

Gabriel Machado Matos

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA UBIQUITINA DE
Litopenaeus vannamei E AVALIAÇÃO DA SUA TRANSCRIÇÃO
FRENTE À INFECÇÃO PELO VÍRUS DA SÍNDROME DA
MANCHA BRANCA (WSSV).**

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido ao Centro de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas.

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

Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme
Razzera

Florianópolis

2015

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

Matos, Gabriel Machado

Expressão heteróloga da ubiquitina de *Litopenaeus vannamei* e avaliação da sua transcrição frente à infecção pelo Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) / Gabriel Machado Matos ; orientadora, Maria Risoleta Freire Marques ; coorientadora, Guilherme Razzera. - Florianópolis, SC, 2015.
72 p.

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

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Vírus da Síndrome da Mancha Branca. 3. *Litopenaeus vannamei*. 4. Ubiquitina. I. Marques, Maria Risoleta Freire. II. Razzera, Guilherme. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Gabriel Machado Matos

EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA UBIQUITINA DE *Litopenaeus vannamei* E AVALIAÇÃO DA SUA TRANSCRIÇÃO FRENTE À INFECÇÃO PELO VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV).

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Centro de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 16 de Julho de 2015

Prof^a. Dr^a. Maria Risoleta Freire Marques
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

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

Prof. Dr. Guilherme Razzera
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

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

M.Sc. Jacó Mattos
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Risoleta Freire Marques pela confiança e orientação ao longo desses anos de iniciação científica no LABCAI.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Guilherme Razzera, pela orientação e ensinamentos profissionais.

À banca avaliadora, Dra. Juliana Moser, M.Sc. Jacó Mattos e Prof. Dr. Rafael Rosa por se disponibilizarem a avaliar o meu trabalho.

Aos integrantes do LABCAI por todo o aprendizado na minha iniciação científica. Em especial à Claudia Hollatz, Daína Lima, Gabrielle Muller, Laura Freitas Marília Siebert, Maya Ribeiro, Miriam Gualdezi, Rafaela Pino Gomes e Talita Miguelão, pela amizade construída ao longo desses anos.

À Dra. Isabel Muller e ao Dr. Pedro Valentim Neto, vocês foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.

À Ana Paula Medeiros, Cecília Valente, Karla Ortiz e Luiz Villas Boas pela amizade e apoio nesses últimos meses.

Aos meus amigos de graduação Bárbara Martins, Claudini Pieri, Débora Pereira, Fabiola Soares, Franciele Dutra, Gabriela Almeida, Guilherme Medeiros, Maria Flávia Xavier, Leonardo Fischer, Mariana Becker, Roberta Ribeiro, Thaís Albertti e Tomás Pessatti, sem vocês essa jornada não teria sido tão especial.

À Chirle Ferreira, Demétrio Gomes e Emily dos Santos pelo companheirismo e aprendizado no projeto CCB Recicla.

À todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a minha formação como biólogo.

E principalmente à minha família, pelo amor incondicional e pelo apoio em todas as minhas escolhas.

RESUMO

A Síndrome da Mancha Branca, é uma das doenças de maior relevância em camarões peneídeos devido ao grande impacto causado na produtividade dos cultivos. Estudos acerca da interação patógeno-hospedeiro são importantes para elucidar os mecanismos envolvidos na infecção pelo vírus. O objetivo desse estudo foi avaliar o envolvimento da ubiquitina no processo de infecção pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). O nível de transcritos do gene que codifica a ubiquitina foi analisado por *q*PCR em brânquias de camarões *L. vannamei* infectados experimentalmente por 48h. Também foi realizada a expressão heteróloga da ubiquitina de *L. vannamei* e a análise da sua estrutura 3D. Por fim, utilizando um anticorpo policlonal sintetizado a partir da ubiquitina recombinante purificada, foram realizados ensaios de titulação e avaliação da concentração mínima de antígeno reconhecida pelo anticorpo. Os camarões infectados apresentaram um aumento de oito vezes no nível de transcritos do gene da ubiquitina em relação ao grupo controle (camarões não infectados). A ubiquitina de *L. vannamei* foi clonada com sucesso em vetor de expressão e foi expressa de forma solúvel. A ubiquitina recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade por íons metálicos e uma fração com grau de pureza superior a 95% foi utilizada para síntese de anticorpo policlonal anti-ubiquitina. As diferentes diluições de anticorpo testadas apresentaram uma eficiência similar no reconhecimento do antígeno, enquanto que, em concentrações de antígeno abaixo de 1,8 µg, a detecção ficou comprometida. A ubiquitina de *L. vannamei* apresenta uma porção C-terminal característica e exclusiva, formada por três repetições de prolina-arginina, e seu modelo 3D construído apontou diferenças na estrutura secundária da molécula, assim como um aumento de cargas positivas na porção C-terminal, sugerindo uma possível atividade antimicrobiana. Em conclusão, os resultados desse estudo corroboram com a hipótese de envolvimento da ubiquitina no processo de infecção pelo WSSV e futuros testes de imunodeteção contribuiriam para determinar o perfil de expressão dessa proteína ao longo da infecção. Além disso, a diferença estrutural na ubiquitina de *L. vannamei* aqui apontada torna essa proteína um interessante alvo de estudos, visando a sua completa caracterização estrutural e funcional.

Palavras-chave: WSSV; *Litopenaeus vannamei*; ubiquitina; *q*PCR; expressão heteróloga; imunodeteção.

ABSTRACT

White Spot Syndrome is a relevant disease of penaeid shrimp due to its huge impact on shrimp farming production. Studies of host-pathogen interaction are important to elucidate the mechanisms involved in virus infection. This report aims to contribute to these studies analyzing the role of ubiquitin in White Spot Syndrome Virus (WSSV) infection. The ubiquitin transcript levels were analyzed by qPCR in gills of *L. vannamei* experimentally infected for 48h. The heterologous expression of *L. vannamei* ubiquitin and its 3D structure analysis were performed as well. A polyclonal antibody was synthesized from the purified recombinant ubiquitin and a titration test followed by a minimum antigen concentration test was performed. Infected shrimp showed an 8 fold increase in the transcript levels of the ubiquitin gene in comparison to the control group (non-infected shrimp). *L. vannamei* ubiquitin was successfully cloned into an expression vector and it was expressed in soluble form. The recombinant ubiquitin was purified by affinity chromatography and a fraction with high purity (>95%) was used for anti-ubiquitin polyclonal antibody synthesis. Different antibody titers showed a similar efficiency in antigen recognition, while in antigen concentrations below 1.8 µg detection was compromised. The *L. vannamei* ubiquitin has a unique C-terminal portion formed by three repeats of proline-arginine and its 3D model presented differences in its secondary structure, as well as an increase of positive charges in the C-terminal portion, indicating possible antimicrobial activity. In conclusion, the results of this study confirm the involvement of ubiquitin in WSSV infection and future immunodetection tests would help to determine the expression profile of this protein during the infection. Moreover, given the structural difference in *L. vannamei* ubiquitin, this protein is an interesting target for further studies aiming its complete structural and functional characterization.

Keywords: WSSV; *Litopenaeus vannamei*; ubiquitin; qPCR; heterologous expression; immunodetection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia do WSSV.....	22
Figura 2. Sintomas observados em camarões <i>Penaeus monodon</i> infectados com o WSSV.....	24
Figura 3. Esquema geral de reconhecimento de PAMPs por PRRs e ativação da resposta inata humoral e celular.....	26
Figura 4. Esquema detalhado das moléculas envolvidas no processo de apoptose em células infectadas com WSSV.....	29
Figura 5. Esquema de ubiquitinação da proteína-alvo.....	31
Figura 6. Diferentes cadeias poliubiquitinadas e suas funções biológicas descritas.....	32
Figura 7. Via de degradação ubiquitina proteassomo 26S.....	33
Figura 8. Expressão relativa dos genes analisados.....	43
Figura 9. Perfis de amplificação e curvas de dissociação das reações de <i>q</i> PCR.....	44
Figura 10. Ligação do gene <i>lvUbq</i> no vetor de expressão pET-14b.....	45
Figura 11. Alinhamento da sequência do vetor pET14b- <i>lvUbq</i> com a sequência do gene <i>lvUbq</i> pela ferramenta Clustal W2.....	45
Figura 12. Fragmento da tradução da sequência de nucleotídeos do vetor pET-14b- <i>lvUbq</i>	46
Figura 13. Expressão e purificação da <i>lvUbq</i> recombinante.....	46
Figura 14. Alinhamento e representação da estrutura secundária da ubiquitina de <i>L. vannamei</i> e de <i>H. sapiens</i>	48
Figura 15. Ubiquitinas modeladas com destaque para porção C-terminal.....	49
Figura 16. Modelos gerados demonstrando as cargas na superfície das ubiquitinas.....	50
Figura 17. DotBlot com 5 diluições diferentes de anticorpo primário.....	51
Figura 18. DotBlot de diluições seriadas do antígeno.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de iniciadores e as respectivas temperaturas de anelamento utilizados nesse trabalho.....	39
Tabela 2. Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos da ubiquitina de <i>L. vannamei</i> obtida a partir da biblioteca de cDNA realizada por Müller (2009).....	39
Tabela 3. Posição das estruturas secundárias nas sequências de aminoácidos da ubiquitina de <i>L. vannamei</i> e <i>H. sapiens</i>	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ALFs: Fatores anti-lipopolisacarídeos

AMPs: Peptídeos antimicrobianos

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA: Albumina bovina sérica

cDNA: DNA complementar

dsRNA: RNA de fita dupla

FAO: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

kbp: kilo Pares de base

kDa: kilo Daltons

lvUbq: Ubiquitina de *L. vannamei*

mRNA: RNA mensageiro

PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos

PDB: *Protein Data Bank*

pET14b-lvUbq: Vetor de expressão pET-14b ligado à ubiquitina de *L. vannamei*

proPO: Sistema pró-fenoloxidase

PRRs: Receptores para padrões específicos

qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa

RISC: Complexo associado ao RNA

RNAi: RNA de interferência

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SSH: Hibridização Subtrativa Supressiva

Ta: Temperatura de anelamento

TSL: Fator supressor de tumor

TTBS: Tampão Tris Base com Tween

Ubq: Ubiquitina

WSSV: Vírus da Síndrome da Mancha Branca

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 CULTIVO DE CAMARÕES.....	19
1.2 O VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA.....	21
1.3 SISTEMA IMUNE E INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO EM CAMARÕES.....	25
1.4 UBIQUITINA.....	30
2 OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 AMOSTRAS UTILIZADAS.....	37
3.2 EXTRAÇÃO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA.....	37
3.3 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE TRANSCRITOS DO GENE DA UBIQUITINA.....	38
3.4 SÍNTESE DO GENE DA UBIQUITINA.....	39
3.5 CLONAGEM DA lvUbq EM VETOR DE EXPRESSÃO.....	39
3.6 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA lvUbq.....	40
3.7 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA PRIMÁRIA E MODELAGEM 3D DA lvUbq.....	41
3.8 PRODUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL, PADRONIZAÇÃO E TESTES INICIAIS DE IMUNODETECÇÃO.....	41
4. RESULTADOS	43
4.1 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE TRANSCRITO DO GENE DA UBIQUITINA EM BRÂNQUIAS DE <i>L. vannamei</i>	43
4.2 CLONAGEM DO GENE DA lvUbq EM VETOR DE EXPRESSÃO.....	44
4.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA lvUbq.....	46
4.4 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA PRIMÁRIA E MODELAGEM 3D DA lvUbq.....	47
4.5 PADRONIZAÇÃO E TESTES INICIAS DE IMUNODETECÇÃO.....	51
5. DISCUSSÃO	53
5.1 A INFECÇÃO PELO WSSV INDUZ A EXPRESSÃO DA UBIQUITINA EM CAMARÕES.....	53
5.2 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA UBIQUITINA DE <i>L. vannamei</i>	57
6. CONCLUSÕES	61
7. REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 CULTIVO DE CAMARÕES.

O consumo de camarões e outros crustáceos, como lagostas, caranguejos e siris, tem aumentado significativamente nas últimas décadas (Bondad-Reantaso, 2012) e a sua captura excessiva para suprir esse consumo é uma ameaça à manutenção dos estoques naturais. Além de ser uma ameaça, a quantidade de pescado capturado não é capaz de suprir a demanda do consumo sozinha. Dessa forma, o cultivo desses animais representa uma importante alternativa para a produção rápida e em alta escala de espécies para alimentação humana (Camargo; Pouey, 2005).

O cultivo de camarões tem se demonstrado de grande relevância socioeconômica nas últimas décadas, devido sua acelerada expansão em países do sudeste asiático e das Américas a partir da década de 70 (Bondad-Reantaso, 2012). As primeiras aplicações da carcinicultura moderna ocorreram no Japão na década de 30, através de trabalhos com larvicultura de *Marsupenaeus japonicus*, mas somente a partir da década de 70 que essa prática foi aplicada em grande escala (Andreatta, Beltrame, 2004).

Segundo dados da FAO (2013), o sudeste asiático destaca-se como maior produtor de camarões cultivados, sendo responsável por mais de 75% da produção mundial nos últimos anos. Apesar dessa grande concentração de produção no continente asiático, regiões produtoras nas Américas também apresentam um papel significativo, incluindo a participação do Brasil como um dos 10 maiores produtores mundiais. Atualmente, nos cultivos de camarões marinhos destaca-se a espécie de camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) como a mais cultivada.

O camarão *L. vannamei* (Família Penaeidae; Ordem Decapoda; Subfilo Crustacea), popularmente conhecido como camarão branco do Pacífico, ou camarão de patas brancas, é natural da costa oeste da América Latina, e apresenta uma distribuição desde o norte do Peru ao sul do México. A espécie foi introduzida na Ásia e no restante da América no final da década de 70 para implantação em cultivos. A preferência pelo cultivo dessa espécie está associada a uma gama de fatores como: a disponibilidade de camarões livres de patógenos específicos (*Specific Pathogen Free*, SPF); a alta taxa de crescimento

dos indivíduos; a sua tolerância à estocagem em grandes densidades; uma dieta com baixa necessidade de proteínas; e a grande sobrevivência na larvicultura (Briggs *et al.*, 2004).

Além do sudeste asiático, países como Equador, Brasil e México são importantes produtores no cenário internacional (FAO). No Brasil, as primeiras fazendas comerciais surgiram no nordeste com o cultivo de *M. japonicus*, porém essa espécie não se adaptou às condições ambientais da região e o cultivo não apresentou viabilidade técnica. Novas tentativas de cultivo foram realizadas com as espécies nativas do Brasil, *Farfantepenaeus subtilis*, *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus schmitti*. Entretanto, esses novos cultivos apresentaram baixa produtividade e rentabilidade, causando o fechamento de muitas fazendas de cultivo (Costa, 2010). Na década de 90, com o desenvolvimento das técnicas de larvicultura e a implantação da espécie *L. vannamei* para o cultivo, houve um grande aumento da produção brasileira. Passando de uma média de 4 mil toneladas produzidas em 1997 para um pico de 90.190 toneladas em 2004 (Rocha; Rocha, 2009).

Em Santa Catarina, a introdução da espécie *L. vannamei* se deu em 1998, permitindo um grande aumento da produção local, devido aos excelentes resultados técnico-econômicos obtidos. O sucesso de implantação dessa espécie no cultivo do estado permitiu o crescimento da carcinicultura local e o surgimento de novas fazendas, passando de uma produção de 50 toneladas em 1998 para uma produção de 4.166 toneladas no ano de 2004 (Costa, 2010). Em 2004 foi detectado pela primeira vez, no Brasil, o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), em fazendas do estado de Santa Catarina. Essa síndrome, entre outros fatores socioeconômicos, contribuiu para a acentuada queda na produção local de camarão, causando grande prejuízo econômico e fechamento de várias fazendas de cultivo do estado (Seiffert *et al.*, 2005).

Desde o começo dos cultivos, as doenças de camarões foram consideradas uma grande ameaça para a produtividade, podendo gerar um grande prejuízo econômico (Lightner; Redman 1998). Essas enfermidades podem ser causadas por diversos agentes, como vírus, bactérias, fungos e protozoários. Dentre esses agentes infecciosos, destacam-se os vírus como principais responsáveis pela perda de produtividade nos cultivos de camarão (Lightner; Redman 1998; Lightner *et al.*, 2012).

1.2 O VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA.

A Síndrome da Mancha Branca é considerada uma das enfermidades de camarão de maior relevância. É uma doença de origem viral, causada pelo vírus de mesmo nome (*White Spot Syndrome Virus*, WSSV). O WSSV infecta várias espécies de crustáceos, causando, em poucos dias, altas taxas de mortalidade em camarões peneídeos (Lightner; Redman 1998).

Os primeiros casos da doença foram observados em viveiros de *M. japonicus* na Ásia. A doença emergiu em agosto de 1992 na província de Fujian, China (Zhan *et al.*, 1998) e se espalhou rapidamente para outras fazendas de cultivo (Lo, 2003). A identificação e caracterização do agente causador dessa doença se deu em 1994, após as altas taxas de mortalidade observada em fazendas do Japão após a importação de *M. japonicus* juvenis da China. (Nakano *et al.*, 1994). Além do ocorrido no Japão, outros surtos foram observados ao longo do sudeste asiático nesse mesmo período, demonstrando a grande capacidade de dispersão e infecção desse vírus (Ecobedo-Bonilla *et al.*, 2008).

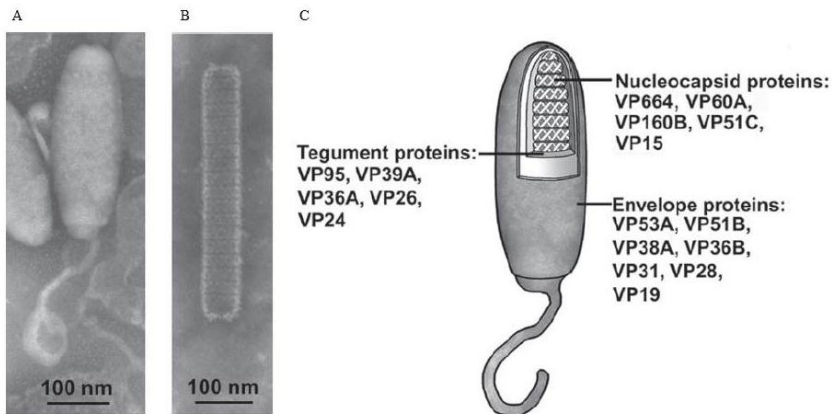
Devido ao crescimento acelerado da carcinicultura na década de 90, muitos patógenos de camarões foram disseminados sem a devida capacidade de detecção. Nesse período, patógenos como o WSSV, foram transmitidos de país a país através de estoques vivos de camarões infectados antes mesmo de que métodos de diagnóstico tivessem sido descritos (Lightner *et al.*, 2012).

O primeiro relato do WSSV no continente americano foi em 1995 em laboratórios de larvicultura nos Estados Unidos da América (Lightner; Redman, 1998) e a partir dessa data, novos casos foram identificados ao longo da América Central e do Sul. No Brasil, o primeiro caso de Síndrome da Mancha Branca foi detectado no ano de 2004 em fazendas de cultivo no estado de Santa Catarina (Seiffert *et al.*, 2005). Nesse período as taxas de mortalidade atingiram mais de 90%, representando um grande prejuízo econômico para a região, que apresentou dificuldades em retomar a produção (Seiffert *et al.*, 2005, Cavalli *et al.*, 2008). Além da ocorrência no sul do país, o WSSV também foi identificado em fazendas de cultivo do nordeste, no estado do Ceará em 2005 e no estado da Bahia em 2008 (Cavalli *et al.*, 2008; Trindade *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2010). A hipótese mais aceita para a entrada e dispersão do vírus em território nacional é a de importação e

movimentação de reprodutores e pós-larvas infectados (Seiffert *et al.*, 2005).

O WSSV é um vírus de fita dupla de DNA, pertencente ao gênero Whispovirus e à família Nimaviridae (Vlak *et al.*, 2002; ICTV, 2014). É formado por um nucleocapsídeo envelopado com uma membrana trilaminar e com um apêndice no formato de um flagelo em uma das extremidade (figura 1). Seu formato é ovóide a bacilariforme, com um tamanho de 250-380 nm de comprimento e de 80-120 nm de largura, variável nos diferentes isolados geográficos (Vlak *et al.*, 2002; Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008; Leu *et al.*, 2009).

Figura 1 - Morfologia do WSSV. **A:** Eletromicrografia de partículas virais do WSSV, com apêndice no formato de flagelo. **B:** Eletromicrografia com destaque para o nucleocapsídeo. **C:** Esquema das proteínas envolvidas na estrutura das partículas virais do WSSV.



Fonte: Leu *et al.*, 2009.

O genoma do WSSV foi descrito a partir da sequência de 3 isolados distintos originados da China, Tailândia e Taiwan (Yang *et al.*, 2001; Van Hulten *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002) e foi o primeiro descrito para vírus de animais marinhos. O genoma dos três isolados sequenciados apresenta em média 300 kbp e mais de 180 *Open Reading Frames* (ORFs) que codificam proteínas funcionais. Apesar de apresentar diferenças no tamanho do genoma, a variação genética entre as sequências é muito pequena, apresentando alta identidade entre os 3 isolados, sugerindo uma evolução a partir de um ancestral comum

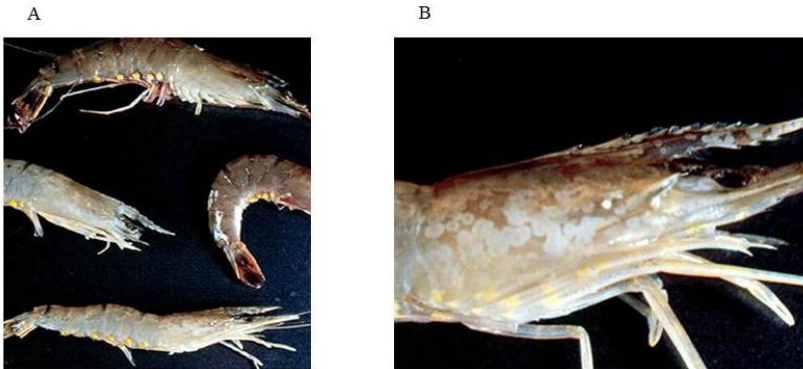
(Marks *et al.*, 2004). Cerca de 80% das ORFs sequenciadas codificam proteínas com baixa ou nenhuma homologia com proteínas de outros vírus, indicando a exclusividade dessa espécie e reforçando a distância evolutiva entre vírus terrestres e marinhos (Yang *et al.*, 2001). Atualmente, apesar de um aumento na quantidade de estudos relacionados às proteínas do WSSV, ainda há uma grande escassez de informações acerca de suas estruturas e funções (Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008).

As principais proteínas descritas são as Viral Proteins (VPs) de membrana VP28 e VP19, e as do nucleocapsídeo VP26, VP24 e VP15 (Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008). A VP28 é importante alvo de estudos, devido seu envolvimento na fixação e penetração nas células do hospedeiro, contudo o mecanismo de entrada na célula não foi completamente descrito (Yi *et al.*, 2004; Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008).

A infecção pelo vírus ocorre tanto pela imersão de hospedeiros em águas contaminadas com partículas virais, quanto pela ingestão de tecidos de animais contaminados com o vírus. Sendo essa última, a principal forma de infecção de animais de cultivo em condições naturais (Chou *et al.*, 1995; Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008). Após a infecção, o vírus faz uso do sistema circulatório do hospedeiro para atingir novos tecidos. O WSSV infecta principalmente tecidos de origem ecto e mesodérmica, incluindo o epitélio cuticular, tecidos conectivos e tecidos hematopoiéticos (Leu *et al.*, 2009). A replicação das partículas virais ocorre no núcleo das células infectadas e nos estágios avançados da infecção ocorre um rompimento da membrana nuclear para a liberação das novas partículas virais (Leu *et al.*, 2009).

A doença é caracterizada pela presença de inclusões brancas na cutícula do camarão (figura 2), porém, apesar desse sintoma ter originado o nome da doença, ele nem sempre é observado em animais infectados (Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008).

Figura 2 - Sintomas observados em camarões *Penaeus monodon* infectados com o WSSV. **A.** *P. monodon* juvenis infectados com WSSV apresentado o sintoma das manchas brancas na cutícula. **B.** Espécimen em destaque.



Fonte: Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, NACA.

O mecanismo envolvido na formação dessas manchas ainda não foi completamente descrito, mas provavelmente está associado a uma disfunção no tegumento do animal, resultando no acúmulo de cálcio na cutícula (Wang *et al.*, 1999). Outros sintomas associados são: uma coloração avermelhada dos apêndices; a redução no consumo de alimentos; letargia; cutícula menos resistente; aumento no tamanho do hepatopâncreas; e aumento no tempo de coagulação da hemolinfa (Chou *et al.*, 1995; Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008).

O WSSV é capaz de infectar inúmeras espécies de crustáceos, incluindo camarões, caranguejos, siris, lagostas e lagostins, porém a sua alta patogenicidade e virulência são observadas somente em infecções de camarões peneídeos (Leu *et al.*, 2009). Em relação às espécies nativas do Brasil, Marques *et al.*, (2011) apontaram a detecção desse vírus em caranguejos nativos (*Chasmagnathus granulata*) coletados em áreas adjacentes a cultivos de camarão em Santa Catarina. O vírus também foi detectado em tecidos de siris (*Callinectes* sp.) e camarões nativos (*F. paulensis*, *F. brasiliensis* e *L. schmitti*) (Costa, 2010; Costa *et al.*, 2012). Além da detecção em tecidos de crustáceos, partículas do WSSV já foram detectadas em microalgas, assim como em sedimentos e na água de fazendas de cultivo, o que dificulta o processo de erradicação do vírus em ambientes contaminados (Natividade; Nomura; Matsumura, 2008).

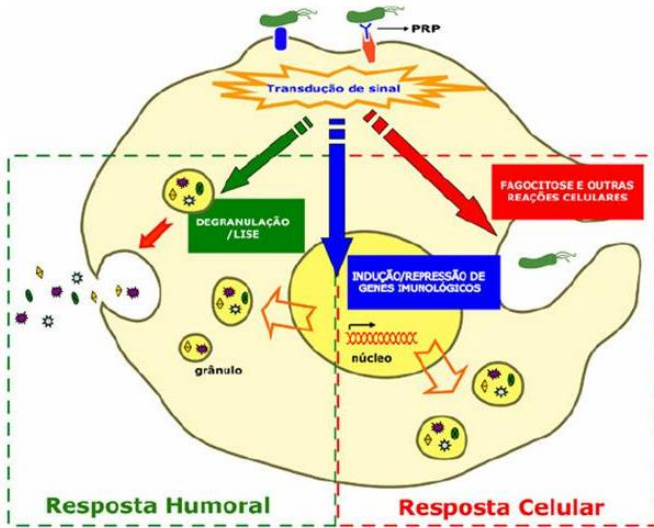
1.3 SISTEMA IMUNE E INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO EM CAMARÕES.

Os camarões em seu hábitat natural são constantemente expostos a microrganismos patogênicos e necessitam de mecanismos capazes de reconhecer e ativar respostas de defesa contra esses patógenos. Diferentemente dos vertebrados, cujo sistema imune compreende tanto respostas inatas quanto adaptativas (produção de anticorpos específicos e memória imunológica), os invertebrados apresentam apenas um sistema de defesa inato. Contudo, o sucesso dos invertebrados ao longo de sua história evolutiva, confirma a presença de um sistema imunológico eficiente contra a infecção de agentes patogênicos (Barraco; Perazzolo; Rosa, 2007).

A primeira linha de defesa se dá pela barreira físico-química proporcionada pelo epitélio de revestimento, assim como pelas enzimas e pH ácido do trato digestivo do animal (Barraco; Perazzolo; Rosa, 2007). Caso os patógenos consigam atravessar essa barreira, inicia-se uma série de respostas humorais (sistema pró-fenoxidase, peptídeos antimicrobianos) e celulares (fagocitose, RNA interferente, apoptose) atuando em conjunto a fim de combater a infecção (Xu *et al.*, 2014).

Em linhas gerais a resposta imune inata está associada ao reconhecimento de padrões moleculares associado a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) por receptores específicos (*pattern recognition receptors*, PRRs), que ativam, por meio de cascatas de transdução de sinal, a resposta de defesa inata humoral e celular (figura 3) (Barraco; Perazzolo; Rosa, 2007; Li; Xiang, 2013; Xu *et al.*, 2014).

Figura 3 - Esquema geral de reconhecimento de PAMPs por PRRs e ativação da resposta inata humoral e celular.



Fonte: Barraco; Perazzolo; Rosa, 2007.

A melanização, realizada a partir da atuação do sistema pró-fenoloxidase (proPO), tem uma função importante no sistema imunológico de invertebrados, sendo uma via rápida de resposta à infecção por patógenos. O reconhecimento de PAMPs pelos PRRs ativa uma cascata de serina proteases que clivam a proPO (inativa) em PO ativa, que junto de outras enzimas atuam na transformação de tirosina em dopamina e melanina. O sistema proPO atua de forma sinérgica, ativando não só a melanização como também a atração de hemócitos para fagocitose, formação de nódulos e produção de moléculas citotóxicas levando à cicatrização de feridas e proteção contra patógenos e parasitas (Amparyup; Charoensapsri; Tassanakajon, 2013; Li Xiang, 2013).

Uma outra forma de resposta humoral de grande importância é a produção de peptídeos antimicrobianos (*antimicrobial peptides*, AMPs). Os AMPs estão presentes em diversos táxons, desde bactéria a vertebrados e 15 famílias distintas desses peptídeos já foram descritas para crustáceos (Rosa; Barraco, 2010; Tassakanajon *et al.*, 2011). Esses peptídeos são chamados de “antibióticos naturais” devido sua alta eficiência contra microrganismos como bacterias gram negativas e

postivas, leveduras, fungos filamentosos e vírus envelopados (Bulet; Stocklin; Menin, 2004). Os AMPs de crustáceos são normalmente pequenos peptídeos catiônicos (menores que 10 kDa), produzidos pelos hemócitos, que são encontrados principalmente no plasma e mucosas (Rosa; Barraco, 2010). De maneira geral, seu mecanismo de ação está associado à desestabilização da membrana celular do patógeno e/ou formação de poros, devido às porções anfipáticas e catiônicas desses peptídeos (Salditt; Li; Spaar, 2006). Porém, estudos apontam que os AMPs podem ser translocados para o interior da célula do patógeno e atuarem impedindo vias metabólicas ou causando danos celulares, sugerindo assim, novos mecanismos de ação para esses peptídeos (Kamysz; Okroj; Lukasiak, 2003).

O envolvimento de algumas famílias de AMPs já foi apontado em casos de infecção de crustáceos pelo WSSV (Tassanakajon *et al.*, 2006). A principal família associada à resposta de defesa ao WSSV é a dos fatores anti-lipopolisacarídeos (*anti-lipopolysaccharide factors*, ALFs). Estudos apontaram que o silenciamento desses peptídeos, resulta no aumento da expressão de proteínas virais em *P. leniusculus* infectados (Liu *et al.*, 2006). Em contrapartida, a pré-incubação do WSSV com ALF recombinante de *P. monodon* reduz a eficiência de infecção desse vírus (Tharntada *et al.*, 2009). Esses resultados apontam a importância dos ALFs de crustáceos na defesa contra a infecção pelo WSSV, indicando um interessante alvo de estudos.

A fagocitose é uma resposta celular altamente conservada utilizada para englobar micropartículas como patógenos e restos celulares. É uma importante via de defesa da imunidade inata em organismos multicelulares e se dá inicialmente pelo reconhecimento de patógenos por receptores na superfície celular dos hemócitos. O reconhecimento pelos receptores ativa uma cascata de sinalização celular que ativa a reorganização do citoesqueleto e da membrana celular causando o envolvimento das partículas patogênicas e formação dos fagossomos. Em seguida se dá a fusão dos fagossomos com os lisossomos celulares, formando o chamado fagolisossomos, um ambiente hostil onde os patógenos são destruídos devido baixo pH e alta concentração de espécies reativas de oxigênio (Stuart; Ezekowitz, 2008; Xu *et al.*, 2014).

Inicialmente identificado em plantas como um mecanismo natural de defesa contra vírus, o RNA de interferência (RNAi) tem sido apontado como peça chave na resposta de defesa inata de artrópodes (Wang *et al.*, 2006). O RNAi é um mecanismo importante tanto na

regulação da expressão de genes da célula, quanto na defesa contra vírus. Segundo a revisão de Labreuche & Warr (2013) o mecanismo de ação do RNAi é dividido em três grandes etapas, inicialmente moléculas de RNA dupla fita (dsRNA) de origem viral, ou produzidas pela própria célula, são processadas pelas enzimas Dicer em pequenos fragmentos. Em seguida as duas fitas (senso e antisenso) desses fragmentos de RNA são separadas e uma delas é acoplada ao complexo de indução de silenciamento de RNA (RISC), que contém uma RNase H chamada de Argonauta. Por fim, o fragmento de RNA acoplado ao RISC serve de "isca" e quando fitas complementares de mRNAs de origem viral ou transcritos pela célula se ligam a esse complexo o RISC cliva o mRNA complementar, impedindo a sua expressão.

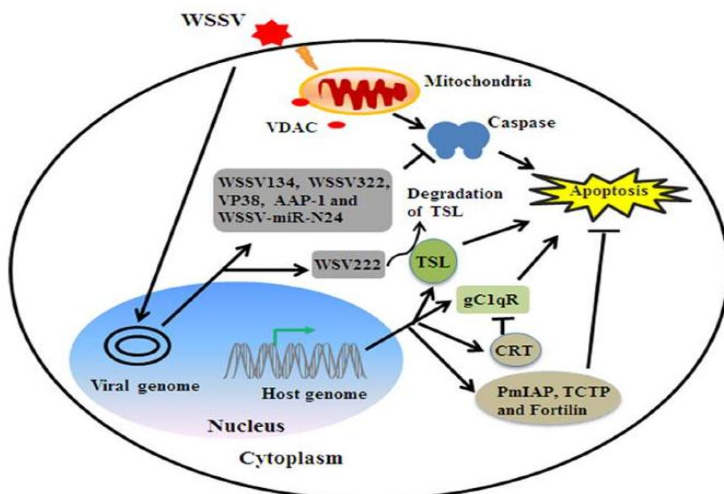
Essa técnica pode ser aplicada para auxiliar na defesa de patologias de animais de cultivo e estudos têm apontado com sucesso o silenciamento de genes do WSSV a partir da técnica de RNAi, diminuindo os efeitos da infecção (Zhu; Zhang, 2011). Dessa forma, a descrição de proteínas de camarões envolvidas no processo de RNAi, principalmente a Dicer e Argonauta, tem sido alvo de muitas pesquisas. Contudo, apesar do grande avanço nas últimas décadas, trata-se de um mecanismo de grande complexidade e muitas etapas ainda precisam ser descritas para camarões peneídeos (Labreuche; Warr, 2012).

A apoptose, ou morte celular programada, é um importante mecanismo de defesa celular em organismos pluricelulares, utilizado para remover células danificadas ou infectadas (Everret; McFadden, 1999). É regulada por uma complexa maquinaria molecular altamente conservada de nematódeos a mamíferos. Esses mecanismo pode ser ativado tanto por sinais endógenos da célula (dano ao DNA, estresse oxidativo, infecções virais), como por sinais exógenos (ativação dos receptores de morte, TNF- α -TNFR, exclusivo de mamíferos) (Danial; Korsmeyer, 2004). Os sinais endógenos, atuam sobre a mitocôndria liberando proteínas pro-apoptóticas armazenadas no espaço intermembrana. Uma das proteínas liberadas é o citocromo C, que quando exposto no citosol inicia uma série de cascatas enzimáticas que levam à ativação das Caspases (Saelens *et al.*, 2004). As caspases são consideradas as proteínas efetoras da apoptose, pois interagem com diversas outras proteínas causando as alterações bioquímicas e morfológicas observadas no processo apoptótico (Korsmeyer *et al.*, 2000; Bao; Shi, 2007). A apoptose é um importante mecanismo de defesa contra infecções virais e se ativada em estágios iniciais de infecção, as partículas virais são destruídas antes mesmo de sua

replicação, controlando, assim, a dispersão do vírus e impedindo a infecção de outras células (Leu *et al.*, 2012).

Em relação à Síndrome da Mancha Branca, estudos confirmaram que a infecção pelo WSSV induz a apoptose em crustáceos. Contudo, a quantidade de células em processo apoptótico varia de acordo com o progresso da infecção (Sahtout; Hassan; Shariff, 2001), com o tipo de tecido (Wongprasert *et al.*, 2003) e com a espécie do hospedeiro (Sahul Hameed *et al.*, 2006). Curiosamente, dados de eletromicroscopia apontam que as células em processo de apoptose não apresentavam partículas virais no seu interior, sugerindo então que o WSSV apresenta mecanismos de silenciar a apoptose nas células infectadas protegendo a replicação das partículas virais (Wongprasert *et al.*, 2003). Atualmente alguns mecanismos utilizados pelo WSSV para inibir a apoptose já foram identificados. Em linhas gerais, o vírus apresenta duas principais proteínas, AAP-1 e WSSV222, que atuam inibindo os sinais celulares iniciais da apoptose, além de atuar induzindo a expressão de proteínas anti-apoptose da própria célula hospedeira (Leu *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2014). Na figura 4, podemos observar um esquema detalhado das interações entre o WSSV e o mecanismo de apoptose em camarão.

Figura 4 - Esquema detalhado das moléculas envolvidas no processo de apoptose em células infectadas com WSSV, demonstrando pontos em que o vírus atua para inibir esse processo.



Fonte: Xu *et al.*, 2014.

Na última década houve um grande avanço no estudo dos mecanismos moleculares envolvidos nas interações patógeno-hospedeiro em camarões e outros invertebrados. O avanço em técnicas de sequenciamento de genomas, produção de bibliotecas de cDNA (Li; Xiang, 2013), análises proteômicas (Sangsuriya *et al.*, 2014), assim como utilização de ferramentas de bioinformática (Sun *et al.*, 2014), contribuíram significativamente para esse avanço. Contudo, dada a complexidade das interações moleculares e bioquímicas, muitas vias de defesa e interações entre moléculas ainda não foram completamente elucidadas. Assim, novos estudos são importantes para contribuir com o avanço dessa área de conhecimento.

O Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI) tem colaborado com estudos sobre moléculas envolvidas na resposta de camarões frente a infecção pelo WSSV (Muller, 2009; Valentim-Neto, 2010) assim como, sobre a influência de diferentes estresses ambientais na resposta de infecção (Moser, 2011). Dentre os resultados obtidos, a ubiquitina tem se mostrado um interessante alvo de estudos e será abordada mais detalhadamente no próximo tópico.

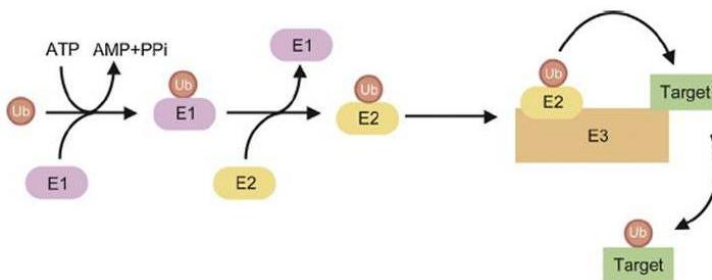
1.4 UBIQUITINA.

A ubiquitina (ubq) é uma proteína pequena, altamente conservada, que está presente nos diversos grupos taxonômicos de eucariotos. É composta normalmente por 76 resíduos de aminoácidos, com um peso molecular de aproximadamente 8,5 kDa e é essencialmente associada à via de degradação de proteínas por meio do complexo proteassomo 26S. Contudo, uma gama de outras funções estão associadas a essa proteína como: ativação de células do sistema imune (Scheid *et al.*, 1975); interação com histonas (Siegelman *et al.*, 1986); ativação e regulação da cascata de sinalização ativada por PRRs (Liu *et al.*, 2013); e atividade antimicrobiana (Seo *et al.*, 2013).

A maioria das proteínas são modificadas covalentemente após sua tradução e essas modificações são essenciais para atribuir e coordenar as suas funções frente a diferentes sinais captados pela célula. As modificações podem ser conferidas a partir do ligamento de pequenas moléculas (fosfatos, agrupamentos metil, carboidratos), como também de pequenos peptídeos como ubiquitinas e proteínas similares a ubiquitinas (*ubiquitin-like proteins*) (Liu *et al.*, 2013).

O processo de ligação da ubq em uma proteína alvo é chamado de ubiquitinação e se dá principalmente por meio de ligações covalentes, em um processo envolvendo três classes de enzimas denominadas: *ubiquitin activating enzyme* (E1), *ubiquitin conjugating enzyme* (E2) e *ubiquitin ligase* (E3). A primeira etapa é a de ativação e se dá por meio de uma ligação tio-éster da E1 com o resíduo de glicina (Gly76) da extremidade C-terminal da ubiquitina, em um processo dependente de ATP. A seguir, ocorre a substituição de E1 pela E2 na ligação com a ubiquitina ativada. E por fim, a E3 interage com a E2 facilitando a transferência da ubiquitina para a proteína-alvo, através de uma ligação isopeptídica, normalmente entre uma lisina da proteína-alvo com a extremidade C-terminal terminal da ubiquitina (figura 5) (Liu *et al.*, 2015).

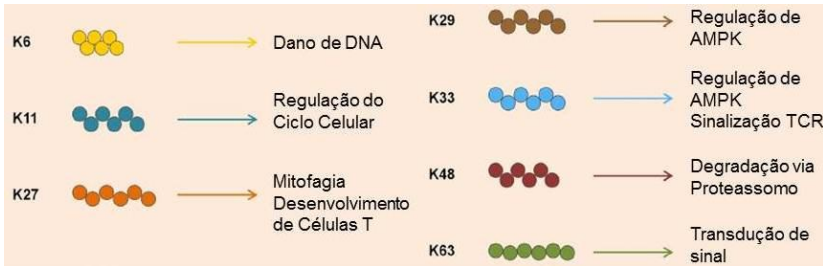
Figura 5 - Esquema de ubiquitinação da proteína-alvo. **Ub.** ubiquitina; **Target.** Proteína Alvo; **E1.** *ubiquitin activating enzyme*; **E2.** *ubiquitin conjugating enzyme*; **E3.** *ubiquitin ligase*.



Fonte: Liu *et al.*, 2015

Normalmente durante o processo de ubiquitinação, não apenas uma, mas várias ubiquitinas são associadas a proteína-alvo formando uma cadeia poliubiquitinada. Dado a presença de 7 resíduos de lisina na ubiquitina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 e K63), diferentes tipos de cadeias poliubiquitinadas podem ser formadas, e quando associadas às proteínas-alvo sinalizam para funções biológicas específicas (figura 6). Ainda, sabe-se muito pouco sobre as funções específicas sinalizadas por cada tipo de cadeia poliubiquitinada, as mais bem estudadas são as ligadas nos resíduos K48 e K63 (Davis; Gack, 2015).

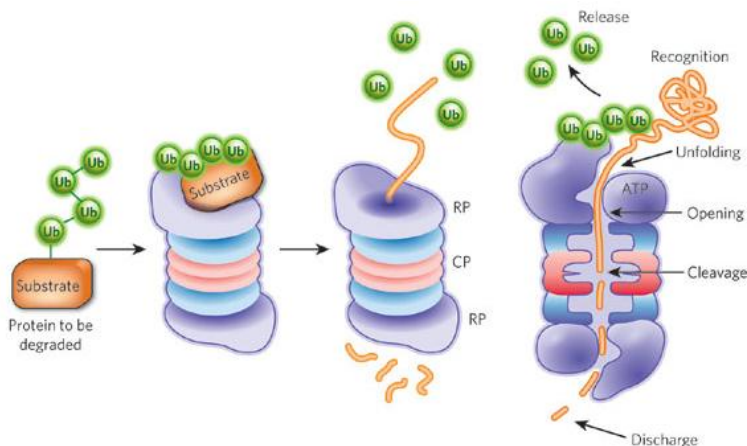
Figura 6 - Diferentes cadeias poliubiquitinadas e suas funções biológicas descritas.



Fonte: Adaptado de Davis; Gack, 2015.

Proteínas-alvo ligadas com cadeias no resíduo K48 são sinalizadas para a via de degradação de proteínas pelo complexo proteassomo 26S (Davis; Gack, 2015). A degradação de proteínas é um processo importante que evita o acúmulo de proteínas anormais ou desnecessárias na situação atual da célula, permitindo a reciclagem dos aminoácidos (Voges; Zwickl; Baumeister, 1999). Após a ubiquitinação, as proteínas alvo são direcionadas ao complexo proteico Proteassomo 26S. O Proteassomo é formado por um subcomplexo central no formato de barril, que apresenta atividade proteolítica e dois subcomplexos reguladores em cada lado do barril. A partícula central é formada por quatro anéis que apresentam três tipos de atividades proteolíticas na porção interna (*chymotrypsin-like*; *trypsin-like*; e *caspase-like activities*). Enquanto que a partícula reguladora, apresenta regiões com atividade de ATPase que atua desenovelando as proteínas antes de entrarem no barril catalítico, facilitando a sua proteólise. A partícula reguladora também atua reconhecendo e removendo as ubiquitinas das proteínas-alvo antes da sua degradação (Voges; Zwickl; Baumeister, 1999; Hochstrasser, 2009).

Figura 7 - Via de degradação ubiquitina proteassomo 26S. As proteínas ubiquitinadas são direcionadas ao complexo proteassomo 26S. Os subcomplexos reguladores (**RP**) atuam desenovelando a proteína-alvo e liberando as ubiquitinas (**Ub**). Enquanto que o subcomplexo central (**CP**) atua clivando a cadeia polipeptídica da proteína alvo



Fonte: Hochstrasser, 2009.

Em contraste proteínas ligadas com cadeias no resíduo K63 não são sinalizadas para a degradação, mas sim são importantes em vias de transdução de sinais. Como mencionado anteriormente, a resposta imune inata é ativada através da detecção de PAMPs por PRRs que ativam uma cascata de sinalização resultando na expressão de genes envolvidos na defesa. A ubiquitina e outras *ubiquitin-like proteins* tem sido identificadas como essenciais na regulação dessa cascata de sinalização, dado que algumas das proteínas envolvidas necessitam ser ubiquitinadas (cadeia K63) para se tornarem completamente ativas e transmitirem de maneira eficiente o sinal captado pelos receptores celulares (Liu *et al.*, 2013; Davis; Gack, 2015).

Alguns estudos vêm apontando o envolvimento da ubq em camarões frente a infecção do WSSV. Muller (2009) identificou o gene da ubiquitina em sua biblioteca de transcritos induzidos pela infecção do WSSV. Assim como validou a indução desse gene por *qPCR* em *L. vannamei* infectados naturalmente, provenientes de surtos da doença no estado de Santa Catarina. Valentim Neto (2010), comparou as proteínas induzidas pelo WSSV em *L. vannamei* infectados experimentalmente ao longo de vários períodos pós infecção e identificou a indução da

ubiquitina em alguns grupos. Vidya, Gireesh-Babu, Pani Prasad (2012), apontaram a indução da ubq tanto em nível gênico quanto protéico em *Penaeus monodon* frente a infecção pelo WSSV.

Uma das principais hipóteses aceitas é o envolvimento da ubq na degradação de proteínas efectoras da apoptose na célula, inibindo o processo apoptótico e permitindo a replicação viral (Leu *et al.*, 2012). Contudo, uma série de outras funções pode ser atribuídas a essa proteína e novos estudos são necessários a fim de elucidar os possíveis mecanismos moleculares envolvidos. Dentro desse contexto, o presente trabalho visa fornecer dados que corroborem a importância da ubiquitina no processo de infecção do WSSV, assim como, servir de base para futuros estudos estruturais e funcionais da ubq de *L. vannamei*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS.

Esse estudo teve como objetivo avaliar o nível de transcritos do gene da ubiquitina em camarões *L. vannamei* infectados pelo WSSV. Assim como, realizar a expressão heteróloga dessa proteína, visando sua caracterização estrutural preliminar e a produção de anticorpos específicos para a imunodeteção da ubiquitina de *L. vannamei*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Avaliar por *q*PCR o nível de transcritos do gene da ubiquitina, em brânquias de camarões *L. vannamei* infectados experimentalmente pelo WSSV;
- Clonar o gene da ubiquitina de *L. vannamei*, sintetizado a partir de uma sequência gênica obtida em trabalhos anteriores;
- Expressar e purificar o produto desse gene para futura análise funcional e estrutural da proteína;
- Modelagem *in silico* da ubiquitina de *L. vannamei*;
- Obter anticorpo policlonal anti-ubiquitina e caracterizá-lo com base em ensaios de titulação e concentração de antígeno, visando sua utilização em futuros experimentos de imunodeteção.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS UTILIZADAS.

As amostras de tecido de camarão utilizadas neste estudo pertencem à coleção do LABCAI e estavam armazenadas a -80°C . Para a análise dos níveis de transcritos, foram utilizadas brânquias de *L. vannamei* infectados experimentalmente por 48h com o WSSV e seu respectivo grupo controle (n=5 para cada grupo), amostras cedidas por Valentim Neto. O grupo escolhido foi o de 48h, pois representava um estágio intermediário da infecção.

A metodologia utilizada por Valentim Neto (2011) está descrita a seguir: camarões *L. vannamei*, livres de patógeno específico (SPF) com peso aproximado de 10 g foram mantidos em caixas de 50 L com condições controladas (aeração constante, oxigênio dissolvido 4,0 mg/mL, amônia (NH_3) 0,5-1,5 mg/L, pH 8,5, temperatura 23°C e salinidade de 25‰). No total foram utilizadas 6 caixas com 15 animais cada, 3 caixas representavam o grupo controle enquanto que 3 caixas representavam o grupo infectado. Os animais foram aclimatados por um período de três dias e após este período, foi realizada a infecção experimental nos animais do grupo infectado. A infecção foi realizada através de um inóculo preparado com tecidos de camarões infectados naturalmente em cultivos de Santa Catarina (carga viral de $5,5 \times 10^6$ cópias virais em 100 μL /camarão). Após infecção foram realizadas coletas em triplicatas dos tecidos nos intervalos de 6, 12, 24, 48 e 72 horas. Em cada intervalo foi verificada por qPCR a carga viral presente nos animais coletados. Todas as amostras foram diagnosticadas por *Nested* PCR para detecção do WSSV no grupo tratado e ausência no grupo controle, seguindo os padrões da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE).

3.2 EXTRAÇÃO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA.

O RNA total de brânquias foi extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen). Adicionou-se 1 ml de Trizol para cada 100 mg de tecido e incubou-se por uma hora à temperatura ambiente. Após a incubação, adicionou-se 200 μl de clorofórmio por mL de Trizol e agitou-se intensamente o material, realizando uma nova incubação à temperatura ambiente por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 14.000g por 30

minutos a 4°C e o sobrenadante resultante foi transferido para um novo tubo. Adicionou-se 500 µL de isopropanol por mL de Trizol e após incubação de 10 minutos, à temperatura ambiente, o material foi centrifugado a 10.000g por 40 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e os precipitados obtidos foram lavados com etanol 75% e centrifugados a 7.500g por 5 minutos à 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado e os precipitados foram secos à temperatura ambiente, ressuspensos em água estéril e armazenados à -80°C.

A partir do RNA total extraído foi realizada a transcrição reversa utilizando o kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA complementar (cDNA) sintetizado foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop 2000) e diluído em água para as concentrações desejadas. Para a curva padrão foi realizado um *pool* de todas as amostras, que foi quantificado e diluído nas seguintes concentrações (1000, 500, 100, 50, 10 e 5 ng).

3.3 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE TRANSCRITOS DO GENE DA UBIQUITINA.

A expressão relativa do gene da ubiquitina foi avaliada utilizando-se o RNA Ribossomal 18S como referência. Os iniciadores utilizados para amplificação foram desenhados para o trabalho de Müller (2009) (tabela 1). Para análise dos níveis de transcritos realizou-se reações de *qPCR* utilizando o kit QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen) com 0,3 µM de cada iniciador *forward* e *reverse* e 100 ng de cDNA. O programa de amplificação utilizado continha: um passo de iniciação de 15 min à 95°C para ativação da enzima, seguido de 40 ciclos de desnaturação por 15s à 94°C, anelamentos por 30s (temperaturas específicas para cada primer) e extensão por 30s à 72°C. As temperaturas de anelamento de cada iniciador estão indicadas na tabela 1. Curvas de concentrações conhecidas de cDNA foram utilizadas para a determinação da eficiência da reação e curvas de dissociação foram realizadas posteriormente às reações de amplificação para analisar o perfil dos produtos obtidos.

Tabela 1 - Sequência de iniciadores e as respectivas temperaturas de anelamento (Ta) utilizados nesse trabalho.

Gene	Sequência <i>Forward</i> (F) e <i>Reverse</i> (R)	Ta (°C)
Ubiquitina	F: 5' AAGGCCAAGATCCAGGATAAGGAG3' R: 5' AGTCAGACAGAGTGCACCATCTT3'	57
RNA Ribossomal 18S	F: 5' GGCCTCGCAATTGGAATGAGTACA3' R: 5' TACGAGCGTTTCAACCGCAAC3'	55

Para calcular a expressão relativa do gene utilizou-se do software REST (Qiagen) e os gráficos foram gerados no software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software).

3.4 SÍNTESE DO GENE DA UBIQUITINA.

O gene da ubiquitina de *L. vannamei* (lvUbq) foi sintetizado e subclonado em vetor plasmidial bacteriano (pIDT-Ubq, IDT Technologies) a partir da sequência de nucleotídeos obtida na biblioteca de cDNA realizada por Müller (2009) (tabela 2). Além da região codificante foram adicionados sítios de restrições para as enzimas *NdeI* e *BamHI*, sendo que o códon da metionina inicial é restaurado pela clivagem do sítio para *NdeI*.

Tabela 2 - Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos da ubiquitina de *L. vannamei* obtida a partir da biblioteca de cDNA realizada por Müller (2009).

Sequência de nucleotídeos	5' CAGATCTTTGTGAAAACGCTGACTGGCAAACATTACCCTGGAAGTG GAACCGAGTGACACCATTGAAAACGTGAAAGCGAAGATCCAAGACAAA GAGGGTATCCCGCCGATCAACAGCGCTTAATTTTCGCAGGCAAGCAAT TGGAAGATGGGCGCACACTGTCTGACTACAATATTCAGAAAGAGTCAAC CCTTCACCTGGTACCGCGCCCGCTCCCCGTTAA3'
Sequência de aminoácidos	MQIFVKLTGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQLIFAGKQLEDG RTLSDYNIQKESTLHLVPRPRPR

3.5 CLONAGEM DA lvUbq EM VETOR DE EXPRESSÃO.

O gene sintetizado foi clivado do plasmídeo fornecido através das enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* (Thermo Scientific). O produto da digestão foi visualizado em gel de agarose 2% corado com Gelred (UniScience) e o fragmento correspondente ao tamanho do gene foi

purificado pelo kit Quiaquick Gel Extraction (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. O fragmento purificado foi quantificado e ligado ao vetor de expressão pET-14b (Novagen) pela enzima T4 DNA ligase (Thermo Scientific), seguindo as especificações do fabricante.

O DNA plasmidial obtido foi sequenciado em sequenciador ABI 3130 Genetic Analyzer através de iniciadores para a região promotora T7 do vetor e as sequências obtidas foram analisadas pela ferramenta de tradução do ExPASy (SIB Bioinformatics Resource Portal, Artimo *et al.*, 2012) e pela ferramenta de alinhamento Clustal W2 (EMBL-EMBI, McWilliam *et al.*, 2013).

O produto de ligação (pET-14b-lvUbq) foi inserido em bactérias competentes *E. coli* BL21 (DE3) pLysS através de choque térmico. Para transformação 50 ng do vetor pET-14b-lvUbq foram incubados com 50 µl de célula competente por 30 min no gelo, seguidos de um banho à 42°C por 1 min e outro em gelo por 1 min. Então, foi adicionado 800 µL de meio LB Broth (Sigma-Aldrich) sem antibióticos e incubou-se por 1h 30 min à 37°C sob agitação, após o crescimento, plaqueou-se 200 µL em LB Sólido (Sigma-Aldrich) com Ampicilina (100µg/mL) e Cloramfenicol (34µg/mL) e a placa foi incubada *overnight* à 37°C.

3.6 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA lvUbq.

Colônias isoladas foram selecionadas e postas para crescer *overnight* à 37°C sob agitação em meio LB Broth, com os respectivos antibióticos. Para indução, uma fração da cultura crescida *overnight* foi adicionada em 250 mL de meio LB fresco (numa diluição de 1:100) com os respectivos antibióticos e incubada à 37°C, sob agitação, até atingir uma Densidade Ótica a 600 nm de absorbância (DO_{600}) entre 0,6 e 0,8. Após atingir essa DO_{600} adicionou-se IPTG 0,5 mM na cultura para indução da expressão da proteína recombinante por 3h à 37°C. Uma fração foi coletada em cada hora pós adição de IPTG para analisar o efeito da indução por SDS-PAGE.

Após as 3h de indução o restante de cultura foi centrifugada à 4°C por 30 min à 3.000g, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso em tampão de lise fosfato (20mM Fosfato; 150mM NaCl, pH 7,0) e sonicado 10x por 30s com intervalos de 30s para resfriar a amostra. Após sonicada, a amostra foi centrifugada à 6.000g por 30 min à 4°C e o sobrenadante foi purificado por cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC). Foram utilizadas colunas de níquel

HisTrap (HisTrap HP Kit for Purification of Histidine Tagged Proteins, GE), conectadas a um cromatógrafo ÄKTA purifier (GE Healthcare). A coluna foi inicialmente equilibrada com o tampão de lise fosfato e lavada com concentrações crescentes de Imidazol pelo tampão de eluição (20mM Fosfato; 150mM NaCl; 500mM Imidazol, pH 7,0).

O efeito da indução e a pureza das frações proteicas foram verificados em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% corado com Comassie Blue G-250 (Sigma-Aldrich). Para a quantificação do conteúdo proteico foi utilizado o método de Bradford, utilizando-se de albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3.7 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA PRIMÁRIA E MODELAGEM 3D DA lvUbq.

A partir da sequência de aminoácidos da lvUbq foi realizada comparação e alinhamento entre as sequências depositadas em bancos de dados independentes e do PDB (Protein Data Bank) através das ferramentas Blastx (NCBI, Altschul *et al.*, 1990) e Clustal W2.

A modelagem 3D da estrutura da proteína foi realizada a partir do alinhamento entre a ubiquitina humana (Referência PDB, 1UBQ) e a lvUbq com a ferramenta Swiss-Model (SIB, Arnold *et al.*, 2006). O modelo gerado foi analisado através do software PyMol (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.4 Schrödinger, LLC) para análise de estrutura secundária, terciária e distribuição de cargas. Assim como, para a produção das imagens 3D utilizadas nesse trabalho.

3.8 PRODUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL, PADRONIZAÇÃO E TESTES INICIAIS DE IMUNODETECÇÃO.

Uma amostra da lvUbq recombinante obtida com grau de pureza acima de 95% foi dialisada (Mini Dialysis Kit, GE Healthcare) na proporção de 1:1000 em tampão de lise fosfato (20mM Fosfato 150mM NaCl, pH 7,0), sob agitação, para remoção do Imidazol. A amostra foi concentrada em filtros Amicon-Ultra (MiliPore) e uma fração de 1mg/ml foi enviada para o laboratório Célula-B (UFRGS) para produção de anticorpo policlonal anti-lvUbq em coelho. As frações de soro obtidas foram alíquotadas e armazenadas a -20°C, de acordo com as recomendações da empresa.

Para padronizar os testes de imunodeteção da ubiquitina foi realizado um DotBlot com diferentes diluições do anticorpo produzido, a fim de determinar o seu título. No ensaio inicial foram utilizados 30 µg da lvUbq recombinante purificada e foram testadas diferentes concentrações de anticorpo policlonal anti-lvUbq (1:500, 1:1.000, 1:3.000, 1:5.000 e 1:10.000), como anticorpo primário, diluído em 5% de leite em pó com baixo teor de gordura, dissolvido em TTBS (20 mM Tris Base e 150 mM NaCl, pH 7,5 com 0,05% de Tween 20 – Sigma). A diluição de anticorpo secundário anti-coelho (Amershan ECL Rabbit IgG, GE Healthcare) foi de 1:3.000, diluído em 5% de leite em pó dissolvido em TTBS. Aplicou-se 7 µL de antígeno na concentração determinada sobre a membrana de nitrocelulose (Amershan ECL Hybond). Em seguida, as membranas foram bloqueadas em leite em pó 5% dissolvido em TTBS por 1h sob agitação à temperatura ambiente. Então, as membranas foram incubadas com as respectivas diluições de anticorpo primário por 1h 30 min, sob agitação em temperatura ambiente. Então, as membranas foram lavadas com jatos de água destilada e 3 banhos com TTBS de 10 min cada, sob agitação. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário por 1h 30 min, sob agitação em temperatura ambiente e, dado o tempo de incubação, o processo de lavagem foi repetido como anteriormente. Para revelação foi utilizado o método de quimioluminescência com solução de Luminol, Ácido p-Cumárico e peróxido de hidrogênio, expondo a membrana à solução de quimioluminescência por 3 min e ao filme por mais 3 min.

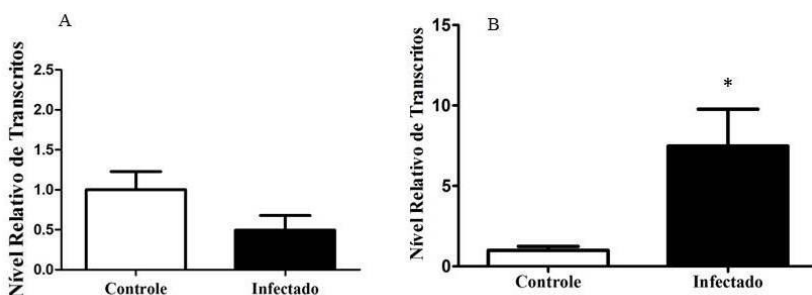
Após a determinação do título do anticorpo, foi realizado um segundo DotBlot a fim de determinar a concentração mínima de antígeno reconhecido pelo anti-lvUbq. Para isso foram testadas 7 diluições seriadas da lvUbq recombinante (30, 15, 7,5, 3,75, 1,8, 0,9, 0,45 µg) com uma diluição fixa de anticorpo primário (1:1.000) e secundário (1:3.000). A metodologia utilizada foi exatamente a mesma do DotBlot anterior.

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE TRANSCRITO DO GENE DA UBIQUITINA EM BRÂNKUIAS DE *L. vannamei*.

O nível de transcritos do RNA ribossomal 18S não apresentou diferença significativa entre os grupos controle e infectado (figura 8, A), portanto o gene foi utilizado como referência para análise da expressão relativa da ubiquitina. Em relação a expressão do gene de interesse, camarões infectados experimentalmente por 48h apresentam um aumento significativo ($p < 0,05$) de 8 vezes no nível de transcritos do gene da ubiquitina em relação ao grupo controle (figura 8, B).

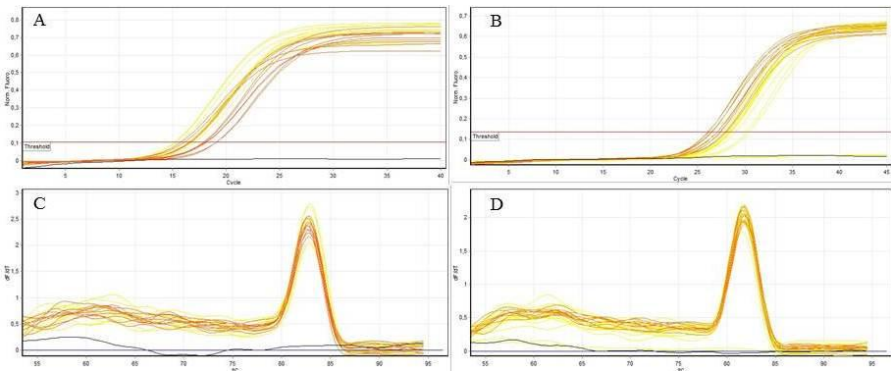
Figura 8 - Expressão relativa dos genes analisados, os valores apresentados representam a média de cada grupo e as barras representam o erro padrão (GraphPad Prism). **A.** Expressão relativa do RNA 18S Ribossomal, não há diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos; **B.** Expressão relativa da ubiquitina, indicando um aumento estatisticamente significativo de 8 vezes na taxa de transcritos do gene. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).



Os perfis de amplificação de ambos os genes podem ser visualizados na figura 9, A e B. Em relação ao gene 18S ribossomal obteve-se um perfil de amplificação com eficiência de 1,00, um R^2 de 0,997 e um único pico na curva de dissociação em aproximadamente 84°C (Figura 9, C). Em relação ao gene da ubiquitina obteve-se uma eficiência de 0,97 e um R^2 de 0,973 na reação de amplificação. A curva de dissociação pode ser visualizadas na figura 9, D, um único pico em

aproximadamente 83°C foi formado, demonstrando especificidade do iniciador utilizado.

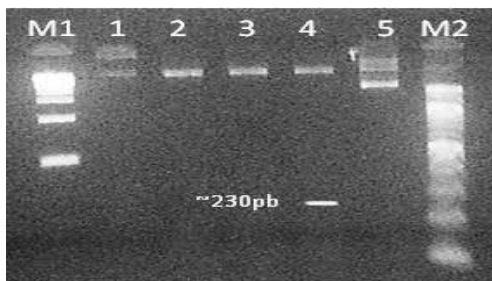
Figura 9 - Perfis de amplificação e curvas de dissociação das reações de *q*PCR, linhas vermelhas representam amostras do grupo infectado e linhas amarelas do grupo controle (software Rotor-Gene, Qiagen); **A.** Perfil de amplificação com iniciador para 18S Ribossomal; **B.** Perfil de amplificação com iniciador para ubiquitina. **C.** Curva de dissociação do iniciador RNA Ribossomal 18S. **D.** Curva de dissociação do iniciador ubiquitina.



4.2 CLONAGEM DO GENE DA lvUbq EM VETOR DE EXPRESSÃO.

O gene da lvUbq foi ligado no vetor de expressão pET-14b como pode-se observar na figura 10. É possível observar uma banda de aproximadamente 230pb, o peso esperado para a sequência do gene em questão, após a clivagem do vetor clonado com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*.

Figura 10 - Ligaç o do gene *lvUbq* no vetor de express o pET-14b, gel de agarose 2% corado com Gelred. **M1.** Peso molecular de 1kb; **1.** pET-14b n o digerido; **2.** pET-14b-*lvUbq* digerido com *NdeI*; **3.** pET-14b-*lvUbq* digerido com *BamHI*; **4.** pET-14b-*lvUbq* digerido com *NdeI* e *BamHI*, presença de fragmento esperado (~230pb); **5.** pIDT-*Ubq* n o digerido; **M2.** Peso molecular de 100pb.



O vetor clonado foi sequenciado para confirmar a inserção correta da seq ncia de interesse. Por meio da ferramenta de alinhamento Clustal W2 comparou-se a seq ncia de nucleot deos obtida do vetor clonado (pET-14b-*lvUbq*) com a seq ncia de interesse (tabela 2), obtendo um alinhamento com 100% de identidade (figura 11).

Figura 11 - Alinhamento da seq ncia do vetor pET14b-*lvUbq* com a seq ncia do gene *lvUbq* pela ferramenta Clustal W2.

```

ubq -----CAGATCTTTGTGAAA 15
vetor CATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCAGATCTTTGTGAAA 120
*****

ubq ACGCTGACTGGCAAACCAATTACCCTGGAAGTGGAACCGAGTGACACCATTGAAAACGTG 75
vetor ACGCTGACTGGCAAACCAATTACCCTGGAAGTGGAACCGAGTGACACCATTGAAAACGTG 180
*****

ubq AAAGCGAAGATCCAAGACAAGAAGGGTATCCCGCCGGATCAACAGCGCTTAATTTTCGCA 135
vetor AAAGCGAAGATCCAAGACAAGAAGGGTATCCCGCCGGATCAACAGCGCTTAATTTTCGCA 240
*****

ubq GGCAAGCAATTGGAAGATGGGCGCACACTGTCTGACTACAATATTCAGAAAGAGTCAACC 195
vetor GGCAAGCAATTGGAAGATGGGCGCACACTGTCTGACTACAATATTCAGAAAGAGTCAACC 300
*****

ubq CTTACCTGGTACCGCGCCCGTCCCGTTAA----- 228
vetor CTTACCTGGTACCGCGCCCGTCCCGTTAAGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAA 360
*****

```

A sequência de nucleotídeos do vetor clonado também foi traduzida pela ferramenta ExPASy Translate Tool e pode-se observar no primeiro *frame* de leitura a sequência para a cauda de histidinas seguida da sequência da lvUbq (figura 12). Confirmando que o gene de interesse foi inserido de forma correta no vetor de expressão.

Figura 12 - Fragmento da tradução da sequência de nucleotídeos do vetor pET-14b-lvUbq, em destaque a cauda de histidinas seguida da lvUbq (ExPASy translate tool).

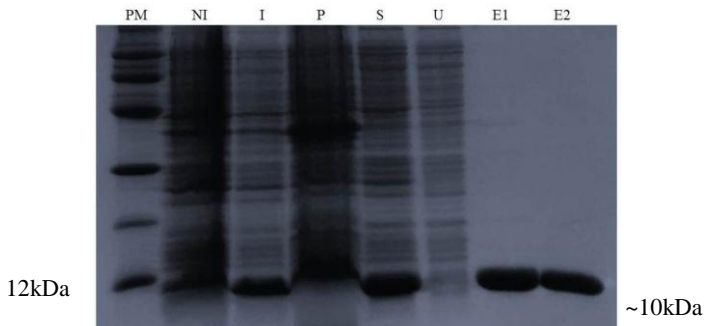
5'3' Frame 1

```
PEIIFVLT LRRRYT Met GSSHHHHHHSSGLVPRGSH Met QIFVKTLTGKTTITLEVE
PSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVPR
PRPR Stop GSGC Stop QSPKGS Stop VGCCHR Stop AITSITPWGL Stop TGLEGFFAER
RNYIRISTGRVWSP Stop SRSR Stop WLQVAKRAGLGGGQSGRTVLRERVRIAS
```

4.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA lvUbq.

A lvUbq recombinante (aproximadamente 10kDa) foi expressa de forma solúvel em grande quantidade a partir de 3h de indução com IPTG 0,5 mM, como observado na figura 13. Na purificação por cromatografia de afinidade foi possível obter uma fração com mais de 95% de pureza, após duas eluições de 200 mM e 250 mM de imidazol.

Figura 13 - Expressão e purificação da lvUbq recombinante (~10kDa). SDS-Page 15%. **PM**: peso molecular; **NI**: fração não-induzida; **I**: fração induzida com IPTG 0,5mM por 3h; **P**: precipitado pós-indução de 3h; **S**: fração solúvel pós-indução 3h; **U**: proteínas que não ligaram a coluna (*unbound*); **E1**: proteínas pós eluição com 200 mM de imidazol; **E2**: proteínas pós eluição com 250 mM de imidazol.



4.4 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA PRIMÁRIA E MODELAGEM 3D DA IvUbq.

Os resultados de alinhamento de sequências de aminoácidos mostram que a ubiquitina é altamente conservada nos diversos táxons de Eucariota. Comparando a sequência da IvUbq através da ferramenta Blastx junto aos bancos de dados independentes e do PDB, obteve-se, com exceção da porção C-terminal, 100% de similariedade em todas as sequências analisadas (total de 200 sequências analisadas - dados não mostrados). A IvUbq apresenta 3 repetições de Prolina-Arginina na porção C-terminal, enquanto que todas as outras sequências apresentavam 2 repetições de Leucina-Arginina seguidas por uma ou duas glicinas finais. Dado que, todas as sequências de aminoácidos encontradas no banco de dados eram idênticas a de *H. sapiens* (referência PDB, 1UBQ) o alinhamento demonstrado na figura 14, A foi feito apenas com essas duas sequências.

A partir do alinhamento gerado, foi construído o modelo de estrutura tri-dimensional com a ferramenta Swiss-Model. O modelo criado apresentava uma identidade de 96% e QMEAN4 de -0,67. Em seguida, outros parâmetros como estrutura secundária, cadeias laterais da porção C-terminal e superfície de cargas foram visualizados no software PyMol. O modelo criado para a IvUbq apresenta 4 folhas β e 3 α -hélices, enquanto que a Ubq humana apresenta 5 folhas β e 2 α -hélices (figura 14). Os aminoácidos que fazem parte de cada estrutura secundária estão listados na tabela 3.

Figura 14 - Alinhamento e representação da estrutura secundária da ubq de *L. vannamei* e de *H. sapiens*. **A:** Alinhamento das sequências de aminoácidos pela ferramenta Clustal W2 e representação esquemática da estrutura secundária do modelo criado. **B:** Modelo construído para lvUbq representando estruturas secundárias [PyMol]. **C:** Modelo da ubiquitina humana representando estruturas secundárias [PyMol]. * indica aminoácidos idênticos, α -hélices estão representadas em vermelho e folhas β em amarelo.

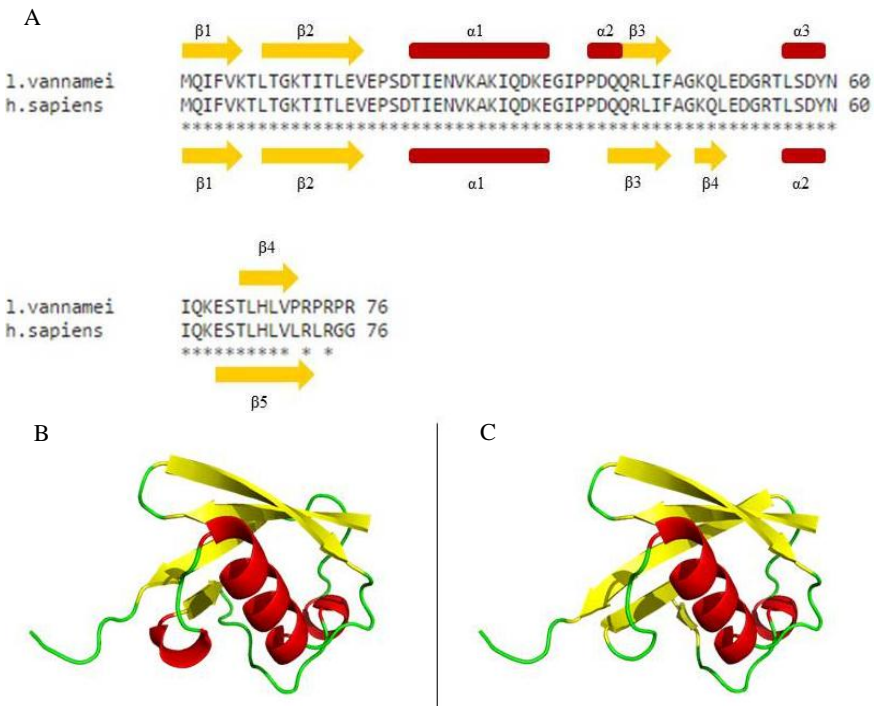
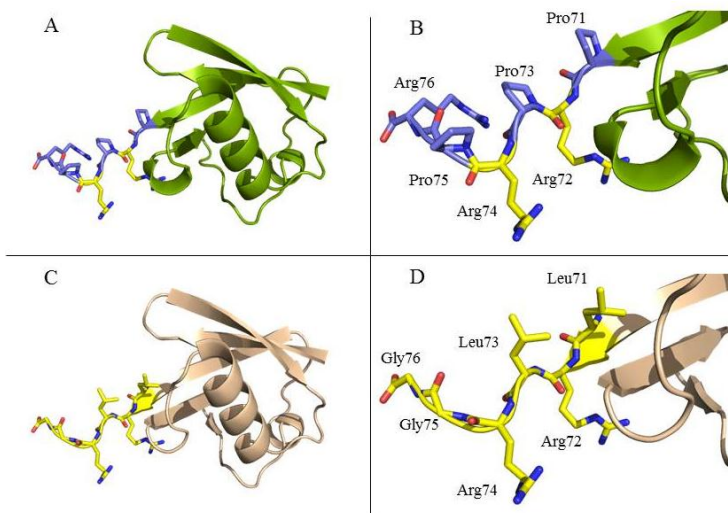


Tabela 3 - Posição das estruturas secundárias nas seqüências de aminoácidas da ubq de *L. vannahmei* e *H. sapiens*

	Posição Folhas β		Posição α -Hélices	
<i>L. vannahmei</i>	β 1	Met1 até Thr7	α 1	Ile23 até Glu34
	β 2	Gly10 até Val16	α 2	Pro38 até Gln40
	β 3	Gln41 até Ile44	α 3	Leu56 até Tyr59
	β 4	Thr66 até Pro71		
<i>H. sapiens</i>	β 1	Met1 até Thr7	α 1	Ile23 até Glu34
	β 2	Gly10 até Val16	α 2	Leu56 até Tyr59
	β 3	Gln40 até Phe45		
	β 4	Lys48 até Leu50		
	β 5	Glu64 até Arg72		

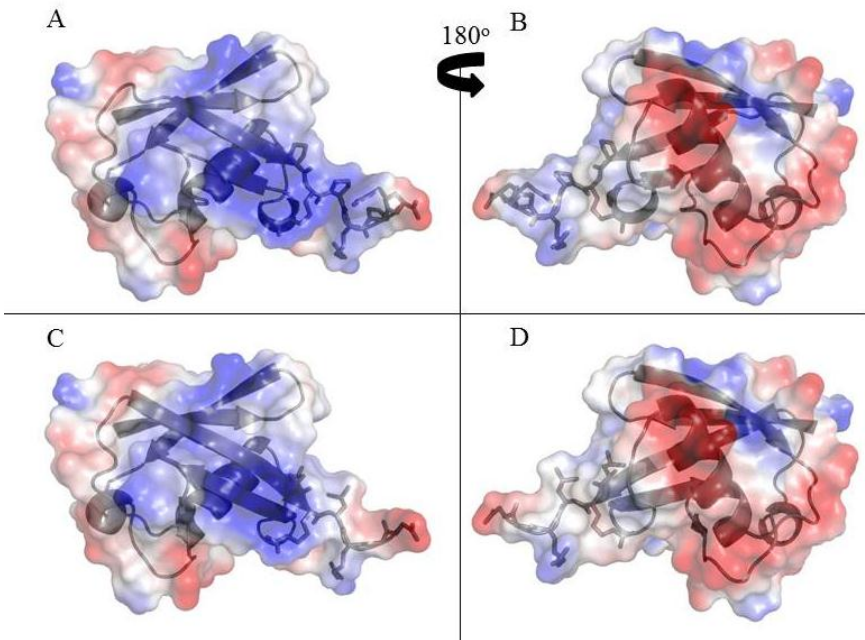
A única diferença observada na seqüência de aminoácidos entre as duas ubqs se localiza na região C-terminal. Na figura 15 podemos visualizar em maior destaque essa diferença em termos das cadeias laterais de cada aminoácido substituído.

Figura 15 - Ubiquitinas modeladas com destaque para porção C-terminal. **A e B:** representam IvUbq, as cadeias laterais diferenciadas (Pro71, Pro73, Pro75 e Arg76) estão identificadas em azul, enquanto que as idênticas em amarelo. **C e D:** representam ubq humana, todas as cadeias laterais estão representadas em amarelo [PyMol]



Em relação à superfície de cargas da molécula, a lvUbq apresenta uma porção C-terminal carregada positivamente, enquanto que a ubiquitina humana apresenta uma porção C-terminal principalmente neutra. A figura 16, ilustra o total de cargas na superfície das duas ubiquitinas em dois ângulos opostos, permitindo visualizar o aumento de cargas positivas na porção C-terminal da lvUbq em comparação com a humana.

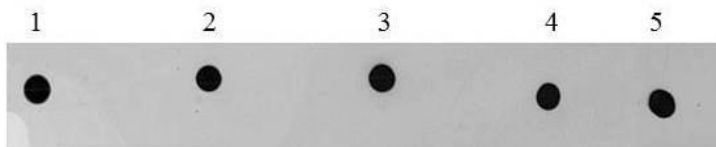
Figura 16 - Modelos geradas demonstrando as cargas na superfície das ubiquitinas. **A e B:** representam a lvUbq em dois ângulos opostos. **C e D:** representam a ubiquitina humana em dois ângulos opostos. Superfícies avermelhadas indicam carga negativa, enquanto que superfícies esbranquiçadas indicam cargas neutra e superfícies azuladas, cargas positiva.



4.5 PADRONIZAÇÃO E TESTES INICIAS DE IMUNODETEÇÃO.

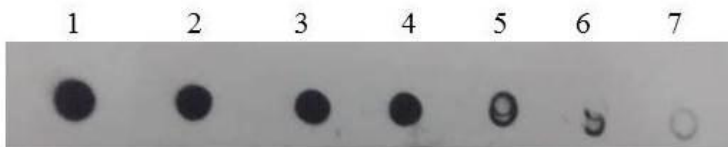
A titulação do anticorpo policlonal anti-lvUbq foi realizada por DotBlot a partir de 5 diluições diferentes (1:500; 1:1.000; 1:3.000; 1:5.000; 1:10.000, figura 17). Em todos os casos foi possível observar o reconhecimento do antígeno com intensidade muito similar. Esse resultado está associado, provavelmente, à alta concentração de antígeno aplicada (30 μg) e/ou ao método utilizado para a detecção do imunocomplexo.

Figura 17 - DotBlot com 5 diluições diferentes de anticorpo primário, a amostra utilizada foi 30 μg de lvUbq recombinante pura. **1:** 1:500; **2:** 1:1.000; **3:** 1:3.000; **4:** 1:5.000; **5:** 1:10.000.



Após a determinação do título do anticorpo, foi realizado um DotBlot com diluições seriadas da lvUbq recombinante pura, a fim de detectar a faixa de reconhecimento do anticorpo obtido (figura 18). Ao todo, foram feitas 7 diluições seriadas partindo de uma concentração inicial de 30 μg de proteína (antígeno). A partir da quinta diluição (1,8 μg) podemos perceber uma diminuição da identificação do antígeno, que se torna quase inexistente/não detectável na última diluição testada (0,45 μg).

Figura 18 - DotBlot de diluições seriadas do antígeno (lvUbq recombinante pura). **1:** 30 μg ; **2:** 15 μg ; **3:** 7,5 μg ; **4:** 3,75 μg ; **5:** 1,8 μg ; **6:** 0,9 μg ; **7:** 0,45 μg



5. DISCUSSÃO

5.1 A INFECÇÃO PELO WSSV INDUZ A EXPRESSÃO DA UBIQUITINA EM CAMARÕES.

Os camarões são constantemente expostos a patógenos e necessitam de mecanismos de reconhecimento e ativação da resposta de defesa para resistir às infecções. As interações moleculares envolvidas nesses processos são bastante complexas e novos estudos vêm contribuindo para elucidar esses mecanismos a eles associados. A ubiquitina é uma proteína associada a diversos processos celulares, como degradação de proteínas, interação com histonas e DNA (Siegelman *et al.*, 1986), atividade antimicrobiana (Seo *et al.*, 2013) e ativação da resposta imune inata (Liu *et al.*, 2013) e a sua participação já foi identificada em diversos estudos com camarões peneídeos infectados com o WSSV.

Muller (2009), gerou duas bibliotecas de cDNA a partir de brânquias de *L. vannamei* naturalmente infectados com WSSV, utilizando a técnica de Hibridização Subtrativa por Supressão (SSH). A ubiquitina foi um dos genes encontrados na biblioteca de genes induzidos e para confirmar a sua indução, o nível de transcritos desse gene foi quantificada por *q*PCR. Os dados de Muller (2009) apontaram um aumento estatisticamente significativo de 91 vezes na expressão da ubiquitina em animais infectados naturalmente em relação ao grupo controle.

No presente estudo, foi avaliado o nível de transcritos do gene da ubiquitina em *L. vannamei* infectados experimentalmente por 48h. O resultado obtido nesse trabalho indica um aumento estatisticamente significativo de 8 vezes na expressão do gene da ubiquitina em relação ao grupo controle (figura 8), confirmando os dados encontrados por Muller (2009). Apesar de a metodologia adotada nesse estudo ter sido baseada no trabalho de Muller (2009), é possível observar uma grande diferença em relação ao aumento do nível de transcritos desse gene entre os dois estudos (91 vezes para 8 vezes). Essa diferença provavelmente está associada a fatores biológicos e experimentais, como: os animais infectados naturalmente podiam estar em estágios diferentes de infecção; os animais infectados naturalmente são expostos a uma série de estresses ambientais, diferentemente dos matinhos em condições

controladas de laboratório; a rota de infecção viral; e os kits de amplificação de *q*PCR utilizados nos dois estudos são diferentes.

Além da biblioteca de Muller (2009), outros estudos sobre o perfil de genes induzidos em *L. vannamei* pelo WSSV, apontam a indução da ubiquitina em diferentes tecidos. Chen *et al.*, (2013) analisaram o transcriptoma do hepatopâncreas de *L. vannamei* infectados experimentalmente por 72h e também identificaram a indução da ubiquitina em seu estudo. Xue *et al.*, (2013) construíram a biblioteca de genes induzidos em hemócitos frente à infecção experimental por WSSV em diferentes estágios de infecção: inicial (5h pós infecção) e final (48h pós infecção). Os resultados obtidos apontam a indução de genes referentes ao processo de ubiquitinação e degradação pela via proteassomo em estágios finais de infecção.

A indução da ubiquitina também foi observada em diferentes espécies de camarões peneídeos. Wang *et al.*, (2006) analisaram o perfil de genes induzidos em *Fenneropenaeus chinensis* moribundos infectados naturalmente e experimentalmente, apontando uma indução no quantidade de transcritos da ubiquitina em ambos os casos. Vidya, Gireesh-Babu, Pani Prasad (2012), analisaram os níveis de transcrito da ubiquitina em brânquias e tecido muscular nas horas iniciais da infecção pelo WSSV em *P. monodon*. Curiosamente, os dados encontrados por eles, indicam que há uma repressão da transcrição desse gene em brânquias nas primeiras horas de infecção (6-12h). Porém, após 18h de infecção, há um aumento acentuado na sua expressão em ambos os tecidos.

Moser (2010) analisou a expressão de alguns genes de interesse em *L. vannamei* expostos ao agrotóxico Permetrina, assim como em camarões expostos ao agrotóxico e subsequentemente infectados com WSSV. A ubiquitina foi um dos genes avaliados e os resultados desse trabalho apontaram a indução desse gene frente a infecção pelo WSSV, porém não houve diferença estatística em animais expostos somente à Permetrina.

Em suma, uma série de estudos vêm apontando que a infecção pelo WSSV induz a expressão do gene da ubiquitina em diferentes tecidos de diferentes espécies de camarões peneídeos. Essa indução é observada tanto em infecções naturais quanto experimentais, corroborando, assim, a relevância desse gene no processo de infecção do vírus.

Em relação à expressão a nível proteico, estudos têm apontado a indução de proteínas relacionadas ao processo de ubiquitinação frente a infecção pelo WSSV. Valentim Neto (2011) identificou a indução da ubiquitina em camarões *L. vannamei* infectados experimentalmente por 24h e 72h, assim como uma *zinc-finger* ligase associada a ubiquitinação, também em 72h. Em *F. chinensis* os estudos de proteômica identificaram a indução de enzimas E2, em hepatopâncreas de camarões infectados por 6h, 12h e 24h (Chai *et al.*, 2010). Enquanto que em hemócitos de *F. chinensis* infectados por 24h foi detectada a indução de proteínas SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) (Li *et al.*, 2014). Em *P. monodon* Vidya, Gireesh-Babu, Pani Prasad (2012) analisaram a expressão da ubiquitina através de anticorpos policlonais em músculo e brânquia e encontraram uma supressão da ubiquitina nas horas iniciais de infecção seguido de aumento na sua expressão após 18h de infecção.

Apesar de comprovada a indução da ubiquitina frente a infecção pelo WSSV, ainda não se sabe a exata função dessa proteína no processo de infecção. A apoptose é um importante mecanismo de defesa contra infecção viral e sua ativação já foi descrita pela infecção do WSSV em camarões peneídeos (Henderson; Stuck, 1999). Para se proteger e conseguir se replicar com sucesso, o WSSV desenvolveu uma série de mecanismos para silenciar o processo apoptótico (Leu *et al.*, 2012). Um dos mecanismos adotados é a expressão da proteína viral WSSV222 que ativa a degradação de um fator supressor de tumor através da sua ubiquitinação. A WSSV222 apresenta um domínio RING-H2 que é normalmente encontrado em proteínas com uma função de E3 ligase. Essa proteína viral se liga a um fator supressor de tumor (*Tumor suppressor like protein*, TSL), causando sua ubiquitinação e direcionamento para a via de degradação proteossomo 26S (He *et al.*, 2006). Em células de mamífero a expressão do TSL ativa a apoptose e, portanto, a WSSV222 atua como um inibidor do processo apoptótico (He *et al.*, 2006). Jeena *et al.*, (2012) apontaram que a expressão de uma proteína viral WSSV199 e a expressão de uma E2 (*conjugating enzyme*) de *Penaues monodon* apresentavam mesmo perfil de expressão ao longo da infecção pelo WSSV. Essa proteína viral também apresenta um domínio RING, reforçando a hipótese de que o vírus atua modulando o padrão de ubiquitinação de proteínas da célula do hospedeiro. Em *L. vannamei* um processo similar também já tinha sido descrito por Wang *et al.*, (2005). Em contrapartida estudos recentes têm reportado a importância da ubiquitina na regulação da imunidade inata antiviral (Liu *et al.*, 2013; Davis; Gack, 2015; Liu *et al.*, 2015). A ubiquitinação de

diferentes proteínas é essencial para a transdução de sinais recebidos pelos PRRs e ativação dos genes de defesa antiviral, contudo esses mecanismos ainda não foram descritos em crustáceos.

Como a ubiquitina é uma proteína que atua em diversos processos celulares os dados encontrados na literatura atual remetem tanto a uma função pró-infecção viral induzida pelo WSSV, como a uma possível função anti-viral produzida pelo próprio hospedeiro. Dada a complexidade de inferir a sua função, novos estudos são necessários a fim de caracterizar o papel da ubiquitina no processo de infecção pelo WSSV.

No presente trabalho, optou-se por avaliar apenas um tempo pós-infecção experimental com o WSSV, o qual representava um estágio intermediário de infecção e com uma carga viral semelhante à encontrada em animais infectados naturalmente por Muller (2009). Contudo, um estudo analisando a expressão do gene da ubiquitina ao longo dos diversos tempos de infecção experimental realizada por Valentim Neto (2011), assim como o de algumas das proteínas virais descritas acima (WSSV222 e WSSV119) seria interessante para completar os dados de transcrição gênica e proteômica já levantados. Dentro desse mesmo contexto, experimentos de imunodeteção da ubiquitina nesses mesmos tecidos forneceriam dados importantes para a construção de um perfil de expressão da ubiquitina ao longo dos tempos de infecção.

A partir dos dados de expressão heteróloga da ubiquitina de *L. vannamei* (que serão abordados mais detalhadamente no próximo tópico) foi produzido um anticorpo policlonal anti-ubiquitina (anti-lvUbq) em coelho, cuja titulação e faixa de detecção de antígeno foram determinadas. O anti-lvUbq obtido é capaz de detectar com intensidade similar o antígeno, mesmo em altas diluições (figura 17). Contudo, a concentração de antígeno utilizada nesse teste foi bastante elevada (30 µg) e em extratos de proteínas totais de diferentes tecidos de camarão é pouco provável que a ubiquitina seja encontrada nessa concentração. Portanto, para futuros testes de imunodeteção em tecidos, é recomendado testar uma diluição inicial menor de anticorpo primário (1:1.000 ou 1:3.000).

O anticorpo produzido reconhece o antígeno até a faixa de concentração de 1.8 µg; abaixo dessa concentração a detecção fica comprometida (figura 18). Os dados de Vidya, Gireesh-Babu, Pani Prasad (2012), apontam que após 18h de infecção com o WSSV, os níveis de ubiquitina encontrados em brânquias é de aproximadamente

1.85 µg/mg de proteínas totais. Dessa forma, para testes de detecção dessa proteína neste e, possivelmente, outros tecidos de camarão da coleção do LABCAI, é provável que seja necessário concentrar a amostra e/ou aumentar o tempo de incubação.

Os resultados de imunodeteção obtidos nesse trabalho são bastante preliminares, mas fornecem subsídios para futuros estudos voltados à imunodeteção dessa proteína em tecidos de camarão e à investigação do perfil temporal de sua expressão frente à infecção pelo WSSV.

5.2 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA UBIQUITINA DE *L. vannamei*.

A expressão heteróloga de uma proteína é uma técnica bastante utilizada para se estudar a sua estrutura e função. Atualmente, existem diversos estudos descrevendo a expressão heteróloga de proteínas envolvidas no processo de ubiquitinação, contudo, são raros os estudos acerca dessa técnica para a própria ubiquitina. Além disso nenhuma referência bibliográfica descreve a expressão heteróloga de ubiquitinas de camarões.

A ubiquitina é uma proteína pequena, de aproximadamente 8.5kDa formada por 76 resíduos de aminoácidos. Nesse trabalho foi realizada a expressão heteróloga da ubiquitina de *L. vannamei* a partir da sequência de nucleotídeos encontrada na biblioteca subtrativa (SSH) de Muller (2009). O gene de interesse foi clonado com sucesso no vetor de expressão pET-14b através das enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* (figuras 10, 11 e 12). O sistema de expressão do vetor pET-14b fusiona na proteína recombinante uma cauda de Histidinas de aproximadamente 2.0 kDa que permite a purificação da proteína recombinante a partir da cromatografia de afinidade por íons metálicos. A lvUbq recombinante foi expressa de forma solúvel em uma alta concentração após 3 horas de indução com IPTG 0,5 mM (figura 13) e foi possível obter uma fração com pureza acima de 95% através da purificação por cromatografia de afinidade. Esses dados confirmam que ubiquitina de *L. vannamei* foi clonada, expressa e purificada com sucesso, permitindo que essa metodologia seja repetida em futuros estudos funcionais com essa proteína.

A ubiquitina é uma proteína altamente conservada presente em diversos táxons de eucariotos (Hicke, 2001). A sequência de nucleotídeos da lvUbq foi comparada aos bancos de dado independentes

e do PDB através da ferramenta Blastx, e os resultados obtidos confirmam que se trata de uma proteína bastante conservada. Curiosamente, a lvUbq é a única que apresenta uma porção C-terminal formada por 3 repetições de prolina-arginina (Pro71, Arg72, Pro73, Arg74, Pro75, Arg76), enquanto que todas as outras sequências apresentavam 2 repetições de leucina-arginina seguidas por uma ou duas glicinas finais (Leu71, Arg72, Leu73, Arg74, Gly75, Gly76). Dado a grande similariedade entre todas as sequências depositadas nos bancos de dados, os resultados desse estudo são comparados apenas com a ubiquitina humana.

O modelo criado para a lvUbq, apresentava algumas diferenças na estrutura secundária (4 folhas β e 3 α -hélices) em relação à ubiquitina humana (5 folhas β e 2 α -hélices, figura 14). Analisando a estrutura 3D, podemos perceber que a substituição na lvUbq da Leu71 pela Pro71 é a provável causa dessas alterações. Na sequência da ubiquitina humana as folhas $\beta 1$ e $\beta 2$ são antiparalelas, enquanto que os aminoácidos da $\beta 3$ interagem tanto com a $\beta 4$ e $\beta 5$. A prolina é um aminoácido com cadeia lateral apolar cíclica distinta, o grupo amino secundário de resíduos de prolina é mantido em uma conformação rígida que reduz a flexibilidade estrutural de regiões polipeptídicas contendo prolina (Nelson; Cox, 2011). Na sequência da lvUbq, a substituição Leu71-Pro71 quebra a última folha β um resíduo antes da humana. Essa quebra encurta a folha $\beta 4$ e conseqüentemente também encurta a sua folha β antiparalela ($\beta 3$ na lvUbq). O programa então calcula que os aminoácidos que não formam mais a ligação entre $\beta 3$ e $\beta 4$, formariam uma pequena α -hélice ($\alpha 2$ na lvUbq). Por fim, o surgimento dessa hélice interfere na formação de uma folha β antiparela ($\beta 4$ na ubiquitina humana) que reduz ainda mais a $\beta 4$ da lvUbq. Essas alterações estão ilustradas na figura 14.

É possível perceber que a substituição de aminoácidos concede a lvUbq uma porção C-terminal carregada positivamente. A alteração de carga na superfície de uma molécula pode interferir nos processos biológicos que ela participa. Seo *et al.*, (2013) identificaram que a ubiquitina purificada do extrato de proteínas totais de brânquias de ostra (*Crassostrea gigas*), apresenta atividade antimicrobiana a uma série de bactérias gram negativas e positivas. A sequência de aminoácidos da ubiquitina de *C. gigas* é idêntica a de *H. sapiens*, com exceção da ausência das duas glicinas finais (Gly75 e Gly76). Segundo o autor, a atividade antimicrobiana da ubiquitina de *C. gigas* estaria relacionada a porção C-terminal e a ausência de glicinas finais intensifica a ação

antimicrobiana desse peptídeo. Em comparação aos dados obtidos no nosso estudo, é possível que ubiquitina de *L. vannamei* também apresente uma atividade antimicrobiana, dado que as glicinas finais estão ausentes e sua porção C-terminal é mais positiva em relação a outras ubiquitinas.

Em conclusão, a ubiquitina de *L. vannamei* apresenta características interessantes e exclusivas que apontam uma possível atividade antimicrobiana. Porém, estudos futuros são necessários a fim de comprovar essa hipótese.

6.CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho corroboram os dados encontrados na literatura acerca do envolvimento da ubiquitina no processo de infecção pelo WSSV. Contudo, a sua função durante o processo ainda não foi descrito e, portanto, novos estudos são necessários visando elucidar sua função.

A obtenção de um perfil transcricional e de um perfil da expressão da ubiquitina ao longo de diferentes tempos de infecção pelo WSSV seriam importantes ferramentas para auxiliar a compreensão das repostas moleculares do hospedeiro frente à infecção viral. Além da questão temporal, a obtenção destes perfis poderia ser analisada ainda sob a ótica da carga viral e da análise conjunta de outros genes, de forma a validar os biomarcadores de infecção viral e/ou susceptibilidade ao vírus, conforme tem sido proposto pelo nosso grupo.

Por fim, devido às características estruturais exclusivas encontradas na ubiquitina de *L. vannamei* e sua possível atividade antimicrobiana, novos estudos com essa proteína são relevantes, tendo em vista a sua completa caracterização estrutural e funcional.

7. REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F. et al.. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410. 1990.

AMPARYUP P.; CHAROENSAPSRI W.; TASSANAKAJON A. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, p. 990-1001. 2013.

ANDREATTA, E. R.; BELTRAME, E. Cultivo de camarões marinhos. In: POLI, C. R. *et al.*. **Aquicultura: experiências brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa. p. 199-220. 2004.

ARNOLD, K. et al.. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, p. 195-201. 2006.

ARTIMO, P. et al.. ExpASY: SIB bioinformatics resource portal. **Nucleic Acids Research**, p. 597-603. 2012.

BARRACO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. **Imunologia de crustáceos com ênfase em camarões**. Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura. Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética. Universidade Federal de Santa Catarina. 2007.

BONDAD-REANTASO, M. G. et al.. The role of crustacean fisheries and aquaculture in global food security: Past, present and future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, p. 158–165. 2012.

BRIGGS, M. et al.. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. **FAO Regional Office for Asia and the Pacific**, Bangkok, p. 92. 2004.

BULLET, P.; STOCKLIN, R; MENIN, L. Antimicrobial peptides from invertebrates to vertebrates. **Immunology Review**, v. 198, p. 169-184. 2003.

CAMARGO, S. G. O.; POUHEY, J. L. O. Aquicultura - Um Mercado em expansão. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 11, p. 393-396. 2005.

CAVALLI, L. S. et al.. Evaluation of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in wild shrimp after a major outbreak in shrimp farms at laguna, southern Brazil. **Atlantica Rio Grande**, v 30. p. 45-52. 2008.

CHAI, Y. et al.. Comparative proteomic profiles of the hepatopancreas in *Fenneropenaeus chinensis* response to white spot syndrome virus. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, p. 480-486. 2010.

CHEN, X. et al.. Transcriptome Analysis of *Litopenaeus vannamei* in Response to White Spot Syndrome Virus Infection. **Plos One**, v. 8. 2013.

CHEN, L. et al.. Identification of a nucleocapsid protein (VP35) gene of shrimp white spot syndrome virus and characterization of the motif important for targeting VP35 to the nuclei of transfected insect cells. **Virology**, v. 293, p.44-53. 2002.

CHOU, H.Y. et al.. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 23, p.165-173. 1995.

COSTA, S. W. **Prospecção de fatores associados à manifestação e dispersão da enfermidade do vírus da síndrome da mancha branca em Santa Catarina**. 2010. 146f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2010.

COSTA, S. W. et al.. Presence of the white spot syndrome virus (WSSV) in wild decapods crustaceans in coastal lagoons in southern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p.12-19. 2012.

DANIAL N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**, v.116, p.205-219. 2004.

DAVIS, M.; GACK, M. U. Ubiquitination in the antiviral immune response. **Virology**, v. 480, p. 52-65. 2015

ESCOBEDO-BONILLA, C. M. et al.. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. **Journal Fish Diseases**, v.31, p. 1-18. 2008

EVERETT, H.; MCFADDEN, G. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. **Trends Microbiol.** V.7, p. 160-165. 1999.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 22 de junho de 2015.

HE, F. et al.. White spot syndrome virus open reading frame 222 encodes a viral E3 ligase and mediates degradation of a host tumor suppression via ubiquitination. **Journal of Virology**, v. 80, p. 84-92. 2006

HENDERSON, T.; STUCK, K. Induction of apoptosis in response to white spot syndrome virus in the pacific white shrimp. In: Book of abstracts, aquaculture America 1999: **World Aquaculture Society**. 1999.

HICKE, L. Protein regulation by monoubiquitin. **Nature reviews in Molecular Cell Biology**, v. 2, p. 195-201. 2001

HOCHSTRASSER, M. Origin and function of ubiquitin-like proteins. **Nature reviews**, v. 458, p. 422-429. 2009.

ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses Disponível em: <http://ictvonline.org/virustaxonomy.asp>. Acesso em: 30 de março de 2015.

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

KAMYSZ W.; OKROJ, M.; LUKASIAK J. Novel properties of antimicrobial peptides. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, p. 461-469. 2003.

KORSMEYER, S.J. *et al.*. Proapoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. **Cell Death & Differentiation**, p. 1166-1173. 2000.

LABREUCHE, Y.; WARR G. W. Insights into the antiviral functions of the RNAi machinery in penaeid shrimp. **Fish and Shellfish Immunology**, v.34, p.1002-1010. 2013.

LEU, J. H. *et al.*. The unique stacked rings in the nucleocapsid of the shite spot syndrome virus virion are formed by the major structural protein VP664. **Journal of Virology**, v. 79, p.140-149. 2005.

LEU, J. H. *et al.*. Whispovirus. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.328, p.197-227. 2009

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

LI, W. *et al.*. Proteomic Analysis of Differentially Expressed Proteins in Fenneropenaeus chinensis Hemocytes upon White Spot Syndrome Virus Infection. **Plos One**, v.9. 2014.

LI, F.; XIANG, J. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 39, p.11-26. 2013.

LIU, H *et al.*. Antilipoplysaccharide factor interfere with white spot syndrome virus replication in vitro and in vivo in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Journal of Virology**, v. 80, p. 10365-10371, 2006.

LIU, X. et al.. Dynamic regulation of innate immunity by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, v. 24, p. 559-570. 2013.

LIU, X. et al.. Sensing and responding to cytosolic viruses invasions : An orchestra of kaleidoscopic ubiquitinations. ***Cytokine & Growth Factor Reviews***, p 1-9. 2015.

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

LIGHTNER, D. V.; REDMAN, R. M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. ***Aquaculture***, v. 168, p. 201-220. 1998.

LO, C.F. Major viral diseases of *Penaeus monodon* in Taiwan. ***Journal of the Fisheries Society***, v. 30, p. 1-13. 2003.

MARKS, H. et al.. Genetic variation among isolates of White spot syndrome virus. ***Archives of virology***, v. 143, p. 673-697. 2004.

MARQUES J. S. et al.. Wild captured crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851), a new host for white spot syndrome virus (WSSV). ***Aquaculture***, v. 318 p. 20-24. 2011.

McWILLIAM, H. et al.. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic acids research*, p.597-600. 2013

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

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

MULLER, I. C. et al.. Genotyping of white spot syndrome virus (WSSV) geographical isolates from Brazil and comparison to other isolates from the Americas. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 88, p.91-98. 2010.

NAKANO, H. Mass mortalities of cultured kuruma shrimp *Penaeus japonicus* in Japan. **Fish Pathology**, v.29, p.135-139. 1994.

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 Virology Methods**, v. 149, p. 28-34. 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas (Aminoácidos). In: **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 71-81.

ROCHA, I. P.;ROCHA, D. M. Produção mundial de camarão: principais produtores, mercados e oportunidades para o Brasil. **Revista da ABCC**, v. 11, p. 50–59. 2009.

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

SAELEN, X. et al.. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, v.23 p.2861-2874. 2004.

SAHUL HAMEED A.S. et al.. Quantitative assessment of apoptotic hemocytes in white spot syndrome virus (WSSV)-infected penaeid shrimp, *Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*, by flow cytometric analysis. **Aquaculture** , v.256, p.111-120. 2006.

SAHTOUT, A.H.; HASSAN, M.D.; SHARIFF, M. DNA fragmentation, an indicator of apoptosis, in cultured black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white spot syndrome virus (WSSV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 44, p.155-159. 2001.

SALDITT, T.; LI, C.; SPAAR, A. Structure of antimicrobial peptides and lipid membranes probed by interface-sensitive X-ray scattering. **Biochemistry Biophysics**, v. 1758, p. 1483-1498. 2006.

SANGSURYIA P. et al.. Construction and application of a protein interaction map for white spot syndrome virus. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology**, v. 13, p. 269-282. 2014.

SCHEID, M.S. et al.. Ir genes and antigen recognition. **Annals of the New York Academy of Sciences** v. 249, p.541–547. 1975.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v.3, p. 1101-1102. 2001.

SIEGELMAN, M. et al.. Cell surface molecule associated with lymphocyte homing is a ubiquitinated branched-chain glycoprotein. **Science** v. 231, p. 823–829. 1986.

SEIFFERT W.; COSTA S. W.; MAGGIONI, D. A mancha branca em Santa Catarina. **Revista Panorama da Aquicultura**, v. 15, p.51-53. 2005.

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

SUN, Z. et al.. Bioinformatic prediction of WSSV-host protein-protein interaction. **BioMed Research International**, p.1-9. 2014.

TASSANAKAJON, A. et al.. *Penaeus monodon* gene discovery project: the generation of an EST collection and establishment of a database. **Gene**, v. 384, p. 104-112. 2006.

THARNTADA S. et al.. Role of antilipopolsaccharide factor from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, in protection from white spot syndrome virus infection. **Journal of Gen. Virology**, v. 90, p. 1491-1498. 2009.

TRINDADE, I. M. S. et al.. Ações de Defesa Sanitária Animal no Combate ao Foco de Mancha Branca de camarões no Município de Canavieiras. **Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia, folheto informativo**, 2008

VALENTIM NETO, P. A. **Caracterização do perfil diferencial de proteínas expressas em brânquias do camarão branco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) infectado versus não infectado com o vírus da mancha branca**. 2011. 113f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2011.

VAN HULTEN, M. C et al.. The White spot syndrome virus DNA genome sequence. **Virology**, v. 286, p. 7–22. 2001.

VIDYA, R.; GIREESH-BABU, P.; PANI PRASAD, K. White spot syndrome virus Manipulates Ubiquitin Gene Expression in *Penaeus monodon*. **Indian Journal of Virology**, p. 82-84. 2012.

VLAK, J.M. et al.. **Nimaviridae: A new virus family infecting aquatic invertebrates**. Report from the XIIth International Congress of Virology, Paris. 2002.

VOGES, D.; ZWICKL, P.; BAUMEISTER, W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. **Annual Reviews in Biochemistry**. 1999.

XU, D. et al.. Cellular immune responses against viral pathogens in shrimp. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 47, p. 287–297. 2014.

XUE, S. et al.. Sequencing and de novo analysis of the hemocytes transcriptome in *Litopenaeus vannamei* response to white spot syndrome virus infection. **Plos One**, v.8. 2013.

YANG, F. et al.. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. **Journal of Virology**, v. 75, p. 11811-11821. 2001.

YI, G. et al.. VP28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration into shrimp cells. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, p. 26-34. 2004.

ZHAN, W. B. et al. White spot syndrome infection of cultured shrimp in China. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.10, p.405–410. 1998.

ZHU, F.; ZHANG, X. Protection of shrimp against white spot syndrome virus with b-1,3-D-glucan-encapsulated vp28-siRNA particles. **Journal of Marine Biotechnology**, p. 1-6. 2011.

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

WANG Z. et al.. RING-H2 protein WSSV249 from white spot syndrome virus sequesters a shrimp ubiquitin-conjugating enzyme, PvUbc, for viral pathogenesis. **Journal of Virology**. v. 79, p. 64–72. 2005

WANG, X. H. et al. RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. **Science**, p. 312:452. 2006

WONGPRASERT, K. et al.. Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white spot syndrome virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, v 55, p.3-10. 2003.