

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

PROSPECÇÃO DE GENES RELACIONADOS COM O CRESCIMENTO  
DO CAMARÃO-ROSA *Farfantepenaeus paulensis*

MICHEL TOTH KAMIMURA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aqüicultura no Programa de Pós-graduação em Aqüicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Marins

Co-orientador: Prof. Dr. Ronaldo O. Cavalli

Rio Grande – RS

Março de 2005

## Agradecimentos

O agradecimento mais importante é para toda minha família, meus irmãos e irmãs, Mansuke, Esperança, Gengis, Raika, Natascia, Hitty, Hanay e Kaysuke, à super-mãe de todos, Mary Márcia, e em especial para meu admirável pai, um exemplo de pessoa e excelente profissional;

Sou muito grato também ao meu orientador, Luf, pela força, parceria, paciência, e por tudo o que aprendi sobre biologia molecular;

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica Marinha ou adjacentes, Karina, Dani, Fred, Márcio, Liane, Juliana, Nino, Jesus, Ana Lupe, José e Laura, pela amizade e por acompanharem passo a passo os trabalhos de todos, é um grande prazer trabalhar com um grupo assim!

Aos pesquisadores que ajudaram no seqüenciamento das amostras na PUC, Prof. Jomar e Cladinara;

Ao CNPq, FAPERGS e FURG, pelo financiamento do projeto, bolsa e oportunidade de estudo;

Aos colegas, professores e funcionários da EMA, que ajudaram ou não no trabalho, mas lotaram a sala na defesa da dissertação;

Aos professores que aceitaram participar da banca examinadora, Prof. Pedro Galetti que veio de São Carlos e o Prof. Ronaldo, co-orientador do trabalho;

Ao meu irmão Gengis e Anna, esse casal super simpático e prestativo, pela boa vontade e tudo mais...

Aos grandes amigos e amigas, pelas partidas de xadrez com alguns, sushi-fest com outros, e inestimáveis amizades com todos, Caico, Cristina Sun (Kuris), Alexandre (Ximbika) e Marina, Sheila, Fabinho e família, Alexandre Garcia, Sensei Gonzalo, João (John), Collin, Tagor e Maria Helena, Seego, Guilherme Alemão, galera da Holmes, e todos os que não vou citar porque faltaria espaço...

E um beijo especial para Simone!

## ÍNDICE

RESUMO GERAL.....	iv
ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS.....	5
CAPÍTULO I: Crescimento do camarão-rosa <i>Farfantepenaeus paulensis</i> cultivado em diferentes salinidades .....	9
Resumo.....	11
Introdução.....	12
Material e Métodos.....	13
Resultados.....	13
Discussão.....	15
Conclusão.....	20
Referências.....	21
CAPÍTULO II: Prospecção de genes relacionados com o crescimento no camarão-rosa <i>Farfantepenaeus paulensis</i> .....	27
Resumo.....	29
Introdução.....	30
Material e Métodos.....	31
Resultados.....	34
Discussão.....	37
Conclusão.....	38
Referências.....	42
CONCLUSÃO GERAL.....	48
ANEXOS.....	49

## Resumo Geral

Na primeira etapa deste estudo, foram realizados experimentos para avaliar o crescimento e sobrevivência de camarões nativos do sul do Brasil, da espécie *Farfantepenaeus paulensis*, cultivados em diferentes salinidades. Para isso, grupos de 200 PL47 (pós-larvas com idade de 47 dias), com peso inicial médio ( $\pm$ DP) de 0,022 g ( $\pm$ 0,008), produzidas na Estação Marinha de Aquacultura (FURG) foram cultivadas durante 60 dias em gaiolas (1m<sup>3</sup>) suspensas em dois tanques com 20.000 L de água, nas salinidades 5 e 30. Os níveis de salinidade foram considerados diferentes tratamentos, os quais contaram com três repetições cada. Os camarões foram alimentados *ad libitum*, com uma ração comercial fornecida duas vezes ao dia em bandejas. As médias ( $\pm$ DP) de temperatura, pH, oxigênio dissolvido e amônia total (N-AT) foram 25,5°C ( $\pm$ 1,9); 8,07 ( $\pm$ 0,13); 5,16 mg/L ( $\pm$ 1,07) e 0,042 mg/L ( $\pm$ 0,013), respectivamente, sendo estes valores considerados aceitáveis para esta espécie. Ao final do experimento, os camarões foram contados e pesados, apresentando uma sobrevivência média, para ambos tratamentos, de 97%. Os resultados obtidos demonstraram um peso final significativamente maior ( $P < 0,05$ , ANOVA seguida pelo teste de Tukey) dos camarões aclimatados na salinidade mais baixa, com médias ( $\pm$ DP) de peso final iguais a 1,08 g ( $\pm$ 0,3) e 0,62 g ( $\pm$ 0,15) na salinidade 30. Estes resultados provavelmente refletem a ação de genes induzidos pela baixa salinidade que também têm efeito sobre o crescimento. Dando prosseguimento ao trabalho, os cinco camarões mais leves e os cinco mais pesados de cada repetição foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido para a etapa posterior. Na segunda fase deste trabalho, foi realizado um estudo de prospecção gênica utilizando os organismos que apresentaram um crescimento diferenciado, com o objetivo de identificar genes relacionados com o processo de crescimento e tolerância à salinidade. O método testado foi uma adaptação da técnica usual de análise da expressão diferencial de genes, através da transcrição reversa do RNA total seguida pela reação em cadeia da polimerase (DDRT-PCR). Utilizando-se os tecidos criopreservados dos camarões, foi extraído o RNA total e produzidos os respectivos DNAs complementares (cDNAs). A partir da comparação entre os genes transcritos nas duas classes de tamanho, foram identificados genes com expressão diferencial na comparação entre indivíduos grandes e pequenos. Dois destes genes, até então desconhecidos para o camarão-rosa (ciclofilina e hemocianina), foram isolados, clonados, sequenciados e comparados com genes de

outras espécies armazenados no Banco Mundial de genes (Genbank). Os resultados obtidos neste estudo demonstram a viabilidade da metodologia utilizada na identificação de genes relacionados com características importantes para a aqüicultura.

## Abstract

This work evaluated growth and survival of a native penaeid shrimp reared in different salinities. Groups of 200 PL47 (post-larvae with 47 days old) of *Farfantepenaeus paulensis* with average initial weight ( $\pm$ SD) of 0,022 g ( $\pm$ 0,008), produced at Estação Marinha de Aquicultura of Fundação Universidade Federal do Rio Grande - Brazil, were cultivated along 60 days in 1m<sup>3</sup> cages inside two tanks of 20.000 L, with salinities 5 and 30. Salinity levels were considered different treatments, with three replicates each. Shrimps were fed *ad libitum* in trays, with a commercial diet supplied two times at day. Averages ( $\pm$ SD) of temperature, pH, dissolved oxygen and total ammonia (TAN; NH<sub>4</sub> - + NH<sub>3</sub>) were 25,5 ( $\pm$ 1,9); 8,07 ( $\pm$ 0,13); 5,16 mg/L ( $\pm$ 1,07) and 0,042 mg/L ( $\pm$ 0,013), respectively, values considered acceptable for the species. At the end of experiment, individually counted shrimps were weighed, presenting a survival of 97% for both treatments. Results demonstrated a significant increase of weight (ANOVA;  $P < 0,05$ ) of the shrimps acclimated in low salinity, with averages ( $\pm$ SD) of final weight 1,08 g ( $\pm$ 0,3), and 0,62 g ( $\pm$ 0,15) in high salinity. These results probably reflect the action of genes induced by low salinity that also have an effect on growth. Continuing the work, five lighter and five heavier shrimps of each replicate were immediately frozen in liquid nitrogen. In the second phase, a study of gene prospection was carried out using animals that presented differentiated growth, with objective of identifying genes related with the processes of growth and salinity tolerance. An adapted method of differential display reverse transcriptase - polimerase chain reaction (DDRT-PCR) was used. From criopreserved tissues of shrimps, total RNA was extracted and complementary DNA produced (cDNA). From the comparison between transcribed genes of large and small size classes animals, differential expressed genes were identified. Two of these genes, ciclophilin and hemocyanin, unknown for the pink shrimp, were isolated, cloned, sequenced and compared with genes of other species in GenBank. Results demonstrated the viability of the methodology used to identify genes with important traces to aquaculture.

## Introdução Geral

A aqüicultura tem se desenvolvido com sucesso no Brasil, e a produção de camarões tem se destacado. Segundo dados da Associação Brasileira de Criadores de Camarões (ABCC), a produção nacional foi de 91.000 toneladas no ano de 2003, posicionando-se entre os maiores produtores mundiais (<http://www.sfiec.org.br/fiec- hoje/maio2004/10/noticia22.htm>). Entretanto, esta produção tem a região Nordeste como principal produtor, com 96% da produção nacional e baseia-se exclusivamente na espécie exótica *Litopenaeus vannamei*. Além das vantagens de se possuir um considerável conhecimento a respeito da biologia e metodologia de cultivo, esta espécie terá seu genoma sequenciado por pesquisadores de uma rede de laboratórios no Brasil (<http://www.shrimp.ufscar.br>).

Por outro lado, apresenta-se o camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967), um peneídeo marinho abundante em águas subtropicais do Atlântico Sul, que pode ser considerado uma interessante proposta para o cultivo de uma espécie nativa do Brasil (D'Incao, 1991; Wasielesky, 2000; Wasielesky *et al.*, 2002). Esta espécie tem sido alvo de constantes pesquisas na Estação Marinha de Aquicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande – FURG, podendo representar uma importante atividade para populações de pescadores artesanais que apresentam baixa capacidade de investimento no país (Wasielesky, 1999; Vaz *et al.*, 2004). Os resultados encontrados em trabalhos utilizando este peneídeo, têm demonstrado o potencial da espécie como uma alternativa viável de cultivo. Para citar alguns exemplos, foram realizados estudos avaliando os efeitos de parâmetros físico-químicos no crescimento e sobrevivência de pós-larvas (Corleto *et al.*, 1993; Wasielesky, 2000; Tsuzuki *et al.*, 2003), efeitos tóxicos de produtos nitrogenados (Ostrensky e Wasielesky, 1995; Cavalli *et al.*, 1996; Cavalli *et al.*, 1998), estudos com densidades de estocagem (Speck *et al.*, 1993; Cavalli *et al.*, 2003), avaliação da alimentação utilizando microorganismos, resíduos de pescado e ração comercial (Thompson *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2000; Domingos, 2001; Thompson *et al.*, 2002), composição da fauna invertebrada bentônica nos cercados de cultivo e o impacto do cultivo nas comunidades bentônicas adjacentes (Poersch *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2004) e a análise das alterações no teor da matéria orgânica no sedimento decorrente do cultivo em cercados (Esteves *et al.*, 1999), são alguns exemplos dos diferentes estudos desenvolvidos para a espécie. Além disso,

comparações entre as performances reprodutivas de matrizes selvagens e de cativeiro (Cavalli *et al.*, 1997; Peixoto *et al.*, 2003a), experimentos com inseminação artificial e estudos relacionados com a maturação nos ovários, têm permitido consideráveis avanços no conhecimento da biologia reprodutiva desta espécie (Peixoto *et al.*, 2003b; Peixoto *et al.*, 2004). Finalmente, a metodologia desenvolvida para a larvicultura está sob controle e a espécie é o alvo no projeto de cultivo de camarões marinhos nativos em gaiolas, cercados e viveiros na região sul do Brasil (Wasielesky *et al.*, 1995; Wasielesky, 1999; Wasielesky *et al.*, 2002).

Embora estes avanços no conhecimento da biologia reprodutiva do camarão-rosa estejam permitindo o desenvolvimento de tecnologias de cultivo com resultados promissores para esta espécie, fica evidente também a necessidade do investimento em projetos de pesquisa que focalizem o desenvolvimento paralelo de programas de melhoramento genético. Programas deste tipo podem permitir a identificação de marcadores moleculares ou genes relacionados com características comercialmente importantes, assim como possibilitar o estudo da variabilidade genética como uma ferramenta importante para a seleção geneticamente assistida de reprodutores, inferindo sobre questões como níveis de endogamia e heterozigosidade dentro das unidades de cultivo. No caso deste estudo, investiga-se a possibilidade do aumento da produtividade deste camarão em relação às suas taxas de crescimento, especialmente em condições estressantes de salinidade, que afetam de maneira significativa a produtividade deste crustáceo em cultivo (Tsuzuki *et al.*, 2000; Wasielesky *et al.*, 2003).

O crescimento em crustáceos pode ser expresso como um processo intermitente centralizado na ecdise, ou seja, quando o exoesqueleto antigo é liberado, o volume corporal aumenta devido à incorporação de água. A regulação do crescimento muscular neste momento é um processo complexo envolvendo um controle refinado entre a síntese protéica muscular e as taxas de degradação. Embora os fatores responsáveis por esta regulação não tenham sido ainda determinados, os mecanismos que regulam este processo aparentam ser tecido-específicos, envolvendo uma combinação de processamento transducional e regulação transcricional que podem variar de espécie para espécie (Whiteley e El Haj, 1997). Hormônios ecdisteróides têm sido implicados no controle cíclico do crescimento tissular durante a muda, os quais provavelmente desencadeiam respostas intracelulares em cascata de uma série de genes envolvidos

neste processo (Koelle *et al.*, 1991). Existem várias técnicas utilizadas atualmente para determinar estes perfis de expressão gênica e para identificar genes expressos diferencialmente sob condições específicas. Para este estudo, foi escolhido uma das metodologias mais utilizadas atualmente, por sua relação custo-benefício favorável, o método da expressão diferencial de genes identificados pela reação em cadeia da polimerase a partir da transcrição reversa do ácido ribonucleico total (RNA total) (DDRT-PCR ou *differential display reverse transcriptase - polimerase chain reaction*). Esta metodologia foi descrita pela primeira vez por Liang e Pardee (1992), com a intenção de prover uma ferramenta efetiva para detectar espécies de RNA individuais que são expressos diferencialmente em distintos tipos de células eucarióticas, e então permitir recuperar e clonar os ácidos desoxirribonucleicos complementares (cDNAs) correspondentes. Este método pode ser usado para identificação de qualquer gene expresso diferencialmente (Kuhn, 2001), e permite a determinação de perfis de transcrição com base qualitativa ou semi-quantitativa (Rahmanm *et al.*, 2003). Desde sua introdução, centenas de aplicações tem sido descritas utilizando a DDRT-PCR. Assim sendo, aplicou-se esta metodologia com algumas adaptações do método original em camarões cultivados em diferentes salinidades, com o objetivo de obter de organismos com tamanho diferenciado, e a posterior identificação dos genes de interesse, que possam estar relacionados com o crescimento.

Para isto, considerando-se que a dissertação está sendo apresentada na forma de trabalho científico, dividiu-se o estudo em dois capítulos. No primeiro capítulo, apresentam-se os resultados de crescimento e sobrevivência obtidos durante a fase de cultivo, na qual os camarões foram submetidos ao crescimento em diferentes salinidades. De acordo com estudos publicados sobre a preferência de pós-larvas e juvenis de peneídeos de várias espécies por águas rasas com baixas salinidades (Mair, 1980; Aziz e Greenwood, 1981; Dall, 1981; Preston, 1985), escolheu-se um tratamento com a salinidade 5, semelhante ao ambiente estuarino, e comparou-se com outro grupo cultivado na salinidade 30, aproximadamente igual à condição marinha de onde provêm as pós-larvas do ambiente natural (D’Incao, 1991). Ao final desta etapa, foram pesados individualmente todos os camarões, selecionados os maiores e os menores de cada repetição dos dois tratamentos, e congelados em nitrogênio líquido, para a fase posterior de análise genética.

No segundo capítulo, foi testada a metodologia de prospecção gênica, baseada na técnica de DDRT-PCR. Com essa finalidade, foram extraídos o RNA total dos camarões selecionados e produzidos os respectivos cDNAs por RT-PCR. Utilizando-se *primers* arbitrários, foram investigados os genes que estavam se expressando diferencialmente nos camarões maiores, menores ou entre os tratamentos de salinidades alta e baixa. Os genes considerados potencialmente interessantes, por estarem se expressando nos camarões maiores e não nos menores, foram separados, analisados e discutidos.

As seqüências parciais obtidas destes genes estão disponíveis no Banco Mundial de Genes (GenBank), e poderão ser usadas como marcadores moleculares em estudos futuros, permitindo uma aplicação prática de seleção geneticamente assistida, como por exemplo, analisar o genoma dos reprodutores que são capturados a cada ano. Identificando-se as matrizes que possuem genes ou seus alelos mais eficientes para as condições de cultivo, será possível avaliar e comparar a performance de qualquer matriz reprodutora selvagem com os reprodutores selecionados (Preston *et al.*, 2004). Como consequência de um estudo deste nível, surgiria a criação e manutenção de linhagens progenitoras, geneticamente segregadas para resistência em condições fisiológicas estressantes (Lemaire *et al.*, 2002). Este tipo de estudo será interessante para a região do estuário da Lagoa dos Patos, por ser a área na qual se desenvolve grande parte dos experimentos da Estação Marinha de Aquicultura (FURG). Pode ser considerado também, uma aproximação entre a pesquisa na Universidade e as famílias de pescadores locais, estreitando a relação entre a pesquisa na área de biotecnologia que acontece dentro dos laboratórios, e a aplicação social junto à comunidade carente local.

## Referências

- Aziz, K.A., Greenwood, J.G., 1981. A Laboratory Investigation Of Temperature and Salinity Tolerances Of Juvenile *Metapenaeus bennettiae* Racek e Dall (Crustacea : Penaeidae). J. Exp. Mar. Biol. Ecol vol. 54, 137- 147.
- Cavalli, R. O., Wasielesky, W.J., Franco C. S., Filho, K.M., 1996. Evaluation of the short-term toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to *Penaeus paulensis* (crustacea, decapoda) broodstock. Arq. Biol. Tecnol. 39(3), 567-575.
- Cavalli, R.O., Scardua, M.P., Wasielesky Jr., W., 1997. Reproductive performance of different sized wild and pond-reared *Penaeus paulensis* females. Journal Of The World Aquaculture Society 28 (3), 260-267.
- Cavalli, R.O., Peixoto, S., Wasielesky, W., 1998. Performance of *Penaeus paulensis* (Perez-Farfante) broodstock under long term exposure to ammonia. Aquaculture Research 29 (11), 815-822.
- Cavalli, R.O., Wasielesky, W., Peixoto, S., Santos, M.H.S., 2003. Estimating the best stocking density for the culture of *Farfantepenaeus paulensis* in pen enclosures. World Aquaculture Society Annual Meeting, Salvador, Brasil.
- Corleto, F. , Cavalli, R. O., Marchiori, M. A. 1993. Crescimento de pós-larvas de *Penaeus paulensis*, Pérez- Farfante, 1967, em diferentes salinidades. Anais do IV Encontro Rio-Grandense de Técnicos em Aqüicultura, 13-23.
- Dall., 1981. Osmoregulatory Ability And Juvenile Habitat Preference In Some Penaeid Prawns. J. exp. mar. Biol. Ecol. 54, 55-64.
- D’Incao, F., 1991. Pesca e biologia de *Penaeus paulensis* na Lagoa dos Patos, RS. Atlântica 13, 159-169.
- Domingos, J.A.S., Santos, M.H.S., Wasielesky, W., 2001. Cultivo do camarão rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda: Penaeidae) em gaiolas utilizando como alimentos ração comercial e resíduos de pescado preservados em sal. Anais do Simpósio Brasileiro de Aqüicultura, Florianópolis, Brasil.
- Esteves, L.S., Wasielesky, W., Lima, L.G., 1999. Alterações no teor de matéria orgânica nos sedimentos do estuário da Lagoa dos Patos decorrentes do cultivo de camarão em cercados. Livro de resumos da XII Semana Nacional de Oceanografia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

- Koelle, M.R., Talbot, W.S., Segraves, W.A., Bender, M.T., Cherbas, P., Hogness, D.S., 1991. The *Drosophila* EcR Gene Encodes An Ecdysone Receptor, A New Member Of The Steroid-Receptor Superfamily. *Cell* 67 (1), 59-77.
- Kuhn, E. 2001. From Library Screening to Microarray technology: Strategies to determine gene expression profiles and to identify differentially regulated genes in plants. *Annals of Botany* 87, 139-155.
- Lemaire, P., Bernard, E., Martinez-Paz, L.P., Chim, L., 2002. Combined effect of temperature and salinity on osmoregulation of juvenile and subadult *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 209 (1-4), 307-317.
- Liang, P.; Pardee, A. B. 1992. Differential display of eucaryotic messenger RNA by means of the polimerase chain reaction. *Science* 257, 967-971.
- Mair, J., 1980. Salinity and Water-Type Preferences of Four Species of Post-Larval Shrimp (*Penaeus*) From West Mexico. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 45 (1), 69-82.
- Ostrensky, A., Wasielesky, W.J. 1995. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the São Paulo shrimp, *Penaeus paulensis*, Pérez-Farfante, 1967. *Aquaculture*, 132, 339-347.
- Peixoto, S., Wasielesky, W., D'Incao, F., Cavalli, R.O., 2003a. Comparison of the reproductive performance of similarly-sized wild and captive *Farfantepenaeus paulensis*. *Journal Of The World Aquaculture Society* 34 (1), 50-56.
- Peixoto, S., Cavalli, R.O., D'Incao, F., Milach, A.M., Wasielesky, W., 2003b. Ovarian maturation of wild *Farfantepenaeus paulensis* in relation to histological and visual changes. *Aquaculture Research* 34 (14), 1255-1260.
- Peixoto, S., Cavalli, R.O., Krummenauer, D., Wasielesky, W., D'Incao, F., 2004. Influence of artificial insemination on the reproductive performance of *Farfantepenaeus paulensis* in conventional and unisex maturation systems. *Aquaculture* 230, 197-204.
- Poersch, L., Wasielesky, W., Cavalli, R.O., Castello, J.P., 2003. Culture of *Farfantepenaeus paulensis* in pen enclosures: impact on the surrounding benthic community. *World Aquaculture Society Annual Meeting, Salvador, Brasil.*
- Preston, N., 1985. The Combined Effects of Temperature and Salinity on Hatching Success and the Survival, Growth, and Development of the Larval Stages of *Metapenaeus Bennettae* (Racek e Dall). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 85, 57-14.

- Preston, N.P., Crocos, P.J., Keys, S.J., Coman, G.J., Koenig, R., 2004. Comparative growth of selected and non-selected Kuruma shrimp *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* in commercial farm ponds: implications for broodstock production. *Aquaculture* 231, 73–82.
- Rahman, M.M., Vandingenen, A., Begum, M., Breuer, M., De Loof, A., Huybrecht, R., 2003. Search for phase specific genes in the brain of desert locust *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) by differential display polymerase chain reaction. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 135(2), 221-8.
- Santos, M.H.S., Santos E.A., Wasielesky, W., 2000. Avaliação do emprego de resíduos de pescado, espécies rejeitadas e ração comercial em sistemas alternativos de cultivo do *Farfantepenaeus paulensis*, no extremo sul do Brasil. Anais do XI Simpósio Brasileiro de Aqüicultura. Florianópolis, Brasil.
- Soares, R., Peixoto, S., Bemvenuti, C., Wasielesky, W., D'Incao, F., Murcia, N., Suita, S., 2004. Composition and abundance of invertebrate benthic fauna in *Farfantepenaeus paulensis* culture pens (Patos Lagoon estuary, Southern Brazil). *Aquaculture* 239 (1-4), 199-215.
- Speck, R. C., Cavalli, R. O., Marchiori, M. A. 1993. Efeito da densidades de estocagem do camarão rosa *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967, em sistema de berçário. Anais do I Congresso Brasileiro de Aqüicultura, 369-384.
- Thompson, F.L., Abreu, P.C., Cavalli, R., 1999. The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae. *Aquaculture* 174 (1-2), 139-153.
- Thompson, F.L., Abreu, P.C., Wasielesky, W., 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture* 203 (3-4), 263-278.
- Tsuzuki, M.Y., Cavalli, R.O., Bianchini, A., 2000. The effects of temperature, age, and acclimation to salinity on the survival of *Farfantepenaeus paulensis* postlarvae *Journal Of The World Aquaculture Society* 31 (3), 459-468.
- Tsuzuki, M.Y., Cavalli, R.O., Bianchini, A., 2003. Effect of salinity on survival, growth, and oxygen consumption of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Perez-Farfante 1967). *Journal of Shellfish Research* 22 (2), 555-559.

- Vaz, L.J., Wasielesky, W., Cavalli, R.O., Peixoto, S., Santos, M.H.S., Ballester, E., 2004. Growth and survival of pink shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*) postlarvae in cages and pen enclosures. *Scientia Agricola* 61 (3), 332-335.
- Whiteley, N.M., El Haj, A.J., 1997. Regulation of muscle gene expression over the moult in crustacea. *Comparative Biochemistry And Physiology B-Biochemistry e Molecular Biology* 117 (3), 323-331.
- Wasielesky, W., Cavalli, R.O., Dolci, D., Silva, T.M.A., 1995. Crescimento do camarão rosa *Penaeus paulensis* (Crustacea: Decapoda) cultivado em gaiolas e cercados no estuário da Lagoa dos Patos, RS, Brasil. *Anais do III Encontro Sul Brasileiro de Aqüicultura*, Ibirubá, RS. Ed. da Universidade, UFRGS, 14-25.
- Wasielesky, W., 1999. Produção do camarão marinho *Penaeus paulensis* no sul do Brasil: cultivo em estruturas alternativas. *Oceanos: Fonte de Alimentos*. Publicação da Fundação Roberto Marinho, Gerdau e CNPq, XV Prêmio Jovem Cientista, Brasília, Brasil.
- Wasielesky, W.J. 2000. Cultivo de juvenis do camarão rosa, *Farfantepenaeus paulensis*, (Decapoda:Penaeidae) no estuário da Lagoa dos Patos: Efeitos de parâmetros ambientais e manejo de cultivo. Tese de doutorado em Oceanografia Biológica, FURG, Rio Grande, RS.
- Wasielesky, W., Peixoto, S., Santos, M.H.S., Cavalli, R.O., 2002. Cultivo do camarão rosa como alternativa de geração de renda. *Extensão Universitária: Ação Comunitária em Universidades Brasileiras*. Olho d'Água, São Paulo, Brasil, 17-27.
- Wasielesky, W., Bianchini, A., Sanchez, C.C., Poersch, L.H., 2003. The effect of temperature, salinity and nitrogen products on food consumption of pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Brazilian Archives Of Biology And Technology* 46 (1), 135-141.

## Capítulo I

### **Crescimento do camarão-rosa Farfantepenaeus paulensis cultivado em diferentes salinidades**

Normas de acordo com a revista *Aquaculture*

**Crescimento do camarão-rosa Farfantepenaeus paulensis  
cultivado em diferentes salinidades**

Michel Toth Kamimura<sup>a</sup>, Karina M. Meier<sup>a,b</sup>, Ronaldo O. Cavalli<sup>c</sup>;  
Luis Fernando Marins<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup>Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Rio Grande, RS - BR

<sup>b</sup>Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Dep. de Química, Lab. de Bioquímica Marinha, Rio Grande, RS - BR

<sup>c</sup>Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Oceanografia, Rio Grande, RS - BR

<sup>d</sup>Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Ciências Fisiológicas, Rio Grande, RS - BR

\* Autor para correspondência: Fax: 55 53 2336850. Endereço eletrônico: dqmluf@furg.br

## Resumo

Grupos de 200 pós-larvas (PL47) de Farfantepenaeus paulensis, com peso inicial médio ( $\pm$ DP) de 0,022 g ( $\pm$ 0,008) produzidas na Estação Marinha de Aquacultura - FURG, foram cultivadas durante 60 dias em gaiolas ( $1\text{m}^3$ ) suspensas em dois tanques com 20.000 L de água nas salinidades 5 e 30. Os níveis de salinidade foram considerados diferentes tratamentos, os quais contaram com três repetições cada. Os camarões foram alimentados ad libitum com uma ração comercial fornecida duas vezes ao dia em bandejas. No tanque com salinidade 5, as médias ( $\pm$ DP) de temperatura, oxigênio dissolvido, amônia total (N-AT) e pH foram iguais a 24,90°C ( $\pm$ 1,55), 5,31 mg/L ( $\pm$ 1,16), 0,04 mg/L ( $\pm$ 0,00) e 8,13 ( $\pm$ 0,15), respectivamente. No tanque com salinidade 30, os mesmos parâmetros medidos foram iguais a 25,63 °C ( $\pm$ 1,60), 5,0 mg/L ( $\pm$ 1,02), 0,045 mg/L ( $\pm$ 0,019) e 8,04 ( $\pm$ 0,09), respectivamente, sendo os valores encontrados nos dois tanques de cultivo considerados aceitáveis para esta espécie. Ao final do experimento, os camarões foram contados e pesados, apresentando uma sobrevivência média de 97% para ambos tratamentos. Os resultados obtidos demonstraram um peso final significativamente maior ( $P < 0,05$ , ANOVA seguida pelo teste de Tukey) dos camarões aclimatados na salinidade 5 em relação aos cultivados em salinidade 30, com médias ( $\pm$ DP) de peso final iguais a 1,08 g ( $\pm$ 0,3) e 0,62 g ( $\pm$ 0,15), respectivamente. Estas diferenças encontradas no peso final dos camarões, provavelmente refletem a ação de genes induzidos pela baixa salinidade que também têm efeito sobre o crescimento.

Palavras-chave: camarão peneídeo; Farfantepenaeus paulensis; efeito da salinidade; osmoregulação; crescimento; multi-funcionalidade de genes.

## 1. Introdução

As pós-larvas de camarões peneídeos normalmente migram para regiões costeiras em busca de águas estuarinas rasas e com baixa salinidade (Mair, 1980; Preston, 1985; Dall, 1990). Vários autores, investigando espécies de peneídeos, constataram uma maior capacidade osmorregulatória e de adaptação às flutuações de salinidade (Aziz e Greenwood, 1981; Rothlisberg, 1998; Kumlu et al., 2001; Pérez-Castañeda e Defeo, 2005), provavelmente devido a uma característica geneticamente programada de eurihalinidade antes de atingirem a fase adulta (Dall, 1981).

O camarão-rosa Farfantepenaeus paulensis (Pérez-Farfante, 1967) é um peneídeo que apresenta essa característica, apesar de depender da pluviosidade e do regime de ventos para entrar no estuário da Lagoa dos Patos, RS, durante a fase de pós-larva (D’Incao, 1991). É uma espécie que se distribui desde o nordeste do Brasil (14°S), até o nordeste da Argentina (38°S) (D’Incao, 1995). Apresenta-se em maiores concentrações próximo de regiões estuarinas, pois desenvolve-se até o estágio pré-adulto do seu ciclo de vida nesses ambientes, como relatado para o estuário da Lagoa dos Patos no sul do Brasil (D’Incao, 1991; Soares, 1999). Há mais de 10 anos esta espécie vem sendo estudada por pesquisadores no sul do Brasil, resultando no desenvolvimento de um projeto direcionado para o cultivo desta espécie de camarão marinho, na Estação Marinha de Aquacultura da Universidade Federal do Rio Grande - FURG (Wasielesky et al., 2003). A importância desta atividade gerou o desenvolvimento de um “pacote tecnológico” de cultivo, como uma atividade alternativa para populações de pescadores artesanais que apresentam baixa capacidade de investimento (Wasielesky, 2000).

Objetivando-se complementar essas tecnologias de cultivo, buscando otimizar a produção em biomassa desta espécie, investigou-se o crescimento dos camarões em diferentes salinidades, alta e baixa. Este cultivo foi realizado durante a fase juvenil, que se estende, usualmente, do primeiro ao sexto mês de vida para peneídeos (Dall, 1990). Para isto, foram cultivados um número significativo de camarões, de modo que se pudesse selecionar individualmente os organismos por classe de peso no final do experimento.

## 2. Material e Métodos

As pós-larvas utilizadas neste trabalho foram produzidas na Estação Marinha de Aquicultura (FURG), a partir de reprodutores selvagens de F. paulensis coletados no litoral sul do Brasil. Grupos de 200 pós-larvas (PL47), com peso inicial médio ( $\pm$ DP) de 0,022 g ( $\pm$ 0,008), foram cultivadas durante 60 dias em gaiolas com 1m<sup>3</sup> cada, suspensas em dois tanques com 20.000 L de água, nas salinidades 5 e 30. A larvicultura é realizada normalmente em salinidade 30, desta forma, as pós-larvas que foram submetidas ao tratamento com salinidade 5 foram gradualmente aclimatadas. A diluição é realizada misturando-se água doce, reduzindo-se 5 unidades da salinidade por dia, até atingir a concentração 15, depois é reduzida 2 unidades por dia até chegar na salinidade 5. Os dois níveis de salinidade foram considerados diferentes tratamentos, os quais contaram com três repetições cada. Os camarões foram alimentados ad libitum, com uma ração comercial para camarão fornecida duas vezes ao dia em bandejas. Durante o cultivo, manteve-se a salinidade e aeração constante nos tanques, com fotoperíodo natural de verão (14 horas claro, 10 horas escuro). Foram medidos os parâmetros físico-químicos de salinidade, temperatura, pH, oxigênio dissolvido e amônia total. A salinidade foi medida usando-se um refratômetro ótico com precisão de 1 ppm, e a amônia total (N-AT) dosada segundo o método da UNESCO (1983). Ao final desta etapa, os camarões foram contados, pesados individualmente, e calculada a sobrevivência para cada gaiola a partir dos camarões remanescentes. A análise dos parâmetros físico-químicos e dados de peso dos camarões, foi feita através da análise de variância (ANOVA) utilizando o software Statistica® v. 5.0. No caso das diferenças significativas entre as médias, seguiu-se o teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

## 3. Resultados

No tanque com salinidade 5, as médias ( $\pm$ DP) de temperatura, oxigênio dissolvido e percentual de saturação, amônia total (N-AT) e pH foram iguais a 24,92 °C ( $\pm$ 1,53); 5,31 mg/L ( $\pm$ 1,16); 62 %; 0,04 mg/L ( $\pm$ 0,00) e 8,15 ( $\pm$ 0,15), respectivamente. No tanque com salinidade 30, os mesmos parâmetros apresentaram médias ( $\pm$ DP) iguais a 25,88 °C ( $\pm$ 2,66); 5,0 mg/L ( $\pm$ 1,02); 59%; 0,045 mg/L ( $\pm$ 0,019) e 8,03 ( $\pm$ 0,09), respectivamente

(Tabela 1). Os parâmetros físico-químicos analisados não apresentaram diferenças significantes entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ) (Tabela 1).

Ao final do experimento, os camarões foram contados e pesados, apresentando uma sobrevivência média, para ambos tratamentos, de 97% (Tabela 2). As médias ( $\pm$ DP) de peso final dos camarões cultivados na salinidade 5 e 30, foram iguais a 1,08 g ( $\pm$ 0,3) e 0,62 g ( $\pm$ 0,15), respectivamente, e apresentaram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) (Tabela 2).

Tabela 1

Médias ( $\pm$ DP) de salinidade, temperatura ( $^{\circ}$ C), oxigênio dissolvido (OD em mg/L), percentual de saturação (%), nitrogênio total na forma amoniacal (N-AT, mg/L) e pH durante os 60 dias de cultivo do camarão Farfantepenaeus paulensis. Entre os tratamentos, as variáveis físico-químicas não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ).

Parâmetros	Salinidade 5	Salinidade 30
Temperatura ( $^{\circ}$ C)	24,90 ( $\pm$ 1,55)	25,63 ( $\pm$ 1,60)
OD (mg/L)	5,31 ( $\pm$ 1,16)	5,0 ( $\pm$ 1,02)
OD (% sat.)	62,42 ( $\pm$ 13,30)	59,42 ( $\pm$ 11,66)
N-AT (mg/L)	0,04 ( $\pm$ 0,000)	0,045 ( $\pm$ 0,019)
PH	8,13 ( $\pm$ 0,15)	8,04 ( $\pm$ 0,09)

Tabela 2

Médias de peso ( $\pm$ DP) inicial, final e percentual de sobrevivência dos camarões Farfantepenaeus paulensis cultivados durante 60 dias. Para cada tratamento, as diferentes letras sobrescritas indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

	Salinidade 5	Salinidade 30
Peso inicial (g)	0,022 ( $\pm$ 0,008) <sup>a</sup>	0,022 ( $\pm$ 0,008) <sup>a</sup>
Peso final (g)	1,08 g ( $\pm$ 0,3) <sup>a</sup>	0,62 g ( $\pm$ 0,15) <sup>b</sup>
Sobrevivência (%)	97,2 ( $\pm$ 2,5) <sup>a</sup>	97,2 ( $\pm$ 4,9) <sup>a</sup>

#### 4. Discussão

A salinidade manteve-se constante dentro dos tanques, provavelmente pelo grande volume utilizado (20.000 L), não interferindo no crescimento dos camarões entre as repetições, dentro de cada tratamento. Entretanto, os resultados de crescimento obtidos demonstram uma diferença significativa no peso final dos camarões cultivados na salinidade 5 em relação aos que cresceram na salinidade 30.

Apesar de algumas espécies, como Metapenaeus monocerus e Penaeus semisulcatus, apresentarem melhor crescimento durante a fase de berçário em salinidades consideradas altas para peneídeos (Kumlu et al., 2001; Soyel e Kumlu, 2003), isso não ocorre na maioria dos casos. O crescimento diferenciado encontrado neste trabalho está de acordo com relatos de outros autores (D’Incao, 1991; Tsuzuki, 1995; Soares, 1999), desta espécie seguir o padrão geral de peneídeos (Dall, 1990; Rothlisberg, 1998; Kumlu, 2001) ao procurarem regiões estuarinas ou lagunares para crescerem até a fase de pré-adulto (D’Incao, 1991). Isto pode ocorrer devido a atração das pós-larvas por ambientes que apresentam gradiente salino e baixa profundidade (Mair, 1980; Azis e Greenwood, 1981; Dall, 1981; Forbes e Benfield, 1986).

Sob o ponto de vista fisiológico, os camarões peneídeos necessitam de uma concentração mínima de sais na água para manter o equilíbrio osmótico no meio em que vivem. Se o meio estiver acima da concentração de seu ponto isosmótico, o organismo tenderá à hipo-regulação, ou seja, irá reter sais e perder água por difusão. Em ambientes com a salinidade abaixo de seu ponto isosmótico, teríamos o processo inverso, com o organismo tendendo a hiper-regulação, retendo água e excretando sais para evitar o acúmulo excessivo de íons em seus fluidos corporais, tendo como consequência a desidratação celular. Desta forma, o ponto isosmótico pode ser determinado quando a osmolalidade plasmática do organismo em estudo for igual à do meio (Lyzfjord et al., 2004). De acordo com essas premissas, vários autores tem determinado o ponto isosmótico de espécies interessantes para a aquacultura, visando otimizar as taxas de crescimento devido ao provável menor gasto energético no processo osmorregulatório.

No caso de peneídeos, vários estudos determinaram o ponto isosmótico de camarões em estágio juvenil. Pode-se citar como exemplos, algumas espécies de peneídeos com seus respectivos pontos isosmóticos, Farfantepenaeus brasiliensis, 25

(Brito *et al.*, 2000), *Litopenaeus vannamei*, entre 25 e 27 (Diaz *et al.*, 2001), *Penaeus merguensis*, 25 (Dall, 1981), *Fenneropenaeus chinensis*, 24,2 (Chen e Li, 1998), *Penaeus latisulcatus*, 31,73 (Sang e Fotedar, 2004), e *Farfantepenaeus paulensis*, também na fase juvenil, com ponto isosmótico igual a 22,8 (Cavalli, com. pess.). Entretanto, esta economia no gasto energético pode ser controversa durante o cultivo de peneídeos corretamente aclimatados, como no caso do presente experimento, pois com exceção de casos em que os camarões sejam expostos a mudanças bruscas de salinidade, o custo da energia gasta em osmoregulação é muito baixo, dentro de uma ampla variação de salinidade (Bishop *et al.*, 1980; Dall, 1990).

Desta forma, considerando que as pós-larvas utilizadas neste estudo foram devidamente aclimatadas antes do início do cultivo, além do gasto energético osmoregulatório provavelmente não interferir no crescimento dos organismos dos dois tratamentos, com salinidades 5 e 30, pode-se observar que o crescimento dos camarões investigados no presente estudo foi melhor na salinidade baixa. Apesar desta salinidade (5) estar mais distante do ponto isosmótico desta espécie, no estágio juvenil, do que a salinidade do outro tratamento (30), Tsuzuki (1995) encontrou resultado semelhante, utilizando pós-larvas da mesma espécie, com a mesma idade, porém em salinidade 10. Complementando estes resultados, têm-se relatado resultados economicamente interessantes, cultivando-se *Litopenaeus vannamei* em águas oligohalinas, com salinidades abaixo de 1 (Samocha, *et al.*, 1998; McGraw *et al.*, 2002; Saoud *et al.*, 2003).

A influência dos fatores ambientais, como salinidade, temperatura e vegetação aquática, somada à dependência da densidade, ou abundância no recrutamento, também é citada como uma importante força combinada que controla o crescimento e a mortalidade em quatro espécies do gênero *Farfantepenaeus* (Pérez-Castañeda e Defeo, 2005) dentro de estuários, mas provavelmente não influenciou nos resultados do presente estudo. Neste trabalho, os parâmetros físico-químicos observados estiveram dentro dos níveis considerados aceitáveis para esta espécie, com relação à salinidade (D’Incao, 1983), temperatura (Boff e Marchiori, 1984), oxigênio dissolvido (Poersch e Marchiori, 1992), pH (Santos e Marchiori, 1992) e nitrogênio na forma amoniacal (Ostrensky e Wasielesky, 1995; Cavalli *et al.*, 1996; Wasielesky, 2000). A densidade de estocagem escolhida, foi propositadamente baixa, com 200 PL’s por m<sup>3</sup> de gaiola, para

evitar altos índices de mortalidade, como já observado para esta espécie (Corleto et al., 1993; Speck et al., 1993).

Analisados os fatores que normalmente poderiam ter afetado os resultados deste estudo, será avaliado o fator mais importante e conclusivo deste trabalho, o efeito pleiotrópico que pode ser gerado pelos genes relacionados com a osmoregulação e o crescimento. Apesar deste mecanismo não ser bem conhecido para crustáceos, existem resultados interessantes, ainda que limitados, envolvendo a adaptação osmótica de peixes eurihalinos com os níveis de expressão de hormônios relacionados com o crescimento, como hormônio do crescimento (GH - *growth hormone*) e o fator de crescimento tipo-insulina I (IGF-I - *insulin-like growth factor I*), que é o principal mediador da função do GH (Inoue et al., 2002). As descobertas sobre a influência do eixo GH/IGF-I na osmoregulação de peixes teleósteos iniciou-se com estudos usando salmonídeos, contudo, esta ação fisiológica não está restrita a peixes anádromos. Tratamentos usando GH ou IGF-I aumentam a tolerância à salinidade e incrementam a atividade de enzimas branquiais de várias espécies de água-doce, como o afiossemion (*killfish*) Fundulus heteroclitus, tilápias Oreochromis mossambicus e Oreochromis niloticus e o striped bass Morone saxatilis (Mancera e McCormick, 1998).

Sakamoto et al.(1997) constataram significativas melhoras na capacidade hiposmoregulatória de ciclídeos eurihalinos, como a tilápia (Oreochromis mossambicus), que receberam injeções de GH e foram expostas à água marinha. A administração de GH também resultou na estimulação de funções imunológicas não-específicas em trutas (Oncorhynchus mykiss) aclimatadas em água marinha (Yada et al., 2001), assim como os níveis de expressão de IGF-I, que foram significativamente mais altos em exemplares do teleósteo eurihalino Cottus kazika, aclimatados em salinidade marinha do que nos peixes mantidos em seu ambiente natural, em água-doce (Inoue et al., 2002). Finalmente, com relação aos efeitos colaterais que podem ser causados pela osmoregulação em peixes, a aclimação e cultivo do peixe de água-doce, *zebrafish* (Danio rerio) em água com salinidade 5, induziu a expressão acima dos níveis normais do eixo GH/IGF-I, resultando em significativo ganho de peso corporal, comparado com os peixes controle mantidos em salinidade 0 (Almeida et al., 2005).

Em crustáceos, os fatores responsáveis pela regulação do crescimento muscular não são bem conhecidos, mas alguns neuro-hormônios tem sido implicados neste

processo. A família de genes CHH / MIH / GIH, que codificam a síntese dos hormônios hiperglicêmico de crustáceos (*crustacean hyperglycemic hormone*), inibidor da muda (*molt-inhibiting hormone*) e inibidor da gônada (*gonad inhibiting hormone*), respectivamente, representa o único grupo de neuropeptídeos originalmente identificados no pedúnculo ocular de crustáceos (Chan et al., 2003).

El Haj et al. (1996) sugerem que o hormônio ecdisteróide 20-hidroxiecdisona (20-HE) também pode atuar na síntese de proteína muscular da lagosta (Homarus americanus), incrementando o processamento ribossomal de RNAm ou diretamente na transcrição genética através da região de resposta do esteróide. Posteriormente, Whiteley e El Haj (1997) relatam que a taxa de síntese protéica de actina no músculo de lagostas é aumentada por dois fatores, o alongamento muscular passivo e a elevação dos níveis de ecdisteróides, mas sugerem que a partir da descoberta de genes responsáveis pela síntese de ecdisteróides, poderão estabelecer-se uma complexa cascata de genes envolvidos atuam no crescimento, como ocorre em insetos (Koelle, 1991). Um desses genes, o HHR3 (*Homarus hormone receptor*), responsável pela síntese de ecdisteróides, teve aumentado os níveis de expressão quando injetado *in vivo* na epiderme e nos tecidos musculares o hormônio 20-HE (El Haj et al., 1997).

Experimentos de estresse salino com esta mesma espécie estenohalina, Homarus americanus, demonstraram um aumento significativo de CHH, na hemolinfa (Chang et al., 1998). Este neuropeptídeo é citado como responsável pela regulação do metabolismo de carboidratos, muda e reprodução (Homola e Chang, 1997), assim como demonstra estar envolvido no controle neuroendócrino da osmoregulação de pós-larvas de lagostas (Charmantier et al., 2001).

Recentes observações com relação ao MIH, da família do CHH, têm considerado este neuro-hormônio uma das mais importantes chaves na mediação do crescimento e reprodução de crustáceos decápodes, pelo fato de inibir a liberação de ecdisona produzida na glândula-Y, mantendo o animal no estágio de intermuda. Ainda que as funções biológicas de hormônios produzidos fora do pedúnculo ocular não tenham sido bem elucidadas, Yodmuang et al. (2004) sugerem uma atividade biológica multifuncional do MIH, por terem encontrado a expressão deste nos gânglios torácicos de Penaeus monodon.

Um outro composto conhecido como metil farnesoato (MF - *methyl farnesoate*) possui estrutura química idêntica ao hormônio juvenil-III de insetos, e é sintetizado pelos órgãos mandibulares de crustáceos. Tem sido citado como um hormônio análogo em crustáceos, por atuar na estimulação da síntese de proteínas em geral, na promoção do ciclo da muda, na reprodução de machos e fêmeas (Homola e Chang, 1997), metamorfose (Abdu *et al.*, 1998) e comportamento (Borst *et al.*, 1995). Tamone e Chang (1993), investigando os efeitos deste mesmo hormônio, observaram que, além de ser inibido pelo hormônio inibidor dos órgãos da mandíbula (MOIH – *mandibular organ inhibiting hormone*), da família do CHH, quando injetado em exemplares de *Cancer magister*, estimula a secreção de ecdisteróides produzidos na glândula-Y, que por sua vez atuará na síntese protéica do crustáceo (Borst *et al.*, 2002). Complementando as prováveis múltiplas funções biológicas deste outro hormônio, estudos realizados com o caranguejo *Carcinus maenas* demonstraram elevações significativas nos níveis de MF na hemolinfa dos animais expostos à salinidades abaixo de seu ponto isosmótico, sugerindo que o MF pode ter uma função na osmoregulação de crustáceos (Lovett *et al.*, 2001). Adicionalmente, Lovett *et al.* (2001) sugerem que o uso de água marinha hiposmótica em relação à osmolalidade do crustáceo, pode ser usado como uma estratégia experimental para manipular os níveis de MF em crustáceos. Os resultados encontrados para este hormônio produzido fora do sistema do pedúnculo ocular dos crustáceos, é corroborado pela outra atividade do CHH. Apesar do mecanismo regulatório não ser precisamente conhecido, as evidências sugerem que o CHH pode ser responsável pela indução da atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase e, desta forma, pode ser correlacionado com a habilidade dos crustáceos invadirem ambientes estuarinos (Ahl e Brown, 1991; Lucu e Towle, 2003).

Finalmente, para explicar como este amplo espectro de funções entre os neuropeptídeos atua em crustáceos, resultados de análises filogenéticas sugerem que a evolução destes grupos de genes ocorrem de maneira similar aos eventos de mutação e duplicação gênica, hipotetizados para a origem da família de genes do hormônio do crescimento e da prolactina, do sistema pituitário dos vertebrados (Chan *et al.*, 2003; Lucu e Towle, 2003). Todos esses fatores corroboram com o resultado encontrado no presente estudo, permitindo a sugestão da multi-funcionalidade dos genes relacionados com a osmoregulação e o crescimento, gerando este padrão de crescimento diferenciado

nos camarões cultivados em salinidade abaixo do ponto isosmótico determinado para esta espécie.

## **5. Conclusão**

Considerando-se os fatores que podem ter influenciado no crescimento diferenciado dos camarões nas diferentes salinidades, a relação entre os parâmetros biofísico-químicos observados neste experimento, as respostas intracelulares de uma série de genes envolvidos no processo de crescimento, e a possibilidade da evolução filogenética dos genes relacionados com múltiplas funções em crustáceos e vertebrados, sugere-se que o mecanismo fisiológico envolvido na osmoregulação pode desencadear um efeito pleiotrópico que permita a expressão de outros genes, que estejam relacionados com o crescimento em crustáceos.

Desta forma, uma investigação paralela utilizando os resultados do presente estudo poderá otimizar os resultados de crescimento desta espécie durante a fase de berçário. A prospecção e a identificação dos genes relacionados com este processo de osmoregulação e crescimento, possibilitaria o início do desenvolvimento de um programa de melhoramento genético para esta espécie.

## 6. Referências

- Abdu, U., Takac, P., Laufer, H., Sagi, A., 1998. Effect of methyl farnesoate on late larval development e metamorphosis in the prawn Macrobrachium rosenbergii (Decapoda, Palaemonidae): A juvenoid-like effect? Biological Bulletin 195 (2), 112-119.
- Ahl, J.S.B., Brown, J.J., 1991. The Effect of Juvenile Hormone-I, Methyl Farnesoate, and Methoprene on Na K-ATPase Activity in Larvae of the Brine Shrimp, *Artemia*. Comparative Biochemistry And Physiology A-Physiology 100 (1), 155-158.
- Almeida, D.V., 2005. Hormônio do crescimento e tolerância à salinidade em peixes geneticamente modificados. Monografia de Graduação. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, RS.
- Aziz, K.A., Greenwood, J.G., 1981. A Laboratory Investigation Of Temperature and Salinity Tolerances Of Juvenile Metapenaeus bennettiae Racek e Dall (Crustacea : Penaeidae). J. Exp. Mar. Biol. Ecol vol. 54, 137- 147.
- Bishop, J.M., Gosselinkm J.J., Stone, J.H., 1980. Oxygen-Consumption and Hemolymph Osmolality Of Brown Shrimp, Penaeus aztecus. Fishery Bulletin 78 (3), 741-757.
- Boff, M.H., Marchiori, M.A., 1984. The effect of temperature on larval development of pink shrimp Penaeus paulensis. Atlântica 7, 7-13.
- Borst, D.W., O'Neill, P.B., Tsukimura, B., 1995. The relationship of methyl farensoate MF levels and behavior in the lobster. Am. Zool. 35(5), 48.
- Borst, D.W., Wainwright, G., Rees, H.H., 2002. In vivo regulation of the mandibular organ in the edible crab, Cancer pagurus. Proc. R. Soc. Lond. B 269, 483-490.
- Brito, R., Chimal, M.E., Rosas, C., 2000. Effect of salinity in survival, growth, and osmotic capacity of early juveniles of Farfantepenaeus brasiliensis (Decapoda: Penaeidae). Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology 244 (2), 253-263.
- Cavalli, R. O., Wasielesky, W.J., Franco C. S., Filho, K.M., 1996. Evaluation of the short-term toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to Penaeus paulensis (crustacea, decapoda) broodstock. Arq. Biol. Tecnol. 39(3), 567-575.

- Chan, S.M., Gu, P.L., Chu, K.H., Tobe, S.S., 2003. Crustacean neuropeptide genes of the CHH/MIH/GIH family: implications from molecular studies. *General and Comparative Endocrinology* 134, 214–219.
- Chang, E.S., Keller, R., Chang, S.A., 1998. Quantification of Crustacean Hyperglycemic Hormone by ELISA in Hemolymph of the Lobster, Homarus americanus, Following Various Stresses. *General and Comparative Endocrinology* 111, 359–366.
- Charmantier, G., Haond, C., Lignot, J.H., Charmantier-Daures, M., 2001. Ecophysiological Adaptation To Salinity Throughout A Life Cycle: A Review In Homarid Lobsters. *Journal Of Experimental Biology* 204 (5), 967-977.
- Chen, J.C., Lin, J.N., 1998. Osmotic concentration and tissue water of Penaeus chinensis juveniles reared at different salinity and temperature levels. *Aquaculture* 164, 173–181.
- Corleto, F. , Cavalli, R. O., Marchiori, M. A. 1993. Crescimento de pós-larvas de Penaeus paulensis, Pérez- Farfante, 1967, em diferentes salinidades. *Anais do IV Encontro Rio-Grandense de Técnicos em Aquicultura*, 13-23.
- Dall., 1981. Osmoregulatory Ability and Juvenile Habitat Preference in Some Penaeid Prawns. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 1981, Vol. 54, pp. 5564.
- Dall, W., Hill, B.J., Rothlisberg, P.C., Staples, D.J., 1990. *The Biology of the Penaeidae*. *Advances in Marine Biology*. Academic Press, London.
- Diaz, F., Farfan, C., Sierra, E., Re, A.D., 2001. Effects of temperature and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation of juveniles of Penaeus vannamei, Boone. *Marine And Freshwater Behaviour And Physiology* 34 (2), 93-104.
- D’Incao, F. 1983. Estudo do Crescimento e da Mortalidade de Penaeus (Farfantepenaeus) paulensis Pérez-Farfante, 1967, na Lagoa dos Patos, RS, Brasil. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- D’Incao, F., 1991. Pesca e biologia de Penaeus paulensis na Lagoa dos Patos, RS. *Atlântica* 13, 159-169.

- D’Incao, F. 1995. Taxonomia, padrões distribucionais e ecológicos dos Dendrobranchiata (Crustacea, Decapoda) do Brasil e Atlântico Ocidental. Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- El Haj, A.J., Clarke, S.R., Harrison, P., Chang, E.S., 1996. *In vivo* muscle protein synthesis rates in american lobster Homarus americanus during the molt cycle and in response to 20-hydroxyecdysone. J. Exp. Biol. 199, 579-585.
- El Haj, A.J., Tamone, S.L., Peake, M., Reddy, P.S., Chang, E.S., 1997. An Ecdysteroid-responsive gene in a lobster - a potential Crustacean member of the steroid hormone receptor superfamily. Gene 201 (1-2), 127-135.
- Forbes, A.T., Benfield, M.C., 1986. Tidal behaviour of post-larval penaeid prawns (Crustacea : Decapoda : Penaeidae) in a southeast African estuary. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. vol. 102, 23-34.
- Homola, E., Chang, E.S., 1997. Methyl Farnesoate: Crustacean Juvenile Hormone in Search of Functions. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 117B (3), 347–356.
- Inoue, K., Iwatani, H., Takei, Y., 2002. Growth hormone and insulin-like growth factor I of a eurihaline fish Cottus kazika: cDNA cloning and expression after seawater acclimation. Gen. And Comp. Endocrin. 131, 77-84.
- Lysfjord, G., Jobling, M., Solberg, C., 2004. Atlantic salmon, Salmo salar L., smolt production strategy affects body composition and early seawater growth. Aquaculture 237 (1-4), 191-205.
- Koelle, M.R., Talbotm W.S., Segraves, W.A, Bender, M.T., Cherbas, P., Hogness, D.S., 1991. The Drosophila EcR Gene Encodes An Ecdysone Receptor, A New Member Of The Steroid-Receptor Superfamily Cell 67 (1), 59-77.
- Kumlu, M., Eroldogan, O.T., Saglamtimur, B., 2001. The effects of salinity and added substrates on growth and survival of Metapenaeus monoceros (Decapoda: Penaeidae) post-larvae. Aquaculture 196, 177–188.
- Lovett, D.L., Verzia, M.P., Clifford, P.D., Borstb, D.W., 2001. Hemolymph levels of methyl farnesoate increase in response to osmotic stress in the green crab, Carcinus maenas. Comparative Biochemistry and Physiology 128A, 299-306.
- Lucu, C., Towle, D.W., 2003. Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup>-ATPase in gills of aquatic crustacea. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 135, 195–214.

- McGraw, W.J., Davis, D.A., Teichert-Coddington, D., Rouse, D.B., 2002. Acclimation of Litopenaeus vannamei postlarvae to low salinity: Influence of age, salinity endpoint, and rate of salinity reduction. *Journal Of The World Aquaculture Society* 33 (1), 78-84.
- Mair, J., 1980. Salinity and water-type preferences of four species of post-larval shrimp (*Penaeus*) from west Mexico. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 45 (1), 69-82.
- Mancera, J.M., McCormick, S.D., 1998. Osmoregulatory actions of the GH/IGF axis in non-salmonid teleosts. *Comp. Biochem. And Physiol.* 121B, 43-48.
- Ostrensky, A., Wasielesky, W.J. 1995. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the São Paulo shrimp, Penaeus paulensis, Pérez-Farfante, 1967. *Aquaculture*, 132, 339-347.
- Pérez-Castañeda, R., Defeo, O., 2005. Growth and mortality of transient shrimp populations (Farfantepenaeus spp.) in a coastal lagoon of Mexico: role of the environment and density-dependence. *Journal of Marine Science* 62, 14-24.
- Poersch, L. H., Marchiori, M. A., 1992. Efeito do oxigênio no camarão rosa Penaeus paulensis, Perez-Farfante, 1967. VII SIMBRAq – II ENBRAPOA. p115.
- Preston, N., 1985. The Combined Effects Of Temperature And Salinity On Hatching Success And The Survival, Growth, And Development Of The Larval Stages Of Metapenaeus Bennetiae (Racek e Dall). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* vol. 85, pp. 57-14
- Rothlisberg, P.C., 1998. Aspects of penaeid biology and ecology of relevance to aquaculture: a review. *Aquaculture* 164, 49–65.
- Sakamoto, T., Shepherd, S.B., Madsen, S.S., Nishioka, R.S., Siharath, K., Richman III, N.H., Bern, H. A., Grau, E.G., 1997. Osmoregulatory actions of growth hormone and prolactin in an advanced teleost. *General and Comparative Endocrinology* 106, 95-101.
- Samocha, T.M., Lawrence, A.L., Pooser, D., 1998. Growth and survival of juvenile *Penaeus vannamei* in low salinity water in a semi-closed recirculating system. *Israeli Journal Of Aquaculture-Bamidgeh* 50 (2), 55-59.
- Sang, H.M., Fotedar, R., 2004. Growth, survival, haemolymph osmolality and organosomatic indices of the western king prawn (Penaeus latisulcatus Kishinouye, 1896) reared at different salinities. *Aquaculture* 234 (1-4), 601-614.

- Santos, M. H., Marchiori, M. A., 1992. Efeito do pH no desenvolvimento larval do camarão rosa *Penaeus paulensis* Perez-Farfante, 1967. VII SIMBRAq – II ENBRAPOA. p116.
- Saoud, I.P., Davis, D.A., Rouse, D.B., 2003. Suitability studies of inland well waters for *Litopenaeus vannamei* culture. *Aquaculture* 217, 373-383.
- Soares, R.B., 1999. Análise do desenvolvimento e crescimento de megalopas de camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* em laboratório e resultados preliminares sobre seu assentamento no estuário da Lagoa dos Patos. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, RS.
- Soyel, H.I., Kumlu, M., 2003. The Effects of Salinity on Postlarval Growth and Survival of *Penaeus semisulcatus* (Decapoda: Penaeidae). *Turk J. Zool.* 27, 221-225.
- Speck, R. C., Cavalli, R. O., Marchiori, M. A. 1993. Efeito da densidades de estocagem do camarão rosa *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967, em sistema de berçário. *Anais do I Congresso Brasileiro de Aqüicultura*, 369-384.
- StatSoft, Inc. (1998). *STATISTICA for Windows* [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, email: info@statsoft.com, WEB: <http://www.statsoft.com>
- Tamone, S.I., Chang, E.S., 1993. Methyl Farnesoate Stimulates Ecdysteroid Secretion From Crab Y-Organs In vitro. *General And Comparative Endocrinology* 89 (3), 425-432.
- Tsuzuki, M.Y., 1995. Efeitos da temperatura e da salinidade na sobrevivência de pós-larvas do camarão-rosa *Penaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967). Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, RS.
- UNESCO, 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Intergovernmental Oceanographic Commission. Manual and Guides 12.
- Wasielesky, W.J. 2000. Cultivo de juvenis do camarão rosa, *Farfantepenaeus paulensis*, (Decapoda:Penaeidae) no estuário da Lagoa dos Patos: Efeitos de parâmetros ambientais e manejo de cultivo. Tese de doutorado em Oceanografia Biológica, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, RS.

- Wasielesky, W., Cavalli, R.O., Santos, M.H.S., Peixoto, S., 2003. Ten years of research on the development of alternative culture systems for Farfantepenaeus paulensis in southern Brazil. Proceedings of World Aquaculture 2003, Salvador, 828.
- Whiteley, N.M., El Haj, A.J., 1997. Regulation of muscle gene expression over the moult in crustacea. Comparative Biochemistry And Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology 117 (3), 323-331.
- Yada, T., Azuma, A. Takagi, Y., 2001. Stimulation of non-specific immune functions in seawater-acclimated rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, with reference to the role of growth hormone. Comp. Biochem. And Phisiol. 129B, 695-701.
- Yodmuang, S., Udomkit, A., Treerattrakool, S., Panyim, S., 2004. Molecular and biological characterization of molt-inhibiting hormone of Penaeus monodon. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 312, 101– 114.

## Capítulo II

### **Prospecção de genes relacionados com o crescimento no camarão-rosa Farfantepenaeus paulensis**

Normas de acordo com a revista *Aquaculture*

**Prospecção de genes relacionados com o crescimento  
no camarão-rosa Farfantepenaeus paulensis**

Michel Toth Kamimura<sup>a\*</sup>; Karina M. Meier<sup>ab</sup>; Ronaldo O. Cavalli<sup>c</sup>;  
Jomar Laurino<sup>d</sup>; Luis Fernando Marins<sup>a,e,\*</sup>

<sup>a</sup>Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Rio Grande, RS - BR

<sup>b</sup>Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Dep. de Química, Lab. de Bioquímica Marinha, Rio Grande, RS - BR

<sup>c</sup>Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Oceanografia, Rio Grande, RS - BR

<sup>d</sup>Pontifícia Universidade Católica, Centro de Biologia Genômica e Molecular, Porto Alegre, RS - BR

<sup>e</sup>Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Ciências Fisiológicas, Rio Grande, RS - BR

\* Autor para correspondência: Fax: 55 53 2336850. Endereço eletrônico: dqmluf@furg.br

## Resumo

Neste trabalho, investigou-se a utilização de uma metodologia de bioprospecção, com o objetivo de identificar genes relacionados com o crescimento e tolerância à salinidade no camarão-rosa Farfantepenaeus paulensis. Para isto, utilizou-se camarões juvenis cultivados em salinidades baixa e alta, que apresentaram um crescimento diferenciado no final do experimento. O método testado foi uma adaptação da expressão diferencial de genes, através da transcrição reversa do RNA total, seguida pela reação em cadeia da polimerase (DDRT-PCR). Utilizando-se os tecidos criopreservados dos camarões, foi extraído o RNA total e sintetizados os respectivos cDNAs, que serviram de base para as reações de PCR, utilizando-se 31 *primers* arbitrários em conjunto com um *primer* reverso universal (UAP). A partir da comparação entre os perfis de expressão dos organismos das duas classes de tamanho, foram detectados genes sendo transcritos diferencialmente. Apesar do número relativamente reduzido de *primers* utilizados, a metodologia demonstrou eficiência e uma relação custo-benefício favorável, apresentando como resultado a identificação de dois genes inéditos e provavelmente relacionados com o crescimento da espécie investigada. As seqüências parciais dos genes que codificam para a hemocianina e para a ciclofilina do camarão-rosa foram isoladas, clonadas, sequenciadas e comparadas por homologia em relação à seqüência de aminoácidos, utilizando-se a ferramenta de busca BLASTP no Banco Mundial de Genes (Genbank).

## 1. Introdução

O camarão-rosa Farfantepenaeus paulensis é uma espécie nativa do sul do Brasil que utiliza o Estuário da Lagoa dos Patos como zona de alimentação para os seus primeiros estágios pós-larvais (D’Incao, 1991). Este peneídeo tem demonstrado um interessante potencial para o cultivo, sendo a espécie alvo de um projeto desenvolvido pela Estação Marinha de Aquacultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande - FURG, visando o desenvolvimento um pacote tecnológico de cultivo de camarões em gaiolas, cercados e viveiros no extremo sul do Brasil (Wasielesky *et al.*, 1995; Wasielesky, 1999; Wasielesky *et al.*, 2002)..

Muitos avanços foram obtidos no conhecimento da biologia reprodutiva do camarão-rosa, permitindo o desenvolvimento de tecnologias de cultivo com resultados promissores para esta espécie (Cavalli *et al.*, 1997; Wasielesky *et al.*, 2003; Peixoto, 2004). Entretanto, fica evidente também a necessidade do investimento em projetos de pesquisa que focalizem o desenvolvimento paralelo de programas de melhoramento genético devido ao fato de que esta espécie apresenta baixas taxas de crescimento em condições ambientais adversas principalmente no que diz respeito à salinidade e temperatura (Hennig e Andreatta, 1998; Tsuzuki, 1995; Wasielesky *et al.*, 2003).

O objetivo do presente estudo foi desenvolver uma metodologia para investigar a expressão de genes envolvidos com os processos de crescimento e tolerância à salinidade do camarão-rosa, visto que estes processos ainda não são inteiramente conhecidos em crustáceos (Jackson e Wang, 1998; Decamp *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2004). Existem várias técnicas utilizadas atualmente para determinar perfis de expressão gênica e para identificar genes transcritos diferencialmente em condições específicas. A escolha do método depende de vários fatores, como o tipo de problema a ser resolvido, as informações de seqüências disponíveis para a espécie ou gênero, e a abundância de padrões transcritos em uma célula ou tecido, que possibilitaria esta identificação dos genes expressos diferencialmente.

No caso deste estudo, foi testada uma combinação de metodologias utilizadas atualmente, visando uma adaptação que apresentasse uma eficiência metodológica e uma relação custo-benefício favorável. O método DDRT-PCR (*differential display reverse transcriptase - polimerase chain reaction*) foi descrito pela primeira vez por Liang e Pardee (1992), com a intenção de prover uma ferramenta efetiva para detectar

espécies de RNA individuais que são expressos diferencialmente em distintos tipos de células eucarióticas, e então permitir recuperar e clonar os ácidos desoxirribonucleicos complementares (cDNAs) correspondentes. Este método pode ser usado para identificação de qualquer gene expresso diferencialmente de uma maneira rápida e eficiente, permitindo a determinação de perfis de transcrição com base qualitativa ou semi-quantitativa (Kuhn, 2001; Ponsuksili *et al.*, 2001; Rahmanm *et al.*, 2003). Desde sua introdução, centenas de aplicações tem sido descritas utilizando variações da DDRT-PCR em organismos de todos os tipos. Desta forma, uma adaptação da metodologia foi aplicada em camarões que foram cultivados em diferentes salinidades, e que apresentaram um tamanho diferenciado no final do cultivo com o intuito de se identificar os genes relacionados com o crescimento e a tolerância à salinidade no camarão-rosa. Pesquisas nesta área podem auxiliar a resolver grande parte dos problemas encontrados na carcinicultura realizada na região sul do Brasil, pois afetam de maneira significativa a produtividade em regiões temperadas (Hennig e Andreatta, 1998; Tsuzuki *et al.*, 2000; Wasielesky, 2000).

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Obtenção do material biológico*

Os camarões utilizados neste trabalho, foram produzidos na Estação Marinha de Aquicultura (FURG), a partir de reprodutores selvagens de *F. paulensis* capturados no litoral sul do Brasil. Foram cultivadas um total de 1200 pós-larvas com idade de 47 dias (PL47) em dois tratamentos, com salinidades 5 e 30 respectivamente. Após 60 dias de cultivo, foram separados os quinze camarões mais leves e os quinze mais pesados de cada tratamento, sendo imediatamente estocados em nitrogênio líquido até a realização das análises genéticas.

### *2.2. Isolamento do RNA total*

O RNA total foi isolado a partir de um corte transversal da região do céfalotórax que contém o pedúnculo ocular dos camarões (50 mg de tecido), utilizando-se TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen<sup>®</sup>, Life Technologies), de acordo com o protocolo do

fabricante. A quantificação do RNA foi feita por espectrofotometria, e a integridade checada por eletroforese em gel com 1% de agarose, contendo o tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) e corado com brometo de etídio. Foi utilizado o Kit MessageMaker<sup>®</sup> Reagent Assembly (Invitrogen, Life Technologies) para a purificação do RNA mensageiro.

### 2.3. Síntese do cDNA e DDRT-PCR

Em primeiro lugar, calculou-se a quantidade de RNA purificado para se obter uma concentração de 5 µg de por amostra, completando-se ao volume final de 11 µL com água tratada com DEPC (Dietil-piromcarbonato), um inibidor de RNAses. Iniciou-se a síntese do cDNA fita simples, acrescentando-se à amostra 1 µL do oligonucleotídeo iniciador (*primer*) AP (5'-GGCCAGGCGTCGACTAGTAC(dT)<sub>17</sub>-3'), 1 µL de dNTP Mix (10 mM) e aquecendo-se à 65°C por 5 minutos. A amostra foi então transferida para o gelo por 1 min., centrifugada e acrescida de 4 µL do tampão fita-simples (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) e 2 µL de DTT (1 mM). Seguiu-se uma incubação à 42°C por 2 horas, adicionou-se 1 µL (200 unidades) da enzima *SuperScript<sup>™</sup> II Rnase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase* (Invitrogen<sup>®</sup>, Life Technologies) e incubou-se por mais 50 min., parando-se a reação com aquecimento à 70°C por 15 minutos. Acrescentou-se à reação, 1 µL de RNase H e incubou-se à 37°C por 50 minutos, para desintegrar a fita de RNA que serviu de molde para o cDNA, sobrando apenas as fitas simples de DNA. As amostras de cDNA, foram purificadas com o kit GlassMAX<sup>®</sup> cDNA Purification System (Invitrogen<sup>®</sup>, Life Technologies), diluídas na proporção de 1:10, e estocadas à -20°C para as subseqüentes reações de PCR.

Nas reações de PCR, foram utilizados 31 *primers* arbitrários (Tabela 1) da Operon Technologies (Alameda, CA), combinados com o *primer* universal de amplificação UAP (5'-CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGT-3', Invitrogen<sup>®</sup>, Life Technologies). Cada reação era composta de uma mistura com 14,2 µL de água purificada *RNase free* (Invitrogen<sup>®</sup>, Life Technologies), 2,0 µL de tampão PCR10X, 1,0 µL de BSA purificada (albumina de soro bovino – *bovine serum albumine*, 10 mg/mL), 0,8 µL de cDNA, 0,6 µL MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,4 µL dNTP (2,5 mM), 0,4 µL do *primer* arbitrário (10 pM/µL), 0,4 µL do *primer* UAP e 0,2 µL (5

unidades/ $\mu\text{L}$ ) de Platinum<sup>®</sup>Taq DNA Polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>, Life Technologies), completando um volume final de 20  $\mu\text{L}$ . O programa utilizado inicia-se com uma desnaturação inicial de 1 min. à 94°C, seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 seg, referente a desnaturação em cada início de ciclo, 40°C por 1 min, correspondente ao anelamento dos *primers*, e 72°C por 1 min. e 30 seg, relativo a fase de extensão. Após os 40 ciclos, finaliza-se a reação com o passo de extensão final por 5 min à 72°C. Os produtos da PCR, foram aplicados em gel de agarose 2%, e corados com brometo de etídio. As corridas eletroforéticas foram realizadas com a potência de 100 W de corrente contínua, e a visualização realizada sobre um transluminador ultra-violeta.

#### *2.4. Recuperação e clonagem dos produtos da expressão diferencial (DD)*

Os padrões de bandas da expressão diferencial, foram examinados comparando-se os camarões maiores e menores, provenientes das salinidades baixa (5) e alta (30). As bandas presentes e com forte expressão nos camarões maiores, e ausentes ou com expressão fraca nos menores foram extraídas do gel com o kit Concert<sup>™</sup>Gel extraction System (Invitrogen<sup>®</sup>, Life Technologies), de acordo com o protocolo do fabricante. Os produtos extraídos com sucesso, foram clonados usando-se o kit para sequenciamento TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit For Sequencing (Invitrogen<sup>®</sup>, Life Technologies), segundo a metodologia do fabricante.

#### *2.5. Sequenciamento*

Os clones foram sequenciados bi-direcionalmente, utilizando os primers de sequenciamento M13F e M13R (Invitrogen<sup>®</sup>, Life Technologies) no sequenciador automático MegaBACE 1000<sup>™</sup> (Amersham Biosciences). As sequências de nucleotídeos obtidas foram traduzidas em sequências de aminoácidos e estas submetidas a comparação com os dados presentes no Banco Mundial de Genes (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), usando a ferramenta de busca BLASTP (*Basic Local Alignment Search Tool Protein*).

Tabela 1.

Seqüências dos *primers* 5' arbitrários utilizados

Primer	Seqüência de Bases	Primer	Seqüência de Bases
AB-01	5'-CCGTCGGTAG-3'	AB-17	5'-TCGCATCCAG-3'
AB-02	5'-GGAAACCCCT-3'	AB-18	5'-CTGGCGTGTC-3'
AB-03	5'-TGGCGCACAC-3'	AB-19	5'-ACACCGATGG-3'
AB-04	5'-GGCACGCGTT-3'	AB-20	5'-CTTCTCGGAC-3'
AB-05	5'-CCCGAAGCGA-3'	AC-05	5'-GTTAGTGCGG-3'
AB-06	5'-GTGGCTTGGA-3'	AC-07	5'-GTGGCCGATG-3'
AB-07	5'-GTAAACCGCC-3'	AD-06	5'-AAGTGCACGG-3'
AB-08	5'-GTTACGGACC-3'	AD-07	5'-CCCTACTGGT-3'
AB-09	5'-GGGCGACTAC-3'	S-05	5'-TTTGGGCCT-3'
AB-10	5'-TTCCCTCCCA-3'	S-06	5'-GATACCTCGG-3'
AB-11	5'-GTGCGCAATG-3'	S-08	5'-TTCAGGGTGG-3'
AB-12	5'-CCTGTACCGA-3'	D-01	5'-ACCGCGAAGG-3'
AB-13	5'-CCTACCGTGG-3'	G-05	5'-CTGAGACGGA-3'
AB-14	5'-AAGTGCAGCC-3'	B-02	5'-TGATCCCTGG-3'
AB-15	5'-CCTCCTTCTC-3'	B-08	5'-GTCCACACGG-3'
AB-16	5'-CCCGGATGGT-3'		

### 3. Resultados

No final do experimento de crescimento, os indivíduos menores e maiores obtidos a partir dos cultivos em diferentes salinidades, tiveram peso médio igual a 0,55 g e 1,50 g para o tratamento com salinidade 5, e 0,41 g e 1,36 g na salinidade 30, respectivamente. Os *primers* G-05 (5'-CTGAGACGGA-3'), S-08 (5'-TTCAGGGTGG-3'), AB-04 (5'-GGCACGCGTT-3') e S-06 (5'-GATACCTCGG-3'), contra o *primer* reverso UAP nas PCRs, amplificaram fragmentos de DNA com tamanho aproximado de 300, 600, 900 e 1300 pares de bases. Estes fragmentos representam genes se expressando fortemente nas reações que continham os cDNAs sintetizados a partir dos camarões grandes, e, no caso do *primer* AB-04, não apareciam ou expressava-se fracamente nos pequenos (Figura 1). As bandas amplificadas pelos *primers* G-05 e S-08 foram sequenciadas e após realizada a busca utilizando a ferramenta BLASTP, identificou-se os genes que codificam as proteínas ciclofilina e hemocianina, as quais

foram submetidas ao GenBank e encontram-se disponíveis sob os números de acesso [AY775150](#) e [AY775151](#) (vide anexos). As seqüências obtidas para a ciclofilina e hemocianina estão apresentadas nas figuras 2 e 3, e os alinhamentos significativos com as seqüências de outras espécies são apresentadas nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

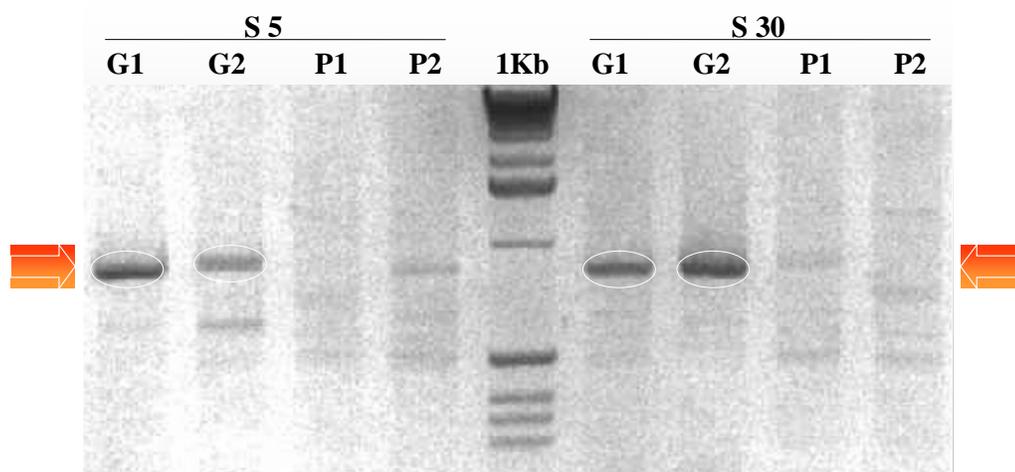


Figura 1. Padrão de bandas diferenciais expressas (setas) utilizando-se os *primers* AB-04 e UAP. S5 e S30, salinidades 5 e 30, respectivamente. G1, G2, P1 e P2, cDNA dos camarões grandes 1 e 2, pequenos 1 e 2, respectivamente.

```

1 ggagatggaactggaggtgtcagcatctatggagataggtttgctgatgagaacttcaag
  G D G T G G V S I Y G D R F A D E N F K 20
61 ctgaagcactatggacctggatggctttccatggcaaagctggaaaggacaccaatgga
  L K H Y G P G W L S M A N A G K D T N G 40
121 tctcagttcttcatcactactgtcaagaccccatggctggatggaaggcacgttgTTTT
  S Q F F I T T V K T P W L D G R H V V F 60
181 ggcaaagtgctaactggcatgaatgtggtgagggatattgaagcagttcaaactagaaat
  G K V L T G M N V V R D I E A V Q T R N 80
241 gataagcctgttcaagaggtcaagattgtagattctggagccattccagtagaaaccca
  D K P V Q E V K I V D S G A I P V E T P 100
301 ttcagagtaacaaaggagggtgtccaataatagaagcatttccctttataaaaaaaaagt
  F R V T K E G V Q * 109
361 aatctgtcttagcacaagagctgctttacatgttttctttcaacagaatcgtgggcaaaa

421 cggttaatattgatattcgtattgttactttaaaaaggaataacttgtttgacaagtagat

481 gtgttgtctgtactggcttgcaaaatTTTgtaagtgtaataaatttctacattagaaaaa

541 aaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Fig.2. Sequência nucleotídica parcial do cDNA da Ciclofilina do camarão-rosa Farfantepenaeus paulensis (Genbank AY775150) e a sequência de aminoácidos deduzida da proteína. Nucleotídeos e aminoácidos estão numerados nos lados esquerdo e direito, respectivamente. O asterisco indica o códon de terminação. O sinal de poliadenilação está sublinhado.

```

1 gagacggatggtgaagccgacgcagctgtagagggacttcacgagaataaccgaattcaac
  E T D G E A D A A V E G L H E N T E F N 20
61 cactatgatgctcatggtaaataccctgataatcgccacatggctaccctctggatcgc
  H Y D A H G K Y P D N R P H G Y P L D R 40
121 aaagttccagatgaccgctggttgaagaccttccaacttcaagcacatccaagtaaag
  K V P D D R V F E D L P N F K H I Q V K 60
181 gtcttcaatcgtggtgaacatatccatcaccattaacttggaaatgaacaaatgccacg
  V F N R G E H I H H H * 71
241 ttttatttatcttctttaaaggctcatgaataaagtcatatacattcaaaaaaaaaaaaaa

```

Fig.3. Sequência nucleotídica parcial do cDNA da Hemocianina do camarão-rosa Farfantepenaeus paulensis (Genbank AY775151) e a sequência de aminoácidos deduzida da proteína. Nucleotídeos e aminoácidos estão numerados nos lados esquerdo e direito, respectivamente. O asterisco indica o códon de terminação. O sinal de poliadenilação está sublinhado.

Tabela 2.

Alinhamentos significativos com a Ciclofilina de Farfantepenaeus paulensis

Nº. de acesso no GenBank	Espécie	% de similaridade
AAH59560	<u>Danio rerio</u>	78
AAA37498	<u>Mus musculus</u>	75
AAA49064	<u>Gallus gallus</u>	74
CAE69202	<u>Caenorhabditis briggsae</u>	71
AAX44050	<u>Homo sapiens</u>	73
AAH54168	<u>Xenopus laevis</u>	74
BAA23764	<u>Tachypleus tridentatus</u>	74
AAM63473	<u>Arabidopsis thaliana</u>	70

Tabela 3 .

Alinhamentos significativos com a Hemocianina de Farfantepenaeus paulensis

Nº. de acesso no GenBank	Espécie	% de similaridade
AAL27460	<u>Penaeus monodon</u>	86
CAB85965	<u>Penaeus vannamei</u>	84
AAW57891	<u>Cancer magister</u>	76
CAB38043	<u>Homarus americanus</u>	55
AAF64305	<u>Callinectes sapidus</u>	56
AAB22190	<u>Panulirus interruptus</u>	61

#### 4. Discussão

A análise da expressão de genes sob condições específicas, assim como a identificação e bioprospecção destes, são temas muito abordados atualmente, devido ao constante desenvolvimento e aprimoramento das técnicas de biologia molecular. Técnicas utilizando métodos combinados têm sido muito utilizadas, como cDNA-AFLP (Bachem *et al.*, 1996), baseada em amplificação seletiva por fragmentos de restrição ligados a adaptadores, derivados do cDNA. SAGE (Vesculescu *et al.*, 1995), que faz uma análise serial de expressão gênica, utilizando fragmentos curtos designados com cauda, extraídos de moléculas do cDNA que são encaudados, clonados e sequenciados. RC4D (Fischer *et al.*, 1995), que combina a técnica de cDNA-AFLP com uma versão específica de família do gene da técnica DDRT-PCR ou ainda, a combinação da DDRT-PCR com AFLP (Fischer *et al.*, 1995), que serve para caracterizar o DNA genômico. O

desenvolvimento de marcadores tipo microsátélites em peneídeos também pode ser usado como uma importante ferramenta em programas de reprodução, assim como aplicações da tecnologia AFLP tem sido usada para identificação de espécies e análises de filogenia, em camarões peneídeos (Cruz *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004), e mapeamento genético de espécies como *Penaeus monodon* e *Marsupenaeus japonicus* (Wilson *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002). Adicionalmente, metodologias que envolvem equipamentos de alto custo, utilizam microarranjos de cDNA (Schena *et al.*, 1996) e microchip, com as quais pode-se gravar um genoma completo com alta acurácia em um simples chip de DNA (Kuhn, 2001), ou ainda combinar com técnicas de transgenia, incrementando taxas de crescimento, e aumentando a resistência a patógenos e fatores estressantes (Melamed *et al.*, 2002).

Técnicas relativamente mais simplificadas, porém muito utilizadas, baseiam-se no desenvolvimento de marcadores moleculares usando *primers* do tipo RAPD (Garcia e Benzie, 1995), e têm como característica básica de distinção, a utilização de um único *primer* ao invés de um par, obtendo-se uma ou mais seqüências desconhecidas, que podem ser amplificadas nas duas direções da fita simples do cDNA. No caso deste estudo, utilizou-se o *primer* reverso universal de amplificação UAP, que possui os mesmos sítios de ligações do *primer* AP usado na síntese do cDNA, contra um oligoprimer arbitrário (tipo RAPD). Como o *primer* UAP possui uma seqüência com várias bases de timina (dT)<sub>17</sub>, que se anelam com a cauda poli-A da extremidade final 3' não-codificante do gene, tem-se a desvantagem de se obter um menor número no padrão de bandas. Por outro lado, a vantagem desta variação na metodologia será observada na etapa de análise da seqüência do gene, permitindo que se saiba a orientação da seqüência que deve ser seguida, para se fazer a busca BLASTP, facilitando a identificação e comparação por homologia da seqüência obtida no GenBank. Outra adaptação do método original, que utiliza visualização por autoradiografia e atualmente gel de poli-acrilamida, foi a utilização de gel de agarose concentrado à 2% corado com brometo de etídio, que permite a visualização em transluminador com luz ultra-violeta. Esta adaptação reduz o custo e o tempo necessários para corrida eletroforética e para a detecção por radioatividade ou coloração com nitrato de prata, segundo a técnica original.

Apesar de utilizar um reduzido número de *primers*, a metodologia demonstrou-se funcional e eficiente, detectando dois genes inéditos (Figuras 1 e 2) com provável importância relacionada com o crescimento dos camarões desta espécie. A ciclofilina é codificada por um gene conservado ao longo da evolução, desde bactérias até humanos e possui alta afinidade com a droga imunossupressiva ciclosporina (Caroni *et al.*, 1991; Martinez-Gonzalez e Hegardt, 1995). Apresenta um grau de similaridade com organismos representantes de Filos dos Reinos Animal e Vegetal, disponíveis no Genbank (Tabela 1). Tem importância para a agricultura tradicional, onde se observou a expressão deste gene em plantas atacadas por insetos herbívoros, infecções patógenas e outros estresses, e transgênica, onde plantas modificadas para este gene demonstraram um incremento na habilidade de se adaptar a severos estresses de campo (Hare *et al.*, 1996; Fidantsef *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2004). É uma proteína intracelular antifúngica, reportada como molécula imunomodulatória envolvida com processos muito importantes, como encapsulamento de proteínas *in vivo*, tráfego de proteínas, podem funcionar como chaperonas e têm sido associadas à respostas ao estresse oxidativo (Galat, 1993; Galat e Metcalfe, 1995; Bugli *et al.*, 1998; Guedes *et al.*, 2005). Esta peptidil-prolil cis-trans isomerase relaciona-se com o complexo calciomodulina-calcineurina no citoplasma, que tem como função aumentar a disponibilidade de cálcio intracelular e promover a desfosforilação do fator nuclear de ativação das células T (NF-AT). O NF-AT desfosforilado, torna-se hábil para entrar pela membrana nuclear e atuar como ativador de transcrição do gene da interleucina-2, que é o fator de crescimento das células T, promovendo também a proliferação de células do sistema imunológico, como os macrófagos e células B (Hamilton e Steiner, 1998; Ivery, 1998; Gotherl e Marahiel, 1999). Os processos envolvidos e relacionados com o gene que foi detectado a partir do RNAm dos camarões grandes deste experimento, podem sugerir que estes animais estavam expressando uma condição imunológica melhor do que os pequenos, tendo como consequência uma disponibilidade maior de energia para a síntese protéica, gerando um maior crescimento em biomassa. Este crescimento diferenciado pode ter conexão com o outro gene identificado durante a prospecção, a hemocianina.

A hemocianina é o polipeptídeo de maior peso molecular conhecido e uma das maiores moléculas em tamanho na natureza. Trata-se de uma macromolécula

metaloprotéica que possui em sua estrutura átomos de cobre, sendo responsável pelo transporte circulatório de oxigênio em artrópodos e moluscos (Rainer e Brouwer, 1993; Lieb et al., 2001). Pode ser usada como ferramenta para monitorar o estado fisiológico em animais expostos a diferentes condições ambientais, como altas concentrações de nitrogênio amoniacal, nitrito ou diferentes salinidades (Chen et al., 1994; Schmitt e Santos, 1999; Cheng et al., 2001; Cheng et al., 2002). Atualmente tem sido intensivamente utilizada em pesquisas na área de biomédicas como insumo para produzir anticorpos e antígenos em mamíferos, por estimular respostas imunológicas a antígenos associados a tumores (Amato et al., 2004; Buskas e Boons, 2004; Gore et al., 2004). O potencial de inibir e reduzir a expressão em células com câncer de Barret sugere um promissor desenvolvimento no tratamento da doença (McFadden, 2003; Vona-Davis et al., 2004). É usado como imunogene em terapias com pacientes infectados com HIV (Azoulay et al., 2004), e, associado a derivados de antígenos tumorais, é um promissor candidato a vacinas imunoterapêuticas polivalentes para pacientes com carcinomas de vários tipos (May et al., 2003; Ragupathi et al., 2003; Pan et al., 2005). Na área de suinocultura, pode ser aplicado com sucesso, conjugado a vacinas polivalentes preventivas (Walders, 2005). A hemocianina pode se apresentar como diferentes tipos entre as espécies, assim como diferentes formas alélicas podem ser encontradas na mesma espécie. A descoberta de variantes que podem se expressar em organismos da mesma espécie, maiores ou menores, por exemplo, possibilitaria o desenvolvimento de marcadores moleculares relacionados ao tamanho dos camarões. O gene encontrado no presente trabalho, pode ser considerado um tipo encontrado nos camarões grandes, sugerindo a possibilidade de se buscar outras formas em organismos com diferentes tamanhos, o que permitiria uma aplicação de melhoramento genético utilizando-se este tipo de marcador molecular. A forte expressão deste gene apenas nos camarões maiores pode estar relacionada com o tamanho dos animais. Considerando que o maior peso encontrado é decorrente da maior taxa de síntese protéica no organismo, este fato está diretamente ligado ao aumento da produção de ATP, que por sua vez demanda uma maior quantidade de oxigênio disponível nas mitocôndrias. Finalmente, explicando a maior expressão do gene encontrado, o transporte destas moléculas de oxigênio é realizado pelo pigmento respiratório dos crustáceos, a hemocianina.

A forma de hemocianina encontrada também apresentou uma alta similaridade com outros genes de crustáceos, com seqüências disponíveis no GenBank (Tabela 2). Atualmente, existem inúmeras publicações existentes na área da medicina humana e veterinária, utilizando diferentes formas de hemocianina, de diversas espécies, em imunoenaios e terapias para doenças de vários tipos. Este fato sugere a possibilidade de se iniciar pesquisas na área de bioprospecção do gene encontrado neste trabalho, oferecendo novas perspectivas de estudos geradas a partir de técnicas biomoleculares associadas à aquacultura.

## **5. Conclusão**

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a metodologia utilizada apresentou uma relação custo-benefício satisfatória, e foi eficiente na identificação de genes em um espaço de tempo relativamente curto. Os dois genes encontrados estavam expressando-se nos camarões maiores e não nos menores, o que pode sugerir uma influência destes no crescimento diferenciado dos organismos no final do cultivo. A relação destes genes com características importantes pode ser utilizada em estudos futuros com camarões e outros organismos interessantes para a aquacultura.

## 6. Referências

- Alvarez, A.L., Racotta, I.S., Arjona, O., Palacios, E., 2004. Salinity stress test as a predictor of survival during growout in Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei). *Aquaculture* 237 (1-4), 237-249.
- Amato, R.J., Engel, J., Lu, J., Low, P., Naveed, F., 2004. Phase I Trial of EC90 (keyhole-limpet hemocyanin fluorescein isothiocyanate conjugate) with GPI-0100 adjuvant followed by EC 17 (folate-fluorescein isothiocyanate conjugate) in patients with metastatic renal cell carcinoma and ovarian cancer. *Journal Of Clinical Oncology* 22 (14), 444S-4754.
- Azoulay, S., Nevers, M.C., Creminon, C., Heripret, L., Garraffo, R., Durant, J., Dellamonica, P., Grassi, J., Guedj, R., Duval, D., 2004. An enzyme immunoassay for the quantification of plasma and intracellular lopinavir in HIV-infected patients. *Journal Of Immunological Methods* 295 (1-2), 37-48.
- Bachem, C.W.B., Vander Hoeven, R.S., DeBruijn, S.M., Vreugdenhil, D., Zabeau, M., Visser, .R.G.F., 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal* 9 (5), 745-753.
- Bugli, F., Khattab, A., Vigneti, E., Butler, R., Cioli, D., Klinkert, M.Q., 1998. Expression cloning and biochemical characterizations of recombinant cyclophilin proteins from Schistosoma mansoni. *Protein Expression and Purification* 12 (3), 340-346.
- Buskas, T., Li, Y.H., Boons, G.J., 2004. The immunogenicity of the tumor-associated antigen Lewis(y) may be suppressed by a bifunctional cross-linker required for coupling to a carrier protein. *Chemistry-A European Journal* 10 (14), 3517-3524.
- Cavalli, R.O., Scardua, M.P., Wasielesky Jr., W., 1997. Reproductive performance of different sized wild and pond-reared Penaeus paulensis females. *Journal Of The World Aquaculture Society* 28 (3), 260-267.
- Caroni, P., Rothenfluh, A., Mcglynn, E., Schneider, C., 1991. S-cyclophilin - new member of the cyclophilin family associated with the secretory pathway. *Journal Of Biological Chemistry* 266 (17), 10739-10742.
- Chen, J.C., Cheng, S.Y., Chen, C.T., 1994. Changes of hemocyanin, protein and free amino-acid levels in the hemolymph of Penaeus japonicus exposed to ambient

- ammonia. *Comparative Biochemistry And Physiology A-Physiology* 109 (2), 339-347.
- Cheng, W., Liu, C.H., Cheng, C.H., Chen, J.C., 2001. Hemolymph oxyhemocyanin, protein, osmolality and electrolyte levels of Macrobrachium rosenbergii in relation to size and molt stage. *Aquaculture* 198 (3-4), 387-400.
- Cheng, W.T., Liu, C.H., Yan, D.F., Chen, J.C., 2002. Hemolymph oxyhemocyanin, protein, osmolality and electrolyte levels of whiteleg shrimp Litopenaeus vannamei in relation to size and molt stage. *Aquaculture* 211 (1-4), 325-339.
- Cruz, P., Ibarra, A.M., Mejia-Ruiz, H., Gaffney, P.M., Perez-Enriquez, R., 2004. Genetic variability assessed by microsatellites in a breeding program of pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei). *Marine Biotechnology* 6 (2), 157-164.
- Decamp, O., Cody, J., Conquest, L., Delanoy, G., Tacon, A.G.J., 2003. Effect of salinity on natural community and production of Litopenaeus vannamei (Boone), within experimental zero-water exchange culture systems. *Aquaculture Research* 34 (4), 345-355.
- D’Incao, F., 1991. Pesca e biologia de Penaeus paulensis na Lagoa dos Patos, RS. *Atlântica* 13, 159-169.
- Fidantsef, A.L., Stout, M.J., Thaler, J.S., Duffey, S.S., Bostock, R.M., 1999. Signal interactions in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, Lycopersicon esculentum *Physiological And Molecular Plant Pathology* 54 (3-4), 97-114.
- Fischer, A., Saedler, H., Theissen, G., 1995. Restriction Fragment Length Polymorphism-Coupled Domain-Directed Differential Display - A highly efficient technique for expression analysis of multigene families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (12), 5331-5335.
- Galat, A., 1993. Peptidylproline cis-trans-isomerases – immunophilins. *European Journal of Biochemistry* 216 (3), 689-707.
- Galat, A., Metcalfe, S.M., 1995. Peptidylproline Cis/Trans Isomerases *Progress In Biophysics and Molecular Biology* 63 (1), 67-118,
- Garcia, D.K., Benzie, J.A.H., 1995. *RAPD Markers Of Potential Use In Penaeid Prawn (Penaeus monodon) Breeding Programs*. *Aquaculture* 130 (2-3), 137-144.

- Gothel, S.F., Marahiel, M.A., 1999. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55 (3), 423-436.
- Gore, E.R., Gower, J., Kurali, E., Sui, J.L., Bynum, J., Ennulat, D., Herzyk, D.J., 2004. Primary antibody response to keyhole limpet hemocyanin in rat as a model for immunotoxicity evaluation. *Toxicology* 197 (1), 23-35.
- Guedes, S.D., Vitorino, R., Domingues, R., Tomer, K., Correia, A.J.F., Amado, F., Domingues, P., 2005. Proteomics of immune-challenged *Drosophila melanogaster* larvae hemolymph. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328 (1), 106-115.
- Hamilton, G.S., Steiner, J.P., 1998. Immunophilins: Beyond immunosuppression. *Journal of Medicinal Chemistry* 41 (26), 5119-5143.
- Hare, P.D., DuPlessis, S., Cress, W.A., VanStaden, J., 1996. Stress-induced changes in plant gene expression - Prospects for enhancing agricultural productivity in South Africa. *South African Journal of Science* 92 (9), 431-439.
- Hennig, O. L., Andreatta, E. R. 1998. Effect of temperature in an intensive nursery system for *Penaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967). *Aquaculture* 164, 167-172.
- Ivery, M.T.G., 1999. A proposed molecular model for the interaction of calcineurin with the cyclosporin A-cyclophilin A complex. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 7, 123-129.
- Jackson, C.J., Wang, Y.G., 1998. Modelling growth rate of *Penaeus monodon* Fabricius in intensively managed ponds: effects of temperature, pond age and stocking density. *Aquaculture Research* 29 (1), 27-36.
- Kuhn, E. 2001. From library screening to microarray technology: strategies to determine gene expression profiles and to identify differentially regulated genes in plants. *Annals of Botany* 87: 139-155.
- Li, Y.T., Byrne, K., Miggiano, E., Whan, V., Moore, S., Keys, S., Crocos, P., Preston, N., Lehnert, S., 2003. Genetic mapping of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* using AFLP markers. *Aquaculture* 219 (1-4), 143-156.
- Liang, P.; Pardee, A. B. 1992. Differential display of eucaryotic messenger RNA by means of the polimerase chain reaction. *Science* 257: 967-971.

- Lieb, B., Altenhein, B., Markl, J., Vincent, A., Van Olden, E., Van Holde, K.E., Miller, K.I., 2001. Structures of two molluscan hemocyanin genes: Significance for gene evolution. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 98 (8), 4546-4551.
- Martinez-Gonzalez, J., Hegardt, F.G., 1995. Characterization of a cdna-encoding a cytosolic peptidylprolyl cis-trans-isomerase from *blattella-germanica*. *European Journal Of Biochemistry* 234 (1), 284-292.
- May, R.J., Beenhouwer, D.O., Scharff, M.D., 2003. Antibodies to keyhole limpet hemocyanin cross-react with an epitope on the polysaccharide capsule of Cryptococcus neoformans and other carbohydrates: Implications for vaccine development. *Journal Of Immunology* 171 (9), 4905-4912.
- McFadden, D.W., Riggs, D.R., Jackson, B.J., Vona-Davis, L., 2003. Keyhole limpet hemocyanin, a novel immune stimulant with promising anticancer activity in Barrett's esophageal adenocarcinoma. *American Journal Of Surgery* 186 (5), 552-555.
- Melamed, P., Gong, Z.Y., Fletcher, G., Hew, C.L. , 2002. The potential impact of modern biotechnology on fish aquaculture. *Aquaculture* 204 (3-4), 255-269.
- Pan, Y.B., Chefalo, P., Nagy, N., Harding, C., Guo, Z.W., 2005. Synthesis and immunological properties of N-modified GM3 antigens as therapeutic cancer vaccines. *Journal Of Medicinal Chemistry* 48 (3), 875-883.
- Peixoto, S., 2004. Avanços nas técnicas de reprodução do camarão-rosa Farfantepenaeus paulensis em cativeiro. Tese de doutorado em Oceanografia Biológica, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS.
- Ponsuksili, S., Wimmers, K., Schellander, K., 2001. Application of differential display RT-PCR to identify porcine liver ESTs. *Gene* 280 (1-2), 75-85.
- Ragupathi, G., Koide, F., Sathyan, N., Kagan, E., Spassova, M., Bornmann, W., Gregor, P., Reis, C.A., Clausen, H., Danishefsky, S.J., Livingston, P.O., 2003. A preclinical study comparing approaches for augmenting the immunogenicity of a heptavalent KLH-conjugate vaccine against epithelial cancers. *Cancer Immunology Immunotherapy* 52 (10), 608-616.
- Rahmanm M. M., A. Vandingenen, Begum M., Breuer M., De Loof A., Huybrecht R. 2003. Search for phase specific genes in the brain of desert locuste Schistocerca

- gregaria (Orthoptera: Acrididae) by differential display polymerase chain reaction. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A. Molecular and Integrative Physiology* 135 (2), 221-228.
- Rainer, J., Brouwer, M., 1993. Hemocyanin Synthesis In The Blue-Crab Callinectes sapidus. *Comparative Biochemistry And Physiology B-Biochemistry And Molecular Biology* 104 (1), 69-73.
- Schena, M., 1996. Genome analysis with gene expression microarrays. *Bioessays* 18 (5), 427-431.
- Schmitt, A.S.C., Santos, E.A., 1999. Haemolymph nitrogenous constituents and nitrogen efflux rates of juvenile shrimp, Penaeus paulensis (Perez-Farfante), exposed to ambient ammonia-N. *Aquaculture Research* 30 (1), 1-11
- Tsuzuki, M.Y., 1995. Efeitos da temperatura e da salinidade na sobrevivência de pós-larvas do camarão-rosa Penaeus paulensis (Pérez-Farfante, 1967). Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, RS.
- Tsuzuki, M.Y., Cavalli, R.O., Bianchini, A., 2000. The effects of temperature, age, and acclimation to salinity on the survival of Farfantepenaeus paulensis postlarvae. *J. World Aquac. Soc.* 31 (3), 459– 468.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 1995. Serial Analysis Of Gene-Expression *Science* 270 (5235), 484-487.
- Vona-Davis, L., Vincent, T., Zulfiqar, S., Jackson, B., Riggs, D., McFadden, D.W., 2004. Proteomic analysis of SEG-1 human Barrett's-associated esophageal adenocarcinoma cells treated with keyhole limpet hemocyanin. *Journal Of Gastrointestinal Surgery* 8 (8), 1018-1023.
- Walders, B., Raschke, A., Neugebauer, M., Geuther, E., Bertling, W., Reiser, C., Buck, A., Strich, S., Hess, J., 2005. Blending of a conventional *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine with a positive marker: tracking of immunised pigs by peptide-specific antibodies raised to the marker component. *Research In Veterinary Science* 78 (2), 135-141.
- Wang, Z.Y., Tsoi, K.H., Chu, K.H., 2004. Applications of AFLP technology in genetic and phylogenetic analysis of penaeid shrimp. *Biochemical Systematics And Ecology* 32 (4), 399-407.

- Wasielesky, W., Cavalli, R.O., Dolci, D., Silva, T.M.A., 1995. Crescimento do camarão rosa Penaeus paulensis (Crustacea: Decapoda) cultivado em gaiolas e cercados no estuário da Lagoa dos Patos, RS, Brasil. Anais do III Encontro Sul Brasileiro de Aqüicultura, Ibirubá, RS. Ed. da Universidade, UFRGS, 14-25.
- Wasielesky, W., 1999. Produção do camarão marinho Penaeus paulensis no sul do Brasil: cultivo em estruturas alternativas. Oceanos: Fonte de Alimentos. Publicação da Fundação Roberto Marinho, Gerdau e CNPq, XV Prêmio Jovem Cientista, Brasília, Brasil.
- Wasielesky, W.J. 2000. Cultivo de juvenis do camarão rosa, Farfantepenaeus paulensis, (Decapoda:Penaeidae) no estuário da Lagoa dos Patos: Efeitos de parâmetros ambientais e manejo de cultivo. Tese de doutorado em Oceanografia Biológica, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS.
- Wasielesky, W., Peixoto, S., Santos, M.H.S., Cavalli, R.O., 2002. Cultivo do camarão rosa como alternativa de geração de renda. Extensão Universitária: Ação Comunitária em Universidades Brasileiras. Olho d'Água, São Paulo, Brasil, 17-27.
- Wasielesky, W., Cavalli, R.O., Santos, M.H.S., Peixoto, S., 2003. Ten years of research on the development of alternative culture systems for Farfantepenaeus paulensis in southern Brazil. Proceedings of World Aquaculture 2003, Salvador, 828.
- Wilson, K., Li, Y.T., Whan, V., Lehnert, S., Byrne, K., Moore, S., Pongsomboon, S., Tassanakajon, A., Rosenberg, G., Ballment, E., Fayazi, Z., Swan, J., Kenway, M., Benzie, J., 2002. Genetic mapping of the black tiger shrimp Penaeus monodon with amplified fragment length polymorphism. Aquaculture 204 (3-4), 297-309.
- Zhang, F., Zhu, L., He, G.C., 2004. Differential gene expression in response to brown planthopper feeding in rice. Journal Of Plant Physiology 161 (1), 53-62.

## **Conclusão geral**

Os camarões no estágio juvenil apresentaram um melhor crescimento na salinidade 5 do que na salinidade 30, provavelmente pela relação multifuncional entre os genes que realizam a osmoregulação e promovem o crescimento.

A prospecção dos possíveis genes envolvidos neste crescimento diferencial foi satisfatória, visto que foi aplicada uma metodologia que demonstrou ser eficiente, acessível economicamente e com bons resultados a curto prazo.

As perspectivas futuras de se utilizar os genes encontrados, em estudos paralelos de bioprospecção aplicados diretamente à saúde humana, abre novas perspectivas para a pesquisa realizada atualmente na área da aquacultura. O campo de pesquisa que utiliza ferramentas biomoleculares poderá auxiliar a carcinicultura nacional, desenvolvendo marcadores moleculares para serem usados em programas de melhoramento genético, assim como reprodutores modificados geneticamente para genes imunoreguladores como a ciclofilina, poderão produzir proles mais resistentes às infecções virais, fato o qual têm preocupado os pesquisadores e principalmente os produtores, atualmente. O antagônico paradigma do desejo de gerenciamento visando crescentes incrementos na produção, com resistência à doenças virais geralmente associadas a insustentabilidade do meio ambiente, poderá ser mantido se técnicas de transgenia forem aplicadas à pesquisa na aquacultura.

## **Anexos**

Search **Nucleotide** for  **Go** **Clear**  
 Limits Preview/Index History Clipboard Details  
 Display **GenBank** Send **all to file**  
 Range: from **begin** to **end**  Reverse complemented strand Features:  SNP  CDD  
 MGC  HPRD  STS

**1: [AY775150](#). Reports [Farfantepenaeus p...](#) [gi:55247510]** [Links](#)

LOCUS AY775150 556 bp mRNA linear INV 07-NOV-2004  
 DEFINITION Farfantepenaeus paulensis cyclophilin mRNA, partial cds.  
 ACCESSION AY775150  
 VERSION AY775150.1 GI:55247510  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Farfantepenaeus paulensis (pink shrimp)  
 ORGANISM [Farfantepenaeus paulensis](#)  
 Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Crustacea; Malacostraca;  
 Eumalacostraca; Eucarida; Decapoda; Dendrobranchiata; Penaeoidea;  
 Penaeidae; Farfantepenaeus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 556)  
 AUTHORS Kamimura,M.T., Laurino,J.P. and Marins,L.F.  
 TITLE cdNA cloning and sequencing of cyclophilin gene from the pink shrimp Farfantepenaeus paulensis  
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 556)  
 AUTHORS Kamimura,M.T., Laurino,J.P. and Marins,L.F.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (10-OCT-2004) Ciencias Fisiologicas, Fundacao Universidade Federal do Rio Grande, Av. Italia, Km 8, Rio Grande, RS 96201-900, Brazil

FEATURES  
 source Location/Qualifiers  
 1..556  
 /organism="Farfantepenaeus paulensis"


CGCTCAGGAT...GACTTC...GCTAG...GATCGGATCCCCG...ATTATATAGCTCGATCGATCT  
TTCTCTATAT...TCGG...ATGG...FATATACACACA...GCGGATAGCATCAGTCTA  
CCCC...CTTCGCATACGT...CTTCGCATACGT...  
ACAGACT...ACGC...TCTCA...CTTACTAACCAATTTGGAGAGGGG...GUA...TGG...GAG

Nucleotide

PubMed   Nucleotide   Protein   Genome   Structure   PMC   Taxonomy   OMIM   Books

Search  for

Limits   Preview/Index   History   Clipboard   Details

Display

Range: from  to   Reverse complemented strand   Features:  SNP  CDD

MGC    HPRD    STS

**1: [AY775151](#)** Reports **Farfantepenaeus p...[gi:55247512]** Links

LOCUS   AY775151   301 bp   mRNA   linear   INV 07-NOV-2004  
 DEFINITION   Farfantepenaeus paulensis hemocyanin mRNA, partial cds.  
 ACCESSION   AY775151  
 VERSION   AY775151.1   GI:55247512  
 KEYWORDS   .  
 SOURCE   Farfantepenaeus paulensis (pink shrimp)  
   ORGANISM   [Farfantepenaeus paulensis](#)  
             Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Crustacea; Malacostraca;  
             Eumalacostraca; Eucarida; Decapoda; Dendrobranchiata; Penaeoidea;  
             Penaeidae; Farfantepenaeus.  
 REFERENCE   1 (bases 1 to 301)  
   AUTHORS   Kamimura,M.T., Laurino,J.P. and Marins,L.F.  
   TITLE   cdNA Cloning and sequencing of the hemocyanin gene from the pink  
           shrimp Farfantepenaeus paulensis  
   JOURNAL   Unpublished  
 REFERENCE   2 (bases 1 to 301)  
   AUTHORS   Kamimura,M.T., Laurino,J.P. and Marins,L.F.  
   TITLE   Direct Submission  
   JOURNAL   Submitted (10-OCT-2004) Ciencias Fisiologicas, Fundacao  
             Universidade Federal do Rio Grande, Av. Italia, Km 8, Rio Grande,  
             RS 96201-900, Brazil  
 FEATURES   Location/Qualifiers  
   source   1..301  
           /organism="Farfantepenaeus paulensis"