

Ruth Liliám Quispe Gaspar

**“AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES  
ASSOCIADOS AO SISTEMA IMUNE DURANTE OS  
ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO CAMARÃO**

*Litopenaeus vannamei*”

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Luciane Maria Perazzolo

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Diego da Rosa

FLORIANÓPOLIS/ SC  
2013

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

Quispe Gaspar , Ruth Liliám

Avaliação da expressão de genes associados ao sistema imune durante os estágios de desenvolvimento do camarão *Litopenaeus vannamei* / Ruth Liliám Quispe Gaspar ; orientadora, Luciane Maria Perazzolo ; co-orientador, Rafael Diego da Rosa. - Florianópolis, SC, 2013.  
113 p.

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

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. *Litopenaeus vannamei*. 3. desenvolvimento embrionário de peixe. 4. genes associados ao sistema imune. 5. expressão gênica. I. Perazzolo, Luciane Maria. II. Rosa, Rafael Diego da. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

**“Avaliação da expressão de genes associados ao sistema imune durante os estágios de desenvolvimento do camarão *Litopenaeus vannamei*”**

por

Ruth Liliám Quispe Gaspar

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 19/PPGBCD/2013) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

**Orientador:**




---

Prof(a). Dr(a). Luciane Maria Perazzolo (BEG/CCB/UFSC)

**Coorientador:**




---

Prof(a). Dr(a). Rafael Diego da Rosa (BEG/CCB/UFSC).

**Banca examinadora:**



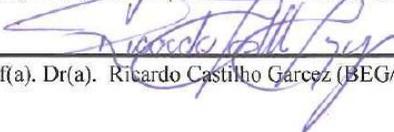

---

Prof(a). Dr(a). Margherita Anna Barracco (BEG/CCB/UFSC)




---

Prof(a). Dr(a). Edmar Roberto Andreatta (AQI/CCA/UFSC)




---

Prof(a). Dr(a). Ricardo Castilho Garcez (BEG/CCB/UFSC)

**Coordenação do Programa:**




---

Prof(a). Dra. Yara Maria Rauh Muller  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Florianópolis, 23 de outubro de 2013.



*A mis padres Paulina e Eusebio, que son ejemplos de humildad, amor, lucha e perseverancia. Ellos forjaron un destino mejor para nosotros, sus hijos.*

*A mis queridos hermanos, por el cariño e apoyo incondicional. Quienes en conjunto me enseñaron a seguir mis ideales, mis sueños... e que con disciplina, paciencia y perseverancia es más fácil conseguir lo que uno se traza... por los caminos en esta vida.*



## AGRADECIMENTOS

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

À minha orientadora, Dra. Luciane Maria Perazzolo, pela oportunidade de integrar a equipe de trabalho de Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA). Obrigada pela disponibilidade de tempo para a realização deste trabalho, pela paciência e a confiança depositada. E pela compreensão, especialmente, nestes últimos meses.

Ao meu co-orientador, Dr. Rafael Diego da Rosa, por todo o apoio e dedicação durante meu mestrado. Pelas respostas a todas minhas consultas via conversa *on-line* quando se encontrava trabalhando em São Paulo. Pela paciência na correção desta dissertação.

Ao Prof. Felipe do Nascimento Vieira e a todo o pessoal do setor de larvicultura do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM-UFSC), sem eles não teria forma de concluir este trabalho. Carlos, José, Walter ... Ao pessoal da área de maturação sempre gentis em colaborar. ... muito obrigada!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de Mestrado, e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento por o financiamento para a compra dos iniciadores de qPCR, utilizado neste trabalho. Assim mesmo, ao projeto FINEP pelos reativos de biologia molecular.

Aos professores da Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, pelas maravilhosas aulas. Em especial, à Prof. Margherita Anna Barracco por todos os ensinamentos, tanto acadêmico como pessoal. Porque apesar de conhecer-a somente dois anos, tornou-se um exemplo de pessoa para mim. Obrigada por las reuniões realizadas em sua casa junto com Luciane e os meninos (as) do LIAA, onde eu preparei um platô típico peruano, o ceviche. Graças pelas panelas de praia! E pela orquídea, que por certo já saíram suas duas flores de cor rosa e branca, depois de dois anos de irrigada.

A Dani pela amizade e companheirismo, dados desde meus primeiros dias no LIAA. Que apesar de estar na França, sua amizade esta presente! Simplesmente uma bela pessoa. Obrigada Rafael Trevisan! Sorte que você estava *online* aquele dia. Obrigada Dani e Rafael!

Ao pessoal de Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA) que de uma forma ou de outra contribuíram para que este trabalho pudesse ser concluído. Obrigada Michael, Gean, Caio, Samuel, Babi, Cris e Emily.

Aos meus caros Gilian, Eliane, Gean, Fabiana, Yago e Augusto, pelos momentos compartilhados. A Michael, Cris e Augusto na luta por pegar camarões em Garopaba, caminho a Tubarão. Aos meus queridos Ana e Mauro pelos momentos compartilhados, pela força dada em momentos um pouco tensos! Pelas pizzas caseiras deliciosas, dias de pescaria, dias de violão e de canto, dias de trilhas, dias de chuva e dias de sol ... Valeu Samuel não esqueceremos esse dia de boa pesca em Sambaqui e o tempero inolvidável.

A mis amigos de Perú: Rosa Amelia, Manuel, Rosa Aurora, Manu, Cledy, Janina, Julio R, Julio A, Edgardo, Katerine, Sabino, Mike, Magna, Naño, Jenny, Carlos Liñan, Olga, Mayzora, Gaby, Churo, Cata, gracias por formar parte de mi vida, unos desde la niñez, colégio, del coro SMP, de la UNMSM, del ITP e Santa Elena. Por todo lo aprendido, compartido, llorado, luchado e bailado!

A mi querido Michael, compañero, amigo e mi amor, que siempre me acompaña en estos caminos de vida. Gracias por estar a mi lado aquí, e ser la persona con quien siempre pude contar durante todo este período, por los fines de semana de trabajo, cuando el tiempo era corto! Por darme confianza cuando tenía alguna duda!... Sabes que puedes confiar en mí. Siempre voy a querer todo lo bueno para ti, porque lo mereces. Todo saldrá bien. Ya lo veras!

A mi familia, a mi madre querida la persona más humilde y tierna que conozco, por todo su amor y cariño, por apoyarme en seguir mis sueños. A mi padre, que a pesar de no estar ya entre nosotros, siempre lo recuerdo con cariño e no olvido sus enseñanzas. A mis hermanos escuderos desde niña, Koki, Kike, Calo, Juan, Flora, Urbano e Yayo, de todo corazón desde aquí siento sus bendiciones. A mi cuñada China, e sobrinos, Calito e Lady, gracias por cuidar de mamá.

A Dios, por el conforto y la alegría, gracias viñador por tu valladar...

*"Aprendi que coragem não é a ausência de medo, mas o triunfo sobre ele. O homem corajoso não é aquele que não sente medo, mas o que conquista esse medo".  
(Da autobiografia "O longo caminho para a liberdade", 1994). Nelson Mandela*



## RESUMO

**QUISPE GASPAR, Ruth Liliám. Avaliação da expressão de genes associados ao sistema imune durante os estágios de desenvolvimento do camarão *Litopenaeus vannamei*.** Florianópolis, 2013. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento – Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2013.

Os cultivos de camarão, tanto nas fazendas quanto nas larviculturas, são susceptíveis à ocorrência de mortalidades causadas por micro-organismos patogênicos, tais como vírus, bactérias e fungos. A grande maioria dos estudos sobre os mecanismos de defesa dos camarões enfocam principalmente a problemática ocorrida nos viveiros de cultivo com animais juvenis e adultos. Por outro lado, tais estudos são ainda escassos nas fases larvais e pós-larvais, mas são igualmente importantes, uma vez que enfermidades nesses estágios podem gerar perdas econômicas consideráveis para as larviculturas. Assim, o presente estudo teve como objetivo ampliar o conhecimento sobre a ontogenia do sistema imune durante o desenvolvimento de *Litopenaeus vannamei*, a espécie de camarão mais cultivada no mundo, através da avaliação da expressão de genes associados ao seu sistema imune utilizando RT-qPCR. Foram analisados 17 genes, de diferentes categorias funcionais, em subestágios de desenvolvimento: ovos fertilizados (0-4h e 7-11h pós-desova), Náuplios (I e V), Protozoas (I e III), Misis (I e III) e Pós-larvas (2, 9 e 17). Todos os genes avaliados mostraram-se expressos no estágio de Pós-larva, o qual é o mais próximo de camarões juvenis. Os genes associados à defesa antiviral (*Lv-Sid 1*, *LvDcr2* e *Lv-Ago 2*, *LvDcr1*, *LvSVC1* e *Lv-Ago 1*), reconhecimento de micro-organismos (*LvDscam*), antioxidante (*Lv-PRX*), sinalização intracelular (fatores de transcrição *LvDorsal* e *LvRelish*) e apoptose (*LvIAP*) foram ubiquamente expressos de ovo a pós-larvas. Enquanto a expressão de genes envolvidos no sistema pró-fenoxidase (*LvproPO-1*), a homeostasia (*LvHHAP*), coagulação (*LvClot*) e peptídeos antimicrobianos (*Litvan PEN2*, *Litvan PEN3* e *LvSty-II*) não foi detectada em todos os subestágios. De maneira interessante, a expressão de genes de uma mesma família gênica (*Litvan PEN2* e *Litvan PEN3*) não ocorreu simultaneamente em um mesmo subestágio de desenvolvimento. Por outro lado, os genes associados à defesa antiviral (*LvDcr1/2*, *Lv-Ago 1/2* and *Lv-Sid-1*), fatores de transcrição (*LvDorsal* e

*LvRelish*), defesa antioxidante (*Lv-PRX*) e apoptose (*LvIAP*) foram mais expressos no Ovo 0-4h em comparação ao Ovo 7-11h, sugerindo uma contribuição materna. A expressão de genes associados ao sistema imune nas fases larvais e pós-larvais de *L. vannamei* ressalta a importância de se conhecer o estabelecimento dos diferentes mecanismos de defesa ao longo do seu desenvolvimento. Assim, o presente estudo vem contribuir, de maneira original e pioneira, com informações a respeito da ontogenia de moléculas do sistema imune, especialmente àquelas associadas à defesa antiviral. Conhecimentos desta natureza poderão contribuir, em um futuro próximo, para o desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas que servirão para avaliar as condições de saúde de animais nos cultivos (larviculturas e fazendas), bem como para orientar à seleção genética de camarões mais resistentes à infecções microbianas e virais.

**Palavras-chave:** *Litopenaeus vannamei*, desenvolvimento embrionário de peneídeos, genes associados ao sistema imune, expressão gênica, RT-qPCR, ontogenia do sistema imune de peneídeos.

## ABSTRACT

**QUISPE GASPAR, Ruth Liliám. “Evaluation of the expression of genes associated with the immune system during the development stages of the shrimp *Litopenaeus vannamei*”. Florianópolis, 2013. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento – Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2013.**

Shrimp farms and hatcheries are susceptible to mortalities events caused by pathogenic microorganisms, such as virus, bacteria and fungi. The great majority of studies related to the defense mechanisms of shrimp are focused in problems that occur mainly in juvenile and adult shrimp farming. Moreover, studies in the shrimp larval and post-larval stages are very limited but are equally important, since diseases can generate considerable economic losses in those stages. Thus, the present study was aimed to expand the knowledge on the ontogeny of the immune system during the development of *Litopenaeus vannamei*, the most cultivated shrimp species in the world, through the evaluation of gene expression associated with the immune system using RT-qPCR. The stages examined in this work included the fertilized egg (0h and 7h post spawns), nauplius (I and V), protozoa (I and III), Mysis (I and III) and postlarval (PL2, PL9 and PL17). As result, it was observed that all analyzed genes were expressed in the post-larval stage, which is the previous stage to juvenile shrimp. While genes associated to antiviral defense (*LvDcr1*, *LvDcr2*, *Lv-Ago 1*, *Lv-Ago 2*, *Lv-Sid-1* and *LvSVC-1*), microorganisms recognition (*LvDscam*), antioxidant defense (*Lv-PRX*), intracellular signaling (transcription factors *LvDorsal* and *LvRelish*) and apoptosis (*LvIAP*) were constitutively expressed from egg to postlarvae; genes involved in the prophenoloxidase system (*LvproPO-1*), homeostasis (*LvHHAP*), coagulation (*LvClot*) and antimicrobial peptides (*Litvan PEN2*, *Litvan PEN3* and *LvSty-II*) were not detected in all stages. Interestingly, the expression of the same gene family (*Litvan PEN2* and *Litvan PEN3*) did not occur simultaneously during the development. In addition, genes associated with antiviral defense (*LvDcr1*, *LvDcr2*, *Lv-Ago 1*, *Lv-Ago 2* and *Lv-Sid 1*), transcription factors (*LvDorsal* and *LvRelish*), antioxidant defense (*Lv-PRX*) and apoptosis (*LvIAP*) were more expressed in egg 0h compared to egg 7h, which suggests a maternal contribution. The expression of genes associated with the immune system in larval and postlarval stages of *L.*

*vannamei* highlights the importance of understanding the establishment of different defense mechanisms throughout the organism development. Thus, the present study aims to contribute in an original and pioneering way, with information about the ontogeny of molecules of the immune system, with especial attention given to molecules associated with antiviral defense. Such knowledge can contribute in the near future for the development of biotechnological tools to evaluate the health of animals in culture (hatchery and farm), as well as the genetic selection of shrimps more resistant to microbial and viral infections.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*, embryonic development of penaeids, genes associated with the immune system, gene expression, RT-qPCR, ontogeny of the immune system of penaeids.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AHPNS** – *Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome* (Síndrome da necrose aguda do hepatopâncreas)
- ALF** – *Anti-lipopolysaccharide factor* (Fator anti-lipopolissacárideo)
- βGBP** – *β-1,3-Glucan binding protein* (Proteínas que se ligam aos β-1,3-glucanos)
- BMN** – *Baculoviral Midgut gland Necrosis* (Vírus da necrose da glândula intestinal do tipo Baculovírus)
- BP** – *Baculovirus penaei* (baculovírus penaei)
- CAT** – Catalase
- cDNA** – *Complementary DNA*
- CIDASC** – Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina
- Clot** – Proteína de coagulação
- Cq** – *Cycle quantification*
- DNA** – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)
- DNase** – Deoxyribonuclease
- Dscam** – *Down syndrome cell adhesion molecule* (Molécula de adesão celular da síndrome de Down)
- dsRNA** – *Double-stranded RNA* (RNA de dupla fita)
- DXV** – *Drosophila X virus* (Virus X de *Drosophila*)
- E** – Eficiência
- EMS** – *Early Mortality Syndrome* (Síndrome da mortalidade precoce).
- GBP** – *Glucan binding protein* (Proteína que se liga a glicanas)
- GC** – Grupos de Condição
- GE** – Grupos de Expressão
- GPX** – Glutathione peroxidase
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogénio
- HCL** – *Hierarchical Clustering* (Agrupamento hierárquico)
- HPV** – *Hepatopancreatic parvovirus* (Parvovírus hepatopancreático)
- IAP** – *Inhibitor of Apoptosis Protein* (Proteína inibidora de apoptose)
- IFN** – Interferon
- IHHNV** – *Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus* (Vírus da necrose hipodérmica e hematopoiética)
- IMD** – *Immune Deficiency*
- IMNV** – *Infectious Mionecrosis Virus* (Vírus da mionecrose infecciosa)
- LBP** – *LPS-binding protein* (proteína que se liga ao LPS)
- LCM** – Laboratório de Camarões Marinhos

- LGBP** – *Lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein*  
(proteína que se liga a ambos os LPS e  $\beta$ -1,3-glucanas)
- LIAA** – Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura
- LPS** – Lipopolissacarídeos
- M** – Misis
- MAS** – Solução de Alsever Modificada
- mas-like** – *Masquerade-like protein*
- MBV** – *Monodon-type baculovirus* (Baculovírus de *P. monodon*)
- MIQE** – *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*
- M/PAMPs** – *Microbe/Pathogen-Associated Molecular Patterns*  
(Padrões moleculares associados a micro-organismos/patógenos)
- N** – Náuplio
- N-E** – Náuplio embrionário
- PAMs** – Peptídeos antimicrobianos
- pb** – Pares de bases
- PBS** – *Phosphate buffered saline*
- PCR** – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da Polimerase)
- PEN** – Peneidina
- PGN** – peptidoglicanas
- PL** – Pós-larva
- proPO** – Prophenoloxidase (pró-fenoloxidase).
- PRPs/PRRs** – *Pattern Recognition Proteins or Receptors*  
(Proteínas/receptores de reconhecimento de padrões moleculares)
- RISC** – *RNA-induced silencing complex* (Complexo multiproteico de silenciamento induzido por RNA)
- RNA** – *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)
- RNAi** – RNA interferência
- RNase** – Ribonuclease
- ROIs** – *Reactive Oxygen Intermediates*
- RT-PCR** – *Reverse transcriptase-Polymerase Chain Reaction*
- RT-qPCR** – *Reverse transcriptase-Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*
- Sid-1** – *Systemic interference defective*
- siRNAs** – *Small Interference RNAs* (Pequeno RNA interferente)
- SOD** – Superóxido dismutase
- ssRNA** – *Single-strand RNA* (RNA de fita simples)
- SVC** – *Single von Willebrand factor type C domain protein 1*
- TGase** – Transglutaminase
- THP** – Tecido Hematopoiético
- Tm** – *Melting temperature* (Temperatura de dissociação)

**TSV** – *Taura syndrome virus* (Vírus da síndrome de Taura)

**VWC** – *von Willebrand Factor type C*

**WSSV** – *White Spot Syndrome Virus* (Vírus da síndrome da mancha branca)

**YHV** – *Yellow Head Virus* (Vírus da cabeça amarela)

**Z** – Protozoa

**Obs:** As siglas dos genes utilizados nesse estudo não estão aqui indicadas, uma vez que são apresentadas na Tabela 2.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Litopenaeus vannamei*. A) Anatomia externa, B) Anatomia interna de camarões peneídeos e C) Órgão x na base do pedúnculo ocular (adaptado de Bondad-Reantaso *et al.*, 2001).....**2**
- Figura 2.** Ciclo de vida dos camarões peneídeos. Os adultos desovam em águas mais profundas e de maior salinidade; onde ocorre o desenvolvimento dos estágios larvais de Náuplio, Protozoa e Misis, que progressivamente vão emergindo em direção às águas costeiras. As pós-larvas se dirigem para ambientes estuarinos onde vivem até se tornarem juvenis. Posteriormente, esses juvenis migram para o mar tornando-se sub-adultos que migram para as profundezas oceânicas para se reproduzirem, reiniciando assim o ciclo.....**4**
- Figura 3.** Liberação de diferentes efetores imunológicos e moléculas imunoreguladoras, após ativação dos hemócitos por agentes patogênicos.....**9**
- Figura 4.** Esquema representativo mostrando os principais mecanismos celulares antivirais desencadeados em crustáceos.....**18**
- Figura 5.** Esquema ilustrativo das condições de manutenção dos animais em laboratório, alimento principal fornecido por subestágios e coletas dos diferentes estágios e subestágios de desenvolvimento. **N:** Náuplio; **Z:** Protozoa; **M:** Misis; **PL:** Pós-larva; **J:** Juvenis.....**23**
- Figura 6.** Eletroforese em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídio mostrando a amplificação, por RT-PCR, de 17 genes associados às respostas de defesa e de três genes associados ao metabolismo e manutenção celular (controles) em 14 subestágios de desenvolvimento do camarão *Litopenaeus vannamei*. As categorias funcionais e os diferentes genes estão indicados à esquerda e o tamanho dos produtos de amplificação, em pares de bases (pb), está representado à direita. (A) Genes expressos em todos os subestágios do desenvolvimento. (B) Genes expressos em alguns estágios de desenvolvimento. (C) Genes de referência. **N:** Náuplio; **Z:** Protozoa; **M:** Misis; **PL:** Pós-larva.....**30**

**Figura 7.** Estabilidade dos genes de referência. Valores de  $C_q$  dos genes de referência fator de alongação 1- $\alpha$  (*LvEF-1 $\alpha$* ), proteína S6 da subunidade ribossomal 40S (*LvRpS6*),  $\beta$ -actina (*Lv-actin*) e média aritmética dos genes, selecionados nos subestágios de desenvolvimento de *Litopenaeus vannamei*. **N:** Náuplio; **Z:** Protozoa; **M:** Misis; **PL:** Pós-larva. Os dois grupos (Ovo 0-4h – NI e NV-PL17) utilizados nas análises de expressão gênica são indicados.....**33**

**Figura 8.** Agrupamento hierárquico dos níveis de expressão de 13 genes associados ao sistema imune nos subestágios Ovo 0-4h, Ovo 7-11h e NI de *Litopenaeus vannamei*. Os níveis de expressão foram calculados de acordo com o método  $2^{-\Delta C_q}$  normalizado com o gene de referência *LvRpS6*. Cada retângulo da matriz corresponde ao valor médio de expressão em um determinado subestágio do desenvolvimento, de três *pools* de amostras independentes. A intensidade da cor, de verde a vermelho, indica a magnitude de expressão gênica, segundo a escala de cor presente na parte superior da figura. Os diferentes genes estão representados à direita. O dendrograma presente na parte superior da figura indica a relação entre as condições experimentais (subestágios do desenvolvimento), definidos como Grupos de Condição (**GC**). O dendrograma à esquerda indica a relação entre os perfis de expressão dos genes, definidos como Grupos de Expressão (**GE**), como detalhado nos Resultados. Os agrupamentos hierárquicos foram construídos através do programa *Multiple Array Viewer* 4.8. **Ne:** não expresso; **Nq:** não quantificável.....**36**

**Figura 9.** Agrupamento hierárquico dos níveis de expressão de 17 genes associados ao sistema imune, nos subestágios NV a PL17 de *Litopenaeus vannamei*. Os níveis de expressão foram calculados de acordo com o método  $2^{-\Delta \Delta C_q}$  normalizado com a média aritmética de três genes de referência (*LvEF-1 $\alpha$* , *Lv-actin* e *LvRpS6*). Cada retângulo da matriz corresponde ao valor médio de expressão em um determinado subestágio do desenvolvimento, de três *pools* de amostras independentes. A intensidade da cor, de verde a vermelho, indica a magnitude de expressão gênica, segundo a escala de cor presente na parte superior da figura, onde o valor 1 representa a expressão no grupo calibrador (camarões juvenis). O dendrograma presente na parte superior da figura indica a relação entre as condições experimentais (subestágios do desenvolvimento), definidos como Grupos de Condição (**GC**). O dendrograma à esquerda indica a relação entre os perfis de expressão dos genes, definidos como Grupos de Expressão (**GE**). Os

agrupamentos hierárquicos foram construídos através do programa *Multiple Array Viewer* 4.8. **Ne**: não expresso; **Nq**: não quantificável.....39

**Figura 10.** Perfil de expressão dos genes *LvDcr1* (A), *Lv-Ago 1* (B) e *Lv-Sid 1* (C) nos subestágios NV a PL17 de *Litopenaeus vannamei*. Os losangos representam os níveis de expressão de cada *pool* de amostras (n=3) e as linhas pontilhadas em vermelho representam a média aritmética. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as condições experimentais ( $P<0,05$ ), obtidas através dos testes ANOVA e Tukey.....41

**Figura 11.** Perfil de expressão dos genes *LvproPO-1* (A), *LvSty-II* (B), *Litvan PEN3* (C) e *Litvan PEN2* (D) nos subestágios NV a PL17 de *Litopenaeus vannamei*. Os losangos representam os níveis de expressão de cada *pool* de amostras (n=3) e as linhas pontilhadas em vermelho representam a média aritmética. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as condições experimentais ( $P<0,05$ ), obtidas através dos testes ANOVA e Tukey.....42

**Figura 12.** Perfil de expressão dos genes *LvDscam* nos subestágios NV a PL17 de *Litopenaeus vannamei*. Os losangos representam os níveis de expressão de cada *pool* de amostras (n=3) e as linhas pontilhadas em vermelho representam a média aritmética. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as condições experimentais ( $P<0,05$ ), obtidas através dos testes ANOVA e Tukey.....43

**Figura 13.** Perfil de expressão dos genes *LvDcr2* (A), *Lv-Ago 2* (B) e *LvSVC1* (C) nos subestágios NV a PL17 de *Litopenaeus vannamei*. Os losangos representam os níveis de expressão de cada *pool* de amostras (n=3) e as linhas pontilhadas em vermelho representam a média aritmética. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as condições experimentais ( $P<0,05$ ), obtidas através dos testes ANOVA e Tukey.....45

**Figura 14.** Perfil de expressão dos genes *LvHHAP* (A), *Lv-PRX* (B), *LvClot* (C) nos subestágios NV a PL17 de *Litopenaeus vannamei*. Os losangos representam os níveis de expressão de cada *pool* de amostras (n=3) e as linhas pontilhadas em vermelho representam a média aritmética. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as

condições experimentais ( $P<0,05$ ), obtidas através dos testes ANOVA e Tukey.....46

**Figura 15.** Perfil de expressão dos genes *LvRelish* (A), *LvDorsal* (B) e *LvIAP* (C) nos subestágios NV a PL17 de *Litopenaeus vannamei*. Os losangos representam os níveis de expressão de cada *pool* de amostras ( $n=3$ ) e as linhas pontilhadas em vermelho representam a média aritmética. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as condições experimentais ( $P<0,05$ ), obtidas através dos testes ANOVA e Tukey.....47

**Figura 16.** Ciclo biológico de *Litopenaeus vannamei* indicando o início da expressão de 17 genes associados ao sistema imune. O significado das siglas de cada gene está apresentando na Tabela 2.....49

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Estágios de desenvolvimento de camarões e a ontogenia de órgãos, tecidos e células associados ao sistema imune.....	<b>5</b>
<b>Tabela 2.</b> Pares de iniciadores de genes associados ao sistema imune em <i>Litopenaeus vannamei</i> utilizados nas análises de RT-PCR convencional e RT qPCR.....	<b>26</b>
<b>Tabela 3.</b> Eficiência dos iniciadores utilizados, valores de <i>T<sub>m</sub></i> e valores máximos de <i>C<sub>q</sub></i> .....	<b>32</b>



## SUMARIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DOS PENEÍDEOS.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. ENFERMIDADES EM CAMARÕES PENEÍDEOS.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE O SISTEMA IMUNE DOS CRUSTÁCEOS.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.1. Proteínas/Receptores de Reconhecimento Padrão (PRPs/PRRs).....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.2. Vias de Sinalização intracelular: Toll e IMD.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.3. Defesas Antimicrobianas: Peptídeos antimicrobianos e sistema proPO.....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.4. Mecanismo antioxidante.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.5. Sistema de Coagulação e Homeostase.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.6. Defesas antivirais em crustáceos.....</b>	<b>15</b>
<b>I) Apoptose e Autofagia.....</b>	<b>15</b>
<b>II) Sistema Interferon (IFN)-like.....</b>	<b>16</b>
<b>III) Sistema de Interferência por RNA (RNAi).....</b>	<b>16</b>
<b>IV) Outras moléculas associadas à defesa antiviral.....</b>	<b>19</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1. OBJETIVO GERAL:.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1. ANIMAIS.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.1. Ovos, larvas e Pós-larvas de <i>L. vannamei</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.2. Juvenis de <i>L. vannamei</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. COLETA DE HEMOLINFA.....</b>	<b>23</b>
<b>3.3. EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA.....</b>	<b>24</b>
<b>3.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....</b>	<b>24</b>
<b>3.5. EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (QPCR).....</b>	<b>27</b>
<b>3.6. ANÁLISE DE DADOS DE QPCR.....</b>	<b>27</b>
<b>3.6.1. Seleção do gene de referência.....</b>	<b>27</b>
<b>3.6.2. Cálculo de expressão relativa.....</b>	<b>28</b>

3.6.3. *Agrupamentos hierárquicos de expressão gênica*.....28

3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....28

4. RESULTADOS ..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

4.1. ANÁLISES QUALITATIVAS DE EXPRESSÃO GÊNICA (RT-PCR CONVENCIONAL) ..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

4.2. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL APÓS TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-QPCR)... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

4.3. ANÁLISES QUANTITATIVAS DE EXPRESSÃO GÊNICA (RT-QPCR) ..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

4.3.1. *Análises de expressão gênica nos subestágios precoces de Ovo 0-4h a NI*..... ¡Error! Marcador no definido.

4.3.2. *Análises de expressão gênica nos subestágios tardios de NV a PL17* ..... ¡Error! Marcador no definido.

5. DISCUSSÃO ..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

6. CONCLUSÕES ..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

7. PERSPECTIVAS..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

## 1. INTRODUÇÃO

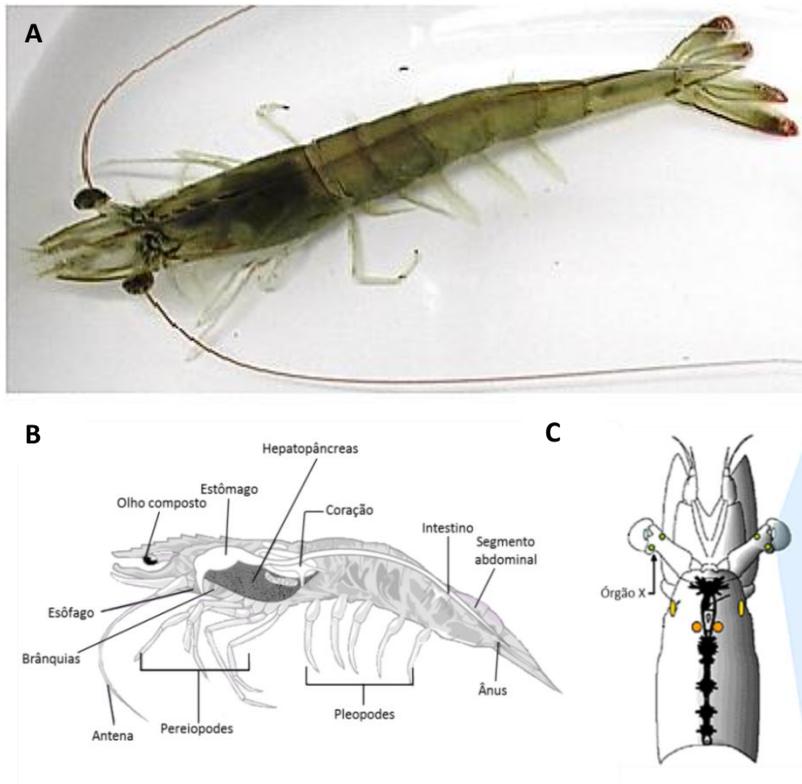
Atualmente, o cultivo de camarões, conhecido como carcinicultura, vem contribuindo para a alimentação humana e para a conservação dos estoques naturais ameaçados pela pesca indiscriminada e destruição dos seus ecossistemas aquáticos. Entre os camarões marinhos cultivados, destacam-se os peneídeos das espécies *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon* e *Marsupenaeus japonicus*, que são mundialmente apreciadas e seu cultivo reveste-se de grande importância sócio-econômica, uma vez que traz muitas divisas aos países produtores, gerando ainda inúmeros empregos.

Dentre os peneídeos, o camarão branco *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) (Fig. 1) se tornou a espécie mais cultivada no mundo devido às suas excelentes características zootécnicas e rusticidade no manejo, representando 71,8% da produção mundial de peneídeos no 2010 (FAO, 2012). Esta espécie se encontra naturalmente distribuída ao largo da costa do Pacífico desde o Golfo da Califórnia-México até o extremo norte do Peru, sendo os principais produtores mundiais a China, a Tailândia, a Indonésia e o Vietnã na Ásia, e o Equador, o México, Honduras e o Brasil nas Américas (FAO, 2012).

No Brasil, essa espécie foi introduzida na região Norte na década de 80 e posteriormente trazida para a região Sul, Santa Catarina (SC), em 1998 com o propósito de viabilizar a atividade no Estado (COSTA *et al.*, 2000), adaptando-se bem aos cultivos e contribuindo com o crescimento da carcinicultura regional (BUGLIONE, 2009).

O cultivo de camarões marinhos é uma atividade econômica que vem crescendo significativamente nas últimas décadas. Nesse sentido, o sucesso da produção depende essencialmente de um manejo adequado tanto nas fazendas quanto em laboratório, onde reprodutores e larvas são mantidos e cultivados. É conhecido que a maturação dos reprodutores depende de uma série de fatores físico-químicos adequados, tais como salinidade, temperatura e oxigênio dissolvido na água. Além disso, sabe-se que nas fêmeas a maturação da gônada é reprimida pelo hormônio repressor da maturação, produzido pelo conjunto de células neurosecretoras (órgão X) na base do pedúnculo ocular (Figura 1), o qual é inativado naturalmente em grandes profundidades (20 a 160 metros) em mar aberto (PRIMAVERA, 1984). Atualmente, esse conhecimento é aproveitado para a maturação e reprodução desses peneídeos em condições de laboratório, com a

ablação unilateral do pedúnculo ocular nas fêmeas, promovendo a maturação das gônadas e sucessivas desovas.



**Figura 1.** *Litopenaeus vannamei*. A) Anatomia externa, B) Anatomia interna de camarões peneídeos e C) Órgão x na base do pedúnculo ocular (adaptado de Bondad-Reantaso *et al.*, 2001).

### 1.1. Considerações sobre os estágios de desenvolvimento dos peneídeos

Os camarões peneídeos possuem estágios de desenvolvimento que se caracterizam por ciclos migratórios, sendo que a maioria das espécies possuem uma fase marinha e outra estuarina (Fig. 2). Os peneídeos possuem, em seu ciclo de vida, um período planctônico-pelágico com três fases larvais: Náuplios, Protozoa e Misis, seguido por um período de transição, denominada Pós-larva (Megalopa),

também planctônico-pelágico e já com aparência geral do adulto, e finalmente, um período bentônico-demersal em duas fases: juvenil e adulta (CALAZANS, 1993).

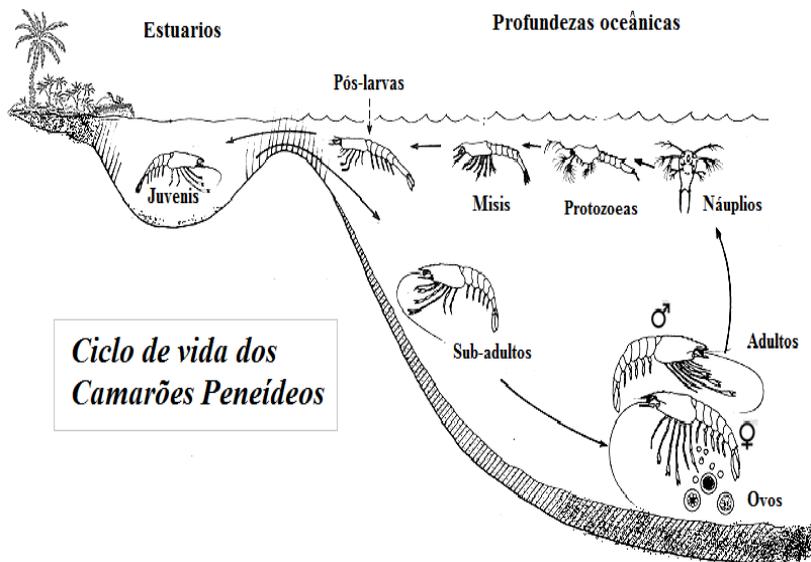
Os estágios larvais dos peneídeos apresentam duração média de duas a três semanas e, a partir do estágio Misis, os camarões estão aptos a alcançarem o ambiente estuarino, onde vivem as Pós-larvas e parte do estágio juvenil. Então, retornam ao ambiente marinho onde ocorre sua reprodução. A duração do estágio juvenil é de dois a três meses e do adulto de 8 a 20 meses (DALL *et al.*, 1990).

Por ocasião do acasalamento, o macho deposita o par de espermatóforos no téllico da fêmea que libera os ovos à medida que são fertilizados no ambiente. Durante essa fase, as fêmeas desovam sucessivamente, produzindo um número considerável de ovos, variando de 100.000 a 500.000 por desova, dependendo da espécie e do tamanho da fêmea (PRIMAVERA, 1984). Aproximadamente 12 horas após a desova, os ovos eclodem em larvas Náuplio, as quais podem se desenvolver em 4, 5 ou 6 subestágios (NI, NII, NIII, NIV, NV e NVI), dependendo da espécie.

Em *L. vannamei*, são identificados cinco subestágios de Náuplios (FENUCCI *et al.*, 1984). Esses se alimentam das reservas vitelínicas (alimentação endógena), já que apresentam um intestino anterior indiferenciado (MUHAMMAD *et al.*, 2012). Estas larvas apresentam um fototaxismo positivo muito importante, que pode estar relacionado às camadas superficiais do mar, onde há uma maior abundância de fitoplâncton, o qual constitui o alimento fundamental para o estágio larvário seguinte Protozoa (ALFONSO; COELHO, 1997). As Protozoas desenvolvem-se em três subestágios (ZI, ZII e ZIII) com duração média de cinco dias, alimentando-se principalmente de fitoplâncton (alimentação exógena). Já, no último estágio larval, denominado Misis, ocorrem também três subestágios (MI, MII e MIII), em três dias e alimentando-se principalmente de zooplâncton (FENUCCI *et al.*, 1984).

Quatro semanas após a desova, as Pós-larvas (PL), que se desenvolvem a partir das Misis, estão aptas a penetrar nos ambientes estuarinos, onde encontram proteção contra predadores e alimentação abundante para o seu crescimento. As PL são morfologicamente iguais aos adultos, exceto por pequenas diferenças no rosto, apresentando hábito bentônico e comportamento alimentar omnívoro (TREECE; FOX, 1993). Normalmente, se atribui 24 horas para cada estágio pós-larval (PL1 a PL30), considerando desde a metamorfose até o 30º dia, a

partir de então os indivíduos são considerados juvenis. Quando os animais atingem 17-21 gramas são considerados sub-adultos, sendo então capazes de se reproduzir. Em torno de 12 meses, atingem 35-40 gramas e são então considerados indivíduos adultos (ARCOS *et al.*, 2005).



**Figura 2.** Ciclo de vida dos camarões peneídeos. Os adultos desovam em águas mais profundas e de maior salinidade; onde ocorre o desenvolvimento dos estágios larvais de Náuplio, Protozoa e Misis, que progressivamente vão emergindo em direção às águas costeiras. As pós-larvas se dirigem para ambientes estuarinos onde vivem até se tornarem juvenis. Posteriormente, esses juvenis migram para o mar tornando-se sub-adultos que migram para as profundezas oceânicas para se reproduzirem, reiniciando assim o ciclo (adaptado de Boschi, 1977).

Embora os estudos envolvendo a reprodução dos peneídeos em cativeiro tenha permitido descrever com profundidade as características morfológicas de cada estágio, bem como estabelecer as condições laboratoriais para se atingir altas taxas de sobrevivência e os fatores ambientais que afetam o seu desenvolvimento larval (SASTRY, 1983), muito pouco se conhece sobre a ontogenia do seu sistema imune. Até o presente momento, a ontogenia de alguns órgãos, tecidos e células

associadas ao sistema imune foram descritos em algumas espécies de camarões como mostra a Tabela 1.

**Tabela 1.** Estágios de desenvolvimento de camarões e a ontogenia de órgãos, tecidos e células associados ao sistema imune

Órgãos, tecidos e células associados ao sistema imune	Estágio (surgimento)	Espécie	Referência
Coração (batimentos irregulares)	NVI	<i>Metapenaeus ensis</i>	(McMahon <i>et al.</i> , 2002)
Brânquias rudimentares	ZII	<i>Penaeus japonicus</i>	(Bouaricha <i>et al.</i> , 1994)
	MIII	<i>Penaeus monodon</i>	(Silas <i>et al.</i> , 1978)
Órgão linfóide	MIII	<i>P. japonicus</i>	(Nakamura, 1987)
Tecido hematopoiético	PL3	<i>L. vannamei</i>	(Muhammad <i>et al.</i> , 2013)
Hemócitos	N-E	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	(Lin <i>et al.</i> , 2007)
	NII	<i>P. monodon</i>	(Jiravanichpaisal <i>et al.</i> , 2007)
	NV	<i>L. vannamei</i>	(Muñoz <i>et al.</i> , 2003)

N: Náuplio; Z: Protozoa; M: Misis; PL: Pós-larva; N-E: Náuplio embrionário, indicando o Náuplio que ainda não eclodiu do ovo.

## 1.2. Enfermidades em camarões peneídeos

A produção de peneídeos em escala comercial requer a intensificação dos sistemas de cultivo e de técnicas de produção, necessitando maiores investimentos e cuidados no manejo. Nesse sentido, as restrições mais frequentemente observadas em relação a essa prática são de ordem ambiental (degradação do ambiente e água imprópria), nutricional e sanitária (KAUTSKY *et al.*, 2000). Cabe, contudo salientar que, as práticas usuais de manejo, baseadas na utilização de altas densidades populacionais, constituem um importante fator de estresse para os animais. Portanto, cultivos intensivos clássicos propiciam o aparecimento e a rápida disseminação de agentes infecciosos resultando, geralmente, em mortalidades massivas e levando, por consequência, a prejuízos econômicos incalculáveis (PERAZZOLO; ROSA; BARRACCO, 2012).

No momento, a profilaxia e o controle de doenças nos cultivos restringem-se, basicamente, a práticas adequadas de manejo e à redução das condições de estresse, uma vez que os fatores que controlam o estado de saúde dos camarões são ainda pouco conhecidos. Nesse contexto, o estudo do sistema imune dos crustáceos representa uma estratégia promissora, visto que permite conhecer as bases da susceptibilidade e da resistência desses animais aos diferentes microorganismos patogênicos e oportunistas.

Entre as doenças infecciosas endêmicas ou pandêmicas que causam sérias perdas econômicas pela diminuição na produção

destacam-se aquelas causadas por vírus que são, indiscutivelmente, as mais difíceis de serem evitadas e tratadas (LIGHTNER *et al.*, 2012). Na história da carcinicultura mundial, as viroses representam aproximadamente 60% das perdas advindas das doenças infecciosas em contrapartida aos 20% atribuídos às perdas causadas pelas infecções bacterianas (FLEGEL, 2012).

Entre as doenças virais que mais afetaram a carcinicultura mundial, especialmente as fazendas de produção de *L. vannamei*, destacam-se o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV, do inglês *White Spot Syndrome Virus*), o vírus da síndrome de Taura (TSV, do inglês *Taura Syndrome Virus*), o vírus da necrose hipodérmica e hematopoiética (IHNV, do inglês *Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus*), o vírus da cabeça amarela (YHV, do inglês *Yellow Head Virus*) e o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV, do inglês *Infectious Mionecrosis Virus*) e (LIGHTNER *et al.*, 2012).

O WSSV é considerado o vírus mais devastador para a carcinicultura, responsável por dizimar populações inteiras de cultivos em todo o mundo (FLEGEL, 2012; LIGHTNER *et al.*, 2012). Mortalidades massivas podem ocorrer em um período muito curto, sendo que em casos mais severos podem chegar a 100% entre 2 a 7 dias após a detecção dos primeiros sinais clínicos (CHOU *et al.*, 1995; CHANG *et al.*, 1999). Como exemplo, podemos citar o episódio ocorrido no estado de Santa Catarina, entre novembro de 2004 e abril de 2009, quando ocorreram mortalidades pelo WSSV em 94 das 107 fazendas operantes, no qual foram relatados 216 surtos pela entidade sanitária do Estado, CIDASC (COSTA, 2010). Recentemente, também foi detectada a presença do WSSV em cultivos no Nordeste do Brasil, onde se concentra 95% da produção nacional de camarões, com registros em Canguaretama, no litoral sul do Rio Grande do Norte (BARROS; TEIXEIRA, 2012). Ainda no Nordeste, o IMNV foi responsável por sérios prejuízos ao setor desde a sua detecção, em 2002 (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004).

As doenças que afetam os camarões não somente ocorrem nas fazendas, mas também podem acometer nas fases larvais, em laboratórios de larvicultura. No caso dos estágios larvais e pós-larvais, as doenças causadas por vírus podem ser advindas de infecções por baculovírus da necrose glandular do intestino médio (BMN, do inglês *Baculoviral Midgut gland Necrosis*), baculovírus de *P. monodon* (MBV, do inglês *Monodon-type Baculovirus*), o baculovírus penaei (BP), o WSSV e o TSV (MANIVANNAN *et al.*, 2002). Por outro lado, também infecções virais múltiplas podem ser eventualmente encontradas nas

larviculturas, em especial de *P. monodon*, onde já houveram registros de infecções por dois (WSSV/MBV, WSSV/HPV) ou três vírus simultâneos (WSSV/MBV/HPV) nos animais (UMESHA *et al.*, 2008).

Infecções por patógenos oportunistas como bactérias e fungos também podem causar mortalidades significativas nos estágios larvais e pós-larvais (LIGHTNER, 1996). Entre essas destacam-se as vibrioses causadas por bactérias do gênero *Vibrio*, responsáveis por mortalidades de até 80% na larvicultura em poucos dias (VANDENBERGHE *et al.*, 1999). Entre as espécies mais patogênicas aos peneídeos destacam-se *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. splendidus* e *V. penaeicida* (LIGHTNER, 1996; GOARANT *et al.*, 2006).

Muito recentemente, tem sido detectada nos cultivos de *L. vannamei* e *P. monodon* no sul da Ásia, uma doença denominada síndrome da necrose aguda do hepatopâncreas ou AHPNS (do inglês, *Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome*), inicialmente conhecida por EMS (do inglês, *Early Mortality Syndrome*). Análises histopatológicas e microbiológicas indicam que o agente etiológico é a bactéria *V. parahaemolyticus*, necessitando, contudo de maiores estudos moleculares e bioquímicos para a sua confirmação e caracterização definitiva (TRAN *et al.*, 2013). Esta bactéria é transmitida por via oral, onde no trato gastrointestinal do camarão produz uma toxina a qual provoca a destruição com disfunção dos tecidos do órgão digestório.

Por outro lado, doenças causadas por bactérias filamentosas também são ocasionalmente observadas em berçários de larviculturas, podendo estar associadas à infecção por bactérias do gênero *Leucothrix*, *Thiotrix*, *Flexibacter*, *Cythopaga* ou *Flavobacterium* (AGUIRRE-GUZMÁN; ASCENCIO-VALLE, 2000). Um exemplo foi descrito em cultivos de PLs de *L. vannamei* no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM, UFSC), cujo agente etiológico foi identificado como sendo a bactéria filamentosa *Flexibacter maritimus* (MOURIÑO *et al.*, 2008).

As doenças causadas por fungos filamentosos podem também representar um problema para os estágios larvais, onde registros foram feitos em cultivos na Índia com mortalidades causadas por *Lagenidium callinectes* e *Serolpidium* spp. (RAMAIAH, 2006). Normalmente, os esporos fúngicos e micélios podem ser observados nas quelas e nos apêndices de Protozoas e Misis, mostrando sinais clínicos tais como letargia e levando a altas mortalidades. RAMASAMY *et al.*, (1996) relataram mortalidade em estágios de Náuplio, Zoa e Misis de *P. monodon* ocasionadas por *L. callinectes*. Por outro lado, mortalidades causadas por outro fungo filamentoso, *Fusarium* spp., podem afetar

todos os estágios de desenvolvimento dos peneídeos (GABRIEL; FELIPE, 2000). Em vista dos relatos acima, fica evidente a necessidade de compreender como estes animais podem-se defender ou conviver com esses micro-organismos.

### **1.3. Considerações sobre o sistema imune dos crustáceos**

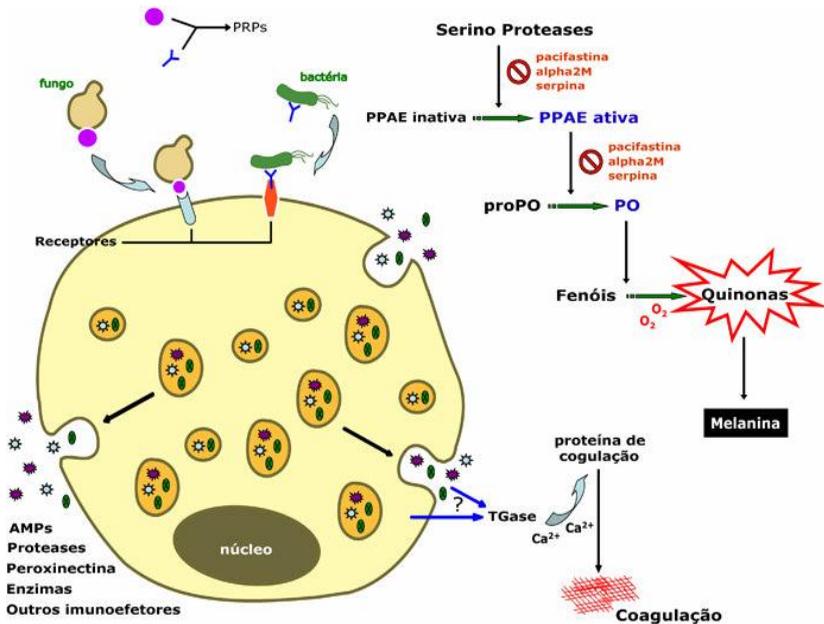
Os crustáceos, assim como os demais invertebrados, apresentam apenas um sistema imune do tipo inato, não possuindo o arsenal imunológico adaptativo presente nos vertebrados, como os receptores e os anticorpos específicos e linhagens de células de memória que lhes confira uma proteção a longo prazo.

A falta de um sistema imune adaptativo resulta na impossibilidade de se desenvolver “vacinas” clássicas, baseadas no reconhecimento específico de um antígeno, diminuindo assim os meios de prevenção e controle de doenças nesses animais. Essa limitação crucial faz com que as infecções por micro-organismos patogênicos sejam particularmente ameaçadoras para esses animais (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008). Apesar de contarem apenas com o sistema imune do tipo inato, os mecanismos imunológicos desencadeados pelos crustáceos são extremamente rápidos e eficientes, o que lhes permite resistir e eliminar, na maioria dos casos, a uma grande variedade de micro-organismos e parasitas de seu organismo.

A primeira linha de defesa desses animais é proporcionada pela presença de uma carapaça exterior rígida ou exoesqueleto, o qual funciona como uma barreira físico-química de proteção. Além disso, grande parte do tubo digestório desses animais, que é a principal via de entrada de micro-organismos, também é coberto por uma camada quitinosa e contínua, fornecendo um meio ácido e preenchido com enzimas capazes de digerir e inativar micro-organismos que não são parte de sua microbiota natural (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

Além disso, cabe ressaltar que, da metamorfose de Náuplio V a Protozoa I, o camarão já deve ter desenvolvido parte do tubo digestório, quando começa sua alimentação exógena e em consequência a colonização por uma específica microbiota. Por outro lado, quando essas barreiras são ultrapassadas, não sendo suficientes para impedir a invasão de agentes patogênicos, desencadeia-se no hospedeiro uma variedade de respostas imunitárias internas/sistêmicas complexas, a fim de neutralizar e remover os agentes invasores (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

O sistema imune dos crustáceos está especialmente ligado ao seu sangue ou hemolinfa, que consiste de uma fração celular (hemócitos) e de uma fração líquida (plasma), onde estão dissolvidos os fatores humorais. As respostas imunes celulares e humorais atuam em sinergismo, protegendo esses animais, na maioria das vezes, de invasões e infecções causadas por patógenos e mantendo, assim, sua integridade e homeostasia. A ativação dos hemócitos dos crustáceos, pelo contato com os micro-organismos ou suas moléculas associadas, resulta na sua lise e/ou degranulação, liberando assim uma variedade de efetores imunológicos para o plasma iniciando a ativação de diferentes mecanismos de defesa (Fig. 3).



**Figura 3.** Liberação de diferentes efetores imunológicos e moléculas imunoreguladoras, após ativação dos hemócitos por agentes patogênicos (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

Entre os mecanismos envolvidos no reconhecimento e destruição de patógenos nos crustáceos, destacam-se: (i) o sistema fagocítico e de encapsulamento; (ii) a produção de moléculas líticas e microbicidas, como as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio; (iii) a produção de proteínas e/ou peptídeos antimicrobianos (PAMs) que

apresentam geralmente uma atividade microbocida rápida e potente contra um amplo espectro de micro-organismos; (iv) a melanização mediada pelo sistema de ativação da pró-fenoloxidase (proPO) gerando moléculas altamente citotóxicas; (v) o sistema de coagulação da hemolinfa; (vi) o sistema de reconhecimento mediado por proteínas de reconhecimento de padrões moleculares e aglutinação celular mediada por lectinas; e (vii) os sistemas antivirais mediados pela interferência por RNA (RNAi), citocinas análogas a interferons, apoptose e autofagia (LIU; SÖDERHÅLL; JIRAVANICHPAISAL, 2009; BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

### ***1.3.1. Proteínas/Receptores de Reconhecimento Padrão (PRPs/PRRs)***

As respostas de defesa são desencadeadas a partir do contato e reconhecimento do agente invasor ou dos seus componentes por proteínas/receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRPs/PRRs; do inglês, *Pattern Recognition Proteins or Receptors*). As PRPs/PRRs são moléculas produzidas pelo hospedeiro, que reconhecem e interagem com padrões moleculares exclusivamente expressos na superfície dos micro-organismos e que estão ausentes no hospedeiro (M/PAMPs, do inglês *Microbe/Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997; KOROPATNICK *et al.*, 2004; NYHOLM; GRAF, 2012). Os principais M/PAMPs reconhecidos pelas PRPs dos invertebrados são: lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular de bactérias Gram-negativas, peptidoglicanas (PGN) e ácido lipoteicoico de bactérias Gram-positivas,  $\beta$ -1,3-glicanas de fungos, RNA de dupla fita (dsRNA; do inglês, *double-stranded RNA*) produzido durante a replicação de vários vírus, RNA de fita simples (ssRNA; do inglês, *single-strand RNA*) e motivos CpG (DNA não-metilado) de micro-organismos (LOKER *et al.*, 2004).

Várias PRPs foram identificadas e caracterizadas na hemolinfa de crustáceos, tais como a proteína que se liga ao LPS ou LBP (do inglês, *LPS-binding protein*), as proteínas que se ligam aos  $\beta$ -1,3-glicanos ou  $\beta$ GBP e GBP (do inglês,  *$\beta$ -1,3-Glucan binding protein*), a proteína que se liga a ambos os LPS e  $\beta$ -1,3-glicanos ou LGBP, a proteína "mas-like" (do inglês, *Masquerade-like protein*) que reconhece vários micro-organismos e vários tipos de lectinas (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006).

Mais recentemente, uma proteína transmembrana da superfamília das imunoglobulinas denominada dscam (do inglês, *Down syndrome cell adhesion molecule*) foi encontrada relacionada ao sistema imune de

invertebrados. Inicialmente, ela foi caracterizada em pacientes com Síndrome de Down, onde a alta expressão do gene no embrião afetava o desenvolvimento neural (YAMAKAWA *et al.*, 1998). Nos invertebrados, homólogos da *dscam* foram primeiramente encontrados em *Drosophila melanogaster* (SCHMUCKER *et al.*, 2000) como proteínas transmembranas ou solúveis no plasma e estando ligadas ao desenvolvimento do eixo neural desses insetos. Nos crustáceos, diferentes isoformas de *dscam* já foram caracterizadas em *Daphnia* spp. (proteína transmembrana) (BRITES *et al.*, 2008), *L. vannamei* (proteína solúvel) (CHOU *et al.*, 2009), *P. monodon* (proteína transmembrana e solúvel) (CHOU *et al.*, 2011) e *P. leniusculus* (proteína transmembrana) (WATTHANASUROROT *et al.*, 2011).

O papel imunológico das *dscam* nos invertebrados, já bem conhecido em insetos, está associado ao reconhecimento e aumento da taxa de fagocitose/endocitose de micro-organismos (bactérias e vírus) pelas células do hospedeiro, atuando assim como PRPs e opsoninas (WATSON *et al.*, 2005). De maneira interessante, isoformas específicas de *dscam* são produzidas por insetos (mosquitos) após o contato com diferentes agentes patogênicos. Essas isoformas são produzidas através de modificações pós-transcricionais por *splicing* alternativo, as quais são induzidas por patógenos específicos (DONG; TAYLOR; DIMOPOULOS, 2006). A produção de isoformas específicas de *dscam* aumenta a probabilidade de reconhecimento e fagocitose dos micro-organismos invasores.

O reconhecimento do agente invasor desencadeia diversas atividades celulares e humorais através de diferentes vias de transdução de sinais (LI; XIANG, 2013). Em *D. melanogaster* foram descritas duas principais vias de transdução de sinal, a via Toll e a via IMD, as quais participam do controle da expressão de PAMs (KHUSH; LEULIER; LEMAITRE, 2001; DE GREGORIO *et al.*, 2002). A existência dessas vias em camarões tem sido recentemente documentada (LI; XIANG, 2013).

### ***1.3.2. Vias de Sinalização intracelular: Toll e IMD***

Em insetos, a via Toll tem um papel chave na resposta frente às bactérias Gram-positivas e fungos, através da regulação de um grande conjunto de genes (peptídeos antimicrobianos, peptídeos pequenos com função desconhecida, bem como componentes da melanização e cascata de coagulação). Além disso, algumas evidências mostram que a via Toll está envolvida na resposta imune frente aos vírus (DXV, do inglês

*Drosophila X Vírus*) em *Drosophila* e *Aedes aegypti*. Na via Toll de *Drosophila*, são ativados os fatores de transcrição do tipo NF- $\kappa$ B dorsal e Dif (BELVIN; ANDERSON, 1996; RUTSCHMAN *et al.*, 2000).

Esses fatores de transcrição encontram-se numa forma inativa no citosol e, quando processados na sua forma ativa, são translocados ao núcleo onde regulam a expressão dos PAMs drosomicina, *metchnikowin* e defensina (LEMAITRE; HOFFMANN, 2007). Nos camarões, *L. vannamei* e *Fenneropenaeus chinensis*, foi encontrado um factor homólogo à proteína dorsal (*LvDorsal* e *FcDorsal*, respectivamente) (LI *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2010). A via IMD, por outro lado, é ativada através do reconhecimento de bactérias Gram-negativas, a qual culmina no processamento do fator de transcrição do tipo NF- $\kappa$ B relish. Uma vez ativado, relish é responsável pela indução da expressão dos PAMs diptericina e atacina (HEDENGREN *et al.*, 1999). Atualmente, o conhecimento sobre o papel da via IMD na resposta imune de camarões é muito limitado, com exceção de dois componentes identificados, IMD e relish encontrados em *L. vannamei* e *F. chinensis*, respectivamente (LI; XIANG, 2013).

### ***1.3.3. Defesas Antimicrobianas: Peptídeos antimicrobianos e sistema proPO***

Na interface entre respostas celulares e humorais de defesa, os crustáceos contam com moléculas antimicrobianas, tais como os peptídeos antimicrobianos (PAMs), que são sintetizados pelos hemócitos e armazenados em seus grânulos, os quais são liberados a partir do contato com os patógenos. Os PAMs apresentam atividade microbicida rápida e potente contra vários micro-organismos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos filamentosos, leveduras e, em alguns casos, também contra protozoários e vírus envelopados (ROSA; BARRACCO, 2010).

O mecanismo de ação dos PAMs se manifesta geralmente sobre as membranas dos micro-organismos, provocando sua desestabilização, seja por uma atividade detergente ou formadora de poros, culminando na destruição do micro-organismo (BULET *et al.*, 2004; BROGDEN, 2005; YOUNT *et al.*, 2006). As principais famílias de PAMs descritas em camarões são as peneidinas (DESTOUMIEUX *et al.*, 1997), crustinas (GROSS *et al.*, 2001; BARTLETT *et al.*, 2002), fatores antilipopolissacárideos (ALFs) (GROSS *et al.*, 2001; SUPUNGUL *et al.*, 2002) e as stylicinas (ROLLAND *et al.*, 2010).

As peneidinas constituem uma família multigênica de peptídeos catiônicos (PEN2, PEN3, PEN4 e PEN5) encontrada exclusivamente em

camarões peneídeos (GUEGUEN *et al.*, 2006; TASSANAKAJON *et al.*, 2010), as quais apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas e fungos filamentosos (DESTOUMIEUX *et al.*, 1997; 1999). As crustínas, por outro lado, possuem um espectro de ação antimicrobiana restrito a bactérias Gram-positivas enquanto que os ALFs são ativos contra um grande número de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (ROSA; BARRACCO, 2010). Finalmente, as stylicinas constituem uma nova família de PAMs recentemente descritas no camarão *Litopenaeus stylirostris* (ROLLAND *et al.*, 2010). Ela apresenta uma forte atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, mas uma baixa atividade frente a bactérias do gênero *Vibrio* spp.

Além dos PAMs, os patógenos podem ser neutralizados ou destruídos pelos hemócitos através de outros mecanismos antimicrobianos, como aqueles do sistema de ativação da pró-fenoloxidase (proPO). Este sistema, em crustáceos, é ativado por LPS de bactérias Gram-negativas e  $\beta$ -1,3-glicanas de fungos (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004). Durante as infecções, estes compostos se ligam aos receptores dos hemócitos granulares diretamente ou através de PRPs plasmáticas e induzem uma degranulação ou exocitose regulada, com liberação de várias moléculas imunoefetoras, entre as quais as moléculas do sistema proPO.

Uma vez liberadas, ocorre a ativação do sistema pelos próprios componentes dos micro-organismos presentes na hemocele. O produto final desta via é o pigmento insolúvel melanina observado frequentemente durante formação de nódulos e cápsulas hemocíticas, durante a cicatrização de ferimentos (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006). Em relação ao papel imunológico do sistema proPO, sabe-se que esta via gera transitoriamente moléculas altamente citotóxicas, como as quinonas, hemiquinonas e radicais livres como os ROIs (do inglês, *Reactive Oxygen Intermediates*) que participam ativamente da morte dos patógenos (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008). Para evitar a ativação indesejada ou generalizada, o hospedeiro possui inibidores de proteases no plasma e/ou nos hemócitos. Entre eles podemos citar a pacifastina (LIANG; SOTTRUP-JENSEN; SÖDERHÄLL, 1997), os inibidores da família Kazal (JOHANSSON; KEYSER; SÖDERHÄLL, 1994; JIMÉNEZ-VEGA; VARGAS-ALBORES, 2005; SOMPRASONG; RIMPHANITCHAYAKIT; TASSANAKAJON, 2006), serpina (LIANG; SÖDERHÄLL, 1995) e  $\alpha$ 2-macroglobulina (HERGENHAHN; HALL; SÖDERHÄLL, 1988).

### ***1.3.4. Mecanismo antioxidante***

A produção das ROIs pode contribuir para a destruição dos patógenos, mas também lesionar os tecidos do hospedeiro. Para tal, o hospedeiro conta basicamente com enzimas antioxidantes, enzimas de reparação e antioxidantes exógenos. O mecanismo antioxidante inclui a presença de enzimas intracelulares, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPX), que atuam sinergicamente para degradar/neutralizar o excesso de ROIs produzido. Recentemente, em crustáceos foi descrita uma nova enzima antioxidante denominada peroxiredoxina (PRX), que ajuda a minimizar os efeitos nocivos do estresse oxidativo, catalisando a redução de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e hidroperóxidos orgânicos para formas menos nocivas para o hospedeiro (VAN HORN *et al.*, 2010).

### ***1.3.5. Sistema de Coagulação e Homeostase***

Pelo fato de que os crustáceos apresentam circulação aberta ou semi-aberta, um mecanismo fisiológico essencial para a sobrevivência destes animais no meio aquático é a coagulação da hemolinfa. A formação de coágulos previne a perda da hemolinfa e a entrada ou disseminação de micro-organismos em sua cavidade corpórea.

Um componente chave do sistema de coagulação de crustáceos é a proteína plasmática de coagulação (Clot), que forma o coágulo no local da injúria através de ligações covalentes entre  $\gamma$ -glutamil- $\epsilon$ -lisina (LORAND; CONRAND, 1984) mediadas pela enzima dependente de  $Ca^{2+}$ , transglutaminase (TGase). A TGase está usualmente compartimentalizada nos hemócitos dos crustáceos (GREENBERG *et al.*, 1991). Além da sua participação na coagulação tem sido demonstrado que o bloqueio do RNAm da TGase produz a diferenciação das células do tecido hematopoiético e a migração dos hemócitos para a hemolinfa, sugerindo sua função na manutenção do estado indiferenciado das células nesse tecido (LIN; SÖDERHÄLL; SÖDERHÄL, 2008).

Os hemócitos são as células imunocompetentes dos crustáceos e a sua manutenção na hemolinfa é essencial para a sobrevivência e para a defesa desses animais frente a eventuais patógenos. Portanto, é necessária uma rápida produção de novos hemócitos a partir do tecido hematopoiético, que é claramente dependente da ação de uma proteína potencialmente expressa nesse tecido, denominada “proteína associada à homeostasia de hemócitos” ou HHAP (do inglês, *Hemocyte Homeostasis-Associated Protein*). A HHAP foi caracterizada no camarão *P. monodon* e no langostino *Pacifastacus leniusculus* (PRAPAVORARAT *et al.*, 2010).

### **1.3.6. Defesas antivirais em crustáceos**

Em relação às defesas antivirais atualmente reconhecidas nos crustáceos, destacam-se três principais mecanismos: a apoptose celular e autofagia, o sistema *interferon-like* e o sistema de interferência por RNA (RNAi) (Fig. 4) (PERAZZOLO; BARRACO; ROSA, 2012).

#### **1) Apoptose e Autofagia**

A apoptose celular é um processo fisiológico de morte celular, geneticamente controlado e que está envolvida na regulação da homeostasia do organismo, atuando tanto no desenvolvimento de tecidos e também nas respostas imunológicas contra vírus (ROULSTON; MARCELLUS; BRANTON, 1999). A indução de apoptose inicia-se em resposta a uma variedade de estímulos, incluindo infecções virais, e envolve várias alterações morfológicas celulares que leva à fragmentação da célula em pequenas vesículas, denominadas de corpos apoptóticos, as quais são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos. As alterações bioquímicas subjacentes incluem a ativação de enzimas nucleases e proteases, da família das caspases que possuem um papel crucial no processo apoptótico, pois catalisam muitos dos diferentes passos da morte celular (CHOWDHURY; THARAKAN; BHAT, 2008).

O próprio hospedeiro possui reguladores intracelulares de apoptose, destacando-se aqueles da família de proteínas IAP (do inglês, *Inhibitor of Apoptosis Proteins*). As IAPs são as únicas proteínas endógenas conhecidas capazes de regular as caspases ativas, inibindo assim a apoptose (HUNTER; LACASSE; KORNELUK, 2007). As primeiras IAPs foram originalmente descobertas como proteínas produzidas por alguns vírus de insetos, sendo hoje detectadas em diversas espécies de invertebrados e vertebrados (LISTON; FONG; KORNELUK, 2003). No caso dos crustáceos, recentemente no camarão *L. vannamei* foram identificados três proteínas inibitórias de apoptose, sendo que IAP1 e IAP3 participariam na defesa frente ao WSSV, enquanto que a IAP2 participaria na regulação de PAMs (peneidinas, lisozimas, crustinas e ALF) (WANG *et al.*, 2013).

Por outro lado, a autofagia é a principal via intracelular de degradação e reciclagem de macromoléculas de vida longa e organelas da célula, que utilizam a via de degradação lisossomal. A autofagia é ativada em resposta a uma variedade de estímulos intra e extracelulares, incluindo privação de nutrientes, tratamento hormonal ou terapêutico, presença de agregados proteicos mal dobrados, organelas inoperantes e

infecção bacteriana. Recentes estudos tem demonstrado que a autofagia em mamíferos está intimamente implicada na remoção de patógenos intracelulares, estando, portanto associada ao sistema imune.

Atualmente é reconhecido que a autofagia contribui com o sistema imune de três formas: a) eliminação direta de patógenos intracelulares (vírus, bactérias e parasitas) a través da sua degradação nos autolisossomos, b) entrega de produtos/componentes microbianos para os receptores de reconhecimento padrão intracelulares, processo conhecido como “inversão topológica”, ativando as respostas imunes efetoras e 3) como efetor antimicrobiano dos receptores *Toll-like* e outros receptores de sinalização (SUMPTER Jr; LEVINE, 2010).

## ***II) Sistema Interferon (IFN)-like***

Outro mecanismo envolvido na defesa antiviral dos crustáceos é o sistema interferon (IFN)-*like*, assim denominado por ser funcionalmente análogo ao sistema antiviral interferon (IFN) dos vertebrados. Os interferons (IFNs) são citocinas que interferem na replicação viral e induzem um estado antiviral inespecífico no hospedeiro. Entre os PAMPs que podem ativar o interferon destacam-se os RNAs de dupla fita virais (dsRNA). Em mamíferos, as infecções virais induzem à sinalização intracelular que leva à produção de IFN- $\alpha/\beta$  e à maturação de células dendríticas que, por sua vez, estimulam a expressão de uma série de genes implicados nas respostas antivirais (DONNELLY; KOTENKO, 2010).

Nos invertebrados, mais especificamente nos crustáceos, nenhuma molécula com homologia aos IFNs de mamíferos foi, até o momento, encontrada (ROSA; BARRACCO, 2008). Apesar disso, relatos recentes indicam a presença nos camarões de moléculas funcionalmente análogas, que participariam da defesa antiviral inespecífica dos crustáceos (ROBALINO *et al.*, 2004; LABREUCHE *et al.*, 2009). Frente a esses resultados, torna-se razoável supor que citocinas análogas aos IFNs de vertebrados devam existir em camarões e seriam as responsáveis pela produção do estado antiviral inespecífico observado em vários estudos (ROBALINO *et al.*, 2007; LABREUCHE *et al.*, 2009).

## ***III) Sistema de Interferência por RNA (RNAi)***

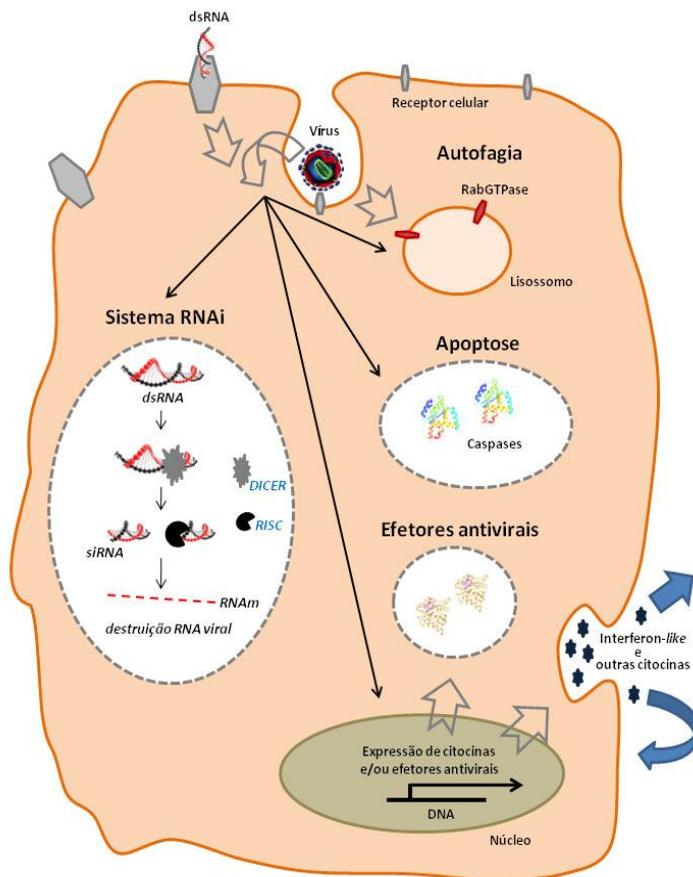
O padrão molecular dsRNA viral é também capaz de desencadear um terceiro mecanismo antiviral em crustáceos, dessa vez patógeno-específico, que é baseado no silenciamento pós-transcricional de genes, conhecido por RNAi (HANNON *et al.*, 2002). O RNAi representa um

mecanismo de defesa natural contra vírus e transposons presente em plantas, fungos, nematódeos, artrópodes e mamíferos (HANNON *et al.*, 2002).

Nesse processo, o dsRNA desencadeia a destruição do RNA mensageiro (RNAm) homólogo à sua própria sequência. Muitos transposons e vírus produzem transitoriamente RNAs de dupla fita (dsRNA) durante os seus ciclos de replicação intracelular, os quais são reconhecidos pelo hospedeiro desencadeando a ativação do RNAi. A ativação deste sistema inicia-se pelo processamento de precursores longos de dsRNA em RNAs pequenos (21-25 pb) (siRNAs do inglês, *Small Interference RNAs*), pela ação de um complexo proteico contendo a enzima dicer, as quais são endoribonucleases do tipo III que clivam especificamente dsRNA ou regiões de grampo de RNAs de fita simples (ALIYARI; DING, 2009). Os siRNAs resultantes são então incorporados a um complexo multiproteico de silenciamento induzido por RNA (RISC; do inglês, *RNA-induced silencing complex*), que conduz à degradação específica ou à repressão da tradução de RNAm com regiões complementares à sequência do dsRNA desencadeante.

Entre as proteínas-chave do sistema do RNAi destaca-se a família das argonautas que são componentes fundamentais do RISC (HAMMOND *et al.*, 2001) com atividade de RNase e que a caracteriza como uma proteína *slicer* do RISC (PARKER; BARFORD, 2006). Todos os complexos RISC caracterizados até o momento possuem como componente pelo menos uma proteína da família argonauta (HAMMOND *et al.*, 2001; HUTVAGNER; ZAMORE, 2002; MARTINEZ *et al.*, 2002; MOURELATOS *et al.*, 2002; VERDEL *et al.*, 2004).

Diferentemente do sistema IFN, que é induzido inespecificamente por qualquer sequência de dsRNA (PAMP) gerando um estado antiviral generalizado e inespecífico, a proteção antiviral baseada no sistema RNAi é sequência-específica (PERAZZOLO; ROSA; BARRACCO, 2012). Em outras palavras, o contato com determinado vírus induz a destruição do RNAm do vírus especificamente pelo RNAi, e não de outro vírus que venha eventualmente infectar o organismo.



**Figura 4.** Esquema representativo mostrando os principais mecanismos celulares antivirais desencadeados em crustáceos (PERAZZOLO; ROSA; BARRACCO, 2012).

A primeira demonstração da existência de defesa antiviral específica em crustáceos foi realizada por Robalino *et al.* (2005) em *L. vannamei*, na qual injeções com dsRNA codificando para sequências de proteínas virais (WSSV ou TSV) resultaram em uma proteção antiviral praticamente completa contra infecções por esses vírus. Desde esse primeiro estudo, vários outros se seguiram, demonstrando a atividade antiviral específica do RNAi contra o WSSV (MEJÍA-RUÍZ *et al.*, 2011; SUDHAKARAN *et al.*, 2011) e outros vírus, inclusive em estudos do nosso laboratório (GUERTLER *et al.*, 2013).

Um dos questionamentos pertinentes ao RNAi é como ocorre a incorporação do dsRNA pela célula (no caso de estudos *in vitro*, com injeções do constructo gênico) e o fenômeno de propagação sistêmica do silenciamento gênico observados em *Caenorhabditis elegans* e *D. melanogaster*. Esses fenômenos parecem estar ligados a dois mecanismos distintos: (a) transferência do dsRNA ao citosol através de um canal proteico transmembrana, denominado Sid-1 (do inglês, *Systemic interference defective*); e/ou (b) endocitose, utilizando receptores *scavenger* de reconhecimento padrão (HUVENNE; SMAGGHE, 2010). Em peneídeos, recentemente um homólogo da Sid-1 foi identificado em *L. vannamei* participando na captação de dsRNA (LABREUCHE *et al.*, 2010).

#### ***IV) Outras moléculas associadas à defesa antiviral***

Além dos mecanismos acima detalhados, os invertebrados contam ainda com outras proteínas com aparente função antiviral tais como a proteína SVC (do inglês, *Single von Willebrand factor type C domain protein 1*). Até agora, as proteínas SVC têm sido unicamente encontradas em artrópodes (*D. melanogaster*, *Ixodes scapularis*, *Apis mellifera*, entre outros), sendo que elas apresentam um único domínio VWC (do inglês, *von Willebrand Factor type C*) (SHELDON *et al.*, 2007).

Em *Drosophila*, altos níveis de expressão do gene *DmVago*, que codifica para a proteína SVC, foram encontrados no órgão imune mais importante da mosca adulta, o corpo gorduroso, depois de serem desafiadas com o vírus C, conseguindo controlar a carga viral (DOSTERT *et al.*, 2005). Além disso, a proteína SVC em *D. melanogaster* é expressa em resposta a certos agentes estressores ambientais, tais como infecções bacterianas e o estado nutricional (ZINKE *et al.*, 2002; SHELDON *et al.*, 2007). Em *L. vannamei* foram identificadas cinco genes codificando para proteínas SVC (SVC1-5), as quais são expressas frente a desafios de WSSV/Poli (C-G) (CHEN *et al.*, 2011).

Embora os camarões possuam diferentes mecanismos de defesa frente aos patógenos, o surgimento de doenças virais e bacterianas nos cultivos tem se tornado um grande obstáculo ao sucesso da carcinicultura no Brasil e no mundo. No momento, a profilaxia e o controle de doenças nos cultivos estão basicamente restritos às boas práticas de manejo, redução nas condições de estresse e na busca de compostos que aumentem a imunocompetência dos camarões. Para tal, é

fundamental o conhecimento prévio dos mecanismos de defesa imune destes crustáceos, assim como sobre a interação patógeno/hospedeiro e suas implicações na suscetibilidade destes animais às infecções.

Nesse sentido, fica evidente que estudos dessa natureza sejam voltados para a espécie de peneídeo mais cultivada no mundo, *L. vannamei*, embora os mesmos tenham sido focados principalmente nos animais juvenis e adultos. Exemplos dos poucos estudos abordando a expressão gênica de moléculas associadas ao sistema imune durante o desenvolvimento dos peneídeos são: (a) peneidinas, crustina, lisozima, ALF (MUÑOZ *et al.*, 2003; JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2007; TASSANAKAJON; SOMBOONWIWAT, 2011) (b) proPO (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2007; CHAROENSAPSRI *et al.*, 2011); (c) Dicer-1 (YAO *et al.*, 2010); (d) *PmPPAE2* (codifica a proteína ativadora da proPO) (CHAROENSAPSRI *et al.*, 2011); (e) transglutaminase e peroxinectina (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2007).

Existe assim, uma lacuna a ser preenchida no sentido de se compreender quando outras importantes moléculas relacionadas ao sistema imune iniciam sua expressão ao longo do desenvolvimento deste camarão. Tais conhecimentos podem ser revelados usando-se técnicas moleculares para avaliar a expressão gênica por análises quantitativas por PCR em tempo real (RT-qPCR). Outra técnica complementar é a análise semi-quantitativa por PCR convencional (RT-PCR) (BRELJAK *et al.*, 2005). Contudo, a técnica de RT-qPCR é mais acurada e confiável em comparação à PCR semi-quantitativa, uma vez que detecta e quantifica, em tempo real, as cópias gênicas a medida que ocorre a sua amplificação (PFAFFL *et al.*, 2004).

O presente estudo utilizou inicialmente a PCR convencional após transcrição reversa a fim de se identificar inicialmente em quais estágios do desenvolvimento de *L. vannamei* (Ovos fertilizados, 0-4h e 7-11h pós-desova; Náuplio I e V; Protozoa I e III; Misis I e III; Pós-larva PL2, PL9 e PL17) estavam sendo expressos 17 genes associados ao sistema imune. Em seguida, análises de RT-qPCR foram realizadas a fim de quantificar os níveis de expressão dos genes de diferentes categorias funcionais: *defesa antiviral* (*LvDcr1*, *LvDcr2*, *Lv-Ago 1*, *Lv-Ago 2*, *LvSVC1* e *Lv-Sid 1*), *PRP/opsonina* (*LvDscam*), *sistema proPO* (*LvproPO-1*), *sistema antioxidante* (*Lv-PRX*), *PAMs* (*LvSty-II*, *Litvan PEN2* e *Litvan PEN3*),  *sinalização intracelular* (fatores de transcrição *LvDorsal* e *LvRelish*), *apoptose* (*LvIAP*), *coagulação* (*LvClot*) e *homeostasia* (*LvHHAP*), contribuindo assim para um maior conhecimento sobre a ontogenia do sistema imune de *L. vannamei*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL:

Avaliar a expressão de genes associados ao sistema imune do camarão *Litopenaeus vannamei* ao longo do seu desenvolvimento.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 2.2.1. Avaliar a presença da expressão de dezessete genes associados ao sistema imune de *L. vannamei* em diferentes subestágios do seu desenvolvimento (Ovos fertilizados, 0-4h e 7-11h pós-desova; Náuplios I e V; Protozoas I e III; Misis I, II e III, Pós-larvas PL2, PL4, PL9, PL11 e PL17), através de análises qualitativas por RT-PCR convencional;
- 2.2.2. Padronizar a técnica de PCR quantitativa em tempo real após transcrição reversa (RT-qPCR) para uso em análises de expressão gênica ao longo do desenvolvimento de *L. vannamei*;
- 2.2.3. Avaliar a expressão de seis genes associados à defesa antiviral (*Lv-Sid-1*, *LvDcr1*, *LvDcr1*, *Lv-Ago 1*, *Lv-Ago 2* e *LvSVC-1*) nos subestágios de desenvolvimento (Ovos fertilizados, 0-4h e 7-11h pós-desova; Náuplios I e V; Protozoas I e III; Misis I e III; Pós-larvas PL2, PL9 e PL17);
- 2.2.4. Avaliar a expressão de quatro genes associados à defesa antimicrobiana (*LvproPO-1*, *Litvan PEN2*, *Litvan PEN3* e *LvSty-II*) nos subestágios mencionados no item 2.2.3;
- 2.2.5. Avaliar a expressão de outros genes associados ao sistema imune (*Lv-PRX*, *LvDscam*, *LvDorsal*, *LvRelish*, *LvIAP*, *LvHHAP* e *LvClot*) nos subestágios mencionados no item 2.2.3.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), em diferentes estágios e subestágios do desenvolvimento, provenientes do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM, Depto AQI, UFSC). Os ovos, estágios larvais e pós-larvais foram coletados e processados *in loco* (LCM), enquanto os juvenis foram transportados ao Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA, BEG, UFSC).

##### 3.1.1. Ovos, larvas e Pós-larvas de *L. vannamei*

Neste estudo foram utilizados ovos fertilizados (**0-4h** e **7-11h**, pós-desova), além de animais nos seguintes estágios do desenvolvimento: Náuplios (**NI** e **NV**); Protozoas (**ZI** e **ZIII**); Misis (**MI** a **MIII**) e Pós-larvas (**PL2**, **PL4**, **PL9**, **PL11** e **PL17**) (Fig. 5). Para tal, 23 fêmeas (45±2 g) foram abladas, fecundadas e acondicionadas em tanques coletivos de desova (6.000 l; 28°C, salinidade 30‰) do Setor de Maturação do LCM.

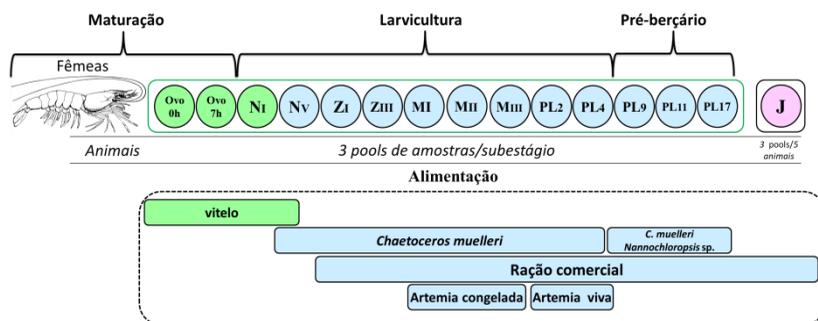
No setor de larvicultura, o subestágio **NV** foi acondicionado em tanques (20.000 l) e alimentados com diatomáceas da espécie *Chaetoceros muelleri* ( $5 \times 10^4$  células/ml) até o último estágio avaliado; as protozoas (**ZI** e **ZIII**) foram alimentadas com ração comercial (INVE Lansy spirulina) e as Misis (**MI** a **MIII**) com ração comercial (INVE Lansy ZM) suplementada com Náuplios de artêmia congelada (INVE artêmia congelada GLS). As Pós-larvas de 2 a 6 dias (**PL2** a **PL6**) foram alimentadas com Náuplios vivos de artêmia e ração comercial (INVE Lansy PL). As **PL6** foram posteriormente transferidas para o setor de pré-berçário, onde foram mantidas em tanques de 50.000 l até o subestágio **PL17**, sendo alimentadas simultaneamente com as microalgas *C. muelleri* e *Nannochloropsis* sp. e ração comercial (INVE Epac XL).

Para a coleta dos ovos, larvas (Náuplios, Protozoas e Misis) e Pós-larvas (**PL2** a **PL17**), quatro litros da água de cada tanque foram filtrados em recipientes contendo diferentes diâmetros de malhas de nylon: 50, 100 e 200 µm, respectivamente. Para as coletas foi considerado um índice maior ou igual a 80% de indivíduos em um determinado subestágio de desenvolvimento, sendo que cada subestágio foi identificado ao microscópio de luz (5×, 10× e 40×), segundo a

descrição de Fenucci (1988). Após coletados, os animais foram lavados duas vezes com PBS 1× (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,46 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4), homogeneizados e armazenados em RNAlater® (Invitrogen) (1:5; p/v) a -20°C, para a posterior extração do RNA.

### 3.1.2. *Juvenis de L. vannamei*

Machos e fêmeas (n=15; 12g ± 2 g) aparentemente saudáveis e em estágio de intermuda foram transferidos do setor de bioflocos do LCM para o LIAA, onde foram acondicionados em aquários de 40L (5 animais/aquário), contendo água marinha filtrada e aeração constante. Os animais foram alimentados uma vez ao dia com ração comercial e 30% da água dos aquários foi renovada a cada 48h.



**Figura 5.** Esquema ilustrativo das condições de manutenção dos animais em laboratório, alimento principal fornecido por subestágios e coletas dos diferentes estágios e subestágios de desenvolvimento. N: Náuplio; Z: Protozoa; M: Misis; PL: Pós-larva; J: Juvenis.

### 3.2. Coleta de hemolinfa

A hemolinfa dos camarões juvenis (n=3 pools de 5 animais) foi extraída da região ventral do abdômen, entre o último esternito cefalotorácico e o primeiro abdominal, através da inserção de uma agulha (13 × 0,4 mm) acoplada a uma seringa estéril de 1 ml. A hemolinfa foi coletada na presença da solução anticoagulante MAS (Solução de Alsever Modificada: 336 mM NaCl, 115 mM glicose, 27 mM citrato de sódio, 9 mM EDTA, pH 7,2). Os hemócitos foram recuperados por centrifugação (800 ×g, 10 min, 4°C), ressuspensos

em Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen) e conservados a -20°C para posterior extração do RNA.

### 3.3. Extração de RNA e síntese de cDNA

Amostras (15 mg) dos ovos e animais em diferentes estágios de desenvolvimento foram lavadas com PBS (2×, 1 min) e homogeneizadas em Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen). Os hemócitos de juvenis, conservados em Trizol<sup>®</sup> a -20°C foram descongelados e processados, assim como as demais amostras, segundo o protocolo preconizado pelo fabricante. Para isso, as amostras foram submetidas à extração com clorofórmio (5:1 Trizol:clorofórmio) e após centrifugação (12.000 ×g por 15 min, 4°C), o RNA obtido foi precipitado em isopropanol (2:1 Trizol:isopropanol) e hidratado com etanol 75%. O sedimento de RNA precipitado foi suspenso em água livre de DNA/RNA/DNases/RNases. Em seguida, as amostras foram tratadas com DNase I (Fermentas 1U/μl) e a mistura incubada por 15 min a 20°C. Após a inativação da DNase (15 min a 65°C), as amostras foram precipitadas com acetato de sódio (0,3 M, pH 5,2) e isopropanol. Finalmente, foi hidratado com etanol 75% e o sedimento de RNA precipitado foi suspenso em água livre de DNA/RNA/DNases/RNases. A concentração e a pureza das amostras de RNA extraídas foram avaliadas em espectrofotômetro (NanoVue plus<sup>™</sup>). Apenas as amostras de RNA com razão de absorvância (A<sub>260</sub>/A<sub>280 nm</sub>) superior a 1,8 foram utilizadas nos experimentos. A integridade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese em agarose (1%). Para a síntese de cDNA, 1 μg de RNA foi reversamente transcrito utilizando-se 200 U da enzima RevertAid<sup>®</sup> Reverse Transcriptase (Fermentas), na presença de 0,5 mM de cada dNTP, 0,5 μg de iniciador oligo (dT)<sub>12-18</sub> e 20 U de RiboLock<sup>™</sup> RNase Inhibitor (Fermentas). As amostras foram então incubadas a 42°C por 60 min e a enzima inativada por calor (65°C por 15 min).

### 3.4. Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de PCR convencional foram realizadas para avaliar em quais estágios de desenvolvimento os genes do presente estudo (Tabela 2) foram detectados. As reações foram realizadas na presença de 1 μl de cDNA (diluído 1:8); 0,4 μM de cada iniciador; 1 U da enzima *Taq* DNA Polymerase Recombinat (Fermentas); 0,2 mM de cada dNTP e 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, em um volume final de 10 μl. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido por

38 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, hibridização dos iniciadores a 58°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. Ao término dos ciclos, as amostras foram submetidas a uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram examinados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (0,01%; v/v).

**Tabela 2.** Pares de iniciadores de genes associados ao sistema imune em *Litopenaeus vannamei* utilizados nas análises de RT-PCR convencional e RT-qPCR

Siglas	Categoria funcional e nome do gene	Seqüência (5' - 3')	Amplicon (pb)	GenBank	Referência
<i>Genes de referência</i>					
LvEF-1 $\alpha$	Fator de elongação 1 - $\alpha$	Fw TGGCTGTGAACAAGATGGACA	103	GU136229	Yao <i>et al.</i> , 2010
		Rv TTGTAGCCACCTCTTTGACG			
LvRpS6	Proteína S6 da subunidade ribossomal 40S	Fw AGCAGATACCCTTGGTGAAG	193	FE080516	Gonçalves <i>et al.</i> , 2014
		Rv GATGCAACCACGGACTGAC			
Lv-actin	$\beta$ -actina	Fw CCACGAGACCACCTACAAC	142	AF300705	Wang <i>et al.</i> , 2007
		Rv AGCGAGGGCAGTGATTTC			
<i>Antioxidantes</i>					
Lv-PRX	Peroxiredoxina	Fw ACGGACAGTCAAGGAGATC	131	GQ995702	Gonçalves <i>et al.</i> , 2014
		Rv GAATTCCTCAACACGGTCAG			
<i>Peptídeos antimicrobianos</i>					
Litvan PEN2	Peneidina 2	Fw GTCTGCCTGGTCTTCTTGG	123	Y14925	Gonçalves <i>et al.</i> , 2014
		Rv GCAGCAATGGCGAGCACTG			
Litvan PEN3	Peneidina 3	Fw GTCGCTGGTCTTCTTGG	141	AF390144	Gonçalves <i>et al.</i> , 2014
		Rv GCGCTGTGAGAGAAGAAATTC			
LvSty-II	Stylicina 2	Fw CACAAGATGGCCACCGTG	140	CK591498	Gonçalves <i>et al.</i> , 2014
		Rv CACACAGGCTCCGCACATAA			
<i>Proteínas relacionadas com a resposta antiviral</i>					
Lv-Ago 1	Argonauta 1	Fw TGCGTCATTTGCCATCCAT	65	HM234689	Labreuche <i>et al.</i> , 2010
		Rv GCCATCTGGAGCGGGAGAAG			
Lv-Ago 2	Argonauta 2	Fw GATGGCATGAAGTCTGCAGTTG	62	HM234690	Labreuche <i>et al.</i> , 2010
		Rv TGCGCACACCATCACTAAG			
LvDcr1	Dicer-1	Fw CCGGAGATAGAACGGTTCAGTG	176	EU676241	Yao <i>et al.</i> , 2010
		Rv CGATAATCTCCCAACACCTG			
LvDcr2	Dicer-2	Fw AGGAAATGCAATGTCTGGTT	78	HQ541163	Chen <i>et al.</i> , 2011
		Rv ACGAGCCCTCCCCCTAGATT			
Lv-Sid 1	Proteína transmembrana transportadora de dsRNA	Fw GAAGCGATTGGCAGTCTGAAC	63	HM234688	Labreuche <i>et al.</i> , 2010
		Rv TGAAGCCTATCTCTGCACTTG			
LvSVC1	Proteína com domínio do fator von Willebrand tipo C	Fw TGCCAACCTAGTGTGAGCTTCA	81	HQ541158	Chen <i>et al.</i> , 2011
		Rv CCATCAGGGCACACGTATTTG			
<i>Proteína de Reconhecimento Padrão</i>					
LvDscam	Molécula de adesão celular da Síndrome de Down	Fw AGGTGGACAATCCGTGGTG	160	GQ154653	Gonçalves <i>et al.</i> , 2014
		Rv GGAGTGTATGTGTGACTGTG			
<i>Sistema Pró-fenoloxidase</i>					
LvproPO-1	pró-fenoloxidase 1	Fw CGGTGACAAGAATTCCTCTTC	122	EU284136	Wang <i>et al.</i> , 2007
		Rv GCAGGTCCGGTAGTAAG			
<i>Moléculas de sinalização intracelular</i>					
LvDorsal	Fator de transcrição Rel/NF- $\kappa$ B (Dorsal/Rel1)	Fw TCACTGTTGACCCACCTTAC	164	FJ998202	Gonçalves <i>et al.</i> , 2014
		Rv GAGGGCATCTTCAACATCAC			
LvRelish	Fator de transcrição Rel/NF- $\kappa$ B (Relish/Rel2)	Fw GAGGAGGCTTGTGCTATG	131	EF432734	Gonçalves <i>et al.</i> , 2014
		Rv CAGGTACAGGCTTGGTTAGG			
<i>Apoptose</i>					
LvLAP	Inibidor de apoptose	Fw TGGAACTGCAAGGCACATGG	181	GQ293142	Gonçalves <i>et al.</i> , 2014
		Rv CTCTGAGTGACACGTTCTG			
<i>Homeostase e coagulação</i>					
LvClot	Proteína de coagulação	Fw ACCAAGGTGCTTCATTAC	172	DQ984182	Gonçalves <i>et al.</i> , 2014
		Rv TGTCACCTTCCAGGGTGTG			
LvHHAP	Proteína associada à homeostase de hemócitos	Fw CAAGCAGGTC AAGCAGAG	108	FE124306	Gonçalves <i>et al.</i> , 2014
		Rv CTGGAACCAATAAGAAGCC			

pb= pares de bases nucleotídicas

### 3.5. Expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Para as análises de expressão gênica foram avaliados 17 genes associados ao sistema imune de camarões, os quais incluem PAMs, PRP/opsonina, moléculas antioxidantes, proteínas relacionadas com a defesa antiviral, moléculas de sinalização intracelular e proteínas associadas ao sistema pró-fenoloxidase, apoptose, homeostasia e coagulação (Tabela 2). Além destes, três genes de referência foram utilizados: o fator de alongação 1- $\alpha$  (*LvEF-1 $\alpha$* ), a proteína S6 da subunidade ribossomal 40S (*LvRpS6*) e a proteína do citoesqueleto,  $\beta$ -actina (*Lv-actin*).

As análises de qPCR foram realizadas em microplacas de 96 poços, utilizando-se o sistema StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). Inicialmente verificou-se a eficiência dos pares de iniciadores através da amplificação em qPCR do *pool* de cDNAs obtidos dos ovos, larvas e pós-larvas em diferentes subestágios do desenvolvimento (item 3.1). Para tal foram feitas diluições seriadas (1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128) deste *pool* em água livre de RNase. Somente foram utilizados iniciadores que apresentaram eficiência de amplificação entre 1,9 e 2,1.

As reações de qPCR tanto para a análise de expressão gênica assim como a eficiência dos iniciadores foram realizadas em um volume final de 10  $\mu$ l contendo 5  $\mu$ l de Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (Fermentas), 0,3  $\mu$ M de cada iniciador, 1  $\mu$ l de cada cDNA (diluído 1:8) e 3,4  $\mu$ l água livre de RNase. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, hibridização dos iniciadores e extensão a 58°C por 1 min. A especificidade das reações foi confirmada através da análise de curvas de dissociação (60-95°C; 0,3°C/s), realizada após as etapas de amplificação.

### 3.6. Análise de dados de qPCR

#### 3.6.1. Seleção do gene de referência

O programa *Normfinder* (<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>) foi utilizado para a escolha do melhor gene de referência entre os três genes candidatos selecionados previamente: *LvEF-1 $\alpha$* , *LvRpS6* e *Lv-*

actin. Para cada gene foi calculado um índice de estabilidade, que leva em consideração a variação dos valores de Cq (do inglês, *Cycle quantification*) entre as diferentes condições. Assim, quanto menor o valor do índice de estabilidade, menor a variação de expressão do gene de referência entre as condições experimentais. Conforme recomendações do MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) (BUSTIN *et al.*, 2009), foi considerada ainda a média aritmética dos três genes de referência selecionados.

### ***3.6.2. Cálculo de expressão relativa***

Para o cálculo de expressão relativa dos genes selecionados, nos diferentes estágios de desenvolvimento em camarões, foi utilizado o método descrito por Livak e Schmittgen (2001). Os valores de expressão relativa foram calculados com base nos valores de Cq dos genes de interesse em relação aos valores de Cq dos genes de referência. Assim, os níveis de expressão gênica foram analisados nos diferentes estágios e subestágios de desenvolvimento em comparação aos animais juvenis (grupo calibrador), que expressam constitutivamente todos os genes testados. O limite de quantificação foi determinado através de uma curva de linearidade dos iniciadores, utilizando diluições seriadas (1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1.024) de cDNA de amostras que apresentaram valores de Cq de 28. Valores de Cq acima do limite de quantificação não foram considerados.

### ***3.6.3. Agrupamentos hierárquicos de expressão gênica***

Agrupamentos hierárquicos (*Hierarchical clustering*) dos níveis de expressão gênica foram realizados a partir dos valores de  $2^{-(\Delta Cq)}$  ou  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$  com o software Multiple Array Viewer 4.81. Os Agrupamentos hierárquicos foram utilizados para relacionar as condições experimentais (subestágios do desenvolvimento) em função de seus níveis de expressão dos genes. Os critérios utilizados no agrupamento foram: ligação média, correlação de Pearson e distância métrica padrão.

## **3.7. Análises estatísticas**

Significâncias estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os subestágios de desenvolvimento foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey.