mulatta</i>	1,35E-06	69%	2
	Proteína ribossomal L7	<i>L. vannamei</i>	1,42E-46	92%	1
	Proteína ribossomal L13A	<i>Ixodes scapularis</i>	2,80E-09	73%	1
	Proteína ribossomal L23	<i>L. vannamei</i>	8,45E-46	96%	1
	Proteína ribossomal L38	<i>Rattus norvegicus</i>	7,24E-17	72%	1
Microssatélite	TUMXLv5.73	<i>L. vannamei</i>	1,74E-19	84%	2
RNA ribosomal	16S rRNA	<i>L. vannamei</i>	1,907100E-101	100%	1

Tabela 14: Genes encontrados na Biblioteca 2, divididos em categorias de acordo com a sua função.

<i>Categoria</i>	<i>Gene</i>	<i>Espécie mais similar</i>	<i>Valor de E</i>	<i>Identidade %</i>	<i>Nº de seqüências</i>
Fosfatase de proteínas	Fosfatase de proteínas PTC7	<i>Mus musculus</i>	1,19E-05	90%	1
Inibidor de proteases de serina	Lospina 1	<i>Amblyomma americanum</i>	9,83E-07	93%	1
Defesa contra bactérias	Precursor de peptídeo antimicrobiano pleuraína-G7	<i>Rana pleuraden</i>	9,52E-07	91%	1
Transdução de sinal	Proteína pequena de ligação a GTP	<i>Lotus japonicus</i>	4,23E-09	86%	1
Biossíntese de ácidos nucléicos	Quinase de nucleosídeos fosfato	<i>L. vannamei</i>	1,96E-58	94%	1
Morfogênese	Cluster de gene HOX	<i>Oryzias latipes</i>	1,44E-18	77%	1
Outros	Parte do genoma completo	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	6,74E-06	44%	2

	Proteína predita	<i>Nematostella vectensis</i>	1,37E-16	74%	2
	GK19074	<i>Drosophila willistoni</i>	4,01E-16	93%	1
	RP23-312G6	<i>M. musculus</i>	5,47E-25	78%	1
	Proteína hipotética	<i>Thermobia domestica</i>	4,45E-04	61%	1
	DKEYP-22H2	<i>D. rerio</i>	5,37E-24	80%	2
	QtsA-13641, similar to human MCM7 minichromosome maintenance deficient 7	<i>Macaca fascicularis</i>	9,18E-06	90%	1
	EST I vannamei5729	<i>L. vannamei</i>	2,00E-78		1
	3D7 chromosome 12	<i>Plasmodium falciparum</i>	1,09E-12	90%	1
	EST I vannamei593	<i>L. vannamei</i>	7,00E-57		1
	LV GL RA53K20f	<i>L. vannamei</i>	3,00E-28		1
	LV ES RA08H03r	<i>L. vannamei</i>	4,00E-41		1
Proteínas ribossomais	Proteína ribossomal L32	<i>Bombyx mori</i>	8,63E-58	66%	1
	Proteína ribossomal	<i>Ornithodoros parkeri</i>	2,48E-34	73%	2

S12						
Proteína	ribossomal	<i>Bos taurus</i>	7,22E-82	78%		1
L23						
Proteína	ribossomal	<i>L. vannamei</i>	1,26E-54	98%		1
L35A						
Proteína	ribossomal	<i>Lepeophtheirus salmonis</i>	1,24E-16	66%		1
L13						
Proteína ribossomal 4		<i>Lonomia obliqua</i>	6,83E-29	78%		1
Proteína	ribossomal	<i>Xenopus tropicalis</i>	2,05E-16	68%		1
L13						
Proteína	ribossomal	<i>Carabus granulatus</i>	5,65E-18	72%		1
L6e						

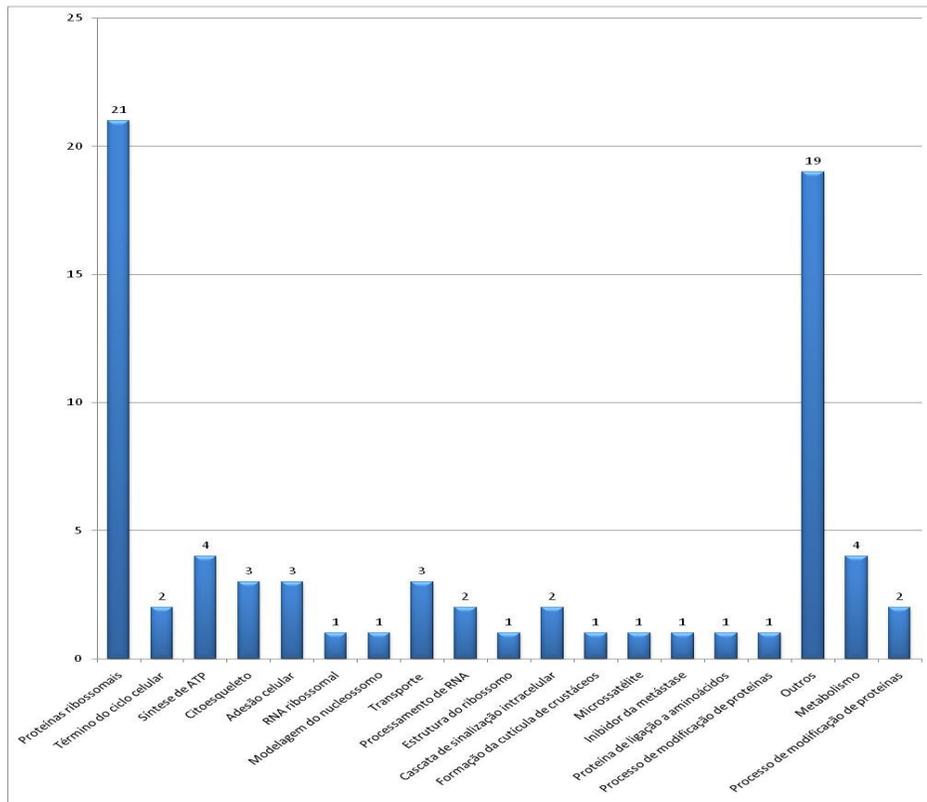


Figura 27: Genes identificados na Biblioteca 1, classificados de acordo com sua função.

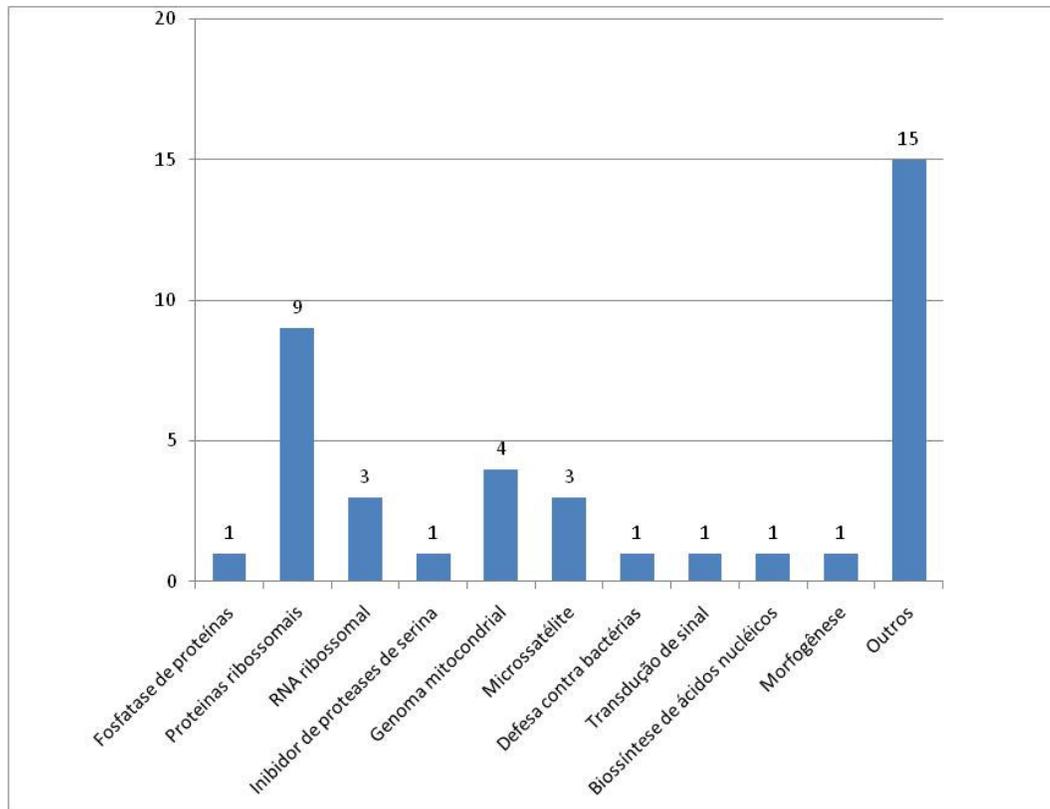


Figura 28: Genes identificados na Biblioteca 2, classificados de acordo com sua função.

3 - PCR em Tempo Real

A reação de padronização inicial mostrou a amplificação de um único produto em todos os genes testados neste estudo, sem a presença de contaminação ou *background* (dados não mostrados). A Tabela 15 mostra os valores de coeficiente de correlação (R^2), inclinação da reta (*slope* ou M), fator de amplificação (100%=2) e eficiência da reação (100%=1) obtidos para os diferentes genes testados. As reações padronizadas apresentaram uma eficiência semelhante, o que permitiu a utilização do método de $\Delta\Delta CT$ comparativo.

Tabela 15: Coeficiente de correlação (R^2), inclinação da reta (M), fator de amplificação e eficiência da reação da curva de dissociação dos iniciadores utilizados.

<i>Gene</i>	R^2	<i>Inclinação</i>	<i>Amplificação</i>	<i>Eficiência</i>
RNA 18S	0,994	-3,415	1,9	0,96
Ciclofilina	0,98749	-3,361	1,94	0,98
Proteína calcificada de cutícula	0,99464	-3,158	1,85	1,00
Oncoproteína nm23	0,98135	-3,404	1,82	0,97
Receptor para proteína quinase	0,99091	-3,178	1,71	1,00
Ubiquitina	0,98442	-3,351	1,84	0,99

A Tabela 16 mostra a expressão relativa dos genes nos animais infectados com relação aos não infectados. As Figuras 29 e 30 apresentam os gráficos das curvas de dissociação geradas nas reações mostrando a formação de um pico único, que representa a amplificação de produtos únicos em todos os genes analisados.

Na Figura 31 estão representadas as expressões relativas dos genes dos camarões infectados com WSSV em relação aos animais negativos para cada gene de interesse. Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) de 91 vezes na expressão da ubiquitina. A proteína calcificada de cutícula teve um aumento de 23 vezes, porém não foi estatisticamente significante. O receptor para proteína quinase e a oncoproteína nm23 tiveram um aumento de duas vezes.

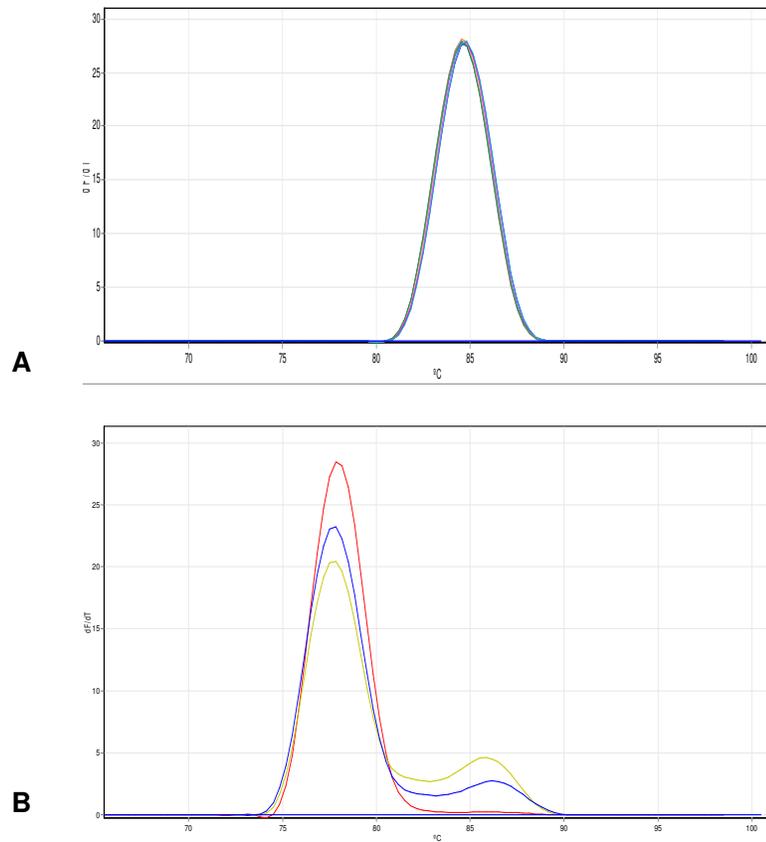


Figura 29: Perfis das curvas de dissociação dos genes constitutivos.

A) RNA 18S. B) Ciclofilina.

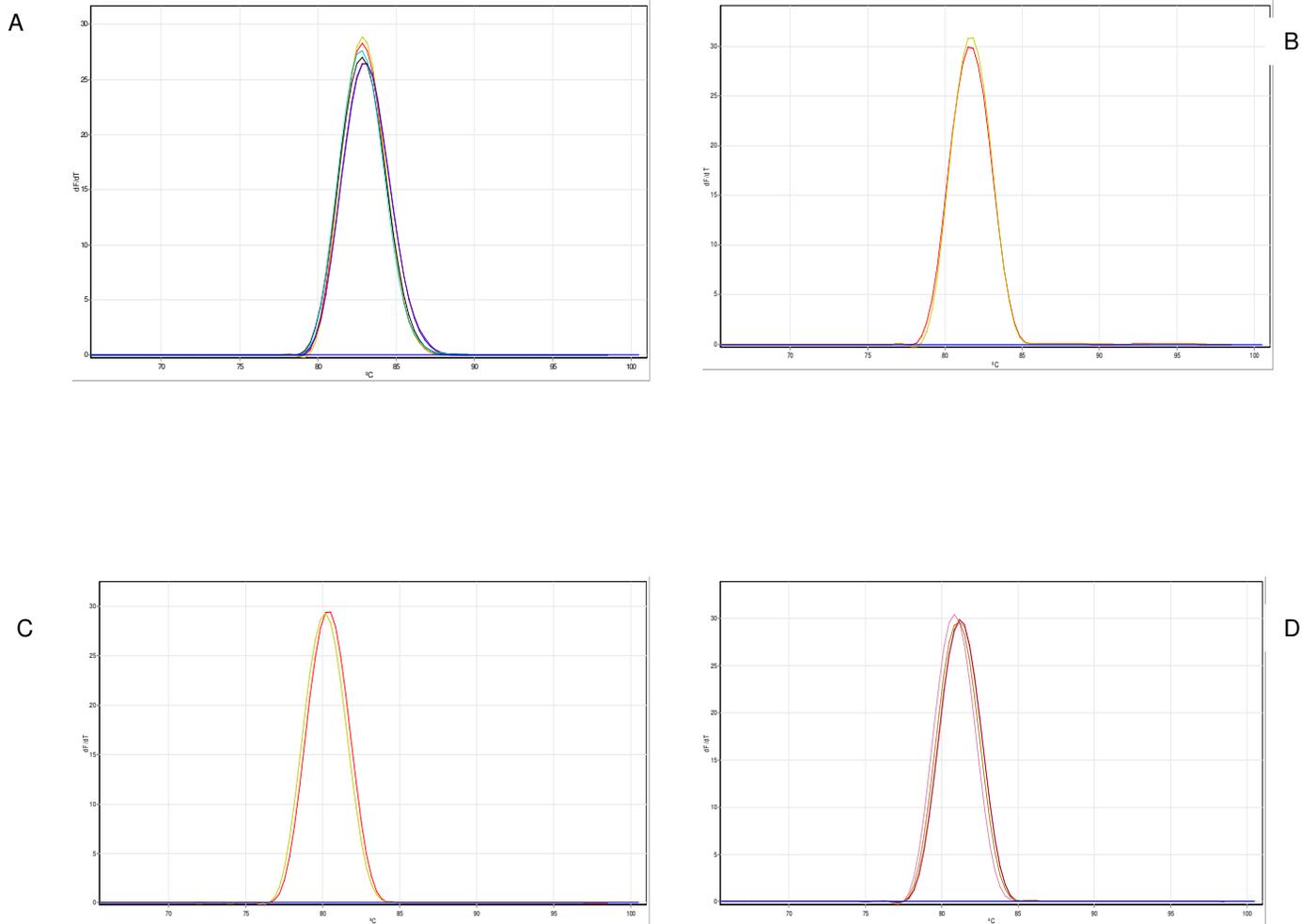


Figura 30: Perfis das curvas de dissociação dos genes induzidos. A) Ubiquitina. B) Receptor para proteína quinase. C) Proteína calcificada de cutícula. D) Oncoproteína nm23.

Tabela 16: Variação da expressão gênica nos camarões infectados, em relação aos animais não-infectados. Em negrito, as expressões relativas com significância estatística.

<i>Ubiquitina</i>	<i>Receptor para proteína quinase</i>	<i>Proteína calcificada de cutícula</i>	<i>Oncoproteína nm23</i>
91,17	2,23	23,64	2,43

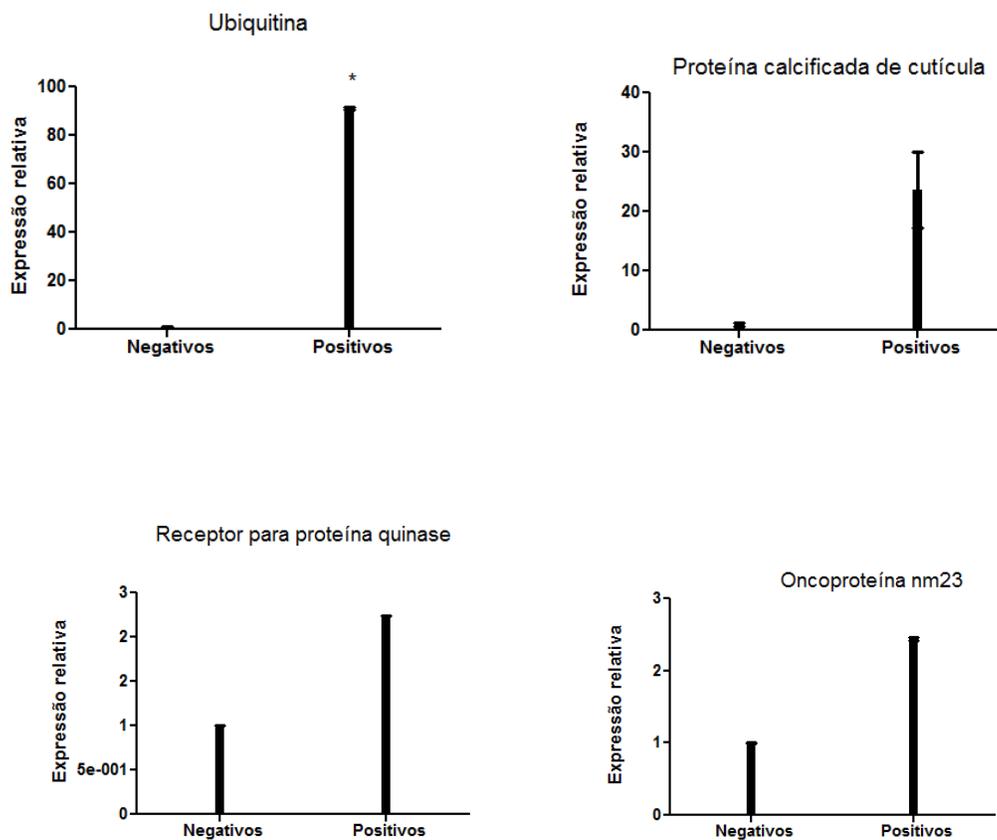


Figura 31: Expressão relativa nos animais positivos e negativos para WSSV. Dados mostrados como média \pm desvio padrão. * representa diferença significativa conforme o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

O WSSV tem causado grandes perdas econômicas em países da Ásia e da América, desde seu surgimento em 1993. No Brasil, esta doença surgiu em 2005 e tem causado grandes mortalidades nos cultivos de camarão da região Sul. Até hoje, não foi desenvolvido um tratamento eficaz para esta doença, e pouco se sabe sobre o mecanismo de infecção do vírus.

A doença é caracterizada pela presença de inclusões brancas na cutícula dos animais infectados. O mecanismo exato de formação destas manchas ainda não está claro. Possivelmente, a infecção pelo WSSV pode induzir disfunções no integumento resultando no acúmulo de sais de cálcio sob a cutícula (WANG et al., 1999). Além disso, animais infectados apresentam uma coloração vermelha no corpo e nos apêndices devida à expansão dos cromatóforos (LIGHTNER et al., 1998; NADALA et al. 1998), anorexia (CHOU et al., 1995), cutícula solta (LO et al., 1996a), inchaço na região das brânquias devido ao acúmulo de fluidos (OTTA et al., 1999), inchaço e coloração amarelada no hepatopâncreas (SAHUL-HAMEED et al. 1998) e diminuição na velocidade de coagulação da hemolinfa (WANG et al., 2000).

Apesar dos principais sintomas da doença terem sido identificados, pouco se sabe sobre o mecanismo de entrada e infecção das células pelo WSSV. Aparentemente, a replicação do WSSV começa nas células epiteliais do intestino e do estômago, células das brânquias e tecido conectivo do hepatopâncreas (CHANG et al., 1996; DI LEONARDO et al., 2005). O mecanismo de distribuição do vírus a partir dos locais primários de infecção não foi elucidado ainda (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008). Enquanto alguns estudos indicam que o vírus infecta

hemócitos e assim chega aos outros órgãos (WANG et al., 2002; DI LEONARDO, 2005), outros mostram que os hemócitos não são infectados e o vírus seria transportado livre na hemolinfa (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2007). O WSSV infecta tecidos de origem ecto- e mesodérmica, como por exemplo, epidérmica, brânquias, intestino anterior e posterior, glândula antenal, órgão linfóide, músculo, olho, coração, gônadas, células hematopoiéticas e células associadas com o sistema nervoso. Este grande número de tecidos infectados pode causar disfunções em múltiplos órgãos e levar a morte (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008). Ainda não se sabe exatamente o mecanismo de infecção destes tecidos, ou as vias que estão envolvidas na doença.

A morfogênese do vírus nas células foi caracterizada (DURAND et al., 1997; WANG et al., 2006). Inicialmente, as células infectadas apresentam núcleos ligeiramente hipertrofiados. Um nucleossomo viral composto de proteínas virais organizadas de forma fibrilar é formado. No citoplasma, o retículo endoplasmático e os ribossomos livres aumentam. O material fibrilar no núcleo induz a formação de membranas circulares que são preenchidas com material central do vírus. O núcleo se torna hipertrofiado e redondo à medida que o número de partículas virais aumenta. A maioria das organelas está desintegrada ou formando estruturas membranosas. O envelope envolve o nucleocapsídeo e uma expansão em forma de cauda se forma. Neste estágio as células hospedeiras estão severamente danificadas e desorganizadas.

No presente estudo, foram geradas duas bibliotecas de cDNAs de *L. vannamei* naturalmente infectados por WSSV, através de SSH. Vários trabalhos identificaram genes diferencialmente expressos em resposta a infecção por WSSV em camarões infectados experimentalmente (PAN et al., 2005; CLAVERO-SALAS et al., 2007; REYES et al., 2007; GARCIA et al., 2009). Entretanto, nestes estudos, os

camarões eram expostos a uma alta concentração de partículas virais e estavam em condições controladas de laboratório, as quais não condizem com o ambiente de um tanque de cultivo. Até onde sabemos, não existe nenhum estudo avaliando as respostas moleculares de camarões naturalmente infectados pelo WSSV.

Fatores ecológicos e ambientais estão intimamente ligados com a ocorrência de doenças em aqüicultura. Segundo Snieszko (1973), as doenças em aqüicultura são um resultado da interação entre o hospedeiro, o ambiente e o patógeno. Animais em ambientes estressantes estão mais suscetíveis à ocorrência de doenças. No ambiente de cultivo, os animais podem estar expostos a variações bruscas de temperatura, baixo oxigênio dissolvido e alterações significativas nos níveis de salinidade (DE LA VEGA et al., 2007). Em camarões, organismos epicomensais das brânquias, normalmente inócuos, podem causar doenças quando há um grande número de animais no tanque ou sob condições estressantes (LIGHTNER; REDMAN, 1998). Vários trabalhos mostram que a incidência de doenças aumenta com a densidade de animais nos tanques (SPAARGAREN, 1998; BELAK et al., 1999). O estresse resultante da baixa qualidade ambiental e do cultivo intensivo é um dos gatilhos para a transição de uma doença de um estado crônico para infecções agudas e parece ser resultado de uma redução na capacidade imunológica dos camarões

Em áreas com muitos cultivos intensivos, os efluentes das fazendas são liberados na água e contaminantes químicos e biológicos recirculam entre as fazendas (KAUTSKY et al., 2000). Esta situação foi observada nos cultivos afetados pelo primeiro surto de Mancha Branca em Santa Catarina, em 2005. De acordo com Seiffert (2005), a doença apenas se manifestou em cultivos com problemas de qualidade de água e de solo, como por exemplo, altos teores de sulfeto e teores de material orgânico acima de 10%. Os tecidos utilizados no presente trabalho são

provenientes de animais infectados pelo WSSV coletados neste período, ou seja, cultivados sob condições estressantes, de baixa qualidade de água. O objetivo deste trabalho foi identificar os genes diferencialmente expressos em camarões naturalmente infectados pelo WSSV, vivendo em um ambiente estressante, de baixa qualidade de água.

A metodologia escolhida para a identificação dos genes diferencialmente expressos foi a SSH, considerada uma das melhores metodologias para a análise de genes diferencialmente expressos. Esta tecnologia combina normalização e subtração em um mesmo procedimento baseado na supressão da PCR (DIATCHENKO et al., 1996), e permite o isolamento de cDNAs diferencialmente expressos com poucas seqüências genômicas. Entretanto, foi relatado que a subtração nem sempre é completa, gerando clones que não resultam necessariamente da expressão diferencial (PORKKA, VISAKORPI; 2001).

A Biblioteca 1 consiste de genes induzidos em camarões infectados por WSSV coletados em fazendas com surtos da doença. Foram encontrados 61 genes, agrupados em 28 categorias, de acordo com a sua função. A Biblioteca 2 consiste de genes reprimidos nestes animais, nesta biblioteca foram encontrados 31 genes pertencentes a 8 categorias. Os genes induzidos pertencem a várias classes diferentes, indicando que a infecção pelo WSSV afeta vários processos celulares, como por exemplo, a síntese de ATP, formação do citoesqueleto, adesão celular e transporte de moléculas, entre outros. Este resultado está de acordo com estudos anteriores, que encontraram classes gênicas similares àquelas encontradas no presente trabalho (WANG et al., 2007a; ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008). Por outro lado, encontrou-se um número menor de classes de genes reprimidos, na Biblioteca 2.

Apenas 16,8% das seqüências identificadas não apresentaram similaridade

com seqüências conhecidas depositadas em bancos de dados. Este número, entretanto, é muito maior (42,7%) se considerarmos seqüências classificadas na categoria *Outros*, que em sua maioria apresentaram similaridade com ESTs de *L. vannamei* não identificadas, clones e proteínas hipotéticas. Este grande número de seqüências não identificadas pode ser explicado pelo pequeno número de genes de crustáceos identificados, quando comparados com mamíferos, por exemplo. O mesmo resultado foi encontrado em outros estudos envolvendo crustáceos (REYES; SALAZAR; GRANJA, 2007; VEGA et al., 2007; ZHAO et al., 2007).

Genes induzidos

Uma das classes de genes com o maior número de seqüências foi a *Síntese de ATP*. Outros estudos com WSSV também encontraram um aumento em genes desta classe. Clavero-Salas et al. (2007), encontrou uma indução da subunidade α da Na^+/K^+ ATPase em brânquias de *L. vannamei* infectados em laboratório com WSSV. Leu et al. (2007), encontrou os mesmos genes que foram identificados nesta classe, no presente trabalho, em uma biblioteca de pós-larvas de *P. monodon* infectadas com WSSV. Por outro lado, Wang et al. (2006), observou uma inibição da cadeia A da ATP sintase em camarões *Fenneropenaeus chinensis* infectados com WSSV. Estudos com outros vírus mostram que a infecção pode causar alterações na morfologia e na localização das mitocôndrias, assim como no funcionamento da cadeia respiratória (RADOVANOVIC et al., 1999; LEE et al., 1999; MURATA et al., 2000; D'AGOSTINO et al., 2002; DERAKHSHAN, 2006).

A classe *Metabolismo* também apresentou um grande número de seqüências. Um dos genes encontrados foi a fosfoenolpiruvato carboxiquinase, uma enzima que faz parte da gliconeogênese, convertendo oxaloacetato a fosfoenolpiruvato e dióxido de carbono. As brânquias são um dos órgãos onde pode ocorrer a gliconeogênese (THABREW et al., 1971). Alguns fatores podem aumentar

a gliconeogênese em crustáceos, como hipóxia e estresse hiperosmótico (SCHEIN et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2004). Djavani et al. (2009), observaram um aumento na expressão de genes da gliconeogênese em macacos *Rhesus* infectados com o vírus da coriomeningite linfocítica. Estes autores observaram um aumento na expressão de vários genes relacionados ao metabolismo de energia, indicando que a infecção pelo vírus causa um efeito parecido com a inanição. Uma situação similar pode ocorrer nas células infectadas pelo WSSV, já que o resultado final da infecção é um colapso nas atividades celulares. Leu et al. (2007), encontraram um aumento em enzimas da via glicolítica em pós-larvas infectadas pelo WSSV, indicando que nestes organismos o metabolismo de glicose encontrava-se alterado.

Outro gene envolvido no metabolismo que foi induzido é a hidroxisteróide desidrogenase, uma enzima envolvida na biossíntese do cortisol. Este gene não foi identificado em crustáceos, mas em estudos com HIV (CHITTIPROL et al., 2009) observou-se uma desregulação da hidroxisteróide desidrogenase, provavelmente associada a um aumento no cortisol nos indivíduos infectados por HIV. Apesar de não existir informações a respeito, a infecção pelo WSSV pode estar afetando a síntese de esteróides no camarão, como por exemplo, os hormônios envolvidos na ecdise.

Os genes de proteínas do citoesqueleto, actina e tubulina, foram encontrados. O transporte intracelular de patógenos é um processo ativo e geralmente envolve tanto actina quanto tubulina (HENRY et al., 2006). Actinas são proteínas conservadas que participam da contração muscular, motilidade celular, divisão celular e estrutura do citoesqueleto (POLLARD, 1990). Além disso, as actinas do citoesqueleto geralmente participam do ciclo de vida do vírus (RADTKE et al., 2006). Em invertebrados, três tipos principais de actina foram identificados, α , β e γ . As actinas α são encontradas nos tecidos musculares, enquanto as actinas β e γ

são encontradas na maioria das células (LEU et al., 2007). Sabe-se que a proteína do envelope de WSSV, VP 26, interage com a actina (XIE; YANG, 2005). Wu et al. (2008), identificaram uma proteína Rab GTPase que interage com a β -actina, tropomiosina e a proteína do envelope viral VP 466 durante o processo de fagocitose. Estes autores sugerem que este mecanismo de fagocitose seja parte do sistema imune inato dos camarões. O aumento na expressão da actina encontrado no presente trabalho pode estar relacionado a um aumento na taxa de fagocitose, como defesa contra a infecção viral.

Tubulina, o componente dos microtúbulos, influencia o formato e a polaridade das células eucarióticas, media o movimento dos cromossomos e organiza espacialmente organelas citoplasmáticas ligadas à membrana (ZHENG et al., 1998). A tubulina participa da síntese de RNA viral (MOYER et al., 1986) e auxilia no transporte das partículas virais, tanto no processo de invasão da célula hospedeira, quanto na liberação das novas partículas virais do núcleo. (TALHOUK; VOLKMAN, 1991; HENRY et al., 2006). O aumento na expressão da tubulina no presente trabalho pode estar associado ao transporte das partículas virais pelas células das brânquias. Em camarões *F. chinensis* (WANG et al., 2008) e lagostins *Procambarus clarkii* (ZENG; LU, 2009) infectados com WSSV, também foi encontrado um aumento na expressão da tubulina. De la Vega et al. (2007), encontraram um aumento na expressão da tubulina em *P. monodon* expostos a hipertermia e hipóxia.

Na categoria *Adesão Celular*, foram encontrados três genes. Um deles é a neuropilina. Neuropilinas são receptores para as semaforinas e fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) (BOVENKAMP et al., 2004). Os VEGFs são fatores de angiogênese e sua super-expressão está relacionada a linfoangiogênese associada a tumores (CAUNT et al., 2008), enquanto as semaforinas têm um papel na regeneração do sistema nervoso, desenvolvimento cardiovascular, atividades do

sistema imune e na angiogênese tumoral (BOVENKAMP et al., 2004, SERINI et al., 2009). A neuropilina também apresenta um papel na angiogênese de tumores (CAUNT et al., 2008). O vírus linfotrópico de células-T humano tipo 1 (HTLV-1) interage com a neuropilina para invadir os linfócitos (LAMBERT et al., 2009). Este vírus mimetiza o VEGF para ligar-se à neuropilina e invadir a célula.

Outro gene envolvido na adesão celular encontrado foi o fator 5 de crescimento de fibroblastos. Os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) fazem parte de uma grande família de polipeptídeos encontrados desde nematóides até humanos. Durante o desenvolvimento embrionário, os FGFs têm diversos papéis na regulação da proliferação celular, migração e diferenciação. Em organismos adultos, os FGFs atuam no reparo de tecidos, resposta a danos e na transdução de sinal no sistema nervoso. Quando expressas inapropriadamente, estas proteínas podem contribuir para o surgimento de cânceres (ORNITZ; ITOH, 2001). Por outro lado, Soler-Garcia et al. (2009), encontraram um aumento de FGFs em indivíduos infectados por HIV.

O terceiro gene relacionado a adesão celular encontrado foi a glicoproteína dos trofoblastos. Os trofoblastos são células que se formam à partir da camada externa do blastocisto, têm a função de fornecer nutrientes ao embrião e formam grande parte da placenta. É possível que a seqüência identificada na Biblioteca 1 seja de outro gene, já que foram utilizadas brânquias na subtração.

A categoria *Modelagem do nucleossomo* foi identificada, com uma seqüência da histona H2B. Em camarões *L. vannamei*, foi encontrada uma atividade antimicrobiana das histonas (PATAT et al., 2004). Entretanto, não existe evidência que estas proteínas também tenham um papel na resposta contra vírus. Sabe-se que o vírus do herpes simplex e do herpes associado a sarcomas entram no ciclo lítico devido a um aumento na acetilação de algumas histonas (PANTRY;

MEDVECZKY, 2009; FERENCZY; DELUCA, 2009). Entretanto, não foi observado um aumento na transcrição dos genes das histonas.

Três genes da categoria *Transporte* foram identificados na Biblioteca 1. A proteína SEC 61, envolvida na translocação de proteínas no retículo endoplasmático é um deles. Esta proteína é composta de múltiplas subunidades e forma um canal de transporte de proteínas (translocon) (SKACH, 2007). O translocon direciona proteínas hidrofílicas para o lúmen do retículo endoplasmático e insere proteínas hidrofóbicas na membrana plasmática (SAURÍ et al., 2007). Além disso, a SEC61 está envolvida no transporte de proteínas defeituosas para fora do retículo endoplasmático. Wang et al. (2006), encontraram um aumento na transcrição de SEC61 através de *microarray* de cefalotórax de *F. chinensis* infectados com WSSV. Muitas proteínas virais são transmembrana, sendo necessária a inserção na bicamada lipídica através da passagem pela SEC61 (SAURÍ et al., 2007). As células infectadas pelo WSSV provavelmente têm toda a sua maquinaria envolvida na síntese de partículas virais, assim, pode haver um aumento na síntese de SEC61 devido a um aumento na produção de proteínas virais.

Outra proteína relacionada ao transporte encontrada foi a sinaptoporina. Esta proteína faz parte das vesículas sinápticas e não foi identificada em crustáceos até hoje. Entretanto, como o tecido utilizado no presente estudo foi brânquias, pode-se tratar de outra proteína com uma seqüência similar à sinaptoporina.

Outra proteína encontrada relacionada ao transporte foi a proteína carreadora de soluto da família 25. Estas proteínas estão envolvidas no transporte de metabólitos, nucleotídeos e cofatores para o interior das mitocôndrias, mas o mecanismo ainda é pouco conhecido (CASIMIR et al., 2009). Até onde sabemos esta proteína não foi identificada em crustáceos. Bai et al. (2005), identificaram uma interação desta proteína com proteínas do vírus da hepatite B. O aumento nesta

proteína pode estar relacionado a um aumento na atividade das mitocôndrias, já que encontramos um aumento em vários genes mitocondriais. Este aumento na atividade mitocondrial levaria a um maior transporte de moléculas, sendo necessário um aumento na síntese destas proteínas carreadoras de soluto.

O transporte de moléculas, de forma geral, parece ser alterado pela infecção viral, indicando que o vírus desvia processos celulares para a síntese de partículas virais.

Uma proteína associada ao *spliceossomo* foi identificada e classificada no grupo *Processamento de RNA*. O *spliceossomo* é um complexo formado por RNA e proteínas que remove íntrons do pré-RNA transcrito. O vírus da herpes simples interage com uma proteína associada ao *spliceossomo* e inibe o *splicing* de mRNAs do hospedeiro. A inibição do *splicing* provavelmente facilita a exportação de transcritos de genes virais (BRYANT et al., 2001). O HIV-1 também tem uma proteína (Vcr) que interage com uma proteína associada ao complexo do *spliceossomo*, provavelmente com o objetivo de aumentar a exportação e o *splicing* de mRNAs virais (TANGE et al., 2001). A indução deste tipo de proteína não foi observada em camarões infectados por vírus, mas é possível que o WSSV use um mecanismo similar para aumentar o *splicing* de seus RNAs e inibir a transcrição de genes do hospedeiro.

A proteína QM, relacionada à apoptose, foi identificada na Biblioteca 1. Este gene foi identificado pela primeira vez em uma linhagem celular não-tumorigênica, através de subtração em relação a células com tumor de Wilm, e foi proposta como um supressor tumoral (DOWDY et al., 1991). Estas proteínas são altamente conservadas e têm um papel no crescimento e diferenciação celular e apoptose (MARTY et al., 1993; GREEN et al., 2000; LILLICO et al., 2002). Em mamíferos, esta proteína está envolvida no processamento pós-traducional de proteínas durante a

diferenciação de vários tecidos (MILLS et al., 1999). Esta proteína também parece estar em várias vias de transdução de sinal em células tumorais (ANDERSON et al., 1990; KAY et al., 2000; SHIMA et al., 2001). Em carpa, *Ctenopharyngodon idellus*, um papel na defesa anti-viral e antibacteriana foi proposta para esta proteína (WEN et al., 2005). Os autores sugerem que esta proteína atua na resposta inflamatória. Pan et al. (2005), identificaram esta proteína através de subtração de hepatopâncreas de camarões resistentes a WSSV. Estes autores sugerem um papel desta proteína na apoptose, já que nos animais resistentes a infecção a apoptose pode estar aumentada. A interação da proteína QM com a hemocianina e a miosina foi observada no estudo de Xu et al. (2008), indicando que esta proteína pode participar no processo de profenoloxidação (proPO). Estes autores também provaram que a proteína QM pode regular a atividade da fenol oxidase, uma enzima chave no processo de ativação da proPO. Em estudos com vírus de plantas, foi identificada a interação da proteína QM com uma quinase de defesa (NSK), que está envolvida na mediação da resposta antiviral (ROCHA et al., 2008). Aparentemente, a proteína QM participa de processos diferentes de defesa antiviral, indicando um papel importante desta proteína na defesa contra patógenos. No presente trabalho, os camarões infectados provavelmente aumentaram a transcrição desta proteína como forma de defesa contra o WSSV, entretanto, não podemos afirmar qual o mecanismo envolvido.

Foram encontrados dois genes pertencentes à classe *Sinalização Celular*. Um deles é o receptor para a proteína quinase C (RACK1). Estas proteínas são um grupo de proteínas ligantes à proteína quinase C (PKC) que mediam funções da PKC e são cruciais na translocação e no subsequente funcionamento das isoenzimas de PKC (CHEN et al., 2003). Este gene também foi identificado em uma biblioteca de ESTs de *P. monodon* infectados com WSSV. A seqüência é altamente

conservada e participa de vários processos, como a sinalização celular, desenvolvimento, adesão, crescimento e movimento celular, e resposta imune. Esta proteína interage com várias proteínas virais. O aumento na expressão da RACK1 após a infecção com o vírus Epstein-Barr parece iniciar uma estratégia de proteção viral, para manter a capacidade das células fagocíticas se ligarem ao vírus (TARDIF et al., 2002). RACK1 também é um repressor da proteína 1A de adenovírus, provavelmente antagonizando seus efeitos na transcrição (SANG et al., 2001). A RACK1 interage com a proteína VP9 do WSSV (TONGANUNT et al., 2009). Os autores afirmam que a RACK1 possa mediar as funções intracelulares da VP9 do WSSV.

Outro gene relacionado à sinalização celular identificado foi a quinase do fosfatidilinositol (PI3K). A PI3K é uma enzima citoplasmática que fosforila o inositol na posição D3 para produzir compostos como: PI-3-fosfato, PI-3,4-bifosfato e PI-3,4,5-bifosfato, todos envolvidos na sinalização celular (CANTLEY et al., 1991). A atividade da PI3K é estimulada por hormônios, fatores de crescimento, produtos oncogênicos e acredita-se que ela tenha um papel na atividade mitogênica (CANTLEY et al., 1991). Não existem evidências da indução da PI3K por infecções virais, mas como o WSSV altera vários processos celulares, é possível que direta ou indiretamente, cause a indução da PI3K.

A proteína calcificada de cutícula foi identificada na categoria *Formação da Cutícula de Crustáceos*. Estas proteínas estão relacionadas à síntese da cutícula em crustáceos, tendo sua transcrição aumentada na fase da muda (KUBALLA et al., 2007). Esta proteína nunca foi diretamente relacionada à infecção pelo WSSV, mas sua indução pode estar relacionada ao depósito anormal de sais de cálcio na cutícula dos animais, que caracteriza a doença.

O gene do fator de alongação 1 – alfa (EF1- α) foi identificado na classe

Proteína de ligação a aminoácidos. Os fatores de elongação dos hospedeiros parecem estar envolvidos na multiplicação de vírus de RNA (THIVIERGE et al., 2008). O WSSV é um vírus de DNA, porém o EF1- α foi identificado em outras bibliotecas de cDNA de camarões infectados por WSSV (LEU et al., 2007; HE et al., 2005; ZHAO et al., 2007). Segundo Duttaroy et al. (1998), o EF1- α também está envolvido na apoptose e interage com proteínas do citoesqueleto. A indução do EF1- α pode estar relacionada com um aumento na apoptose, já que foi identificada uma proteína apoptótica (proteína QM). Além disso, seu aumento pode estar relacionado com a indução de proteínas do citoesqueleto (actina e tubulina).

Dois genes foram identificados na categoria *Processo de Modificação de Proteínas*, ubiquitina e subunidade 1 da enzima ativadora de SUMO1. A ubiquitina participa da via de degradação de proteínas ubiquitina-proteassomo. Esta via é uma das principais formas de degradação de proteínas na célula, atuando em vários processos como a progressão celular, biogênese de organelas, regulação transcricional, processamento de antígenos e apoptose (CHEN et al., 2008; SHEN et al., 2009). Uma indução da ubiquitina também foi observada em outros estudos com camarões infectados por WSSV (HE et al., 2005; WANG et al., 2006). Segundo Aviel et al. (2000), a proteína latente de membrana do vírus Epstein-Barr pode ser degradada pela ubiquitina, e o gene da ubiquitina pode ser transcricionalmente induzido pela infecção lítica com o vírus da herpes simplex, causando acúmulo do RNA da ubiquitina e da própria proteína na célula (LATCHMAN et al., 1987).

As proteínas SUMO (proteínas modificadoras pequenas relacionadas à ubiquitina) também fazem marcação de proteínas, como a ubiquitina. Sabe-se que estas proteínas estão envolvidas na transcrição gênica, replicação de DNA, segregação cromossômica, recombinação homóloga, transporte de íons, fissão e fusão de mitocôndrias e transporte de proteínas ao longo dos axônios (NATURE,

2008). Uma alteração na expressão das proteínas SUMO foi observada em camarões infectados por WSSV (WANG et al., 2007a) e pelo Vírus da Cabeça Amarela (YHV) (PONGSOMBOON et al., 2008). Alguns vírus de DNA podem utilizar as proteínas SUMO, tanto bloqueando-as quanto empregando-as a seu favor (NATURE, 2008).

A oncoproteína nm23 foi classificada na categoria *Inibidor da Metástase*. Este gene foi isolado pela primeira vez de um melanoma de camundongo (STEEG, et al. 1988). A oncoproteína nm23 é uma nucleosídeo difosfato quinase com atividades de histidina quinase e autofosforilação da serina, que suprime a metástase em algumas neoplasias. Estudos recentes sugerem que a oncoproteína nm23 é uma enzima multifuncional envolvida no controle da progressão do ciclo celular e da transcrição, reparo de DNA e motilidade celular (POSTEL et al., 2002; TOMASSI et al., 2003). CLAVERO-SALAS et al. (2007), encontraram uma maior expressão desta proteína em *L. vannamei* infectados com WSSV.

Um grande número de genes de proteínas ribossomais foi encontrado. Outros estudos envolvendo SSH em camarões infectados com WSSV encontraram uma indução destas proteínas (DE LA VEGA et al., 2007; ZHAO et al., 2007). Estas proteínas participam de síntese de proteínas e em geral, são expressas constitutivamente. Contudo, proteínas ribossomais, assim como fatores de transcrição e alongamento foram identificados como envolvidos na regulação celular, transformação e morte, conferindo novas funções a estas proteínas (ZAPATA et al., 2009).

Genes reprimidos

Um número menor de seqüências foi identificada na Biblioteca 2, indicando que a infecção pelo WSSV talvez induza mais genes do que reprima.

Uma das categorias de genes reprimidos foi a *Fosfatase de proteínas*. Uma proteína fosfatase foi identificada nesta categoria. Uma proteína fosfatase do camarão interage com as proteínas ORF427 e WSSV403, associadas à latência do vírus (LU; KWANG, 2004; HE; KWANG, 2008). No presente estudo, entretanto, a infecção pelo vírus parece reduzir a expressão desta proteína.

Uma seqüência de Iospina, um inibidor de proteases de serina foi identificado. As Iospinas são um tipo de serpinas, provenientes de carrapatos (MULENGA et al., 2007). As serpinas regulam diversas cascatas proteolíticas, entre elas as cascatas de ativação das respostas de defesa de artrópodes (ativação da proPO e iniciação da via Toll) (LIU et al., 2009). Em hemócitos de *P. monodon* infectados com *Vibrio harveyi*, ocorre um aumento na expressão de serpina ao longo do tempo (SOMBOONWIWAT et al., 2006). A inibição das serpinas pode ser devida à uma incapacidade das células se defenderem contra a infecção por WSSV.

Na categoria *Defesa contra Bactérias*, foi identificado um precursor do peptídeo antimicrobiano pleuraína-G7. A pleuraína é um peptídeo anti-microbiano que foi isolado da pele do anfíbio *Rana pleuraden*. Segundo Wang et al. (2007b), os membros desta família são compostos por 26 aminoácidos com uma seqüência N-terminal única e uma seqüência heptapeptídeo com pontes dissulfeto. A pleuraína não tem similaridade com peptídeos conhecidos e apresenta atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e fungos. Esta é a primeira vez que este gene é identificado em camarões, e sua diminuição pode indicar uma diminuição na resposta imune dos camarões infectados por WSSV.

Uma proteína pequena de ligação a GTP (protein G) foi identificada na categoria *Transdução de Sinal*. As proteínas G existem em todos os eucariotos e constituem uma superfamília com mais de 100 membros. Esta superfamília é classificada estruturalmente em cinco famílias: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf, e Ran. Elas

regulam uma grande variedade de funções celulares como relógios biológicos, que iniciam e terminam funções celulares específicas e determinam os períodos para a continuação de funções celulares específicas (TAKAI et al., 2001). Uma proteína de *P. monodon* foi identificada como uma proteína G que se liga à proteína VP28 do WSSV (SRITUNYALUCKSANA et al., 2006).

Na categoria *Biossíntese de Ácidos Nucléicos*, foi identificada uma quinase de nucleosídeos fosfato. Esta proteína faz a transferência do ATP dos nucleotídeos difosfato para os nucleotídeos difosfato, produzindo assim NTPs para a síntese de ácidos nucleicos, CTP para a biossíntese de lipídeos, UTP para a síntese de polissacarídeos e GTP para a elongação de proteínas, transdução de sinal e polimerização de microtúbulos. Estas proteínas também estão envolvidas no crescimento celular, diferenciação, metástase e no controle da endocitose (WANG et al., 2007a). Wang et al. (2006), também encontraram uma inibição deste gene em camarões infectados por WSSV, através de *microarray*. Esta diminuição pode indicar uma alteração em todos os processos onde a proteína quinase atua.

Um cluster de gene HOX foi identificado na categoria *Morfogênese*. Os genes Hox são um tipo de genes *homeobox*, e especificam a identidade dos segmentos ao longo do eixo antero-posterior. Estes genes já foram identificados em *L. vannamei* (PAWLAK; HERTZLER, 2008), entretanto, não há evidência de supressão destes genes pela infecção por WSSV.

Na Biblioteca 2 também foram encontrados muitas proteínas ribossomais, inclusive algumas são as mesmas encontradas na Biblioteca 1. Este alto número de proteínas ribossomais talvez seja um *background* da técnica, que pode mascarar outros genes de ocorrência rara. Os trabalhos envolvendo SSH em camarões publicados até o momento, ou apresentam poucas seqüências de proteínas ribossomais ou não apresentam este resultado.

Confirmação da expressão gênica por PCR em Tempo Real

A expressão diferencial dos genes proteína calcificada de cutícula, oncoproteína nm23, receptor para proteína quinase e ubiquitina foi confirmada através de PCR em Tempo Real. Para a normalização dos dados, foram utilizados os genes do RNA ribossomal 18S e da ciclofilina. A expressão destes genes foi avaliada pelo teste t de Student e não apresentou diferença estatística.

A ubiquitina teve um aumento de 91 vezes nos animais infectados pelo WSSV, sendo que esta diferença foi significativamente estatística. A ubiquitina é uma proteína envolvida na apoptose e como discutido anteriormente, houve um aumento na expressão de várias proteínas relacionadas à apoptose.

A proteína calcificada de cutícula teve um grande aumento (23 vezes), entretanto esta expressão maior não foi estatisticamente significativa. Foi observado um maior desvio padrão neste gene em comparação com os outros. Este fato pode ser devido à grande uma variação individual na expressão gênica deste gene, em função do metabolismo envolvido. Esta proteína está envolvida no processo de muda, e possíveis variações na sincronização do processo podem alterar os níveis desta proteína. Uma alternativa seria a análise de animais na mesma fase da muda.

A oncoproteína nm23 e o receptor para proteína quinase apresentaram um aumento de duas vezes. Apesar destas diferenças não serem significativas estatisticamente, elas indicam um aumento na expressão destes genes nos animais infectados pelo WSSV. A ubiquitina pode ser utilizada como gene indicador das respostas metabólicas e de defesa contra o vírus.

Várias classes de genes diferentes foram identificadas na Biblioteca 1 (genes induzidos), indicando que a infecção pelo WSSV altera um grande número de vias metabólicas diferentes. O metabolismo energético parece ser aumentado, de forma geral. Este aumento pode estar relacionado a uma maior demanda energética,

devido à síntese de um grande número de partículas virais. Este aumento no metabolismo pode contribuir para uma depleção das reservas energéticas celulares, levando a um colapso nos estágios finais da infecção.

Outra via que parece aumentada de forma geral é a apoptose, com vários genes envolvidos neste processo sendo induzidos. A apoptose parece ser um mecanismo de defesa do organismo contra a infecção viral, e seu aumento pode ser devido a uma tentativa do organismo se defender contra a infecção viral.

Alguns genes envolvidos na angiogênese e na inibição da metástase foram identificados. É possível que ao mesmo tempo em que o vírus induza uma maior proliferação celular, o organismo tente responder à infecção reduzindo esta proliferação.

Os genes avaliados através de PCR em Tempo Real tiveram um aumento da expressão nos animais infectados pelo WSSV, mas este aumento foi estatisticamente significativo apenas no caso da ubiquitina. A ubiquitina pode ser indicada como um gene marcador de respostas metabólicas e de defesa contra o vírus. A proteína calcificada de cutícula apresentou um aumento elevado nos animais infectados, entretanto, este gene deve ser avaliado com cuidado devido à grande variação individual. A oncoproteína nm23 e a proteína quinase apresentaram um aumento, mas seu uso é limitado pelo fato da diferença entre os grupos ter sido de apenas 2 vezes. Posteriormente, outros genes da biblioteca serão avaliados através de PCR-RT, como por exemplo a actina, a proteína QM e a sec 61. Espera-se que estes genes apresentem um grande limiar de aumento e tenham uma pequena variação individual.

CONCLUSÕES

O presente trabalho consistiu de três linhas principais. A primeira parte teve como objetivo a padronização da metodologia de PCR-RT para detecção do WSSV em *L. vannamei*. Foi determinado um limite mínimo de detecção de 3,55 cópias virais/ μ l de amostra. A PCR-RT mostrou-se muito mais sensível que a PCR *Nested*, que tem um limite de detecção de $3,55 \times 10^5$ cópias do genoma viral. Amostras de animais coletados em campo, positivas e negativas através de PCR *Nested* foram quantificadas através de PCR-RT. A carga viral das amostras positivas foi determinada, e algumas amostras negativas por PCR *Nested* mostraram-se positivas fracas por PCR-RT. Este resultado mostra a necessidade de desenvolver técnicas sensíveis para monitorar infecções leves, em indivíduos assintomáticos e carreadores do vírus. A identificação de infecções leves é importante principalmente na seleção de reprodutores, produção de pós-larvas e desenvolvimento de linhagens de animais SPF.

Outros vírus, como por exemplo, o IHNV e o IMNV podem ser analisados por PCR-RT. Utilizando-se sondas, como a Taqman, seria possível inclusive desenvolver uma PCR-RT *Multiplex*, para a detecção simultânea destes vírus e do WSSV. No caso do IMNV, é muito importante detectar a presença deste vírus em animais (pós-larvas) que sejam importados do Nordeste, para evitar a introdução deste patógeno na região Sul.

Na segunda parte do trabalho, foi realizada a genotipagem de isolados brasileiros de WSSV. Foram utilizadas amostras de WSSV de Santa Catarina e da Bahia. As amostras de Santa Catarina tiveram o mesmo genótipo para os marcadores analisados, apesar de terem sido coletadas em regiões do estado e períodos diferentes. As amostras da Bahia tiveram um padrão diferente de repetição para os minissatélites utilizados, indicando que existem pelo menos duas “cepas” ou

isolados geográficos de WSSV no Brasil. Com base nestes resultados, sugerimos duas hipóteses para explicar este fato. É possível que introduções múltiplas do WSSV possam ter ocorrido no país. Outra explicação possível é que o WSSV tenha sofrido mutações desde sua introdução no Brasil.

Os isolados brasileiros também foram comparados com isolados de outros países das Américas. Aparentemente, todos os isolados são diferentes quanto ao padrão de repetições dos marcadores analisados. Isto pode ser devido a mutações no genoma do WSSV, após a sua introdução nos diferentes países. Entretanto, Santa Catarina, México, Nicarágua, Honduras e Panamá possuem mais de 9 repetições para a ORF 94, enquanto a Bahia e os EUA têm menos de 9 repetições. Uma similaridade de virulência talvez possa estar relacionada a esta similaridade no número de repetições. Uma perspectiva para a continuação deste trabalho é analisar um número maior de amostras de Santa Catarina, para confirmar a existência de um único isolado no estado e se possível, compará-lo com amostras provenientes do Ceará, estado que teve um surto de Mancha Branca em 2005. Assim, seria possível afirmar se os dois casos de 2005 foram causados pelo mesmo isolado ou não. Seria interessante, neste caso, tentar identificar a origem do WSSV no Brasil, se o Nordeste ou o Sul do Brasil e como o vírus se espalhou pelo país.

A terceira parte do trabalho teve como objetivo identificar genes diferencialmente expressos em animais de cultivo infectados com o WSSV. Várias classes de genes foram induzidas nos camarões infectados. A infecção pelo WSSV parece alterar o metabolismo celular de uma forma geral, afetando desde o metabolismo energético até proteínas do citoesqueleto. Posteriormente, pretende-se realizar a subtração de amostras de hemolinfa, para isolar genes diferencialmente expressos neste tecido. Alguns genes identificados na Biblioteca foram avaliados através de PCR-RT. Todos apresentaram um aumento na sua expressão, mas

apenas o gene da ubiquitina teve um aumento estatisticamente significativo nos animais infectados. Os genes confirmados como diferencialmente expressos poderão ser utilizados como indicadores das respostas metabólicas dos animais. A expressão diferencial destes genes pode também ser avaliada em animais infectados experimentalmente com o vírus, para confirmar se a expressão diferencial de um dado gene é devida apenas à infecção e/ou pode estar potencializada pela interação vírus *versus* ambiente.

Além disso, o papel destes genes na infecção pode ser também avaliado. Uma outra perspectiva para este trabalho é a obtenção da seqüência completa de alguns genes, sua expressão heteróloga e a produção de anticorpos específicos. Assim, será possível identificar e localizar os produtos destes genes nas células, através de *Western Blotting* e hibridização *in situ*, por exemplo, além de quantificar comparativamente os níveis de proteínas expressas nos animais infectados e naqueles livres da infecção.

BIBLIOGRAFIA

- AI, H.S.; HUANG, Y.C.; LI, S.D.; WENG, S.P.; YU, X.Q.; HE, J.G. Characterization of a prophenoloxidase from hemocytes of the shrimp *Litopenaeus vannamei* that is down-regulated by white spot syndrome virus. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, p. 28-39, 2008.
- ANDERSON, D.; KOCH, C.A.; GRAY, L.; ELLIS, C.; MORAN, M.F.; PAWSON, T. Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors. **Science**, v. 250, p. 979–982, 1990.
- ARTS J.A.J.; TAVERNE-THIELE, A.J.; SAVELKOUL, H.F.J.; ROMBOUT, J.H.W.M. Haemocyte reactions in WSSV immersion infected *Penaeus monodon*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, p. 164-170, 2007.
- Associação Brasileira de Criadores de Camarão. Disponível em: <http://www.abccam.com.br/>. Acesso em: 25 de agosto de 2009.
- ASTROFSKY, K.M.; ROUX, M.M.; KLIMPLE, K.R.; FOX, J.G.; DHAR, A.K. Isolation of differentially expressed genes from white spot syndrome virus (WSSV) infected Pacific blue shrimp (*Penaeus stylirostris*). **Archives of Virology**, v. 147, p. 1799-1812, 2002.
- BACHÈRE, E. Shrimp immunity and disease control. **Aquaculture**, v. 191, p. 3-11, 2000.
- BAI, G.Q.; CHENG, J.; ZHANG, S.-L.; HUANG, Y.-P.; WANG, L.; LIU, Y.; LIN, S.-M. Screening of hepatocyte proteins binding to complete S protein of hepatitis B virus by yeast-two hybrid system. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11(25), p. 3899-3904, 2005.
- BAUMGARTNER, W.A.; HAWKE, J.P.; BOWLES, K.; VARNER, P. W.; HASSON, K.W. Primary diagnosis and surveillance of white spot syndrome virus in wild and farmed crawfish (*Procambarus clarkia*, *P. zonangulus*) in Louisiana, USA. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 85, p. 15-22, 2009.
- BELAK, J.; DHAR, A.K.; PRIMAVERA, J.H.; DELA PENA, L.D.; PETTIT, P.; ALCIVAR-WARREN, A. Prevalence of viral diseases IHNV and WSSV in *Penaeus monodon* from the Philippines and its association with mangrove status and shrimp culture systems. In: ALCIVAR-WARREN, A. (ed), **Proceedings of the Aquaculture and Conservation of Marine Shrimp Biodiversity Symposium**, Tufts University School of Veterinary Medicine, 1999.
- BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyse DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 573-580, 1999.
- BOVENKAMPA, D.E.; GOISHIA, K.; D, BAHARY, N.; DAVIDSON, A.J.; et al. Expression and mapping of duplicate neuropilin-1 and neuropilin-2 genes in developing zebrafish. **Gene Expression Patterns**, v. 4, p. 361–370, 2004.
- BRYANT, H.E.; WADD, S.E.; LAMOND, A.I.; SILVERSTEIN, S.J.; CLEMENTS, J. B. Herpes Simplex Virus IE63 (ICP27) Protein Interacts with Spliceosome-Associated Protein 145 and Inhibits Splicing prior to the First Catalytic Step. **Journal of Virology**, v. 75, p. 4376–4385, 2001.
- BUSTIN, S. .Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 169–193, 2000.

- BUSTIN, S.A.; BENES, V.; NOLAN, T; PFAFFL, M.W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, p. 597-601, 2005.
- CAI, S.L.; HUANG, J.; WANG, C.M.; SONG, X.L.; SUN, X.; YU, J.; ZHANG, Y.; YANG, C.H. Epidemiological studies on the explosive epidemic disease of prawn in 1993-1994. **Journal of Fish China**, v. 19, p. 112–117, 1995.
- CANE, P.A.; COOK, P.; RATCLIFFE, D.; MUTIMER, D.; PILLAY, D. Use of real time PCR and fluorimetry to detect lamivudine resistance-associated mutations in hepatitis B virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 1600–1608, 1999.
- CASIMIR, M.; LASORSA, F.M.; RUBI, B.; CAILLE, D.; PALMIERI, F.; MEDA, P.; MAECHLER, P. Mitochondrial glutamate carrier GC1 as a newly identified player in the control of glucose-stimulated insulin secretion. **Journal of Biological Chemistry**, No Prelo, 2009.
- CAUNT M.; MAK, J.; LIANG, W.-C.; STAWICKI, S.; et al. Blocking Neuropilin-2 Function Inhibits Tumor Cell Metastasis. **Cancer Cell**, v. 13, p. 331–342, 2008.
- CHANG, P. S.; LO, C. F.; WANG, Y. C.; KOU, G. H. Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 27, p. 131-139, 1996.
- CHANG P.S.; CHEN H.C.; WANG Y.C. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crabs and lobsters by in situ hybridization. **Aquaculture**, v. 164, p. 233–242, 1998.
- CHEE, M.; YANG, R.; HUBBELL, E.; BERNO, A.; HUANG, X.C.; STERN, D.; WINKLER, J.; LOCKHART, D.J.; MORRIS, M.S.; FODOR, S.P. Accessing genetic information with high-density DNA arrays. **Science**, v. 274, p. 610–614, 1996.
- CHEN, L. L.; WANG, H. C.; HUANG, C. J.; PENG, S. E.; CHEN, Y. G.; LIN, S. J.; CHEN, W. Y.; DAI, C. F.; YU, H. T.; WANG, C. H.; LO, C. F.; KOU, G. H. Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. **Virology**, v. 301, p. 136-147, 2002.
- CHEN, Y.-H.; WANG, H.-C.; LIN, C.-Y.; CHUANG, N.-N. Effects of Prenyl Pyrophosphates on the Binding of PKC ϵ With RACK1. **Journal of Experimental Zoology**, v. 295, p. 71–82, 2003.
- CHEN, Y.T.; LIN, C.H.; JI, W.T.; LI, S.K.; LIU, H.J. Proteasome inhibition reduces avian reovirus replication and apoptosis induction in cultured cells **Journal of Virological Methods**, v. 151, p. 95-100, 2008.
- CHIOU, T.T.; WU, J.L.; CHEN, T.T.; LU, J.K. Molecular cloning and characterization of cDNA of penaeidinlike antimicrobial peptide from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Marine Biotechnology**, v. 7, p. 119–127, 2005.
- CHITTIPROL, S.; KUMAR, A.M.; KUMAR, H.R.; SATISHCHANDRA, P.; RAO, R.S.; RAVI, V.; DESAI, A.; SUBBAKRISHNA, D.K.; PHILIP, M.; SATISH, K.S.; SHETTY, K.T.; KUMAR M. HIV-1 clade C infection and progressive disruption in the relationship between cortisol, DHEAS and CD4 cell numbers: A two-year follow-up study. **Clinica Chimica Acta**, Jul 1, 2009.
- CHOU, H.Y.; HUANG, C.Y.; WANG, C.H.; CHIANG, H.C.; LO, C.F. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 23, p. 165–173, 1995.

CHU, S.; DERISI, J.; EISEN, M.; MULHOLLAND, J.; BOSTEIN, D.; BROWN, P.O.; HERSKOWITZ, I.; The transcriptional program of sporulation in budding yeast. **Science**, v. 282, p. 699–705, 1998.

CIDASC. **Relatório final. Equipe coordenadora das ações de prevenção, controle e combate à doença da Mancha Branca dos crustáceos.** 2005.

CLAVERO-SALAS, A.; SOTELO-MUNDO, R.R.; GOLLAS-GALVÁN, T.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PEREGRINO-URIARTE, A.B.; MUHLIA-ALMAZÁN, A.; YEPIZ-PLASCENCIA, G. Transcriptome analysis of gills from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* infected with White Spot Syndrome Virus. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, p. 459-472, 2007.

CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J.M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21(18), p. 3674-6, 2005.

DE LA VEGA, E.; DEGNAN, B.M.; HALL, M.R.; COWLEY, J.A.; WILSON, K.J. Quantitative real-time RT-PCR demonstrates that handling stress can lead to rapid increases of gill-associated virus (GAV) infection levels in *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 59, p. 195-203, 2004.

DE LA VEGA, E.; DEGNAN, B.M.; HALL, M.R.; WILSON, K.J. Differential expression of immune-related genes and transposable elements in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) exposed to a range of environmental stressors. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, p. 1072-1088, 2007.

DERAKHSHAN M, WILLCOCKS MM, SALAKO MA, KASS GEN, CARTER MJ. Human herpesvirus 1 proteins Us3 induces an inhibition of mitochondrial electron transport. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 2155-2159, 2006.

DESTOUMIEUX, D.; BULET, P.; LOEW, D.; VAN DORSSELAER, A.; RODRIGUEZ, J.; BACHÈRE, E. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 28398–28406, 1997.

DESTOUMIEUX-GARZON, D.; SAULNIER, D.; GARNIER, J.; JOUFFREY, C.; BULET, P.; BACHÈRE, E. Crustacean immunity: antifungal peptides are generated from the C-terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 47070–47077, 2001.

DHAR, A.K.; DETTROI, A.; ROUX, M.M.; KLIMPEL, K.R.; READ, B. Identification of differential expressed genes in shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with white spot syndrome virus by cDNA microarrays. **Archives of Virology**, v. 148, p. 2381-2396, 2003.

DI LEONARDO V.A., BONNICHON V., ROCH P., PARRINELLO N. & BONAMI J.R. Comparative WSSV infection routes in the shrimp genera *Marsupenaeus* and *Palaemon*. **Journal of Fish Diseases**, v. 28, p. 565–569, 2005.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y.F.; CAMPBELL, A.P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E.D.; SIEBERT, P.D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, p. 6025–6030, 1996.

DIEU, B.T.M.; MARKS, H.; SIEBENGA, J.J.; GOLDBACH, R.W.; ZUIDEMA, D.; DUONG, T.P.; VLAK, J.M. Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam. **Journal of General Virology**, v. 85, 3607–3618, 2004.

DJAVANI, M.; CRASTA, O.R.; ZHANG, Y.; ZAPATA, J.C.; SOBRAL, B.; LECHNER, M.G.; BRYANT, J.; DAVIS, H.; SALVATO, M.S. Gene expression in primate liver during viral hemorrhagic fever. **Virology Journal**, v. 12, p. 6-20, 2009.

DOWDY, S.F.; LAI, K.M.; WEISSMAN, B.E.; MATSUI, Y.; HOGAN, B.L.; STANBRIDGE, E.J. The isolation and characterization of a novel cDNA demonstrating an altered mRNA level in nontumorigenic Wilms' microcell hybrid cells. **Nucleic Acids Research**, v. 19(20), p. 5763-5769, 1991.

DURAND, S.; LIGHTNER, D.V.; NUNAN, L.M.; REDMAN, R.M.; MARI, J.; BONAMI, J.R. Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 27, p. 59-66, 1996.

DURAND, S.; LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M.; BONAMI, J.R. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 29, p. 205-211, 1997.

DURAND, S.V.; LIGHTNER, D.V. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. **Journal of Fish Diseases**, v. 25, p. 381-389, 2002.

DURAND, S.V.; REDMAN, R.M.; MOHNEY, L.L.; TANG-NELSON, K.; BONAMI, J.R.; Lightner, D.V. Qualitative and quantitative studies on the relative virus load of tails and heads of shrimp acutely infected with WSSV. **Aquaculture**, v. 216, p. 9-18, 2003.

DUTTARROY, A.; BOURBEAU, D.; WANG, X.L.; WANG, E. Apoptosis rate can be accelerated or decelerated by overexpression or reduction of the level of elongation factor-1 alpha. **Experimental Cell Research**, v. 238, p. 168-176, 1998.

ESCOBEDO-BONILLA C.M.; ALDAY-SANZ, V.; WILLE, M.; SORGELOOS, P.; PENSART, M.B.; NAUWYNCK, H.J. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, v. 31, 1-18, 2008.

FAO. Disponível em: <http://www.fao.org/>. Acesso em: 25 de agosto de 2009.

FEGAN, D.; CLIFFORD III, H.C. Health management for viral diseases in shrimp farms. In: **BROWDY, C. L.; JORY, D. E.** editors. The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture, 2001.

FERENCZY, M.W.; DELUCA, NA. Epigenetic modulation of gene expression from quiescent hsv genomes. **No prelo**, 2009.

FLEGEL, T. W. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 433-442, 1997.

FREITAS, R.R.; VINATEA, L.; NETTO, S.A. Analysis of the marine shrimp culture production chain in Southern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81(2), p. 287-295, 2009.

GARCÍA, J.C.; REYES, A.; SALAZAR, M.; GRANJA, C.B. Differential gene expression in White Spot Syndrome Virus (WSSV)-infected naïve and previously challenged Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. **Aquaculture**, v. 289, p. 253-258, 2009.

GARGIONI, R., BARRACCO, M.A. Haemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. **Journal of Morphology**, v. 236, p. 209-221, 1998.

GELINSKI NETO, F. **Carcinicultura e meio ambiente: abalando mitos**. Tese de doutorado. 2005. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GRANJA, C.B. ; VIDAL, O.M.; PARRA, G.; SALAZAR M. Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 68, p. 175–180, 2006.

GREEN, H.; CANFIELD, A.E.; HILLARBY, M.C.; GRANT, M.E.; BOOT-HANDFORD, R.P.; FREEMONT, A.J.; WALLIS, G.A. The ribosomal protein QM is expressed differentially during vertebrate endochondral bone development. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 5, p. 1066–1075, 2000.

HALL, M.R.; VAN HAM, E.H. The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 29, p. 290-299, 1998.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HE, J.G.; DENG, M.; LONG, Q.X.; ZHOU, H.M. et al. Theory and strategies for controlling white spot syndrome (WSS) of cultured *Penaeus monodon* in South China. **J Sun Yatsen University Suppl**, v. 39, p. 147–153, 2000.

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

HE, F.; KWANG, J. Identification and characterization of a new E3 ubiquitin ligase in white spot syndrome virus involved in virus latency. **Virology Journal**, v. 5, p. 151, 2008.

HENRY, T.; GORVEL, J.-P.; MÉRESSE, S. Molecular motors hijacking by intracellular pathogens. **Cellular Microbiology**, 8, p. 23–32, 2006.

HOA, T.T.; HODGSON, R.A.; OANH, D.T.; PHUONG, N.T.; PRESTON, N.J.; WALKER, P.J. Genotypic variations in tandem repeat DNA segments between ribonucleotide reductase subunit genes of white spot syndrome virus (WSSV) isolates from Vietnam. In: **Diseases in Asian aquaculture**, Asian Fisheries Society, Manila, p. 339–351, 2005.

HOSSAIN, M. S.; CHAKRABORTY, A.; JOSEPH, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Detection of new hosts for white spot syndrome virus using nested polymerase chain reaction. **Aquaculture**, v. 198, p. 1-11, 2001.

HSU, H.C.; LO, C.F.; LIN, S.C.; LIU, K.F. et al. Studies on effective PCR screening strategies for white spot syndrome virus (WSSV) detection in *Penaeus monodon* brooders. . **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 39, p. 13–19, 1999.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: a DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, p. 868-877, 1999.

INFOFISH. White spot syndrome spreads in Latin America. **Infofish International**, v. 5, p. 37,

1999.

INOUE, K.; MIWA, S.; OSEKO, N.; NAKANO, H.; KIMURA, T.; MOMOYAMA, K.; HIRAOKA, M. Mass mortalities of cultured Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan in 1993: electron microscope evidence of the causative virus. **Fish Pathology**, v. 29, p. 149-158, 1994.

JARASRASSAMEE, B.; SUPUNGUL, P.; PANYIM, S.; KLINBUNGA, S.; RIMPHANICHAYAKIT, V.; TASSANAKAJON, A. Recombinant expression and characterization of five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Marine Biotechnology**, v. 7, p. 46-52, 2005.

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

KARUNASAGAR I., OTTA S.K. & KARUNASAGAR I. Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India. **Aquaculture**, v. 153, p. 9-13, 1997.

KASORNCHANDRA, J.; BOONYARATPALIN, S.; ITAMI, T. Detection of white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: microscopic observation and polymerase chain reaction. **Aquaculture**, v. 164, p. 243-251, 1998.

KAUTSKY, N.; RÖNNBÄCK, P.; TEDENGREN, M.; TROELL, M. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, v. 191, p. 145-161, 2000.

KAY, B.K.; WILLIAMSON, M.P.; SUDOL, M.. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. **FASEB Journal**, v. 14, p. 231-241, 2000.

KHADIJAH, S.; NEO, Y.S.; HOSSAIN, M.S.; MILLER, L.D.; MATHAVAN, S.; KWANG J. Identification of white spot syndrome virus latency-related genes in specific-pathogen-free shrimps by use of a microarray. **Journal of Virology**, v. 77, p. 10162-10167, 2003.

KIATPATHOMCHAI, W.; BOONSAENG, V.; TASSANAKAJON, A.; WONGTEERASUPAYA, C.; JITRAPAKDEE, S.; PANYIM S. A non-stop, single tube, semi-nested PCR technique for grading the severity of white spot syndrome virus infections in *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 47, p. 235-239, 2001.

KIATPATHOMCHAI, W.; TAWREETUNGTRAGOON, A.; JITTIVADHANA, K.; WONGTEERASUPAYA, C.; BOONSAENG, V.; FLEGEL, T.W. Target for standard Thai PCR assay identical in 12 white spot syndrome virus (WSSV) types that differ in DNA multiple repeat length. **Journal of Virological Methods**, v. 130, p. 79- 82, 2005.

KIMURA, H.; MORITA, M.; YABUTA, Y.; KUZUSHIMA, K.; KATO, K.; KOJIMA, S.; MATSUYAMA, T.; MORISHIMA, T. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 132-136, 1999.

KOPACEK, P.; GRUBHOFFER, L.; SÖDERHALL, K. Isolation and characterization of a hemagglutinin with affinity for lipopolysaccharides from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 17, p. 407-418, 1993.

LAMBERT, S.; BOUTTIER, M.; VASSY, R.; SEIGNEURET, M.; PETROW-SADOWSKI, C.; JANVIER, S.; HEVEKER, N.; RUSCETTI, F.W.; PERRET, G.; JONES, K.S.; PIQUE, C. HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. **Blood**, v. 113, p. 5176-518521, 2009.

LAN, Y.; LU, W.; XU, X. Genomic instability of prawn white spot bacilliform virus (WSBV) and its association to virus virulence. **Virus Research**, v. 90, p. 264–274, 2002.

LATCHMAN, D.S.; ESTRIDGE, J.K.; KEMP, L.M. Transcriptional induction of the ubiquitin gene during herpes simplex virus infection is dependent upon the viral immediate-early protein ICP4. **Nucleic Acids Research**, v. 15, p. 7283–7293, 1987.

LE MOULLAC, G.; HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. **Aquaculture**, v. 91, p. 121-131, 2000.

LEE D.O.; WICKINS JF. **Crustacean farming**. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications, p. 464, 1992.

LEI, K.; LI, F.; ZHANG, M.; YANG, H.; LUO, T.; XU, X. Difference between hemocyanin subunits from shrimp *Penaeus japonicus* in anti-WSSV defense. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 32 (7), p. 808-813, 2008.

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, 2007.

LEWIN, S.R.; VESANEN, M.; KOSTRISKIS, L.; HURLEY, A.; DURAN, M.; ZHANG, L.; HO, D.D.; MARKOWITZ, M. Use of real time PCR and molecular beacons to detect virus replication in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals on prolonged effective antiretroviral therapy. **Journal of Virology**, v. 73, p. 6099–6103, 1999.

LI, Q.; CHEN, Y.; YANG, F. Identification of a collagen-like protein gene from white spot syndrome virus. **Archives of Virology**, v. 149, p. 215–223, 2004.

LI, D.F.; ZHANG, M.C.; YANG, H.J.; ZHU, Y.B.; XU, X. Beta-integrin mediates WSSV infection. **Virology**, v. 368, p. 122–132, 2007.

LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, v. 257, p. 967–971, 1992.

LIANG, P.; AVERBOUKH, L.; KEYOMARSI, K.; SAGER, R.; PARDEE, A.B. Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. **Cancer Research**, v. 52, p. 6966–6968, 1992.

LIGHTNER, D. V. (ed.) **A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for disease of cultured penaeid shrimp**. World Aquaculture Society. Baton Rouge. 1996.

LIGHTNER D.V., HASSON K.W., WHITE B.L. & REDMAN R.M. Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 10, p. 271–281, 1998.

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

LILLICO, S.G.; MOTTRAM, J.C.; MURPHY, N.B.; WELBURN, S.C. Characterisation of the QM gene of *Trypanosoma brucei*. **FEMS Microbiology. Letters**, v. 211, p. 123–128, 2002.

LIU, F.; LIU, Y.; LI, F.; DONG, B.; XIANG, J. Molecular cloning and expression profile of putative antilipopolsaccharide factor in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). **Marine Biotechnology**, v. 7, p. 600–608, 2005.

LIU, B.; YU, Z.; SONG, X.; GUAN, Y.; JIAN, X.; HE J. The effect of acute salinity change on white spot syndrome (WSS) outbreaks in *Fenneropenaeus chinensis*. **Aquaculture**, v. 253, p. 163-170, 2006a.

LIU, H.; JIRAVANICHPAISAL, P.; SÖDERHÄLL, I.; CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. Antilipopolsaccharide Factor interferes with white spot syndrome virus replication in vitro and in vivo in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Journal of Virology**, v. 80, p. 10365–10371, 2006b.

LIU, B.; YU, Z.; SONG, X.; GUAN, Y. Studies on the transmission of WSSV (white spot syndrome virus) in juvenile *Marsupenaeus japonicus* via marine microalgae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 95, p. 87–92, 2007.

LIU, H.; SÖDERHÄLL, K.; JIRAVANICHPAISAL, P. Antiviral immunity in crustaceans. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 27, p. 79–88, 2009a.

LIU, Y.; LI, F.; WANG, B.; DONG, B.; ZHANG, X.; XIANG, J. A serpin from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to bacteria and WSSV challenge. **Fish Shellfish Immunology**, v. 26, p. 345-351, 2009b.

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

LO, C. F.; LEU, J. H.; HO, C. H.; CHEN, C. H.; PENG, S. E.; CHEN, Y. T.; CHOU, C. M.; YEH, P. Y.; HUANG, C. J.; CHOU, H. Y.; WANG, C. H.; OU, G. H. Detection of baculovirus associated with White spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 25, p. 133-141, 1996a.

LO, C.F.; HO, C.H.; PENG, S.E.; CHEN, C.H.; HSU, H.C.; CHIU, Y.L.; CHANG, C.F.; LIU, K.F.; SU, M.S.; WANG, C.H.; KOU G.H. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 27, p. 215–225, 1996b.

LO, C. F.; HSU, H. C.; TSAI, M. F.; HO, C. H.; PENG, S. E.; KOU, G. H.; LIGHTNER, D. V. Specific genomic DNA fragment analysis of different geographical clinical samples of shrimp white spot syndrome virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 35, p. 175-185, 1999.

LU, Y.; WANG, S. Y.; LOTZ, J. M. The use of differential display to isolate viral genomic sequence for rapid development of PCR-based detection methods: A test case using Taura syndrome virus. **Journal of Virological Methods**, v. 121, p. 107-114, 2004.

LU, L.; KWANG, J. Identification of a novel shrimp protein phosphatase and its association with latency-related ORF427 of white spot syndrome virus. **FEBS Letter**, v. 577, 141-146, 2004.

LUANA, W.; LI, F.; WANG, B.; ZHANG, X.; LIU, Y.; XIANG, J. Molecular characteristics and expression analysis of calreticulin in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 147(3), p. 482-491, 2007.

- MACIEL, M. L. T. **Contribuição para o desenvolvimento de uma proposta de monitoramento e certificação sanitária em cultivo de camarão marinho no Estado de Santa Catarina**. 2002. 38p. Dissertação de mestrado. Curso de pós-graduação em Aqüicultura. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.
- MACKAY, I.M.; ARDEN, K.E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 1292–1305, 2002.
- MADRID, R. Como está o negócio “camarão marinho”. **Revista Brasileira de Agropecuária**, ano 1, nº 11, p. 66-80, Ed. Escala, São Paulo, 2001.
- MARKS, H.; GOLDBACH, R.W.; VLAK, J.M.; VAN HULTEN, M.C.W. Genetic variation among isolates of White spot syndrome virus. **Archives of Virology**, v. 149, p. 673–697, 2004.
- MARKS H. 2005. **Genomics and Transcriptomics of White Spot Syndrome Virus**. PhD dissertation, Department of Plant Sciences, Wageningen University, The Netherlands.
- MARQUES, M. R. F.; BARRACCO, M. A. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. **Aquaculture**, v.191, p. 23–44, 2000.
- MARQUES, J.S. **Contribuição para o monitoramento do vírus da Síndrome da Mancha Branca na carcinicultura de Santa Catarina**. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2008.
- MARQUES, M.R.F., MOSER, J.R., MÜLLER, I.C. **Virologia de crustáceos e métodos moleculares de diagnóstico** in: SILVA-SOUZA, A.T. (Org.), Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil. Abrapoa, Maringá, p. 159-185. 2006.
- MARTIN, G.G., GRAVES, L. Fine structure and classification of shrimp haemocytes. **Journal of Morphology**, v. 185, p. 339–348, 1985.
- MARTY, I.; BRUGIDOU, C.; CHARTIER, Y.; MEYER, Y. Growth-related gene expression in *Nicotiana tabacum* mesophyll protoplasts. **Plant Journal**, v. 4, p. 265–278, 1993.
- MAYO, M. A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. **Archives of Virology**, v. 147, p. 1655-1663, 2002.
- MELLO, G.L. **Toxicidade de dois agroquímicos utilizados no cultivo de arroz irrigado em juvenis de *Litopenaeus vannamei***. 2007. 53 p. Dissertação de mestrado. Curso de pós-graduação em Aqüicultura. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.
- MELLO, G.L.; FARIAS, A.P. Policultivo de tilápias e camarões marinhos - Os resultados das primeiras experiências em Laguna - SC. **Panorama da Aqüicultura**, v. 17 (102), p. 42-47, 2007.
- MILLS, A.A.; MILLS, M.J.; GARDINER, D.M.; BRYANT, S.V.; STANBRIDGE, E.J. Analysis of the pattern of QM expression during mouse development. **Differentiation**, v. 64, p. 161–171, 1999.
- MISCIATELLI, N.; JONES, D. A.; LATCHFORD, J. W. Potencial of several different methods of combating bacterial disease in shrimp aquaculture with special emphasis on quorum sensing. **V Congresso Ecuatoriano de Acuicultura**, Guayaquil, Ecuador, 1999.
- MOSER, J.R. **Respostas bioquímicas do camarão branco, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), exposto ao inseticida Carbofuran e determinação da prevalência natural do Vírus da**

Necrose Hipodermal e Hematopoiética – IHHNV. 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MOYER, S.A.; BAKER, S.C.; LESSARD, J.L. Tubulin: a factor necessary for the synthesis of both Sendai virus and vesicular stomatitis virus RNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, p. 5405–5409, 1986.

MULENGA, A.; KHUMTHONG, R.; BLANDON, M.A. Molecular and expression analysis of a family of the *Amblyomma americanum* tick Iospins. **The Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 3188-3198, 2007.

MURATA, T.; GOSHIMA, F.; DAIKOKU, T.; INAGAKI-OHARA, K.; TAKAKUWA, H.; KATO, K.; NISHIYAMA, Y. Mitochondrial distribution and function in herpes simplex virus-infected cells. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 401-406, 2000.

MUSTHAQ, S.S.; SUDHAKARAN, R.; AHMED, I.V.P.; BALASUBRAMANIAN, G.; HAMEED, S.A.S. Variability in the tandem repetitive DNA sequence of white spot syndrome virus (WSSV) genome and stability of VP28 gene to detect different isolates of WSSV from India. **Aquaculture**, v. 256, p. 34–41, 2006.

NADALA, E.C.B. JR; LOH, P.C. A comparative study of three different isolates of white spot virus. **Dis Aquat Org**, v.33, p. 231-234, 1998.

NADALA, E.C.B.; TAPAY, L.M.; LOH, P.C. Characterization of a non-occluded baculovirus-like agent pathogenic to penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 33, p. 221–229, 1998.

NANHAI, H.; QIN, Q.; XU, X. Differential profile of genes expressed in hemocytes of White Spot Syndrome –resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization. **Antiviral Research**, v. 66, p.39-45, 2005.

NATIVIDAD, K.D.T.; NOMURA, N.; MATSUMURA, M. Detection of White spot syndrome virus DNA in pond soil using a 2-step nested PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 149, p. 28–34, 2008.

Nature, v. 452, p. 709-711, 2008.

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

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

OIE (Office International des Epizooties/World Animal Health Organization) Immediate notification report 6307. **Office International des Epizooties**, Paris, France, 2005a.

OIE (Office International des Epizooties/World Animal Health Organization) White spot disease in Brazil, Follow-up report no.1. **Diseases information**, v. 18, p. 248-249, 2005b.

OIE - World organisation for animal health. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals**. 2006. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/en_index.htm>. Acesso em: 14 de agosto de 2009.

- OLIVEIRA, G.T.; EICHLER, P.; ROSSI, I.C.; DA SILVA, R.S.M. Hepatopancreas Gluconeogenesis During Anoxia and Post-Anoxia Recovery in *Chasmagnathus Granulata* Crabs Maintained on High-Protein or Carbohydrate-Rich Diets. **Journal of Experimental Zoology**, v. 301A, p. 240–248, 2004.
- OMORI, S.A.; MARTIN, G.G.; HOSE, J.E. Morphology of haemocyte lysis and clotting in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis*. **Cellular and Tissue Research**, v. 255, p. 117–123, 1989.
- ORNITZ, D.M.; ITOH, N. Fibroblast growth factors. **Genome Biology**, v. 2(3), p. 3005.1–3005.12, 2001.
- OSTRENSKY, A.; BOEGER, W.A. principais problemas enfrentados atualmente pela aqüicultura brasileira In: **Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer** Ed.: OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO D. Brasília, 276 p., 2008.
- OTTA, S.K.; SHUBHA, G.; JOSEPH, B.; CHAKRABORTY, A.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR I. Polymerase chain reaction (PCR) detection of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured and wild crustaceans in India. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 38, p. 67–70, 1999.
- PADREEP B, SHEKAR M, GUDKOV N, KARUNASAGAR I, KARUNASAGAR I Genotyping of white spot syndrome virus prevalence in shrimp farms of India. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 78, p. 189-198, 2008.
- PAN, D.; HE, N.; YANG, Z.; LIU, H.; XU, X. Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 29, p. 103-112, 2005.
- PANTOJA, C.; D.V. LIGHTNER. **Enfermedades virales** In: MORALES, V.; J. CUÉLLAR-ANJEL (eds.). Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. p. 55-114, 2008.
- PANTRY, S.N.; MEDVECZKY, P.G. Epigenetic regulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication. **Seminars in Cancer Biology**, v. 19, p. 153–157, 2009.
- PATAT, S.; CARNEGIE, R.B.; KINGSBURY, C.; GROSS, P.S.; CHAPMAN, R.; SCHEY, K.L. Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, p. 4825–4833, 2004.
- PAREDES, L. E. O vírus da Mancha Branca no Brasil. Que fazer? **Revista da ABCC**, nº 1, p. 30, 2005.
- PAWLAK, J.B.; HERTZLER, P.L. Cloning and characterization of hox genes in shrimp. **Plant & Animal Genomes XVI Conference**, January 12-16, San Diego, CA, 2008.
- PENG, S.E.; LO CF, LIU KF, KOU GH The transition from pre-patent to patent infection of white spot syndrome virus (WSSV) in *Penaeus monodon* triggered by pereiopod excision. **Fish Pathology**, v. 33, p. 395–400, 1998.
- PENG, S.-E.; LO, C.-F.; LIN, S.-C.; CHEN, L.-L.; CHANG, Y.-S.; LIU, K.-F.; SU, M.-S.; KOU, G.-H. Performance of WSSV-infected and WSSV-negative *Penaeus monodon* postlarvae in

culture ponds. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 46, p. 165–172, 2001.

PÉREZ FARFANTE, I.; KENSLEY, B. F. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Key and diagnosis for the families and genera. *Mémoires du Muséum National D'Histoire Naturelle*, v. 175, p. 1-233, 1997.

POLLARD, T.D. Actin. **Currents Opinions in Cell Biology**, v. 2, p. 33-40, 1990.

PORKKA, K.P.; VISAKORPI, T. Detection of differentially expressed genes in prostate cancer by combining suppression subtractive hybridization and cDNA library array. **Journal of Pathology**, v. 193(1), p. 73–79, 2001.

POSTEL, E.H.; ABRAMCZYK, B.A.; GURSKY, S.K.; XU, Y. Structure-based mutational and functional analysis identify human NM23-H2 as a multifunctional enzyme. **Biochemistry**, v. 41, p. 6330-6337, 2002.

POWELL, J.W.B.; BURGE, E.J.; BROWDY, C.L.; SHEPARD, E.F. Efficiency and sensitivity determination of Shrimple®, an immunochromatographic assay for white spot syndrome virus (WSSV), using quantitative real-time PCR. **Aquaculture**, v. 257, p. 167–172, 2006.

PADREEP, B.; SHEKAR, M.; GUDKOV, N.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Genotyping of white spot syndrome virus prevalent in shrimp farms of India. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 78, p. 189-198, 2008.

QUÉRÉ, R.; COMMES, T.; MARTI, J.; BONAMI, J. R.; PIQUEMAL, D. White spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus simultaneous diagnosis by miniarray system with colorimetry detection. **Journal of Virological Methods**, v. 105, p. 189-196, 2002.

RADTKE, K.; DOHNER, K.; SODEIK, B. Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. **Cellular Microbiology**, v. 8, p. 387-400, 2006.

REBRIKOV, D.; BRITANOVA, O.; GURSKAYA, N.; LUKYANOV, K.; TARABYKIN, V.; LUKYANOV, S. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. **Nucleic Acids Research**, v. 28(20), p. 90, 2000.

REVISTA DA ABCC. n° 1, p. 7, 2005.

REYES, A.; SALAZAR, M.; GRANJA, C. Temperature modifies gene expression in subcuticular epithelial cells of white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 31, p. 23–29, 2007.

RIRIE, K.M.; RASMUSSEN, R.P.; WITTEWER, C.T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 270, p. 154–160, 1997.

ROCHA, I. P.; ROCHA, M. M. R.; FREITAS, C. M. C. Panorama da Aqüicultura Brasileira: Situação da Região Nordeste. In: Contribuições ao desenvolvimento da aqüicultura, em especial, da carcinicultura marinha do Brasil. MCR. Aquacultura, 88p, 1998.

ROCHA, I. P. Aqüicultura: um excelente negócio. **Revista Brasileira de Agropecuária**, n°11, p. 6-12, 2001.

ROCHA C.S.; SANTOS, A.A.; MACHADO, J.P.B.; FONTES, E.P.B. The ribosomal protein

L10/QM-like protein is a component of the NIK-mediated antiviral signaling. **Virology**, v. 380, p. 165–169, 2008.

ROJTINNAKORN, J.; HIRONO, I.; ITAMI, T.; TAKAHASHI, Y.; AOKI, T. Gene expression in hemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 13, p. 69-83, 2002.

RYNCARZ, A.J.; GODDARDET, J.; WALD, A.; HUANG, M.L.; ROIZMAN, B.; COREY, L. Development of a high-throughput quantitative assay for detecting herpes simplex virus DNA in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1941–1947, 1999.

SAHUL-HAMEED A.S., ANILKUMAR M., RAJ M.L.S. & JAYARAMAN K. Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. **Aquaculture**, v. 160, p. 31–45, 1998.

SAHUL-HAMEED, A.S.; BALASUBRAMANIAN, G.; SYED MUSTHAQ, S.; YOGANANDHAN, K. Experimental infection of twenty species of Indian marine crabs with white spot syndrome virus (WSSV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 57, p. 157–161, 2003.

SANG, N.; SEVERINO, A.; RUSSO, P.; BALDI, A.; GIORDANO, A.; MILEO, A.M., et al. RACK1 interacts with E1A and rescues E1A-induced yeast growth inhibition and mammalian cell apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 27026–27033, 2001.

SAURÍ, A.; MCCORMICK, P.J.; JOHNSON, A.E.; MINGARRO, I. Sec61 α and TRAM are Sequentially Adjacent to a Nascent Viral Membrane Protein during its ER Integration **Journal of Molecular Biology**, v. 366, p. 366–374, 2007.

SCHEIN, V.; WACHE, Y.; ETGESA, R.; KUCHARSKIA, L.C.; VAN WORMHOUDT, A.; DA SILVA, R.S.M. Effect of hyperosmotic shock on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle. **FEBS Letters**, v. 561, p. 202-206, 2004.

SCHMITTGEN, T. e LIVAK, K.. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3(6), p. 1101-1108, 2008.

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

SEIFFERT, W. Q. Cultivo de Crustáceos. In: **Fundamentos de Aqüicultura**. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004.

SEIFFERT, W. A mancha branca em Santa Catarina. **Revista da ABCC**, n°1, p. 34-36, 2005.

SEIFFERT, W.Q.; WINCKLER, S.; MAGGIONI, D.S. A Mancha Branca em Santa Catarina. **Revista Panorama da Aqüicultura**, n° 87, 2005.

SERINI, G.; MAIONE, F.; BUSSOLINO, F. Semaphorins and tumor angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 12, p. 187–193, 2009.

SHEKAR, M.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. A computer based identification of variable number tandem repeats in white spot syndrome virus genomes. **Current Science**, v. 89, p. 882–887, 2005.

SHEKHAR, M.S.; AZAD, I.S.; RAVICHANDRAN, P. Comparison of dot blot and PCR diagnostic techniques for detection of white spot syndrome virus in different tissues of *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 261, p. 1122–1127, 2006.

- SHEKAR M, KARUNASAGAR I, KARUNASAGAR I. Abundance, composition and distribution of simple sequence repeats and dinucleotide compositional bias within WSSV genomes. **Journal of Genetics**, v. 86, p. 69-73, 2007.
- SHEN, B.; ZHANG, Z.; WANG, Y.; WANG, G.; CHEN, Y.; LIN, P.; WANG, S.; ZOU, Z. Differential expression of ubiquitin-conjugating enzyme E2r in the developing ovary and testis of penaeid shrimp *Marsupenaeus japonicus*. **Molecular Biology Reports**, v. 36, p. 1149–1157, 2009.
- SHI, Z.; WANG, H.; ZHANG, J.; XIE, Y.; LI, L.; CHEN, X.; EDGERTON B-F.; BONAMI J-R. Response of crayfish, *Procambarus clarkii*, haemocytes infected by white spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, v.28, p. 151–156, 2005.
- SHIMA, T.; OKUMURA, N.; TAKAO, T.; SATOMI, Y.; YAGI, T.; OKADA, M.; NAGAI, K. Interaction of the SH2 domain of fyn with a cytoskeletal protein, h-adducin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 42233–42240, 2001.
- SKACH, W.R. The expanding role of the ER translocon in membrane protein folding. **The Journal of Cell Biology**, v. 179(7), p. 1333-1335, 2007.
- SNIESZKO, S.F. **Diseases of fishes and their control in the US**. The Two Lakes Fifth Fishery Management Training Course Report. Jansen, London, pp. 55–66, 1973
- SÖDERHÄLL, K.; CERENIUS, L.; JOHANSSON, M. The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defence. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 712, p. 155–161, 1994.
- SOLER-GARCÍA, Á.A.; RAKHMANINA, N.Y.; MATTISON, P.C.; RAY P.E. A urinary biomarker profile for children with HIV-associated renal diseases. **Kidney International**, v. 76, p. 207–214, 2009.
- SOMBOONWIWAT, K.; SUPUNGUL, P.; RIMPHANITCHAYAKIT, V.; AOKI, T.; HIRONO, I.; TASSANAKAJON, A. Differentially Expressed Genes in Hemocytes of *Vibrio harveyi*-challenged Shrimp *Penaeus monodon*. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, p. 26-36, 2006.
- de SOUZA, T.M. **Detecção do vírus da mancha branca (WSV) em *Litopenaeus vannamei* por métodos moleculares de diagnóstico: hibridização in situ e pcr em tempo real**. Dissertação de mestrado. 2008. 46 p. Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.
- SPAARGAREN, D.R. Cultivation of tiger prawns, *Penaeus monodon*, Fabricius, 1798 Decapoda, Natantia, in Hainan, PR China. **Crustaceana**, v. 71, p. 144–157, 1998.
- SRITUNYALUCKSANA, K.; CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Developmental and Comparative Immunology**, v.23, p. 179-186, 1999.
- SRITUNYALUCKSANA, K.; WANNAPAPHO, W.; LO, C.F.; FLEGEL, T.W. PmRab7 is a VP28-binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp. **Journal of Virology**, v. 80, p. 10734-10742, 2006a.
- SRITUNYALUCKSANA, K.; SRISALA, J.; MCCOLL, K.; NIELSEN, L.; FLEGEL, T.W. Comparison of PCR testing methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeid shrimp. **Aquaculture**, v. 255, p. 95–104, 2006b.

- STEEG, P.S.; BEVILACQUA, G.; KOPPER, L.; THORGEIRSSON, U.P.; TALMADGE, J.E.; LIOTTA, L.A.; et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 80, p. 200-204, 1988.
- SUBASINGHE, R. P. Epidemiological approach to aquatic animals health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. **Preventive Veterinary Medicine**, v.67, p. 117-124, 2005.
- SUGDEN, D.; WINTER, P. **Molecular Biomethods Handbook**. Humana Press:Springer, 2008.
- TALHOUK, S.N.; VOLKMAN, L.E. Autographa californica M nuclear polyhedrosis virus and cytochalasin D: antagonists in the regulation of protein synthesis. **Virology**, v. 182, p. 626-634, 1991.
- TANG, K.F.J.; LIGHTNER, D.V. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 44, p. 79–85, 2001.
- TANGE, T.Ø.; JENSEN, T.H.; KJEMS, J. In Vitro Interaction between Human Immunodeficiency Virus Type 1 Rev Protein and Splicing Factor ASF/SF2-associated Protein, p32. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271(17), p. 10066–10072, 1996.
- TARDIF, M.; SAVARD, M.; FLAMAND, L.; GOSSELIN, J. Impaired protein kinase C activation/translocation in Epstein–Barr virus-infected monocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 24148–25154, 2002.
- THABREW, M.I.; POAT P.C.; MUNDAY K.A. Carbohydrate metabolism in *Carcinus maenas* gill tissue. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 40(B), p. 531-541, 1971.
- TOMMASI S, FEDELE V, CRAPOLICCHIO A, BELLIZZI A, PARADISO A, RESHKIN SJ. ErbB2 and the antimetastatic nm23/NDP kinase in regulating serum induced breast cancer invasion. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 12, p. 131-1344, 2003.
- TONGANUNT, M.; NUPAN, B.; SUKLOUR, S.; SAENGSAKDA, M.; SENAPIN, S.; CHOTIGEAT, W.; PHONGDARA, A. The role of Pm-fortilin in protecting shrimp from White Spot Syndrome Virus (WSSV) infection. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 25(5), p. 633-637, 2008.
- VAN HULTEN, M.C.W.; TSAI, M.F.; SCHIPPER, C.A.; LO, C.F.; KOU, G.H.; VLAK, J.M. Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 307–316, 2000.
- VAN HULTEN, M. C. W.; WITTEVELDT, J.; PETERS, S.; KLOOSTERBOER, N.; TARCHINI, R.; FIERS, M.; SANDBRINK, H.; LANKHORST, R. –K.; VLAK, J. M. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. **Virology**, v. 286, p. 7-22, 2001.
- VASEEHARAN, B.; JAYAKUMAR, R.; RAMASAMY, P. PCR-based detection of white spot syndrome virus in cultured and captured crustaceans in India. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 443-447, 2003.
- VIDAL, O.M.; GRANJA, C.B.; ARANGUREN, F.; BROCC, J.A.; SALAZAR, M. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 32, p. 364-372, 2001.
- WAIKHOM, G.; JOHN, K.R.; GEORGE, M.R.; JEYASEELAN, M.J.P. Differential host passing alters pathogenicity and induces genomic variation in white spot syndrome virus.

Aquaculture, v. 261, p. 54–63, 2006.

WANG, Y.G.; HASSAN, M.D.; SHARIFF, M.; ZAMRI, S.M.; CHEN X. Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 39, p. 1–11, 1999.

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

WANG, Q.; NUNAN, L.M.; LIGHTNER, D.V. Identification of genomic variations among geographic isolates of white spot syndrome virus using restriction analysis and southern blot hybridization. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 43, p. 175–181, 2000.

WANG, Y.T.; LIU, W.; SEAH, J.N.; LAM, C.S.; XIANG, J.H.; KORZH, V.; KWANG J. White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 52, p. 249–259, 2002.

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

WANG, H.-C.; WANG, H.-C.; LEU, J.-H.; KOU, G.-H.; WANG, A.H.-J.; LO, C-F. Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 31(7), p. 672–686, 2007a.

WANG, X.; SONG, Y.; LI, J.; LIU, H.; XU, X.; LAI, R.; ZHANG, K. A new family of antimicrobial peptides from skin secretions of *Rana pleuraden*. **Peptides**, v. 28, p. 2069–2074, 2007b.

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. 664–675, 2008.

WEN, Y.; SHAO, J.-Z.; PAN, X.-X.; XIANG, L.-X. Molecular cloning, characterization and expression analysis of QM gene from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) homologous to Wilms' tumor suppressor. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 141, p. 356 – 365, 2005.

WINSTANLEY, C. **Molecular Biomethods Handbook**. Humana Press: Springer, 2008.

WONGTEERASUPAYA, C.; PUNGCHAI, P.; WITHYACHUMNARNKUL, B.; BOONSAENG, V.; PANYIM, S.; FLEGEL, T.W.; WALKER, P.J. High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates in Thailand. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 54, p. 253–257, 2003.

XIAO, L.; ZHANG, J.; YIN, Y.F.; CHEN, C.L. LI, K.; CHANG, A.; SIROIS, P. Molecular diagnosis of HIV and relevant novel technologies in mutation analysis. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 389–397, 2008.

XIE, X.; YANG, F. Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin. *Virology*, v. 336, p. 93–99, 2005.

XU, J.; WU, S. ZHANG, X. Novel Function of QM Protein of Shrimp (*Penaeus japonicus*) in Regulation of Phenol Oxidase Activity by Interaction with Hemocyanin. *Cell Physiology and Biochemistry*, v. 21, p.

473-480, 2008.

YANG, F.; HE, J.; LIN, X.; PAN, D.; ZHANG, X.; XU, X. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. **Journal of Virology**, v. 75, p. 11811-11821, 2001.

YOSHIDA, H.; KINOSHITA, K.; ASHIDA, M. Purification of a peptidoglycan recognition protein from haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 13854–13860, 1996.

ZAPATA, M.; TANGUY, A.; DAVID, E.; MORAGA, D.; RIQUELME, C. Transcriptomic response of *Argopecten purpuratus* post-larvae to copper exposure under experimental conditions. **Gene**, v. 442, p. 37-46, 2009.

ZENG, Y.; LU, C.-P. Identification of differentially expressed genes in haemocytes of the crayfish (*Procambarus clarkii*) infected with white spot syndrome virus by suppression subtractive hybridization and cDNA microarrays **Fish and Shellfish Immunology**, v. 26, p. 646-650, 2009.

ZHANG, Y.; WANG, S.; PENG, X. Identification of a type of human IgG-like protein in shrimp *Penaeus vannamei* by mass spectrometry. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 301, p. 39– 54, 2004.

ZHANG, X.; HUANG, C.; QIN, Q. Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*. **Antiviral Research**, v. 61, p. 93–99, 2004.

ZHAO, Z.-Y.; YIN, Z.-X.; WENG, S.-P.; GUAN, H.-J.; LI, S.-D.; XING, K.; CHAN, S.-M.; HE, J.-G. Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridization. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, p. 520-534, 2007.

ZHAO, Z.Y.; YIN, Z.X.; XU, X.P.; WENG, S.P.; RAO, X.Y.; DAI, Z.X.; et al. A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-WSSV activity. **Journal of Virology**, v. 83, p. 347–356, 2008.

ZHENG, Y.; ROY, P.J.; LIANG, P.; MACRAE, T.H. Cloning and sequencing of an α -tubulin cDNA from *Artemia franciscana*: evidence for translational regulation of α -tubulin synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1442, p. 419-426, 1998.

