



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

JULIANA OLIVEIRA DE FREITAS

EXPRESSÃO DE GENES IMUNOLÓGICOS EM CAMARÕES *Litopenaeus vannamei*
DESAFIADOS EXPERIMENTALMENTE COM O VÍRUS DA MIONECROSE
INFECCIOSA E TRATADOS COM dsRNA PRODUZIDAS *in vivo*

FORTALEZA

2020

JULIANA OLIVEIRA DE FREITAS

EXPRESSÃO DE GENES IMUNOLÓGICOS EM CAMARÕES *Litopenaeus vannamei*
DESAFIADOS EXPERIMENTALMENTE COM O VÍRUS DA MIONECROSE
INFECCIOSA E TRATADOS COM dsRNA PRODUZIDAS *in vivo*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia de Recursos Aquáticos.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F936e Freitas, Juliana Oliveira de.
Expressão de genes imunológicos em camarões *Litopenaeus vannamei* desafiados experimentalmente com o vírus da mionecrose infecciosa e tratados com dsRNA produzidas in vivo / Juliana Oliveira de Freitas. – 2020.
68 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.
1. Camarão branco. 2. IMNV. 3. Imunologia. 4. RNAi. I. Título.

CDD 639.2

JULIANA OLIVEIRA DE FREITAS

EXPRESSÃO DE GENES IMUNOLÓGICOS EM CAMARÕES *Litopenaeus vannamei*
DESAFIADOS EXPERIMENTALMENTE COM O VÍRUS DA MIONECROSE
INFECCIOSA E TRATADOS COM dsRNA PRODUZIDAS *in vivo*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia de Recursos Aquáticos.

Aprovada em: 27/01/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rubens Galdino Feijó
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

Prof. Dr. Luis Fernando Fernandes Marins
Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

Dr. Rafael dos Santos Rocha
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Carmosa e Nilton.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Maggioni, pela confiança em mim depositada, pela paciência e orientação.

Aos membros da banca avaliadora Prof. Dr. Luis Fernando Fernandes Marins, Dr. Rafael dos Santos Rocha e Prof. Dr. Rubens Galdino Feijó pelas valiosas contribuições.

Aos meus pais, Maria Carmosa de Oliveira de Freitas e José Nilton de Freitas por todo amor, cuidado, incentivo, ensinamentos e pela educação que me deram.

Minha eterna e imensurável gratidão à minha mãe Carmosa e minha irmã Mariane, por suas incessantes orações, pelo amor incondicional, incentivo, otimismo, zelo, preocupações e cuidados diários. A força para persistir vem de Deus, da fé inabalável que me ensinaram a ter e desse amor que me dão sempre.

Aos técnicos do laboratório CEDECAM, Graça Coelho e Rafael Rocha pelo acolhimento, boa vontade e disposição de ajudar e ensinar sempre. Vocês são grandes professores.

Aos amigos e colegas de laboratório Fagner, Marina, Mayara, Ingrid, Jamille, Hudson, Juliana, Levy, Raysa e Jhonatas pela amizade, pelos bons e descontraídos momentos compartilhados, por toda ajuda durante esse percurso. Em especial ao Fagner Nogueira, por toda a paciência e generosidade em compartilhar seus conhecimentos, pelo apoio e orientação em todas as etapas da realização desse trabalho.

Aos familiares, especialmente a Fernanda, Hadassa e tia Mônica, por terem me acolhido como irmã/filha, por tudo e por tanto que fizeram e fazem por mim.

Aos bons professores e grandes mestres que deixaram suas marcas e contribuições em minha formação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O cultivo de camarão marinho vem se expandido mundialmente desde o início do século, e o camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) é a espécie mais cultivada. Embora a carcinicultura apresente crescimento expressivo, a manifestação de enfermidades dificulta seu avanço. A doença causada pelo vírus da mionecrose infecciosa (IMNV), primeiramente relatada no nordeste brasileiro em 2002, ainda provoca significativas perdas na carcinicultura brasileira. Dentre as alternativas de combate a infecções virais, o RNA de interferência (RNAi) é promissor, pois há evidências da eficácia na aplicação dessa técnica no tratamento dessas enfermidades. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a dinâmica da expressão de genes imunológicos em camarões *L. vannamei* infectados experimentalmente com o IMNV e tratados com moléculas de dsRNA produzidos *in vivo* pelo *Bacillus subtilis* JJBs3 contendo a sequência do ORF1a referente ao IMNV. Num primeiro experimento, foi realizado o acompanhamento do desenvolvimento da mionecrose infecciosa para duas diluições ($1,02 \times 10^4$ e $1,02 \times 10^3$ cópias/100 μ l) de um extrato de tecido infectado por IMNV, por quantificação das cópias virais por RT-qPCR e métodos histopatológicos; foram validados os extratos IMNV e SPF (livre de IMNV, WSSV e IHHNV) através de infecção experimental por injeção intramuscular, com duração de 22 dias. Os grupos infectados com o extrato IMNV apresentaram curvas de sobrevivência com diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos dois grupos controle (solução salina e extrato de tecido SPF), bem como alterações histopatológicas. Foram verificadas ainda, diferenças significativas ($p < 0,05$) na carga viral dos tratamentos III e IV entre o 2º pré e o 6º dia pós-injeção, dentre os três pontos de coleta, com valores médios de $1,33 \times 10^2$ a $1,59 \times 10^7$ cópias virais, respectivamente. A expressão dos genes imunológicos (*Sid-1*, *Dicer-2*, *Argonauta-2*, *proPO-1* e *PPAE-1*), avaliada por qPCR e aplicando o método $2^{-\Delta Cq}$, apresentou diminuição ao longo do experimento, com exceção do *Sid-1* e *Argonauta-2* no tratamento com menor dose viral. No segundo experimento (25 dias; seis tratamentos; quatro pontos de coleta), foi avaliado o efeito de diferentes doses (0.5, 1.0, 3.0 e 5.0 μ g de dsRNA por grama de camarão) produzidas *in vivo* pelo *Bacillus subtilis* JJBs3, ministradas através de injeção intramuscular dois dias antes do desafio. Foram utilizados dois grupos controles, em um deles os animais foram injetados com solução salina e extrato de tecido SPF (negativo), e no outro com solução salina e extrato de tecido infectado (positivo). Alterações histopatológicas características de IMN e diferenças significativas ($p < 0,05$) na carga viral entre o 2º pré e 8º dia pós-injeção foram verificadas nos tratamentos que receberam injeção com extrato IMNV. Não foram observadas diferenças na

sobrevivência ou na expressão dos genes analisados ao longo do experimento, mostrando que da forma e nas condições em que foram ofertadas, as dsRNAs não surtiram efeito protetivo. Por se tratar de um novo modelo de produção de dsRNA, as técnicas de obtenção, purificação, quantificação e métodos de entrega dessas moléculas precisam ser aprimoradas.

Palavras-chave: Camarão branco. IMNV. Imunologia. RNAi.

ABSTRACT

Shrimp farming is one of the fastest growing aquaculture activities in the world and the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) is the most widely cultivated species. Although shrimp farming shows significant growth, the manifestation of diseases hinders its progress. The disease caused by the Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) causes significant losses in Brazilian shrimp farming. Recent evidence has suggested that interference RNA (RNAi) could be a viable alternative to control viral diseases. The present work aimed to evaluate the dynamics of immunological gene expression in *L. vannamei* shrimp experimentally infected with IMNV and treated with dsRNA molecules produced *in vivo* by *Bacillus subtilis* JJBs3 containing the IMNV sequence of ORF1a. In a first experiment, the progress of the infection caused by two dilutions (1.02×10^4 and 1.02×10^3 copies / 100 μ l) of an IMNV-infected tissue extract was monitored by quantifying viral copies by RT- qPCR and histopathological methods; IMNV and SPF (free from IMNV, WSSV and IHHNV) extracts were validated through experimental intramuscular injection infection lasting 22 days. Groups infected with IMNV extract showed survival curves with significant differences ($p < 0.05$) in relation to the two control groups (saline solution and SPF tissue extract), as well as histopathological alterations. Significant differences ($p < 0.05$) in viral load were observed in treatments III and IV between the 2nd and 6th day after infection, among three collection points, with average values of 1.33×10^2 to 1.59×10^7 viral copies, respectively. Expression of immunological genes (*Sid-1*, *Dicer-2*, *Argonaut-2*, *proPO-1* and *PPAE-1*), was evaluated by qPCR, applying the $2^{-\Delta Cq}$ method. In most cases expression reduction was observed. However, *Sid-1* and *Argonaut-2* showed expression increase in the treatment with the lowest viral dose. In the second experiment (25 days; six treatments; four sampling points), the effect of different doses (0.5, 1.0, 3.0 and 5.0 μ g dsRNA per gram of shrimp), administered by intramuscular injection two days before the challenge, was monitored. Two control groups were used, in one of them the animals were injected with saline and SPF tissue extract (negative), and in the other, with saline and infected tissue extract (positive). Histopathological changes characteristic of IMN and significant differences ($p < 0.05$) in viral load between the 2nd and 8th post-injection day were verified in cases where IMNV was applied. No differences were observed in the extent or expression of the genes analyzed throughout the experiment, suggesting that in the present conditions dsRNAs had no protective effect. Because this is a new model of dsRNA production, the techniques of use, purification, quantification as well as the delivery methods of these molecules need to be improved.

Keywords: White shrimp. IMNV. Immunology. RNAi.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Fotomicrografias de cortes histológicos corados com H&E referentes aos tratamentos do experimento 1 (I – solução salina, II – extrato de tecido SPF, III – IMNV 10^{-2} , IMNV 10^1)..... 43
- Figura 2 - Perfil de expressão dos genes *Sid-1*, *Argonauta-2*, *Dicer-2*, *proPO-1* e *PPAE-1* em hemócitos do camarão *L. vannamei* injetados intramuscularmente com: I - solução salina; II - extrato de tecido SPF; III – extrato de tecido infectado por IMNV (10^{-2}); IV - extrato de tecido infectado por IMNV (10^1)..... 47
- Figura 3 - Fotomicrografias de cortes histológicos corados com H&E referentes aos tratamentos do experimento 2 (I - controle negativo, II - controle positivo, III - 0,5 µg de dsRNA por grama de camarão, IV - 1,0 µg dsRNA por grama de camarão, V - 3,0 µg dsRNA por grama de camarão, VI - 5,0 µg dsRNA por grama de camarão)..... 50
- Figura 4 - Abundância dos transcritos dos genes *SID-1*, *Argonauta-2*, *Dicer-2*, *proPO-1* e *PPAE-1* em hemócitos de camarões *L.vannamei* injetados intramuscularmente com: I) solução salina e extrato de tecido SPF; II) solução salina e extrato de tecido com IMNV; III) 0,5 µg de dsRNA/g de camarão; IV) 1,0 µg de dsRNA/g de camarão; V) 3,0 µg de dsRNA/g de camarão; VI) 5,0 µg de dsRNA/g de camarão ao longo de 25 dias de bioensaio experimental, no 2º dia pré-injeção, dia 0, 5º e 8º dias pós injeção..... 55

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Percentual de sobrevivência dos camarões injetados com solução salina, extrato SPF ou extrato IMNV (10^{-2} e 10^{-1}) no período de 20 dias pós-injeção..... 42
- Gráfico 2 - Quantificação do número médio de cópias do IMNV no 2º dia pré-injeção e nos 3º e 6º dia pós-injeção da solução salina, extrato SPF ou extrato IMNV (10^{-2} , 10^{-1}) em camarões *L. vannamei*..... 44
- Gráfico 3 - Percentual de sobrevivência dos camarões no período de 23 dias pós-injeção com extrato de tecido SPF (I) ou extrato de tecido IMNV (II-VI)..... 49
- Gráfico 4 - Quantificação do número médio de cópias do IMNV no 2º dia pré-injeção e nos 3º e 6º dia pós-injeção da solução salina, extrato SPF ou extrato IMNV (10^{-2} , 10^{-1}) em camarões *L. vannamei*..... 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCC	Associação Brasileira de Criadores de Camarão
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	Sulfato de amônio
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
aa	Aminoácidos
AFA	Álcool, Formol e Ácido Acético Glacial
ANOVA	Análise de variância
AUG	Adenosina-Uridina-Guanosina (Códon de iniciação)
BP	<i>Baculovirus penaei</i>
CsCl	Cloreto de Césio
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
dsRNA	Dupla fita de RNA
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
g	Gramas
g	Giros
g/mL	Gramas por mililitro
GLV	<i>Giardia lamblia vírus – Vírus Giardia Lamblia</i>
H ₂ O	Água
HPV	<i>Hepatopancreatic parvovirus</i> - Parvovirose hepatopancreática
IHHNV	<i>Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis</i> – Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética
IMN	Doença da Mionecrose Infecciosa
IMNV	<i>Infectious Myonecrosis Virus</i> – Vírus da Mionecrose Infecciosa
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio Dibásico
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio Monobásico
MBV	<i>Penaeus monodon-type baculovirus</i>
mg	Miligramas
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
min	Minutos

mL	Mililitros
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanômetro
nt	Nucleotídeos
O.D	Densidade Óptica
OIE	World Organisation for Animal Health – Organização Mundial da Saúde Animal
ORF	<i>Open Reading Frames</i> – Quadro de Leitura Aberta
p/v	Peso dividido pelo volume
pb	Pares de bases
PBS	Tampão Fosfato Salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
<i>RdRp</i>	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i> – RNA polimerase dependente de RNA
RDS	<i>Runt Deformity Syndrome</i> – Síndrome da Deformidade e do Nanismo
RISC	Complexo de Silenciamento induzido por RNA
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
rpm	Rotações por minuto
<i>rr2</i>	Ribonucleotídeo redutase 2
RT-LAMP	Amplificação isotérmica mediada por loop de Transcrição Reversa
RT-PCR	Reação da Transcriptase Reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
RT-qPCR	PCR quantitativa de Transcrição Reversa
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
siRNA	<i>Small interfering RNA</i> - Pequeno RNA de interferência
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i> - Livre de patógenos específicos
TSV	<i>Taura Syndrome Virus</i> – Vírus da Síndrome de Taura
UAA	Uridina-Adenosina-Adenosina (Códon de parada)
VP28	Proteína Viral 28
WSSV	<i>White Spot Syndrome Virus</i> – Vírus da Síndrome da Mancha Branca
µm	Micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca Registrada
™	Trade Mark (Marca Comercial)
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	A carcinicultura no Brasil.....	19
2.2	Principais enfermidades virais na carcinicultura.....	20
2.3	Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV).....	23
2.3.1	<i>Variabilidade genética do IMNV.....</i>	24
2.4	Sistema imunológico do camarão.....	26
2.5	Genes imunológicos em <i>Litopenaeus vannamei</i>.....	27
2.6	Produção de dsRNA <i>in vivo</i>.....	30
3	OBJETIVOS.....	32
3.1	Geral.....	32
3.2	Específicos.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	Preparação dos extratos de tecidos infectado por IMNV e extrato de tecido SPF (livre de IMNV, IHNV e WSSV).....	33
4.2	Indução e extração de dsRNAs.....	34
4.3	Experimento 1 – Validação dos extratos de tecidos infectante e livre de patógenos específicos.....	35
4.4	Experimento 2 – Dose-resposta de dsRNA produzidos <i>in vivo</i> para o tratamento contra a doença causada pelo vírus da mionecrose infecciosa.....	36
4.5	Análises histológicas.....	37
4.6	Extração de RNA e síntese de cDNA.....	37
4.7	Quantificação de IMNV por RT-qPCR.....	38
4.8	Análise da expressão de genes imunológicos.....	39
4.9	Análises estatísticas.....	40
5	RESULTADOS.....	41
5.1	Experimento 1 – Validação dos extratos de tecidos infectante e livre de patógenos específicos.....	41
5.1.1	<i>Sobrevivência.....</i>	41
5.1.2	<i>Histologia.....</i>	42

5.1.3	<i>Evolução da carga viral</i>	44
5.1.4	<i>Expressão dos genes</i>	45
5.1.4.1	<i>Gene SID-1</i>	45
5.1.4.2	<i>Gene Dicer-2</i>	45
5.1.4.3	<i>Gene Argonauta-2</i>	45
5.1.4.4	<i>Gene proPO-1</i>	46
5.1.4.5	<i>Gene PPAE-1</i>	46
5.2	Experimento 2 - Dose-resposta de dsRNA produzidos in vivo para o tratamento contra a doença causada pelo vírus da mionecrose infecciosa	48
5.2.1	<i>Sobrevivência</i>	48
5.2.2	<i>Histologia</i>	49
5.2.3	<i>Evolução da carga viral</i>	51
5.2.4	<i>Expressão dos genes</i>	53
5.2.4.1	<i>Gene SID-1</i>	53
5.2.4.2	<i>Gene Dicer-2</i>	53
5.2.4.3	<i>Gene Argonauta-2</i>	53
5.2.4.4	<i>Gene proPO-1</i>	53
5.2.4.5	<i>Gene PPAE-1</i>	53
6	DISCUSSÃO	56
7	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de camarão é uma das atividades da aquicultura que mais tem se expandido mundialmente, sendo o crustáceo mais cultivado desde a década de 90. A produção mundial de crustáceos foi estimada em 7,9 milhões de toneladas em 2016, movimentando em torno de 57,1 bilhões de dólares. Desse total, 4,16 milhões de toneladas (53%) correspondeu à produção do camarão branco do pacífico *Litopenaeus vannamei*, a espécie mais cultivada globalmente, nativa da costa do Pacífico oriental, do México ao Peru, porém introduzida com sucesso em diversos países do mundo todo (FAO, 2018).

Mesmo diante do significativo crescimento da atividade, alguns problemas dificultam maiores progressos, dentre eles a grande manifestação de enfermidades e as dificuldades relacionadas ao seu controle, fatores aliados ao manejo e a carência de maiores investimentos em ciência e tecnologia, principalmente na área de genética, que certamente impulsionariam ainda mais o crescimento do setor. A sanidade é crucial para o sucesso do sistema produtivo, contudo as enfermidades manifestam-se nos mais diversos segmentos de produção (PINHEIRO *et al.*, 2007; BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). Dentre as doenças que acometem os camarões de cultivo, as de origem viral e a EMS/AHPND, de origem bacteriana, são as que mais preocupam e desafiam produtores, devido ao grande impacto econômico negativo causado pelas perdas massivas nas produções (FLEGEL *et al.*, 2004; FAO, 2013).

Uma dessas enfermidades é a doença causada pelo Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV), relatada pela primeira vez em 2002, no estado do Piauí, Nordeste do Brasil (OIE, 2019). Desde o seu surgimento provoca significativo impacto na produção de camarão. As medidas de combate empregadas nos cultivos consistem principalmente na aplicação de boas práticas de manejo e medidas preventivas (MOSS *et al.*, 2012; LIGHTNER, 2005; PRUDER, 2004). Além dessas medidas e práticas, biotecnologias emergentes nas áreas de imunologia e engenharia genética vêm sendo desenvolvidas e testadas como alternativas para o tratamento da doença. A interferência por RNA (RNAi), por exemplo, é uma das ferramentas biotecnológicas que vem sendo bastante exploradas, se apresentando como uma alternativa promissora para o controle de viroses em camarões cultivados (CHAROONNART; PURTON; SAKSMERPROME, 2018).

A carcinicultura é uma importante atividade do setor aquícola, que contribui diretamente na produção de alimentos, geração de emprego e renda. Diante dos grandes impactos causados pelas doenças que acometem os cultivos de camarão e que se configuram

como um grande obstáculo para um maior êxito da atividade, estudos que visam uma melhor compreensão dos mecanismos de defesa e a aplicação de ferramentas biotecnológicas a exemplo do uso de dsRNA produzidas por um microrganismo reconhecidamente seguro, como alternativas para o enfrentamento e controle de enfermidades são de considerável relevância. Desse modo, a finalidade do presente estudo é avaliar a modulação da expressão de genes imunológicos em camarões *Litopenaeus vannamei* infectados experimentalmente com o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) e tratados com moléculas de dsRNA produzidos *in vivo* pelo *Bacillus subtilis* JJBs3.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A carcinicultura no Brasil

A aquicultura é uma prática ampla, referente aos cultivos de variados organismos aquáticos, incluindo algas, plantas aquáticas, moluscos, anfíbios, crustáceos e peixes. A criação de camarão com finalidades de subsistência teve sua origem no Sudoeste da Ásia. A prática sustentou por séculos, traços artesanais até a década de 1930, quando no Japão foi obtida em laboratório a desova de fêmeas capturadas no mar para serem utilizadas na produção comercial de pós-larvas, e foi esta tecnologia a responsável pela origem do que é hoje a carcinicultura contemporânea (ROCHA; RODRIGUES, 2004).

No Brasil, as experiências iniciais de cultivo de camarões aconteceram no decorrer dos anos 70, primeiramente com espécies nativas e posteriormente com as exóticas (BARBIERI JÚNIOR; OSTRENSKY NETO, 2001). No entanto, a atividade só se destacou no cenário nacional no início da década de 90, após a introdução do *Litopenaeus vannamei* e com a ampliação das áreas de produção em vários estados, em especial na região Nordeste, por apresentar condições e recursos naturais favoráveis, tais como uma vasta costa marítima, muitos hectares de água represada, clima predominantemente tropical, grande concentração de água doce continental, entre outros aspectos (RODRIGUES; BORBA, 2013).

Na carcinicultura, o camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, é a espécie mais cultivada, e responde por 53% da produção total de crustáceos cultivados globalmente (FAO, 2018). A preferência pela utilização desse organismo advém de fatores como rusticidade, grande capacidade adaptativa a diferentes condições climáticas e suas mudanças, alta produtividade em densidades elevadas, tolerância e bom desempenho zootécnico em ampla variação de salinidade (VALENÇA; MENDES, 2009). De acordo com os dados mais recentes, a China lidera a produção mundial de crustáceos marinhos, seguida pela Indonésia e Vietnã. O Brasil é o 11º maior produtor, com 52.100 toneladas, o que representa 1,01% da produção mundial (FAO, 2018). A região Nordeste concentra a maior produção de camarão marinho do Brasil, respondendo por 99,4% da produção nacional, com destaque para os estados do Rio Grande do Norte e Ceará, responsável por 43,2% e 28,5% do total da produção, com mais de 13 mil toneladas de camarão em 2018 (IBGE, 2018).

O desenvolvimento da carcinicultura brasileira depende da aplicação de esforços como recursos financeiros, científicos e técnicos. Embora a atividade de cultivo de camarões venha apresentando crescimento expressivo e grande notoriedade no setor aquícola, ela

enfrenta sérios entraves que têm dificultado seu avanço, como a manifestação expressiva de doenças virais altamente devastadoras, fatores aliados ao manejo, e adicionalmente o déficit em investimentos em ciência e tecnologia, principalmente na área de genética, que são sem dúvidas uma ferramenta fundamental para o enfrentamento destes problemas. Na carcinicultura, como em qualquer outro cultivo animal, a sanidade é um elemento chave para o sucesso do sistema produtivo, no entanto, as enfermidades manifestam-se nos mais diversos segmentos da produção animal, causando grandes perdas e impactos econômicos (PINHEIRO *et al.*, 2007).

2.2 Principais enfermidades virais na carcinicultura

Entre os principais elementos que limitam um maior êxito da carcinicultura no mundo estão o surgimento e manifestação de enfermidades e as dificuldades relacionadas ao seu controle. Cultivos com altas densidades populacionais sem os devidos cuidados e suportes tecnológicos facilitam a rápida disseminação de agentes patogênicos, que podem ocasionar grandes mortalidades e, conseqüentemente prejuízos econômicos (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014).

As enfermidades que acometem o cultivo de camarões incluem síndromes que podem ser de origem infecciosa, causadas por vírus, bactérias, fungos, protozoários e metazoários, ou de etiologia não infecciosa, ocasionadas por agentes abióticos, como fatores ambientais, físicos, nutricionais ou genéticos (PANTOJA; LIGHTNER, 2014). A carcinicultura funciona como uma corrente de elos relacionados entre si, que engloba o organismo cultivado, o ambiente de cultivo e os patógenos. Quando essa corrente é rompida ocorre um desequilíbrio, desencadeando situações de estresse que facilitam a instalação destes patógenos e o surgimento de doenças, que em sua maioria estão relacionadas a microrganismos oportunistas, encontrados tanto na água e sedimento, quanto nos organismos cultivados (MARTINS, 2006).

Recentemente, uma doença emergente, a Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS), tecnicamente denominada doença da necrose hepatopancreática aguda (AHPND) vem causando impactos econômicos significativos diante das altas mortalidades ocasionadas em pós-larvas de camarão após 20 a 30 dias do início do cultivo (FAO, 2013). Essa enfermidade é causada por espécies de bactérias do gênero *Vibrio*, e é considerada juntamente com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) como os patógenos mais perigosos que afetam camarões (SOOWANNAYAN *et al.*, 2019). Dentre as doenças que acometem os camarões de

cultivo, as de origem viral são as que mais preocupam e desafiam produtores e pesquisadores, devido ao grande impacto econômico negativo causado pelas perdas massivas nas produções (FLEGEL *et al.*, 2004). Mais de vinte vírus já foram relatados como causadores de infecções em camarões marinhos, no entanto, muitos não foram associados a sinais clínicos de doenças e alguns foram apenas observados por microscopia eletrônica (WALKER; MOHAN, 2009).

No Brasil, as enfermidades de maior relevância são de origem viral e bacteriana ou a associação dos dois. Há relatos da ocorrência de pelo menos sete agentes de origem viral na carcinicultura brasileira, especificamente: *Baculovirus penaei* (BP) (BUENO; NASCIMENTO; MEYER, 1990); *Penaeus monodon-type baculovirus*, (MBV) (BUENO, 1991), *Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus* (IHHNV) (BUENO, 1991; MARTINS, 2003), *Hepatopancreatic parvovirus* (HPV) (BUENO, 1991), *Taura Syndrome vírus* (TSV) (GESTEIRA; ANDRADE, 2002), *Infectious Myonecrosis virus* (IMNV) (LIGHTNER *et al.*, 2004), e o *White Spot Syndrome Virus* (WSSV) (SEIFFERT; WINCKLER; MAGGIONI *et al.*, 2005). Dentre as enfermidades de etiologia viral que afetam os camarões cultivados no Brasil, as que recebem maior destaque são causadas pelo Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV) e o Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV).

A doença causada pelo vírus da mancha branca é apontada como a mais devastadora da indústria aquícola mundial (NATARAJAN *et al.*, 2017). Ela causa uma destruição sistemática dos tecidos ectodermis e mesodermis, das brânquias e do tecido subcuticular do estômago e intestino. Os animais afetados apresentam ainda anorexia, letargia, e quando moribundos, podem apresentar uma coloração rosa ou avermelhada, sendo o sintoma externo mais clássico da patologia a formação de depósitos de sais de cálcio no epitélio cuticular, sob a forma de manchas brancas arredondadas, os quais deram nome à síndrome (FAO, 2001; PANTOJA; LIGHTNER, 2014).

Em 2004, no sul do Brasil, no estado de Santa Catarina foram registrados os primeiros surtos da doença, e em janeiro de 2005 a enfermidade foi diagnosticada e notificada à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), atingindo com rapidez grande parte das fazendas do estado (SEIFFERT; WINCKLER; MAGGIONI *et al.*, 2005). Em março de 2005 houve relatos da doença em uma única fazenda no Ceará (MULLER *et al.*, 2010). Em 2007, o WSSV foi diagnosticado em camarões coletados em fazendas localizadas em território cearense (FEIJÓ *et al.*, 2013). No ano de 2008, foram registradas mortalidades associadas ao vírus em fazendas no sul da Bahia (MULLER *et al.*, 2010) e em 2011, nos Estados de Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte. Em 2016 o estado do Ceará sofreu um grande

surto de WSSV, que atingiu de forma devastadora o litoral oeste do estado, que até então não tinha registrado grandes impactos causados pela doença.

A infecção hipodermal e necrose hematopoiética, também conhecida como síndrome da deformidade e nanismo no *Litopenaeus vannamei* é causada pelo Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV), e está amplamente distribuída em instalações de cultivo nas Américas e na Ásia (OIE, 2017). Foi diagnosticado pela primeira vez em pós-larvas de *Litopenaeus stylirostris* e *Litopenaeus vannamei* no Havaí, na década de 80. Os sintomas clínicos da doença podem variar de acordo com a espécie de camarão, mas entre os principais sinais estão: redução na ingestão de alimentos, alteração na coloração, enrugamento das antenas e cutículas, crescimento reduzido e desuniforme, características da enfermidade conhecida como RDS (*Runt Deformity Syndrome*), a Síndrome do Nanismo Deformativo (LIGHTNER; REDMAN; BELL, 1983).

O primeiro registo de IHHNV no Brasil foi feito por Bueno (1991) em camarões das espécies *Penaeus monodon* e *L. vannamei*, que exibiam deformações externas e taxa de crescimento reduzido. O vírus foi detectado também em espécies nativas do Ceará, como *Farfantepenaeus subtilis*, *Farfantepenaeus brasiliensis* e *Litopenaeus schimitti*, coletadas em ambiente natural em áreas próximas a fazendas de cultivo de camarão do litoral leste do estado (OLIVEIRA-NETO, 2006). Diferente de outras doenças virais que acometem os cultivos de camarão, os impactos econômicos causados pela infecção por IHHNV em camarões *L. vannamei* não são devido a elevadas taxas de mortalidades, mas à desuniformidade e crescimento reduzido (LIGHTNER, 2008).

A doença causada pelo Vírus da Mionecrose Infecçiosa (IMNV) foi relatada pela primeira vez em 2002, no estado do Piauí, Nordeste do Brasil. Nos anos seguintes disseminou-se pelos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco, causando uma diminuição expressiva da produção nacional de camarão (OIE, 2019). Em 2006 foi confirmada a presença dessa enfermidade também na Indonésia (SENAPIN *et al.*, 2007).

De acordo com Lightner (2005), o IMNV se manifesta na fase inicial ocasionando altas taxas de mortalidade, passando para um estágio crônico com mortalidades mais baixas. A manifestação da doença geralmente está associada a fatores como estresse físico e ambiental, causando mortalidades elevadas principalmente na fase juvenil de *L. vannamei* (LIGHTNER; PANTOJA, 2004). A mionecrose é o principal sintoma de IMN, que consiste na necrose dos músculos estriados do abdômen e do cefalotórax. Os animais tendem a apresentar perda da transparência da cauda, áreas com coloração de aspecto leitoso e em estágios mais avançados pode ocorrer o apodrecimento das áreas afetadas, resultando em uma

cor alaranjada (SILVA; PINHEIRO; COIMBRA, 2011; NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004). Essa enfermidade desde o seu surgimento provoca significativo impacto na produção de camarão, afetando principalmente a região Nordeste, maior produtor nacional, que frequentemente ainda sofre com surtos da doença nos cultivos. Isso torna indispensável o desenvolvimento de pesquisas e estudos relacionados ao IMNV, suas características, variações e impactos por ele causados.

2.3 Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV)

O IMNV é um vírus de RNA, não envelopado, com simetria icosaédrica, 40 nm de diâmetro e uma densidade de 1,366 g/mL em CsCl. Recentemente, estudos filogenéticos baseados em sequências de *RdRp* (*RNA-dependent RNA polymerase*) introduziram o IMNV como membro de um novo grupo monofilético, intimamente relacionado ao clado de um outro vírus, *Giardia lamblia vírus* (GLV), pertencente a família Totiviridae (Liu *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2014).

A partícula possui protrusões em seu capsídeo que provavelmente estão envolvidas na transmissão extracelular e patogenicidade viral. Seu genoma é formado por uma única molécula de RNA de dupla fita contendo pelo menos 8.226 pb (*veja item 2.3.1*) e apresenta dois quadros de leitura aberta (*Open Reading Frames* - ORF's): o ORF1, no sentido 5' compreende 5.127 nt e codifica 1.708 aa, partindo dos nt 470-472 AUG para o códon de parada na estrutura UAA nas posições 5.594-5.596, deixando uma região não traduzida de 469 nt. O ORF2 abrange 2.739 nt, codificando 912 aa, iniciando nas posições 5.395-5.397 e finalizando nas posições 8.131-8.133, deixando uma região 3' não traduzida de 93 nt. ORF2 começa a 199 nt acima da extremidade de ORF1 (posições 5395-5593) indicando que ORF1 e ORF2 estão sobrepostos (POULOS *et al.*, 2006; TANG *et al.*, 2008; DANTAS *et al.*, 2015).

Os camarões infectados por IMNV exibem necrose dos músculos estriados do abdômen e do cefalotórax. A cauda pode apresentar coloração de aspecto leitoso, perdendo a transparência. Os músculos e os apêndices afetados podem exibir uma coloração avermelhada, com aparência de camarão cozido. Os peneídeos enfermos podem apresentar redução de consumo alimentar, anorexia, diminuição do volume do hepatopâncreas, diminuição de lipídios, nado desorientado, dificuldade para endurecer a carapaça. Os camarões afetados pelo IMNV têm aparência muito debilitada e apresentam com facilidade, flexão do 3º segmento abdominal (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004).

Quanto aos sinais que podem ser observados através de histopatologia, em sua fase aguda a mionecrose é coagulativa, caracterizada pela presença de edema entre as fibras musculares, podendo as lesões estar concentradas em uma ou em várias áreas. Na fase crônica da doença, a necrose evolui da forma coagulativa para a liquefação dos músculos, ocorrendo fibrose e infiltração hemocítica na musculatura, podendo apresentar ainda hipertrofia do órgão linfóide e a formação de esferoides, principalmente próximos ao coração e glândulas antenais (LIGHTNER *et al.*, 2004).

A doença da Mionecrose Infecciosa, bem como outras enfermidades virais, geralmente se manifesta como resultado de um aumento na contagem viral, decorrente de várias formas de estresse ambiental ou fisiológico. Diferente do que se tem já relatado para WSSV, não existem para IMNV vetores específicos bem descritos, no entanto, pela sua estrutura não-envelopada, semelhante a de TSV, considera-se que o IMNV pode permanecer infeccioso em intestino e fezes de aves marinhas que se alimentam de camarões moribundos de fazendas de cultivos onde ocorreram surtos de IMN (OIE, 2018). Além disso, a transmissão da doença se dá por canibalismo, pela água e por transmissão vertical dos reprodutores para prole (LIGHTNER, 2011). Foi constatado experimentalmente que o microcrustáceo *Artemia franciscana* pode ser um potencial vetor, visto que é suscetível ao IMNV e é amplamente utilizada como fonte de alimento das larvas e reprodutores de camarões cultivados (SILVA *et al.*, 2015).

Para a detecção da Mionecrose Infecciosa são empregadas principalmente técnicas histopatológicas e ferramentas moleculares. Os métodos moleculares que utilizam marcadores genéticos específicos para a detecção do IMNV são: hibridização *in situ*, transcrição reversa do RNA total seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e RT-PCR em tempo real (RT-qPCR). Também é utilizada a amplificação isotérmica mediada por *loop* acoplada à transcrição reversa (RT-LAMP, do inglês – *reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification*) (ANDRADE *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2008; ANDRADE; LIGHTNER, 2009; TEIXEIRA-LOPES *et al.*, 2010; TEIXEIRA-LOPES *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2013).

2.3.1 Variabilidade genética do IMNV

Os vírus de RNA estão sujeito a altas taxas de mutação, devido a fatores como a ausência da atividade de correção de erros da RNA polimerase. Alterações em regiões específicas do genoma de diferentes vírus influenciam diretamente em sua capacidade de infecção e nos mecanismos de patogenicidade. As primeiras evidências dessa influência

surgiram a partir de estudos de viróides, que tinham sua capacidade de infecção, replicação e patogenicidade afetadas por alterações induzidas em seu genoma de RNA (TABLER; SFINGER, 1985; SANO *et al.*, 1992).

O IMNV é um vírus de RNA não envelopado pertencente à família Totiviridae, purificado e caracterizado pela primeira vez por Poulos *et al.* (2006), que descreveram seu genoma como uma molécula única de dsRNA com 7.560 pb. O sequenciamento do genoma viral indicou a presença de dois ORF's. O ORF da extremidade 5' (ORF 1, nt 136-4.953) codifica para as proteínas do capsídeo e de ligação a dsRNA (*RNA binding protein*), enquanto que o ORF da extremidade 3' (ORF 2, nt 5.241-7.451) contém genes para a codificação da RNA polimerase dependente de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase, RdRp*). Novas características do genoma do IMNV foram identificadas por Nibert (2007) e incluem a presença de duas sequências '2A-like motifs', que provavelmente estão envolvidas na clivagem de um grupo poliprotéico na região N terminal do ORF 1 do vírus.

Recentemente, em estudo publicado por Dantas *et al.* (2015) dois genomas adicionais de isolados brasileiros do IMNV coletados em 2009 e 2013 foram sequenciados e analisados, revelando 643 e 22 pb extras nas extremidades 5' e 3' do genoma do IMNV, respectivamente, confirmando que seu tamanho real é pelo menos 8.226 pb. Considerando essas sequências adicionais no genoma, o ORF1 pode começar no nt 470, abrange 5.127 nt, codificando uma poliproteína de 1.708 aa. ORF2 abrange 2.739 nt, codificando 912 aa, iniciando nas posições nt 5.395-5.397 e terminando no códon de parada nas posições nt 8.131-8.133, deixando uma região 3' não traduzida de 93 nt. ORF2 começa 199 nt acima da extremidade de ORF1 indicando que ORF1 e ORF2 podem estar sobrepostos.

Dados depositados no GenBank mostram o sequenciamento parcial de pelo menos nove cepas, e o sequenciamento do genoma completo de quatro cepas do IMNV, isolados do Brasil e da Indonésia (PRASAD *et al.*, 2017). Alinhamentos múltiplos da proteína capsidial do IMNV de sequências brasileiras mostram um alto grau de similaridade entre sequências do Brasil e da Indonésia, sendo quase que geneticamente idênticas, sugerindo que a cepa da Indonésia pode ser originária do Brasil (COELHO-MELO *et al.*, 2014; PRASAD *et al.*, 2017). Observa-se também que a região mais variável do genoma está localizada na primeira metade do ORF1, coincidindo com uma região que provavelmente codifica protruções no capsídeo. As informações que se tem acerca do vírus podem ser usadas como uma boa base e um ponto de partida para elucidar a regulação traducional do vírus, suas variações e também os mecanismos envolvidos na sua virulência, e a partir daí desenvolver técnicas que possibilitem o tratamento da doença por ele causado (DANTAS *et al.* 2015).

Desde o surgimento da enfermidade causada pelo IMNV, as medidas de combate empregadas nos cultivos consistem principalmente na aplicação de boas práticas de manejo e medidas preventivas. A desinfecção de ovos e larvas é recomendada para auxiliar na prevenção da doença, bem como uma rotina de diagnóstico de reprodutores, ovos e larvas para a produção de animais livres de patógeno específico (MOSS *et al.*, 2012; LIGHTNER, 2005; PRUDER, 2004).

Além do emprego de medidas preventivas na carcinicultura, biotecnologias emergentes nas áreas de imunologia e engenharia genética vêm sendo desenvolvidas e testadas como alternativas para o tratamento da doença. A interferência por RNA (RNAi), por exemplo, é uma das ferramentas biotecnológicas que vem sendo bastante explorada, por ser um mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional, apresentando-se assim como uma alternativa promissora para o controle de viroses em camarões cultivados (CHAROONNART; PURTON; SAKSMERPROME, 2018).

2.4 Sistema imunológico do camarão

O sistema imunológico consiste em mecanismos através dos quais os organismos multicelulares se defendem de invasores externos. Uma resposta imune envolve o reconhecimento do antígeno, que pode ser um patógeno ou outro corpo estranho qualquer, e em seguida desencadeia uma reação direcionada a este elemento, para eliminá-lo do organismo (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2015). O sistema imune pode ser inato ou adaptativo, sendo o inato caracterizado pelos mecanismos que estão naturalmente presentes nos organismos multicelulares, desde plantas a humanos, e que atuam como a primeira defesa contra a invasão, por meio do reconhecimento de moléculas padrão associadas ao agente invasor. O sistema adaptativo está presente apenas em vertebrados, e apresenta mecanismos de defesa mais complexos e rebuscados, como anticorpos, linfócitos e memória imunológica capaz de reconhecer antígenos (LEE; SÖDERHALL, 2002).

Nos camarões e demais crustáceos, a defesa primária é o exoesqueleto, que atua como uma barreira física de proteção. Seu sistema imune inato está diretamente relacionado à hemolinfa, que é composta pelos hemócitos e o plasma, onde estão dissolvidos os fatores humorais, que juntos atuam na proteção do organismo contra invasões e infecções por patógenos. Em camarões, os principais mecanismos de defesa são o reconhecimento de invasores por proteínas de reconhecimento padrão; sinalização e ativação de hemócitos; respostas imunocelulares como fagocitose, formação de cápsulas e nódulos e infiltração

hemocitária; produção de moléculas antimicrobianas; melanização mediada pelo sistema de ativação da profenoloxidase e defesas antivirais (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014).

O conhecimento sobre o sistema imunológico inato dos camarões, conceituado como desprovido de anticorpos específicos e células de memória fez com que por bastante tempo fosse ressaltada a ideia de que seria inconcebível o desenvolvimento de vacinas ou terapias semelhantes para tratar enfermidades recorrentes nesses animais. No entanto, esse conceito vem sendo bastante contestado diante de descobertas que apontam para a possível presença de uma imunidade adaptativa alternativa em crustáceos, como por exemplo, o mecanismo do RNA interferente (JOHNSON; HULTEN; BARNES, 2008).

Uma abordagem que integre de forma aprofundada conhecimentos relacionados à imunidade, fisiologia e patologia do camarão, aliada aos estudos genéticos e moleculares é necessária e fundamental para a prevenção e o controle de doenças que acometem a carcinicultura (BACHÈRE, 2000).

2.5 Genes imunológicos em *Litopenaeus vannamei*

A formação de nódulos e cápsulas hemocíticas está entre os principais mecanismos de defesa em crustáceos e é constantemente acompanhada por reações de melanização. A biossíntese de melanina é um processo que compreende uma série de reações químicas em cascata, designadas de sistema de ativação da pró-fenoloxidase ou sistema proPO (LEE; SÖDERHALL, 2002).

Normalmente, a cascata proPO é acionada por uma pequena quantidade de moléculas como lipopolissacarídeos, glucanos ou peptidoglicanos. As proteínas de reconhecimento padrão ligam essas moléculas e inicializam o sistema proPO através dessa cascata proteolítica, mediada principalmente por serino proteínas, dentre elas a enzima ativadora da pró-fenoloxidase (*PPAE*), que converte o *proPO* inativo em sua forma ativa (SÖDERHALL; CERENIUS, 2004). A regulação do sistema é feita por inibidores de proteases presentes na hemolinfa e que evitam uma super-ativação deste sistema, também restringindo a reação apenas aos locais infectados (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006).

A atividade da enzima fenoloxidase (PO) é um parâmetro muito utilizado como indicativo das condições do sistema imunológico e de defesa dos camarões em bioensaios experimentais frente a desafios com diferentes condições ambientais, fisiológicas e sanitárias. Song *et al.* (2003) observaram aumento da atividade de PO em animais da espécie *L.*

vannamei infectados com TSV quando comparados a camarões saudáveis da mesma espécie. Resultados parecidos também foram encontrados por Motesdeoca *et al.* (2001) em *L. vannamei* infectados pelo WSSV. Em contraste, diversos trabalhos relatam uma diminuição na expressão gênica de proPO e na atividade da forma enzimática ativa (PO) em camarões submetidos a infecções virais (ROUX *et al.*, 2002; MATHEW *et al.*, 2007; YEH *et al.*, 2009; AI *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2009).

A interferência por RNA (RNAi) é um mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional conservado durante a evolução, mediado por pequenos RNAs de fita dupla (dsRNAs) capazes de reconhecer especificamente uma sequência de mRNA alvo e mediar sua clivagem ou reprimir sua tradução (MITTAL, 2004). O uso de RNAi como um mecanismo antiviral é particularmente importante e tem sido largamente utilizado no desenvolvimento de terapias antivirais para a carcinicultura, visto que os vírus contribuem para perdas econômicas substanciais dentro dos cultivos, e estratégias para prevenir ou combater infecções virais são altamente desejáveis (FAUCE; OWENS, 2012).

Nos camarões, moléculas longas de dsRNA podem ser internalizadas para o citoplasma através de canais proteicos de transmembrana, identificados como SID-1, que codifica uma proteína integral de membrana e sinaliza para a ativação do RNAi. A ativação do mecanismo de RNAi se dá através do processamento de precursores longos de dsRNA em RNAs menores (21-25 pb), denominados como pequenos RNAs de interferência (*small interfering RNAs* – siRNA) ou, por meio da ação de um complexo proteico que contém a enzima *DICER*, uma endoribonuclease do tipo II, que cliva dsRNA ou regiões de grampo de RNAs de fita simples (ALIYARI; DING, 2008). Os siRNAs resultantes são incorporados ao RISC, um complexo multiproteico de silenciamento induzido por RNA, que causará a degradação específica ou impedirá a tradução do mRNA alvo (ROBALINO *et al.*, 2007).

Após a associação dos siRNAs ao RISC, as fitas de siRNA são separadas, e a fita antisense é então utilizada como molde pelo RISC para ir de encontro aos mRNAs alvos, que possuem sequências de nucleotídeos complementares, e então degradá-los, impedindo que a proteína correspondente seja traduzida (GELEY; MULLER, 2004). Dentre as proteínas-chave do sistema de RNAi, as da família das argonautas destacam-se, por serem componentes fundamentais do RISC. A proteína Argonauta 2, por exemplo, forma um núcleo catalítico com outras proteínas relacionadas e direciona a degradação específica do mRNA alvo ou o bloqueio do processo de tradução (LABREUCHE *et al.*, 2010).

O RNAi demonstrou resultados satisfatórios em respostas antivirais de artrópodes (WANG *et al.*, 2006). Para camarões, já existem vários trabalhos bem sucedidos envolvendo

o mecanismo. Sequências específicas de dsRNA tem sido largamente aplicadas para inibir a replicação viral no camarão contra o TSV, IHHNV, YHV, WSSV e IMNV (ROBALINO *et al.*, 2005; LOY *et al.*, 2013). Em *L. vannamei* infectados com YHV, sequência específica de dsRNA atuou na prevenção contra a infecção pelo vírus, conferindo também efeito terapêutico (ASSAVALAPSAKUL; CHINNIRUNVONG; PANYIM, 2009). Estudos feitos com dsRNA com uma sequência específica contra o vírus da Taura resultou na inibição da replicação do TSV (ROBALINO *et al.*, 2005). A injeção de RNAs de cadeia dupla homólogos a mRNA para a VP28 do vírus da síndrome da mancha branca pode induzir proteção no camarão contra WSSV (NILSEN *et al.*, 2017).

Camarões *L. vannamei* infectados experimentalmente com o vírus da Mionecrose Infecciosa que antes da infecção receberam injeções com uma sequência otimizada de dsRNA apresentaram 50% de sobrevivência, enquanto os demais tratamentos que não receberam injeções de dsRNA relacionada, tiveram 100% de mortalidade, comprovando a eficácia da aplicação de duplas fitas no tratamento da doença, inclusive reduzindo significativamente o número de cópias virais nos animais tratados (LOY *et al.*, 2013).

Uma baixa dose (0,02 µg) de um fragmento de 81 ou 153 pb, com sequência correspondente a suposta clivagem da proteína 1 no ORF1, protegeu 100% dos animais desafiados com o Vírus da Mionecrose Infecciosa contra a manifestação dos sinais da doença e mortalidade causada por ela. Além disso, os animais tratados com dsRNA específica sobreviveram a uma infecção inicial e foram resistentes a infecções subsequentes mais de 50 dias depois, com uma dose maior do vírus. Essa proteção é provavelmente dependente da sequência, visto que o dsRNA não específico para a sequência não forneceu proteção aos animais como havia sido descrito para outros vírus de camarão (LOY *et al.*, 2012). A injeção de dsRNAs sintéticas visando os genes ORF1a e ORF1b inibiu fortemente a replicação do IMNV ao longo de um período de 3 semanas após desafio viral, e resultou em 90 e 83% de sobrevivência dos camarões, respectivamente (FEIJÓ *et al.*, 2015).

Diante do exposto, a aplicação do mecanismo de interferência por RNA vem se mostrando como uma ferramenta promissora e efetiva para o controle de viroses em camarões cultivados (LIU; SÖDERHÄLL; JIRAVANICHPAISAL, 2009). A identificação e caracterização do papel dos pequenos ácidos ribonucleicos (*small RNAs*) não codificantes na regulação da expressão gênica e a técnica de RNAi são eventos marcantes na área das ciências biológicas, e constituem atualmente uma das áreas de estudo mais ativas e estudadas da biologia (KULCHESKI; MARGIS, 2017).

2.6 Produção de dsRNA *in vivo*

Mesmo diante do grande potencial da tecnologia de RNAi como uma importante ferramenta de contribuição para o desenvolvimento de terapias gênicas a partir do silenciamento de genes virais que acometem a carcinicultura, ainda existem alguns impasses para a aplicação prática em larga escala, como os elevados custos na utilização de dsRNA quando produzidos *in vitro* e a escolha do melhor método de entrega efetivo das dsRNAs aos animais (SAKSMERPROME *et al.*, 2009; SANCHEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2018).

No camarão, o silenciamento gênico tem sido experimentalmente induzido por vários métodos, tais como injeção *in vivo*, entrega *in vitro* a partir de culturas primárias de células e alimentação contendo bactérias que produzem dsRNA *in vivo*. A injeção intramuscular de dsRNA é um dos métodos mais utilizados para interromper a expressão gênica, principalmente em desafios experimentais, e vários estudos mostram em diferentes espécies de camarões a capacidade de dsRNA ectópico se espalhar do local de injeção para os demais tecidos, mediando a degradação de mRNAs alvos ou impedindo sua tradução, facilitando desse modo experimentos de silenciamento gênico confiáveis e reprodutíveis. No entanto, torna-se pouco viável sua aplicação prática em cultivos, devido ao oneroso manejo e elevado custo para a produção *in vitro* em quantidades necessárias para atender a uma alta demanda em se tratando de escala de cultivo comercial (ROBALINO *et al.*, 2011).

A produção *in vivo* de dsRNA em larga escala vem sendo feita a partir da utilização de variados microrganismos. Recentemente, pesquisas vêm sendo realizadas utilizando vírus recombinantes para a transferência de genes em diversas espécies animais, incluindo camarões. A exemplo de estudos com baculovírus recombinantes, que tem sido atualmente desenvolvidos para expressar a proteína VP28 de WSSV em sua superfície para a entrega de genes que expressam dsRNA específico para *rr2* de WSSV em células de camarão, desencadeando o mecanismo de RNAi, com a finalidade de investigar os efeitos protetores da utilização desse vírus recombinante como um veículo de entrega de dsRNA (RATTANAROJPONG *et al.*, 2016).

A bactéria *Escherichia coli* é uma das espécies mais testadas e utilizadas em diversos trabalhos já realizados, apresentando eficácia na produção de dsRNA para proteção e tratamento de camarões contra doenças virais (SARATHI *et al.*, 2008; SAKSMERPROM *et al.*, 2009; LOY *et al.*, 2012; THAMMASORN *et al.*, 2015).

Em meio a inúmeros microrganismos disponíveis que podem ser utilizados para essa finalidade, alguns pertencentes ao gênero *Bacillus* têm atualmente se mostrado como

candidatos interessantes. Muitos estudos têm sido realizados com a espécie *Bacillus subtilis*, diante de seu potencial probiótico e da possibilidade da utilização de linhagens recombinantes, capazes de produzir moléculas antivirais, e por serem um potente veículo de entrega, devido sua resistência e capacidade de esporulação, que os fazem sobreviver a condições ambientais adversas, facilitando sua estocagem e oferta viável aos animais. Além disso, não são patogênicos, não são tóxicos quando utilizados como alimento e podem produzir substâncias antimicrobianas, versatilidade no uso de nutrientes para seu crescimento, alta secreção de compostos enzimáticos e antimicrobianos, formação de esporos e por ser reconhecidamente seguro (*Generally Recognized as Safe - GRAS*) pela Administração de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration – FDA*), tornando-os candidatos mais adequados em comparação com outros probióticos (BALCÁZAR; ROJAS-LUNA; CUNNINGHAM, 2007; LIU *et al.*, 2010; FU *et al.*, 2011; OLMOS; PANIAGUA-MICHEL, 2014).

Contudo, a escolha do melhor e mais efetivo método de produção e entrega de moléculas de dsRNA que ativem o mecanismo de RNAi e que, de fato, silenciem genes de interesse requer mais investigação e continua a ser um desafio para a aplicabilidade prática da terapia, que precisa ainda ser consolidada na carcinicultura (DHAR *et al.*, 2019).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a dinâmica da expressão de genes imunológicos em camarões *Litopenaeus vannamei* infectados experimentalmente com o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) e tratados com moléculas de dsRNA produzidos *in vivo*.

3.2 Específicos

- Validar a infectividade dos extratos IMNV e SPF (livre de IMNV, WSSV e IHHNV) por meio de bioensaio de infecção experimental.
- Acompanhar o desenvolvimento da mionecrose infecciosa ao longo do período de desafio, por meio de PCR em tempo real e análise histopatológica.
- Avaliar a expressão diferencial de genes imunológicos (*Sid-1*, *Dicer-2*, *Argonauta-2*, *proPO-1* e *PPAE-1*) frente à infecção com o IMNV e administração de diferentes dosagens de moléculas produzidas *in vivo* pela cepa de *Bacillus subtilis* JJBs3 expressando a construção dsRNA-VP28ORF1a.

4 MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foram realizados dois experimentos, mencionados no texto como experimento 1 e experimento 2. Os subtópicos deste item se propõem a apresentar os delineamentos experimentais dos dois bioensaios, bem como os demais procedimentos metodológicos que os antecederam: preparação de extratos de tecidos e produção de dsRNAs, e as etapas pós experimentos: análises histológicas, extração de RNA, síntese de cDNA, quantificação do IMNV por RT-qPCR, análises de expressão gênica e análises estatísticas.

4.1 Preparação dos extratos de tecidos infectado por IMNV e extrato de tecido SPF (livre de IMNV, IHHNV e WSSV)

Os extratos utilizados nos desafios experimentais foram produzidos no Centro de Estudos e Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos (CEDECAM, Labomar, UFC). A produção do extrato de tecido infectado pelo IMNV foi feita por meio da captura de 47 camarões com 9 g (± 1), provenientes de regiões do Nordeste brasileiro com relatos de surto da Mionecrose Infecciosa. RT-PCR foi utilizado para selecionar os animais infectados com IMNV, utilizando protocolo descrito por Senapin *et al.* (2007). Foram realizados ainda, PCR para investigar a presença do WSSV (NUNAN; LIGHTNER, 2011) e IHHNV (OIE, 2012), para selecionar camarões infectados somente por IMNV, conforme protocolo adaptado de Prior *et al.* (2003).

Para a produção do extrato de tecido SPF, 72 camarões de 9 g (± 1) obtidos do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA) foram mantidos individualmente por 7 dias em sistema monitorado diariamente, em caixas plásticas de 5,5 litros com aeração constante e renovação de água diária de 50%, obedecendo aos seguintes parâmetros: 28°C, pH 7,3, 5,5 mg/L de Oxigênio Dissolvido e fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro. Todos os animais foram diagnosticados por qPCR ou RT-qPCR para WSSV, IHHNV e IMNV, com a finalidade de selecionar os animais livres dos três patógenos para a produção do extrato de tecido SPF. Um total de 24 animais estava livre dos três patógenos virais investigados, que são os que mais preocupam a região Nordeste, e foram utilizados para a elaboração do extrato.

Ambos os extratos foram preparados a partir do músculo abdominal dos camarões selecionados. As amostras foram homogeneizadas em tampão salino gelado (NaCl 330 mM, Tris 10 mM, pH 7,4) (1:10 p/v) e em seguida centrifugadas a 4.000 g/30 min/4°C. O

sobrenadante foi recuperado e novamente centrifugado a 8.000 g/30 min/4°C. Os extratos finais obtidos foram filtrados em membranas de 0,45 µm e 0,22 µm, respectivamente, e depois armazenados a -80°C até o momento de sua utilização (adaptado de PRIOR *et al.*, 2003). Para o extrato de tecido infectante, após a quantificação do número de cópias do IMNV por RT-qPCR, com um valor estimado de $1,02 \times 10^5$ cópias/100 µl do extrato, foi diluído nas concentrações de 10^{-1} e 10^{-2} , o que resultou na determinação aproximada de $1,02 \times 10^4$ e $1,02 \times 10^3$ cópias/100 µl, respectivamente, utilizadas para o bioensaio de infecção experimental de validação dos extratos, seguindo metodologia adaptada de Feijó (2014).

4.2 Indução e extração de dsRNAs

A cepa JJBs3 utilizada no segundo experimento foi desenvolvida e cedida por Filho (2019) e trata-se de um *Bacillus subtilis* com deleção do gene *rnc* envolvido na produção da enzima ribonuclease tipo III, que atua na degradação de dsRNA, e a integração de genes da VP28 do vírus da síndrome da mancha branca (*White Spot Syndrome Virus – WSSV*) e do gene da ORF1a do vírus da mionecrose infecciosa (*Infectious Myonecrosis Virus – IMNV*) flanqueados por dois promotores bidirecionais P_{ybl} ativados na fase estacionária de crescimento bacteriano. Esta cepa possui resistência aos antibióticos eritromicina e cloranfenicol.

Os processos de indução e extração das moléculas de dsRNAs foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Para induzir a produção de dsRNA pela bactéria *Bacillus subtilis* cepa JJBs3, foi inoculada em meio mínimo proposto por Anagnostopoulos e Spizizen (1961) modificado [10x ((10 g de (NH₄)₂SO₄; 70 g de K₂HPO₄; 30 g de KH₂PO₄; 5 g de Tris Na-Citrato 2x H₂O; 1 g MgSO₄ 7xH₂O; água destilada) + água destilada] com glicose (20%), caseína (1%) e cloranfenicol (10 mg/mL) até atingir o O.D de 0,1 (600nm), incubado *overnight* a 37°C com agitação contínua (250 rpm).

Para extração das dsRNAs, alíquotas do cultivo foram centrifugadas a 10.000 g/5 min/25°C. Em seguida o sobrenadante foi descartado e adicionou-se ao pellet 20 mg/mL de lizozima diluída em 200 µl de tampão de digestão e mantido por 30 min/37 °C. Foram adicionados 200 µl de SDS 0,1% em PBS, e posteriormente as amostras foram fervidas por 2 minutos. Foram adicionados 3,0 mL de Trizol[®] e incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 2,0 mL de clorofórmio e as amostras foram incubadas por 3 minutos, posteriormente centrifugadas a 12.000 g/15 min/4 °C. O sobrenadante é o RNA

extraído, que foi transferido para um novo tubo estéril, onde foi adicionado 10 mL de álcool isopropílico gelado, e misturado por inversão.

Para facilitar a precipitação do RNA, foi estocado a -80°C por 1 hora. As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e centrifugadas a $10.000\text{ g}/10\text{ min}/4^{\circ}\text{C}$. As amostras foram lavadas com 1 mL de etanol 75%, mescladas no vortex e centrifugadas a $7.500\text{ g}/5\text{ min}/4^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e os tubos invertidos sobre um papel toalha para secagem do pellet a temperatura ambiente durante 10 minutos. Para a solubilização foi adicionado ao pellet 2 mL de solução salina e em seguida foram quantificadas no BioDrop™ da Isogen como RNA.

Para visualizar o material extraído foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1%. As duplas fitas de RNA estavam na concentração de $186\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$, e foram padronizadas para as diferentes diluições utilizadas no experimento 2 (0,5; 1,0; 3,0 e 5,0) μg de dsRNA por grama de camarão, de acordo com o peso do animal.

4.3 Experimento 1 – Validação dos extratos de tecidos infectante e livre de patógenos específicos

O desafio experimental foi conduzido no Laboratório Multiuso do Centro de Estudos em Aquicultura Costeira (CEAC), localizado no município de Eusébio – Ceará e teve duração de 22 dias. Foram utilizados camarões marinhos juvenis da espécie *Litopenaeus vannamei*, fornecidos pelo LANOA. Esses animais passaram por processo de aclimação durante 20 dias anteriores ao experimento em 7 tanques de 500 litros cada, com aeração contínua e renovação diária de água de 50% do volume total.

Os parâmetros físico-químicos da água monitorados foram mantidos em salinidade 34, temperatura aproximada de 28°C , pH 7,3, 5,5 mg/L de Oxigênio Dissolvido e fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro. Durante a aclimação e no decorrer do bioensaio os camarões foram alimentados 2 vezes ao dia com ração comercial contendo 35% de proteína bruta em uma quantidade correspondente a 3,5% do peso corporal.

Após o período de aclimação, os animais com peso de 5 g (± 1) foram transferidos para aquários de 100 litros. Um total de 80 animais foi distribuído em 8 aquários, divididos em 4 grupos distintos, sendo 2 aquários por tratamento, 20 animais por tratamento, identificados de acordo com o material injetado como: I) Injeção com solução salina (grupo controle 1); II) Injeção com extrato SPF (grupo controle 2); III) Injeção com extrato IMNV 10^{-2} ; IV) Injeção com extrato IMNV 10^{-1} . Cada camarão foi injetado intramuscularmente com

100 µl de solução salina (NaCl 330 mM, Tris 10 mM, pH 7,4), extrato de tecido SPF ou extrato de tecido infectado por IMNV (valor estimado de $1,02 \times 10^5$ cópias/100 µl) em duas diferentes diluições (10^{-2} e 10^{-1}) resultando na determinação aproximada de $1,02 \times 10^4$ e $1,02 \times 10^3$ cópias/100 µl respectivamente, de acordo com seu tratamento.

Os camarões foram observados três vezes ao dia para o registro da mortalidade e acompanhamento de sinais clínicos característicos de IMN. Para as análises moleculares por RT-qPCR foram coletadas amostras de hemolinfa (~150 µl) de seis camarões por tratamento por dia de coleta, selecionados aleatoriamente, tendo sido as coletas realizadas no 2º dia antes da injeção e nos 3º e 6º dias após a injeção. Para evitar que o mesmo camarão fosse escolhido mais de uma vez para coleta de material biológico, um pequeno corte no urópode foi realizado para identificação.

Para as análises histológicas foram coletados quatro animais por tratamento. Nos grupos injetados com extrato de tecido infectado por IMNV foram selecionados os camarões moribundos que apresentavam sinais clínicos avançados de IMN, coletados nos dias de maiores taxas de mortalidade, 5º e 6º dia pós-infecção para o tratamento IV (10^{-1}) e 7º e 8º para o tratamento III (10^{-2}) e nos grupos controles os animais foram amostrados de modo aleatório, no 20º dia pós-injeção.

4.4 Experimento 2 – Dose-resposta de dsRNA produzidas *in vivo* para o tratamento contra a doença causada pelo vírus da mionecrose infecciosa

O presente experimento teve duração de 25 dias e foi realizado no Laboratório Multiuso do CEAC, localizado no município de Eusébio – Ceará. Foram utilizados camarões marinhos juvenis da espécie *Litopenaeus vannamei*, fornecidos pelo LANOA. Esses animais passaram por processo de aclimação durante 20 dias anteriores ao experimento em 7 tanques de 500 litros cada, com aeração contínua e renovação diária de água de 50% do volume total.

Os parâmetros físico-químicos da água monitorados foram mantidos em salinidade 34, temperatura aproximada de 28°C, pH 7,3, 5,5 mg/L de Oxigênio Dissolvido e fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro. Durante a aclimação e no decorrer do bioensaio os camarões foram alimentados 2 vezes ao dia com ração comercial contendo 35% de proteína bruta em uma quantidade correspondente a 3,5% do peso corporal.

Após o período de aclimação, 240 animais com peso de 5 g (± 1) foram distribuídos em 12 aquários de 100 litros cada, equivalentes a 6 tratamentos distintos, cada aquário contendo 20 camarões e cada tratamento com 40 camarões, e identificados de acordo

com as soluções injetadas em: I) Solução salina e extrato de tecido SPF (controle negativo), II) Solução salina e extrato de tecido infectado por IMNV (controle positivo), III) 0,5 µg de dsRNA por grama de camarão, produzidas pelo *Bacillus* (VP28ORF1a) e tecido infectado por IMNV, IV) 1,0 µg dsRNA por grama de camarão, produzidas pelo *Bacillus* (VP28ORF1a) e tecido infectado por IMNV, V) 3,0 µg dsRNA por grama de camarão, produzidas pelo *Bacillus* (VP28ORF1a) e tecido infectado por IMNV, VI) 5,0 µg dsRNA por grama de camarão, produzidas pelo *Bacillus* (VP28ORF1a) e tecido infectado por IMNV. A primeira injeção, com solução salina (grupos controles) ou dsRNA (demais tratamentos) foi realizada dois dias antes da injeção com extrato de tecido SPF (I) ou extrato de tecido infectado por IMNV (II-VI). Os animais dos tratamentos II, III, IV, V e VI foram injetados com extrato IMNV na concentração aproximada de $1,02 \times 10^3$ cópias/100 µl, correspondente à diluição de 10^{-2} , validado no experimento 1.

Para as análises moleculares por RT-qPCR foram coletadas amostras de hemolinfa (~150 µl) de nove camarões por tratamento por dia de coleta, tendo sido as coletas realizadas no 2º dia antes da injeção, e nos 5º e 8º dias após injeção com extrato IMNV ou SPF. Após a coleta da hemolinfa, os camarões foram marcados e devolvidos aos seus respectivos aquários e não participaram de coletas subsequentes. Para as análises histológicas foram coletados quatro animais por tratamento, selecionando dos tratamentos II-VI, animais que apresentavam sinais clínicos avançados de IMN, no 7º e 8º dia pós-injeção, e no tratamento I (controle negativo) os animais foram amostrados de modo aleatório no 20º dia, já que todos apresentavam aspectos de animais saudáveis.

4.5 Análises histológicas

Os camarões amostrados para histologia foram fixados com solução de Davidson AFA (11,5% de ácido acético glacial, 22% de formalina e 33% de álcool etílico 95%) e imersos na mesma solução. Depois de 24 horas, as amostras foram transferidas para álcool 70%, para serem processadas posteriormente. Após as etapas de desidratação, diafanização, infiltração e inclusão, cortes histológicos transversais e longitudinais de 5 µm foram obtidos com o uso do micrótomo e submetidos a coloração com hematoxilina–eosina e a seguir examinados por microscopia de luz (BELL; LIGHTNER, 1988). Alterações histopatológicas características da IMN foram analisadas conforme descrito por Lightner (2011).

4.6 Extração de RNA e síntese de cDNA

A hemolinfa de cada camarão coletado foi centrifugada a 1.200 g/10 min/4°C para isolar os hemócitos do plasma, o RNA total foi extraído com a utilização do reagente Trizol (Invitrogen®), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 200 µl de clorofórmio, agitando-as vigorosamente durante 1 minuto no vortex. Em seguida foram incubadas a temperatura ambiente por 15 min. Para a separação das fases, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g/15 min/4 °C. Transferiu-se 450 µl da fase superior (RNA total) para um tubo de 1,5 mL contendo 500 µl de álcool isopropílico. As amostras foram incubadas durante 15 minutos a 30°C, e centrifugadas a 12.000 g/10 min/4 °C. O sobrenadante foi removido por inversão, tomando-se os devidos cuidados para não perder o *pellet*.

As amostras foram lavadas com 1 mL de etanol 75%, mescladas no vortex e centrifugadas a 7.500 g/5 min/4 °C. O etanol foi descartado e os tubos invertidos sobre um papel toalha para secagem em temperatura ambiente durante 10 minutos. O RNA total foi dissolvido em 40 µL de água ultrapura (Invitrogen®) e quantificado utilizando o espectrofotômetro NanoDrop ® 2000 da Thermo Scientific. As amostras de RNA foram padronizadas na concentração de 50 ng/µL para o processo de síntese de cDNA. Para as análises de expressão gênica, as amostras de RNA total foram tratadas com DNase I (Invitrogen™), conforme recomendações do fabricante.

O cDNA foi sintetizado com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies®) em um volume de 10 µl de reação final contendo 1 µl de RT Buffer (10×), 0,4 µl de dNTP's mix (25×), 1 µl de RT random primers (10×), 0,5 µl de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U), 2,1 µl de H₂O Nuclease-Free e 5,0 µl de RNA total. As amostras foram incubadas em termociclador a 25°C/10 min, seguidos de 37°C/120 min e 85°C/5 min. O cDNA foi armazenado a -20°C até a sua utilização para as análises de quantificação viral por RT-qPCR e expressão gênica.

4.7 Quantificação do IMNV por RT-qPCR

Para a quantificação do número de cópias do IMNV foi utilizada a metodologia e primers descritos por Andrade *et al.* (2007). As reações de RT-qPCR para a quantificação da carga viral foram realizadas em um volume final de 10 µl, contendo 5 µl TaqMan™ Universal Master Mix II com UNG, Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, 0,3 µl (10 µM) de cada primer, IMNV412F (5'-GGACCTATCATACATAGCGTTTGCA-3') e IMNV545R

(5'AACCCATATCTATTGTCGCTGGAT-3'), 0,15 µl (10µM) da sonda de hidrólise (IMNV) (5'-6FAM CCACCTTTACTTTCAATACTACATCATCCCCGG TAMRA-3'), 1 µl (10-25 ng) de cDNA e 3,25 µl de água ultrapura (Invitrogen®).

Um controle negativo, contendo todos os reagentes, exceto o cDNA alvo e uma série de diluições (10×) do controle positivo pTOPO-IMNV equivalente a 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 cópias do IMNV foram também adicionados à placa para a reação da RT-qPCR. O controle positivo pTOPO-IMNV consistiu de uma construção genética resultante da ligação de um fragmento de 908 pb do IMNV (N° de acesso no GenBank: AY570982, nt 4274-5181) ao *pCR® 2.1-TOPO vector* (Invitrogen®).

Para a quantificação do número de cópias do IMNV foi utilizada a plataforma *7500 Real-time PCR system* (Applied Biosystems®). As condições de amplificações obedeceram aos seguintes passos: incubação a 50°C por 2 min, seguido da ativação da *Platinum®Taq DNA polymerase* a 95°C por 2 min, 40 ciclos de 15s a 95°C e 30s a 60°C. Os dados foram coletados durante a etapa de extensão final (60°C). O número de cópias virais de cada amostra foi determinado de acordo com o *software SDS 1.3.1* (Applied Biosystems®). Todas as amostras foram testadas em duplicata e só foram consideradas positivas quando ambas as réplicas apresentaram amplificação válida.

4.8 Análise da expressão de genes imunológicos

Os genes *β-actina*, *Eflα*, *Sid-1*, *Dicer-2* e *Argonauta-2*, *proPO-1*, *PPAE-1* foram analisados através de RT-qPCRs quantitativas, utilizando o reagente *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix – UDG* (Invitrogen®), na plataforma *ABI 7500 Real Time Systems* (Applied Biosystems®). Como genes de referência para calcular a quantificação de expressão gênica em *L. vannamei* foram utilizados iniciadores correspondentes ao gene do fator de alongação 1-alfa (YAO *et al.*, 2010) e da *β-actina*, por apresentar alta taxa de conservação entre inúmeras espécies.

A eficiência de amplificação de todos os primers foi determinada de acordo com Pfaffl *et al.* (2002) e a especificidade das amplificações verificadas a partir da análise das curvas de *melting*. As reações de RT-qPCR foram feitas em um volume final de 10 µl contendo 5 µl do *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen®), 0,3 µl (10 µM) de cada primer, 0,2 µl (50×) do corante de referência Rox, 1 µl (12,5 ng) de cDNA e 3,2 µl de água ultra pura (Invitrogen®). As condições de termociclagem utilizadas foram 50°C/2 min, 95 °C/2 min, seguido de 40 ciclos de 95°C/15s e 60°C/30s. As reações de RT-qPCR

foram realizadas em duplicatas e somente consideradas válidas quando a média dos Cq das réplicas apresentava um desvio de até 0,3. Os valores de Cq médios obtidos foram normalizados e convertidos para a forma linear pelo método $2^{-\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os normalizadores β -actina e EF1-alfa foram analisados pelo geNorm para normalização dos dados com critério $M < 1,5$, e em seguida o fator de normalização obtido foi utilizado para o cálculo da expressão dos genes de cada amostra.

Para o experimento 2 foram feitos pool de cDNA (material genético de 3 camarões por pool), tendo sido 3 pool por tratamento em cada ponto de coleta. No experimento 1, como só foram coletadas seis amostras por tratamento por dia de coleta, as análises foram realizadas com material individual, e não em pool.

4.9 Análises estatísticas

Para analisar as diferenças das curvas de sobrevivência entre os tratamentos foi utilizado o teste de Log-rank (Mantel-Cox), estimado pela metodologia *Gehan-Breslow-Wilcoxon*. Para examinar as diferenças na carga viral foi aplicada análise de variância de uma via (*One-way analysis of variance, ANOVA*), utilizando o teste de *Dunnett's* para múltipla comparação.

Para as diferenças na expressão dos genes, como os dados de expressão obtidos não obedeceram ao critério de homocedasticidade foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e o pós-teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls. Para as análises estatísticas utilizou-se os *softwares GraphPad Prism versão 5.01 for Windows* (GraphPad Software®) e StatSoft Statistica 7.0.

5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1 - Validação dos extratos de tecidos infectante e livre de patógenos

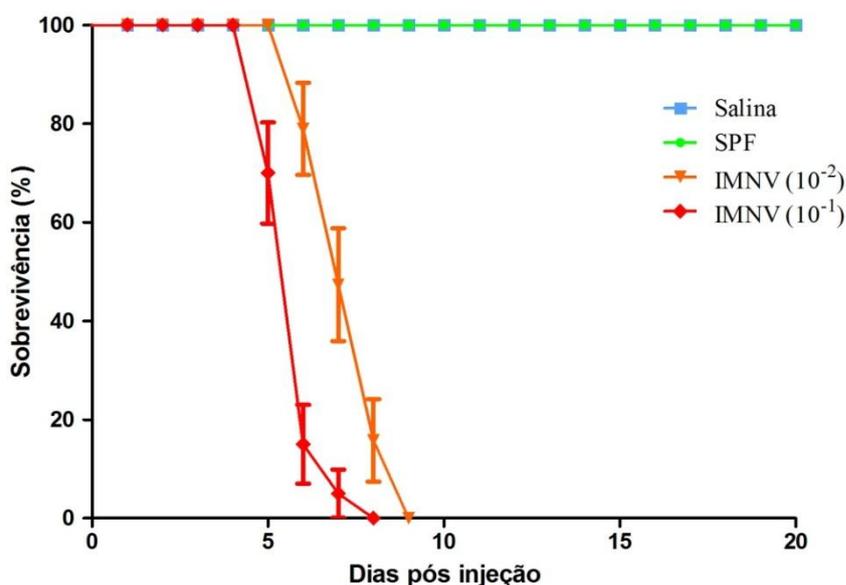
5.1.1 Sobrevivência

Os percentuais de sobrevivência dos camarões desafiados estão apresentadas no gráfico 1. Os primeiros sinais clínicos macroscópicos característicos da Mionecrose Infecciosa foram observados no 4º dia pós-infecção (d.p.i) nos camarões que foram injetados com extrato IMNV 10^{-2} e 10^{-1} . Opacidade muscular na região abdominal distal e na cauda, natação errática e redução nas taxas de alimentação foram verificadas nesses animais. No 5º d.p.i foram registradas as primeiras mortalidades no tratamento com extrato IMNV 10^{-1} . A partir do 6º d.p.i ocorreram mortalidades mais atenuadas no tratamento 10^{-1} e iniciaram as mortalidades no tratamento 10^{-2} .

Os dias 6,7 e 8 pós-infecção foram os que apresentaram maiores índices de mortalidade nos tratamentos com extrato IMNV nas duas concentrações. Todos os animais injetados com o extrato IMNV nas concentrações (10^{-1}) e (10^{-2}) morreram até o 9º d.p.i. Os grupos infectados com o extrato IMNV (10^{-2} e 10^{-1}) apresentaram entre si diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em suas curvas de sobrevivência. Foram observados padrões similares nas curvas de mortalidade.

Ao longo dos 22 dias de experimento não ocorreu mortalidade e não foram observados sinais clínicos macroscópicos indicativos de Mionecrose Infecciosa nos grupos controles, nos quais os camarões receberam injeções com solução salina ou extrato de tecido SPF.

Gráfico 1 - Percentual de sobrevivência dos camarões injetados com solução salina, extrato SPF ou extrato IMNV (10^{-2} e 10^{-1}) no período de 20 dias pós-injeção.

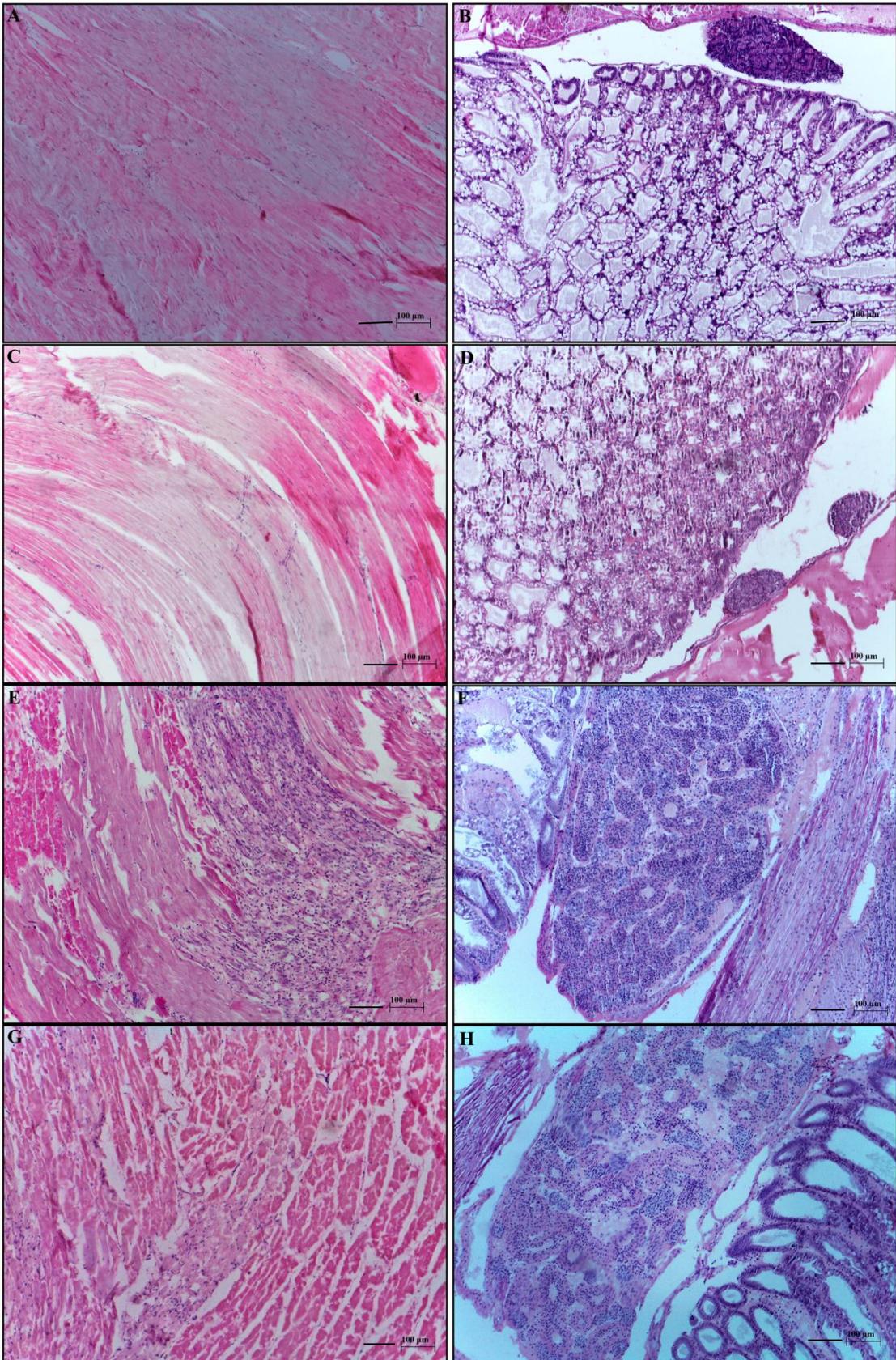


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.2 Histologia

Danos teciduais, como infiltrações hemocíticas, necrose coagulativa e esferoides ectópicos no órgão linfoide foram observados por meio de métodos histopatológicos, confirmando a infecção pelo vírus da mionecrose infecciosa nos grupos que foram injetados com o extrato viral, enquanto nos tratamentos controles (SPF e solução salina) não foram observadas alterações histopatológicas (Figura 1).

Figura 1 – Fotomicrografias de cortes histológicos corados com H&E referentes aos tratamentos do experimento 1 (I – solução salina, II – extrato de tecido SPF, III – IMNV 10^{-2} , IMNV 10^{-1}). As imagens do lado esquerdo (A, C, E e G) são de tecido muscular, enquanto as do lado direito (B, D, F e H) são cortes do hepatopâncreas, mostrando o órgão linfoide. A e B: Solução Salina, C e D: Extrato SPF, E e F: IMNV 10^{-2} , G e H: IMNV 10^{-1} . A e C: tecido muscular normal; B e D: órgão linfoide de animais que não foram infectados experimentalmente com IMNV; F e H: hipertrofia do órgão linfoide ocasionada pela acumulação de esferoides; E e G: infiltrações hemocíticas, necroses de coagulação e de liquefação com substituição do tecido muscular por tecido fibroso. Aumento com objetiva: 10x. Barra de Escala: (100 μ m).



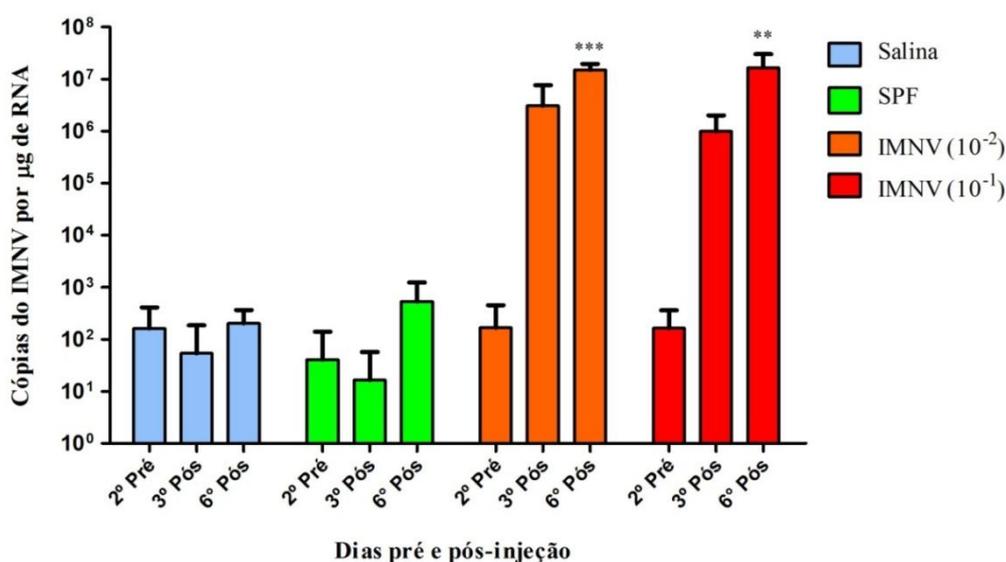
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.3 Evolução da carga viral

O extrato do IMNV utilizado nos experimentos teve a média do número de cópias virais estimado em $1,02 \times 10^5$ cópias/100 μ l, o que resultou na determinação aproximada de $1,02 \times 10^3$ cópias/100 μ l na diluição de 10^{-2} (tratamento III) e $1,02 \times 10^4$ cópias/100 μ l para a diluição de 10^{-1} (tratamento IV).

Conforme apresentado no gráfico 2, pode-se observar que os animais já apresentavam uma carga viral basal antes das injeções, com valores homogêneos para todos os camarões analisados pertencentes aos quatro grupos estudados, resultando num valor médio de $1,20 \times 10^2$ cópias do IMNV/ μ g de RNA. Nos tratamentos controles I e II (solução salina e extrato SPF) não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) na evolução da carga viral ao longo dos dias de experimento. Nos tratamentos que receberam injeção com extrato IMNV foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) no número de cópias virais entre o primeiro e o último ponto de coleta, com valores médios de $1,33 \times 10^2$ no 2º dia pré-infecção e $1,59 \times 10^7$ cópias do IMNV/ μ g de RNA no 6º dia pós-infecção.

Gráfico 2 - Quantificação do número médio de cópias do IMNV no 2º dia pré-injeção e nos 3º e 6º dia pós-injeção da solução salina, extrato SPF ou extrato IMNV (10^{-2} , 10^{-1}) em camarões *L. vannamei*. As diferenças estatísticas são relacionadas ao 2º dia pré-injeção e representadas com asteriscos, dois (***) quando ($p < 0,001$) ou três asteriscos (***) para ($p < 0,0001$).



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1.4 Expressão dos genes

5.1.4.1 Gene *Sid-1*

Os níveis de expressão do mRNA do *Sid-1* detectados nos hemócitos dos animais analisados no decorrer dos dias de experimento apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) apenas no tratamento controle I (solução salina) e tratamento III (IMNV 10^{-2}). Os camarões pertencentes ao grupo I tiveram os níveis de expressão do *Sid-1* diminuídos em 88% e 89% no 3° e 6° dia pós-injeção respectivamente, quando comparados ao 2° dia antes da injeção. Os animais infectados experimentalmente com IMNV na diluição de 10^{-2} tiveram os níveis dos transcritos aumentados em 151% no 6° dia pós-injeção em relação ao 2° dia pré-injeção, e aumentando em 260% do 3° para o 6° dia pós. Nos demais tratamentos (II- SPF e IV- 10^{-1}) não foram detectadas variações significativas nos níveis do transcrito ao longo dos dias de experimento (Figura 2).

5.1.4.2 Gene *Dicer-2*

Os níveis dos transcritos do *Dicer-2* apresentaram variações significativas ao longo dos dias de experimento em todos os grupos testados. Nos tratamentos controles I e II houve uma regulação para baixo nos níveis dos transcritos no 6° dia pós-injeção em relação ao 2° dia pré-injeção. Houve uma diminuição de 93% ($p < 0,05$) e 91% ($p < 0,05$) na expressão do mRNA de *Dicer-2* nos grupos injetados com solução salina (I) e extrato de tecido SPF (II), respectivamente. No grupo III, injetado com extrato de tecido infectado por IMNV (10^{-2}) a expressão foi diminuída em 55% ($p < 0,05$) no 3° dia pós em relação ao 2° dia pré-injeção e aumentada 120% ($p < 0,05$) no 6° dia em relação ao 3° dia pós-injeção, enquanto que no grupo IV, injetado com extrato de tecido infectado por IMNV (10^{-1}) a expressão foi diminuída em 90% ($p < 0,05$) no 6° dia pós em relação ao 2° dia pré-injeção (Figura 2).

5.1.4.3 Gene *Argonauta-2*

Os níveis de expressão do mRNA do *Argonauta-2* detectados nos hemócitos dos camarões examinados apresentaram variações significativas ($p < 0,05$) ao longo dos dias de experimento em todos os tratamentos. No tratamento I (salina) os níveis de expressão do *Argonauta-2* diminuíram 73% e no tratamento II (SPF) 92% do 2° dia pré para o 3° dia pós-

injeção, e aumentaram 195% do 3° para o 6° dia no tratamento II. No grupo III, em que os animais foram injetados com extrato de tecido infectado por IMNV na diluição de 10^{-2} a expressão aumentou 503% no 6° dia em relação ao 3° dia pós-injeção, enquanto que no grupo IV, injetado com extrato de tecido infectado por IMNV (10^{-1}) a expressão foi diminuída em 74% no 6° dia pós em relação ao 2° dia pré-injeção (Figura 2).

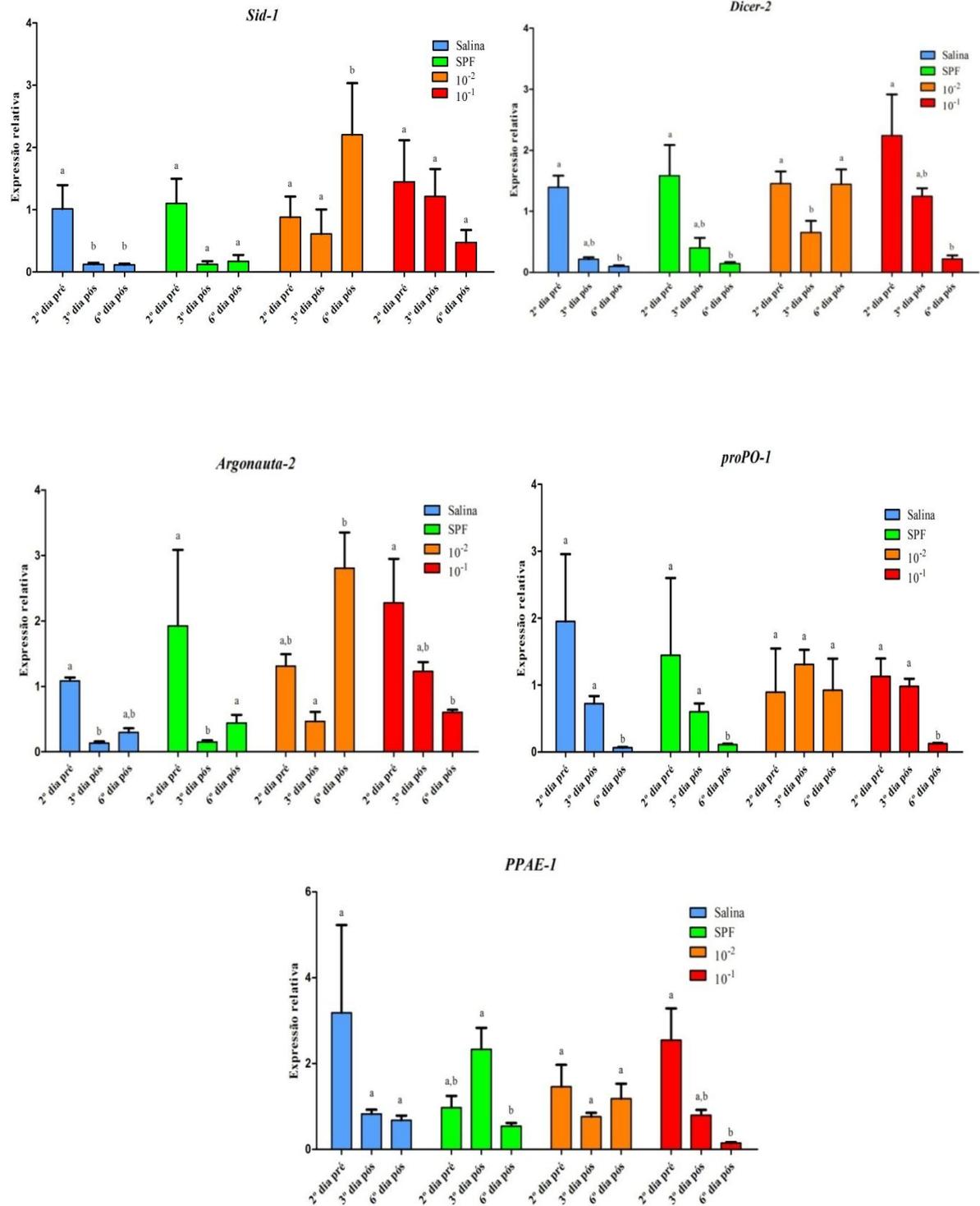
5.1.4.4 Gene *proPO-1*

Para os camarões do tratamento I, os níveis de transcritos do *proPO-1* foram diminuídos cerca de 97% ($p < 0,05$) do 2° dia pré para o 6° dia pós injeção com solução salina e 81% ($p < 0,05$) do 3° para o 6° dia pós-injeção. Os camarões injetados com o extrato de tecido SPF também tiveram seus níveis de expressão do mRNA do *proPO-1* diminuídos em 92% ($p < 0,05$) do 2° dia pré para o 6° dia pós-injeção e 82% ($p < 0,05$) do 3° para o 6° dia, respectivamente. Dentre os grupos injetados com extrato de tecido infectado por IMNV, somente o tratamento IV, que recebeu o vírus em maior concentração (10^{-1}) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) na expressão do *proPO-1* ao longo dos dias de experimento, onde foi detectada uma diminuição de 89% no nível de expressão dos transcritos do *proPO-1* do 2° dia pré para o 6° dia pós-injeção e 87% do 3° para o 6° dia pós-injeção (Figura 2).

5.1.4.5 Gene *PPAE-1*

Os animais que receberam injeção com extrato de tecido SPF tiveram seus níveis de expressão do mRNA de *PPAE-1* diminuídos em 77% ($p < 0,05$) do 3° para o 6° dia pós-injeção. Os camarões pertencentes ao grupo injetado com extrato de tecido infectado por IMNV (10^{-1}) também mostraram diminuição de 94% ($p < 0,05$) nos níveis dos transcritos do *PPAE-1* do 2° dia pré para o 6° dia pós-injeção. Os demais tratamentos não apresentaram variações significativas entre os pontos de coleta no decorrer do experimento (Figura 2).

Figura 2 – Perfil de expressão dos genes *Sid-1*, *Argonauta-2*, *Dicer-2*, *proPO-1* e *PPAE-1* em hemócitos do camarão *L. vannamei* injetados intramuscularmente com: I - solução salina; II - extrato de tecido SPF; III – extrato de tecido infectado por IMNV (10^{-2}); IV - extrato de tecido infectado por IMNV (10^{-1}). Letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os dias do experimento em um determinado tratamento ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Experimento 2 - Dose-resposta de dsRNA produzidas *in vivo* para o tratamento contra o vírus da mionecrose infecciosa

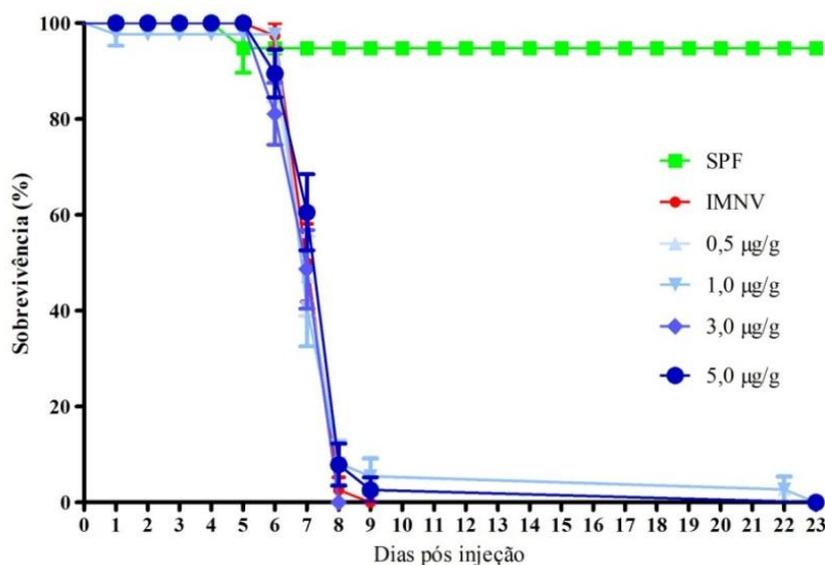
5.2.1 Sobrevivência

No gráfico 3 são exibidas as taxas de sobrevivência dos camarões desafiados no experimento 2. Os primeiros sinais clínicos macroscópicos característicos da Mionecrose Infecciosa foram observados no 6º dia pós-injeção nos camarões que foram injetados com extrato IMNV, tanto no tratamento II (controle positivo) como nos tratamentos que receberam injeções com dsRNA (III-VI). Perda de transparência na região caudal, opacidade muscular na região abdominal distal e na cauda, natação errática e redução nas taxas de alimentação foram verificadas nesses animais. Também no 6º dia foram registradas as primeiras mortalidades nos animais infectados. Os dias 7 e 8 pós-injeção foram os que apresentaram maiores índices de mortalidade em todos os tratamentos que receberam injeção intramuscular com extrato IMNV (II-VI), 77 animais no dia 7 (32%) e 72 no dia 8 (34%) do total de 240 animais.

Entre todos os tratamentos que receberam injeção com extrato IMNV não foram verificadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) em suas curvas de sobrevivência, e foram observados padrões bem similares nas curvas de mortalidade. O tratamento I (controle negativo) diferiu de forma significativa estatisticamente ($p < 0,05$) de todos os demais tratamentos (II-VI). Ao longo dos 25 dias de experimento apenas uma mortalidade foi registrada no grupo de animais que foram injetados com solução salina e extrato de tecido SPF (controle negativo) e não foram observados sinais clínicos macroscópicos indicativos de Mionecrose Infecciosa.

O experimento foi finalizado no 23º dia pós-injeção com 97,5%, 5%, 10%, 7,5%, 5% e 2,5% de sobrevivência nos tratamentos I, II, III, IV, V e VI, respectivamente.

Gráfico 3 - Percentual de sobrevivência dos camarões no período de 23 dias pós-injeção com extrato de tecido SPF (I) ou extrato de tecido IMNV (II-VI).

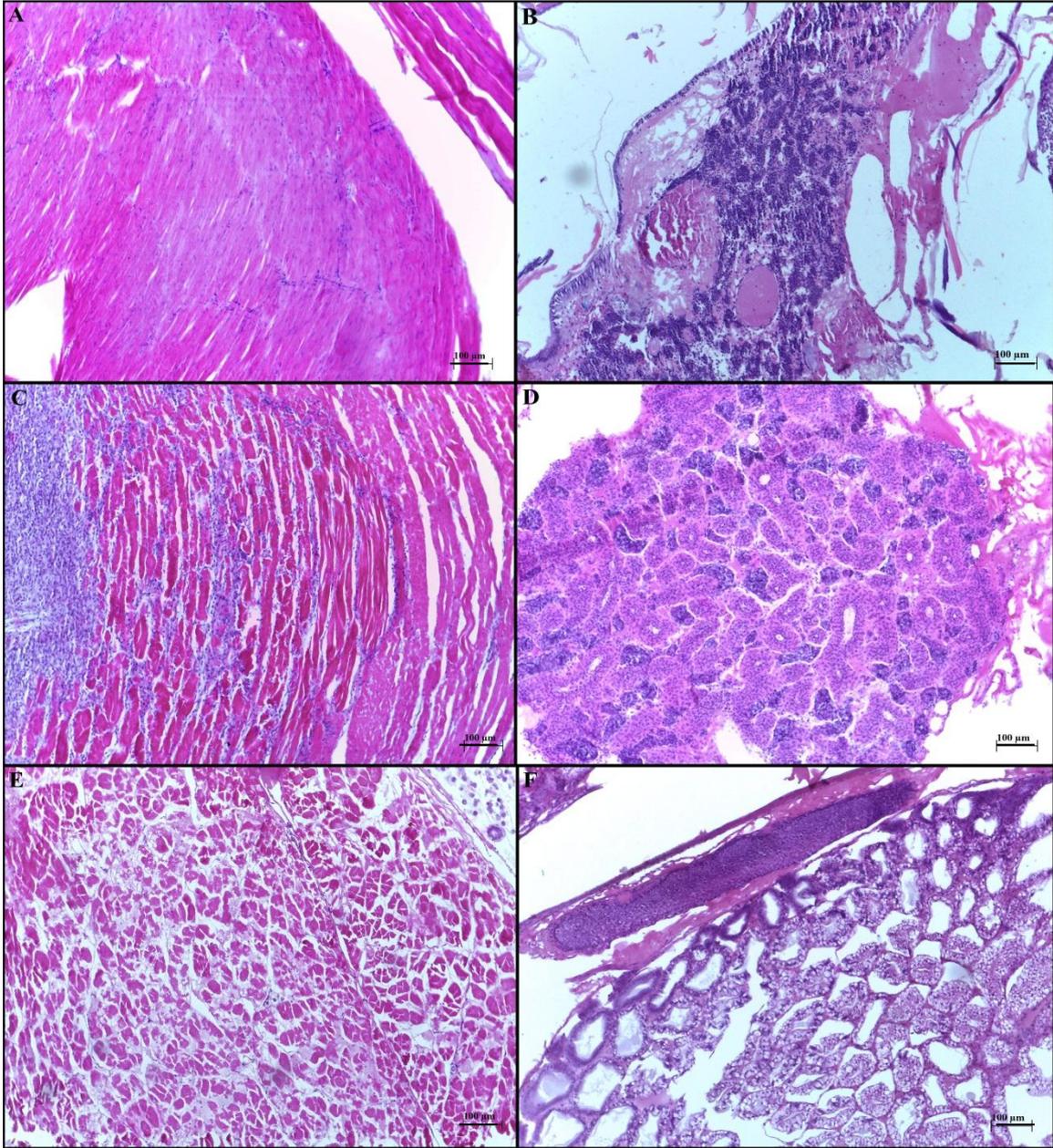


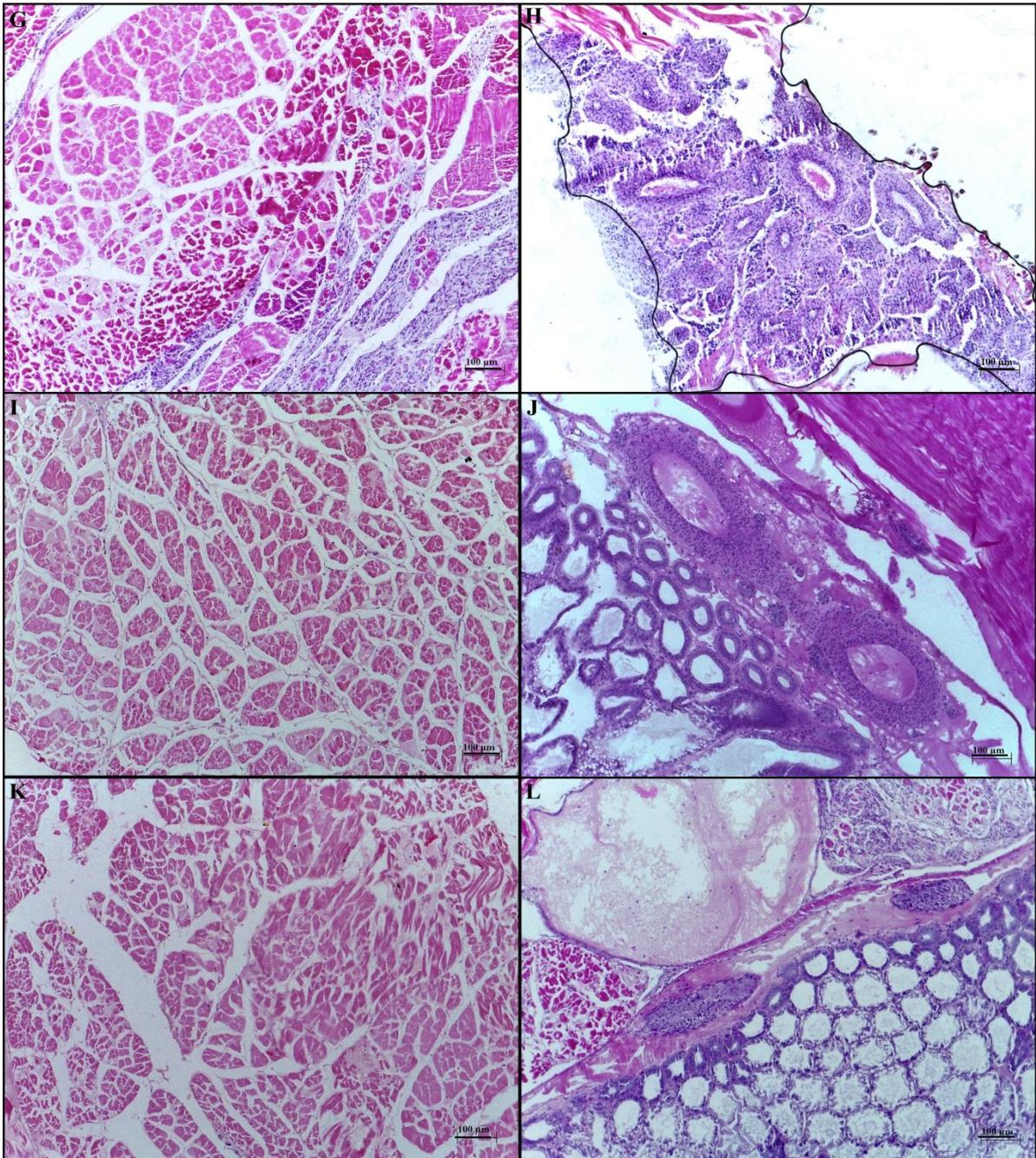
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.2 Histologia

Danos teciduais, como infiltrações hemocíticas, necrose coagulativa e esferoides ectópicos no órgão linfoide foram observados por meio de métodos histopatológicos confirmativos da infecção pelo vírus da mionecrose infecciosa nos grupos que foram injetados com o extrato de tecido infectado com IMNV, enquanto no tratamento controle negativo (SPF) não foram observadas alterações histopatológicas (Figura 3).

Figura 3 – Fotomicrografias de cortes histológicos corados com H&E referentes aos tratamentos do experimento 2 (I - controle negativo, II - controle positivo, III - 0,5 µg de dsRNA por grama de camarão, IV - 1,0 µg dsRNA por grama de camarão, V - 3,0 µg dsRNA por grama de camarão, VI - 5,0 µg dsRNA por grama de camarão). As imagens do lado esquerdo (A, C, E, G, I e K) são de tecido muscular, enquanto as do lado direito (B, D, F, H, J e L) são cortes do hepatopâncreas, mostrando o órgão linfoide. A e B: extrato SPF; C e D: extrato IMNV; E e F: 0,5 µg de dsRNA/g de camarão; G e H: 1,0 µg; I e J: 3,0 µg; K e L: 5,0 µg. A: tecido muscular normal; B: órgão linfoide de animais que não foram infectados experimentalmente com IMNV; C, E, G, I e K F e H: tecido muscular infectado por IMNV, com infiltrações hemocíticas, necroses de coagulação e de liquefação com substituição do tecido muscular por tecido fibroso; D, F, H, J e L: hipertrofia do órgão linfoide ocasionada pela acumulação de esferoides. Aumento com objetiva: 10x. Barra de Escala: (100 µm).





Fonte: Elaborada pelo autor

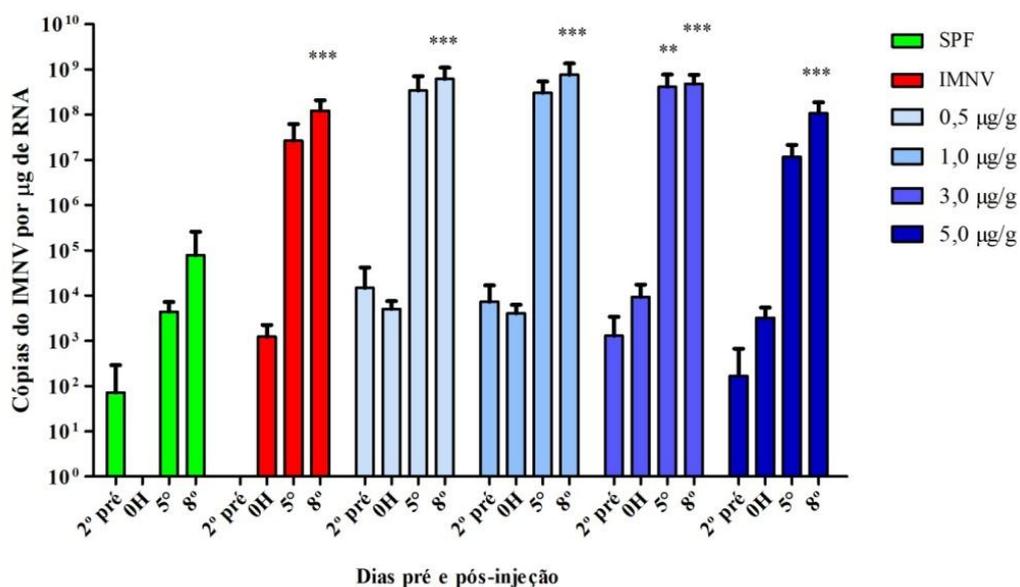
5.2.3 Evolução da carga viral

Conforme mostrado no gráfico 4, pode-se observar que com exceção dos animais do tratamento II, que receberam injeção com extrato de tecido IMNV, todos os outros grupos já apresentavam uma carga viral basal antes das injeções, com valores homogêneos para todos os camarões analisados pertencentes aos outros cinco tratamentos, resultando num valor médio de $4,75 \times 10^3$ cópias do IMNV/ μg de RNA. Todos os animais utilizados no

experimento são oriundos de um mesmo lote e todos receberam os mesmos cuidados durante a aclimação, e foram escolhidos aleatoriamente para compor os tratamentos.

Em todos os grupos de camarões injetados com extrato de tecido infectado com IMNV houve diferenças significativas ($p < 0,05$) no número de cópias virais no decorrer dos dias de experimento. No tratamento II, em que os animais foram injetados com solução salina e dois dias depois com extrato IMNV, houve um aumento no número de cópias do IMNV no 8º dia pós-injeção ($p < 0,0001$) com valores médios aumentados para $1,23 \times 10^8$ cópias virais por μg de RNA. Nos demais animais pertencentes aos grupos que foram injetados com dsRNA e dois dias seguidos injetados com extrato IMNV ocorreu aumento no número de cópias virais no 8º dia pós-injeção ($p < 0,0001$) com valores médios aumentados de $1,49 \times 10^4$ para $6,14 \times 10^8$, $7,30 \times 10^3$ para $1,08 \times 10^8$, $1,30 \times 10^3$ para $4,79 \times 10^8$ e $1,67 \times 10^2$ para $1,08 \times 10^8$ nos tratamentos III, IV, V e VI, respectivamente. O tratamento IV apresentou ainda diferença estatística significativa ($p < 0,001$) entre o 2º e 5º dia pós-injeção, aumentando de $7,30 \times 10^3$ para $3,06 \times 10^8$.

Gráfico 4 - Quantificação do número médio de cópias do IMNV no 2º dia pré-injeção e nos 3º e 6º dia pós-injeção da solução salina, extrato SPF ou extrato IMNV (10^{-2} , 10^{-1}) em camarões *L. vannamei*. As diferenças estatísticas são relacionadas ao 2º dia pré-injeção e representadas com asteriscos, dois (**), quando ($p < 0,001$) ou três asteriscos (***) para ($p < 0,0001$).



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.4 Expressão dos genes

5.2.4.1 Gene *Sid-1*

Conforme mostrado na figura 4, apenas no tratamento I, onde os animais foram injetados com solução salina e extrato de tecido SPF houve variação estatística significativa ($p < 0,05$) nos níveis dos transcritos do *Sid-1*, que aumentou 104% no dia 0 com relação ao 2° dia pré-injeção, e diminuiu 90% no 5° dia em relação ao dia zero.

5.2.4.2 Gene *Dicer-2*

Os níveis dos transcritos de *Dicer-2* variaram significativamente ($p < 0,05$) nos tratamentos I e II. No tratamento I houve redução de 95% em sua expressão no 8° dia pós-injeção quando comparado ao 2° dia pré-injeção e 94% no dia 8 em relação ao dia zero. Para o tratamento II, a expressão diminuiu 86% do 2° dia pré para o 8° dia pós-injeção. Os demais tratamentos não apresentaram variações estatisticamente significativas na expressão desse gene ao longo dos dias de experimento (Figura 4).

5.2.4.3 Gene *Argonauta-2*

Assim como para o gene *Sid-1*, os transcritos de *Argonauta-2* também só variaram significativamente ($p < 0,05$) no tratamento I. Os níveis de expressão do mRNA do *Argonauta-2* diminuíram 92% no 8° dia pós-injeção com relação ao 2° dia pré-injeção e 95% tanto do dia zero para o 5°, como do zero para o 8° dia pós-injeção (Figura 4).

5.2.4.4 Gene *proPO-1*

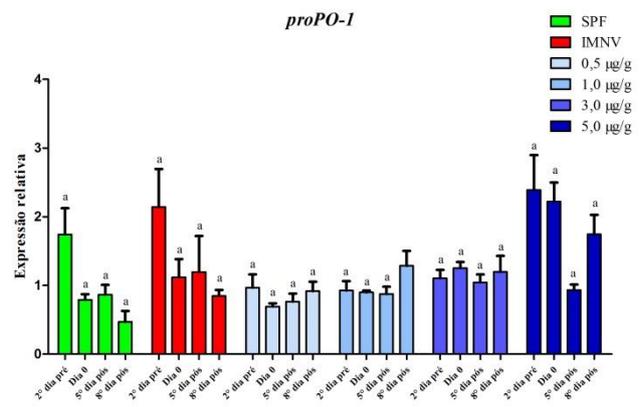
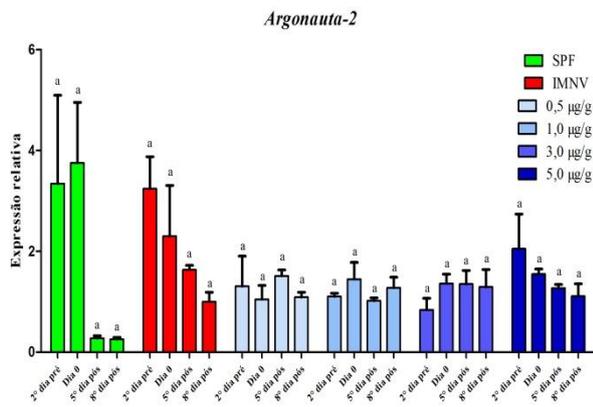
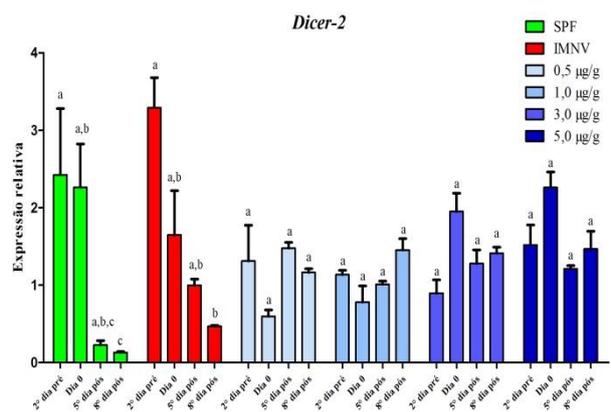
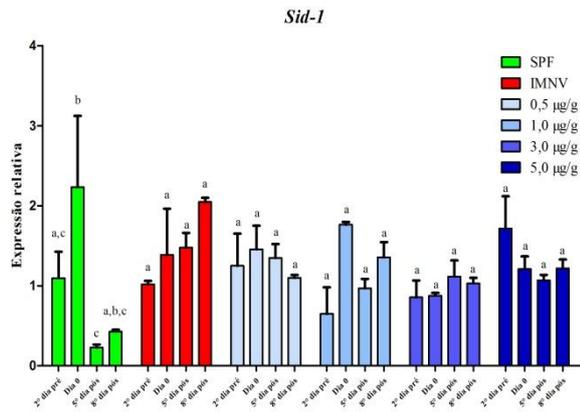
Conforme exposto na figura 4, em nenhum dos tratamentos ocorreu alteração com diferença significativa nos níveis de transcrição do gene *proPO-1*.

5.2.4.5 Gene *PPAE-1*

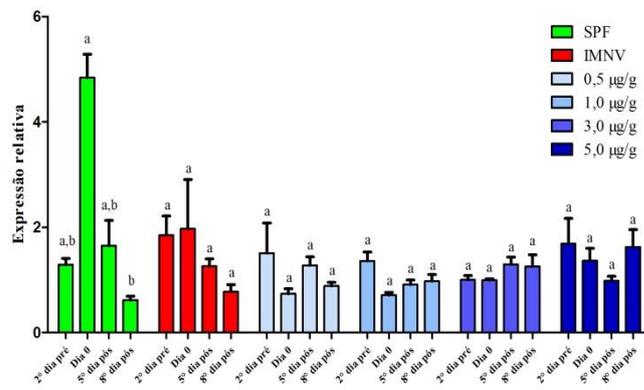
De acordo com a figura 4, apenas no tratamento I, onde os animais foram injetados com solução salina e extrato de tecido SPF houve variação estatística significativa

($p < 0,05$) nos níveis dos transcritos do *PPAE-1*, que diminuiu 87% do dia zero para o 8° dia pós-injeção.

Figura 4 - Abundância dos transcritos dos genes *SID-1*, *Argonauta-2*, *Dicer-2*, *proPO-1* e *PPAE-1* em hemócitos de camarões *L.vannamei* injetados intramuscularmente com: I) solução salina e extrato de tecido SPF; II) solução salina e extrato de tecido com IMNV; III) 0,5 µg de dsRNA/g de camarão; IV) 1,0 µg de dsRNA/g de camarão; V) 3,0 µg de dsRNA/g de camarão; VI) 5,0 µg de dsRNA/g de camarão ao longo de 25 dias de bioensaio experimental, no 2° dia pré-injeção, dia 0, 5° e 8° dias pós injeção. As barras representam os pontos de coleta (2° dia pré; dia 0; 5° dia pós, 8° dia pós). Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os dias do experimento em um determinado tratamento.



PPAE-1



Fonte: Elaborada pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Os extratos de tecidos testados neste trabalho foram validados mediante as análises de curvas de sobrevivência, avaliação da carga viral e histopatologia. A utilização de extrato de tecido livre dos patógenos WSSV, IMNV e IHNV se mostrou adequada na aplicação como controle negativo de infecção experimental, observando-se sobrevivência máxima e não evolução da carga viral significativa ($p < 0.05$) semelhante ao verificado no tratamento que recebeu a injeção apenas com solução salina. Poucos trabalhos relatam a utilização de extratos de tecido livre de patógenos como controle negativo de infecção (PANTOJA *et al.*, 2004; HASSON *et al.*, 2005). A utilização de extrato de tecido livre de patógenos pode ser considerada um controle mais apropriado para validação de infectividade de inóculos virais em bioensaios experimentais, dado que ambos possuem similar composição bioquímica e diferem entre si apenas na presença do agente patogênico.

Os animais utilizados nos experimentos já apresentavam uma carga viral basal do IMNV, visto que são provenientes do Nordeste brasileiro, tido como uma região endêmica para esse patógeno e levando em consideração que as principais larviculturas da região não dispõem de animais SPF para esta doença, o que dificulta a obtenção de animais livres de IMNV.

A resposta imune e a modulação na expressão de genes relacionados à imunidade nos animais podem ser ativadas com a entrada de vírus ou de algum outro corpo estranho nas células do animal (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2015; JI; YAO; WANG, 2009), assim sendo, essa infecção basal antes do bioensaio experimental pode ter interferido nas respostas que se esperava obter quanto à modulação da expressão dos genes tanto no experimento 1, onde se buscou observar ao longo dos dias pós-injeção a dinâmica de expressão dos transcritos de genes relacionados à imunidade em animais que receberam injeções em duas diferentes concentrações virais, quanto no experimento 2, em que foram ministradas diferentes dosagens de dsRNAs produzidas por *Bacillus subtilis* JJBs3, que não surtiram efeito protetivo e nem modularam a expressão dos genes imunológicos.

A ativação do sistema proPO é um parâmetro muito utilizado em crustáceos para avaliar seu estado imunológico (SONG *et al.*, 2003). A diminuição da atividade da PO pode decorrer da menor proporção de hemócitos granulares (HGs), visto que estas células armazenam a pró-enzima *proPO* e outros fatores de ativação do sistema, assim a redução nos níveis de proPO em animais severamente infectados podem indicar uma imunodepleção (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006).

No primeiro experimento, os resultados encontrados mostram níveis dos transcritos de *proPO-1* e *PPAE-1* diminuídos no 6º dia pós-injeção nos camarões do grupo que receberam maior concentração do vírus (Figura 2). No entanto, interessante, essa diminuição também foi verificada nos grupos controles. Muitos estudos também relataram diminuição da expressão gênica de *proPO* e em sua atividade em animais submetidos a infecções virais (ROUX *et al.*, 2002; MATHEW *et al.*, 2007; YEH *et al.*, 2009; AI *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2009). Em contraste, outros trabalhos realizados com camarões infectados por WSSV e por TSV, demonstraram um aumento da atividade da pró-fenoloxidase (MOTESDEOCA *et al.*, 2001; SONG *et al.*, 2003).

Em *L. vannamei*, um gene homólogo ao *Sid-1* foi identificado, cujos níveis de transcritos aumentaram após injeções com dsRNA de sequência não-específica (LABREUCHE *et al.*, 2010). Esses resultados indicam que o dsRNA ativa a transcrição do *Sid-1* e sugerem seu potencial papel na captação dos dsRNAs pelas células dos camarões. A indução dos transcritos do *Sid-1* (Figura 2) detectada no tratamento que recebeu a menor dose do extrato infectante no 6º d.p.i no experimento 1 é sugestivo de captação e exportação celular de moléculas de dsRNA produzidas durante o curso da infecção pelo IMNV. Interessantemente, não foi observado o mesmo no tratamento que recebeu a maior dose do vírus. Maruekawong *et al.* (2018) relata que a *Sid-1* está envolvida no processo de captação de dsRNA para dentro da célula, porém outros mecanismos de endocitose de dsRNA precisam ser investigados.

Nos grupos controles, em que os animais foram injetados com solução salina ou extrato de tecido SPF, a manutenção de baixos níveis de transcritos do *Sid-1* detectados ao longo do experimento pode indicar a baixa taxa de replicação do IMNV nestes camarões, conforme apresentado no gráfico 4, mostrando a não evolução da carga viral nos animais dos grupos controles ao longo do período experimental, com valores médios de $1,01 \times 10^2$ no 2º dia pré injeção e $3,67 \times 10^2$ no 6º dia pós-injeção.

O nível de transcritos da *Dicer-2* no experimento 1 (Figura 2) foi regulado para baixo nos organismos que receberam a maior dose do extrato de tecido infectante. Isso pode estar relacionado a não contenção do processo infeccioso, o que pode está associado à ausência dessa enzima no decorrer da evolução da doença. Os resultados observados diferem dos demais trabalhos frente a infecções experimentais com o IMNV e o WSSV (FEIJÓ *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2011).

Assim como para o *Sid-1*, a indução dos transcritos de *Argonauta-2* (Figura 2) para esse experimento só foi detectada no tratamento que recebeu a menor dose do extrato de

tecido infectado com IMNV no 6° d.p.i, e apresentou diminuição dos níveis de expressão de seus transcritos no tratamento que recebeu a dose mais concentrada do vírus. Esses resultados podem indicar que não houve o requerimento da enzima *Argonauta-2* para guiar a degradação específica dos dsRNA nos animais infectados.

Ainda no experimento 1, a expressão de todos os genes analisados nas diferentes diluições do extrato de tecido infectante injetado não seguiram um padrão similar. Na menor diluição houve uma maior indução dos genes relacionados ao mecanismo de RNAi do 3° para o 6° dia pós infecção, diferindo da diluição mais concentrada, isso pode estar relacionado com a severidade do processo infeccioso, mostrando que na dose maior não teve indução dos níveis do mRNA.

No experimento 2, referente ao bioensaio com a utilização de dsRNAs produzidas pela cepa de *Bacillus subtilis* JJBs3 expressando dsRNA VP28ORF1a não foram encontradas variações significativas nos níveis dos transcritos de nenhum dos genes analisados (*Sid-1*, *Dicer-2*, *Argonauta-2*, *proPO-1* e *PPAE-1*) ao longo dos dias de experimento, em nenhum dos tratamentos após terem sido injetados intramuscularmente com diferentes concentrações de moléculas de dsRNA produzida *in vivo*, e dois dias depois com extrato de tecido infectado por IMNV. Isso difere dos resultados descritos por outros autores que utilizaram dsRNAs purificadas no tratamento de doenças virais em camarões e observaram o efeito de silenciamento específico do vírus (MOTESDEOCA *et al.*, 2001; ROBALINO *et al.*, 2005; CHINNIRUNVONG; PANYIM, 2009; LOY *et al.*, 2012; LOY *et al.*, 2013; ASSAVALAPSAKUL; FEIJÓ *et al.*, 2015).

Os dados de expressão dos genes analisados estão em concordância com os dados de sobrevivência e carga viral (Figura 4), em que não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos que foram injetados com IMNV (II-VI), tanto o que foi injetado com solução salina no 2° dia pré (controle positivo), quanto aqueles que receberam injeções com duplas fitas.

A indução de defesa antiviral específica por meio da injeção intramuscular de moléculas de dsRNA com sequência viral-específica vêm apresentando resultados satisfatórios no silenciamento de vários vírus em camarões (FAUCE; OWENS, 2012), mesmo quando utilizadas em camarões desafiados com altas concentrações virais. Efeitos positivos, resultando em sobrevivência acima de 90% foram relatados com dsRNA sintéticas relacionadas a ORF1a, ORF1b ou apenas a ORF1 (FEIJÓ *et al.*, 2015; LOY *et al.*, 2012). No entanto, mesmo apresentando uma construção com sequência específica, no presente estudo, do modo e nas condições em que foram ofertadas aos camarões desafiados

experimentalmente, as moléculas de dsRNA-VP28ORF1a produzidas pela cepa *B. subtilis* JJBs3 não surtiram efeito protetivo, não foram efetivas no controle da replicação viral, resultando em quase 100% de mortalidade nos grupos de camarões que receberam as moléculas relacionadas ao vírus, ao longo dos 25 dias de desafio experimental, bem como não modularam a expressão dos genes imunológicos analisados.

A oferta de dsRNA por meio de injeções intramusculares é bem descrita e largamente aplicada em desafios experimentais, no entanto, fatores como custo e manejo oneroso tornam inviável sua aplicação prática nos cultivos de camarões. No presente estudo, o método empregado na entrega das dsRNAs produzidas pelo *Bacillus subtilis* pode ser apontado como uma das causas que as levaram não surtirem o efeito antiviral esperado. Os animais tiveram os números de cópias virais aumentados tanto nos tratamentos que receberam uma segunda injeção no tempo zero com extrato de tecido infectado (II-VI), quanto no tratamento que recebeu injeção com extrato de tecido SPF (Gráfico 4). A elevada carga viral basal somada ao possível estresse das injeções podem ter influenciado nos resultados.

Além do método de entrega e da carga viral basal já elevada, outros motivos podem ter colaborado para o não funcionamento das dsRNAs, tais como a ausência de purificação das mesmas, para a remoção de outros componentes que não fossem duplas fitas de RNA da sequência específica desejada, a não utilização de um método mais preciso de quantificação das duplas fitas. A utilização de dsRNA com mais de um alvo específico, como a VP28ORF1a não foi relatada em trabalhos anteriores e a eficácia no processo de silenciamento com duplas fitas integradas precisa ser mais investigada.

A produção de moléculas de dsRNA em modelos *in vivo* para o combate ao IMNV é algo relativamente novo e não conta com registros. Por se tratar de um modelo de produção de dsRNA recente e da utilização de uma construção nova, mais investigações no que diz respeito às técnicas de obtenção, purificação, quantificação e outros métodos de entrega dessas moléculas excretadas pela cepa JJBs3 precisam ser realizadas e testadas.

7 CONCLUSÃO

Da forma e nas condições em que foi conduzido o bioensaio experimental 2 e que foram ofertadas aos camarões *Litopenaeus vannamei* desafiados experimentalmente com o vírus da mionecrose infecciosa, as moléculas de dsRNA-VP28ORF1a produzidas pelo *B. subtilis* JJBs3 não surtiram efeito protetivo, uma vez que não foi observado o controle da replicação viral.

O extrato de tecido infectado com IMNV se mostrou bastante letal em ambos os experimentos e nas diferentes dosagens em que foi aplicado, possibilitando o acompanhamento e observação do desenvolvimento da mionecrose infecciosa ao longo do período de desafio, por meio de PCR e análise histopatológica. Novos bioensaios podem ser realizados com a finalidade de tentar estabelecer uma dose letal média (DL50) para os animais que forem infectados experimentalmente com esse extrato de tecido infectado.

O extrato de tecido livre de patógenos se mostrou eficaz, diante de sobrevivência máxima e da ausência de evolução da carga viral nos animais com ele injetados. Dessa forma pode ser considerado um controle aperfeiçoado para validação de infectividade de inóculos virais em bioensaios, dado que ambos possuem similar composição bioquímica e diferem entre si apenas na presença do agente patogênico, não influenciando em resultados de sobrevivência, carga viral e histopatologia.

A produção de dsRNA *in vivo* com o modelo utilizado no presente estudo é bem recente e sem relatos anteriores, e assim necessita de mais investigações no que diz respeito às técnicas de obtenção, purificação, quantificação e outros métodos de entrega dessas moléculas excretadas pela cepa JJBs3 do *Bacillus subtilis*.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul; LICHTMAN, Andrew; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- AI, Hua-Shui. *et al.* Characterization of a prophenoloxidase from hemocytes of the shrimp *Litopenaeus vannamei* that is down-regulated by WSSV. **Fish & Shellfish Immunology**, [S.l.], v. 26, p. 28-39, 2008.
- ALIYARI, Roghiyh.; DING, Shou-Wei. RNA-based viral immunity initiated by the Dicer family of host immune receptors. **Immunological Reviews**, [S.l.], v. 227, p. 176-188, 2008.
- ANAGNOSTOPOULOS, C.; SPIZIZEN, Jhon. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, [S.l.], v. 81, p. 741-745, 1961.
- ANDRADE, Thales Passos; LIGHTNER, Donald. Development of a method for the detection of infectious myonecrosis virus by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification and nucleic acid lateral flow hybrid assay. **Journal of Fish Diseases**, [S.l.], v. 32, p. 911-24, 2009.
- ANDRADE, Thales Passos; REDMAN, Rita; LIGHTNER, Donald. Evaluation of the preservation of shrimp samples with Davidson's AFA fixative for infectious myonecrosis virus (IMNV) in situ hybridization. **Aquaculture**, [S.l.], v. 278, p. 179-183, 2008.
- ANDRADE, T. P. *et al.* Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of Infectious myonecrosis virus (IMNV). **Aquaculture**, [S.l.], v. 264, p. 9-15, 2007.
- ASSAVALAPSAKUL, Wanchai; CHINNIRUNVONG, Wanlop; PANYIM, Sakol. Application of YHV-protease dsRNA for protection and therapeutic treatment against yellow head virus infection *Litopenaeus vannamei*. **Diseases of Aquatic Organisms**, [S.l.], v. 84, n. 2, p. 167-71, 2009.
- BALCÁZAR, José. Luis; ROJAS-LUNA, Tyrone; CUNNINGHAM, David. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, [S.l.], v. 96, p. 147-150, 2007.
- BARBIERI JÚNIOR, Roberto Carlos; OSTRENSKY NETO, Antônio. **Camarões marinhos: reprodução, maturação, larvicultura**. 1. ed. Viçosa: Aprenda Fácil, 2001.
- BARRACCO, Margherita Anna; PERAZZOLO Luciane María; ROSA Rafael Diego. Avances en la Inmunología del Camarón. In: MORALES, Vielka; CUÉLLAR-ANJEL, Jorge. **Guia Técnica – Patología e imunología de camarones penaeidos**. Panamá: OIRSA, 2014. p. 237-308.
- BELL, Thomas; LIGHTNER, Donald. **A handbook of normal penaeid shrimp histology**. 1. ed. Arizona: World Aquaculture Society, 1988.
- BUENO, Sérgio Luiz de Siqueira. Doenças em camarões marinhos no Brasil. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 8, nov/dez. 1991. Disponível em:

<https://panoramadaaquicultura.com.br/doencas-em-camaroes-marinhos/>. Acesso em: 5 abr. 2019.

BUENO, Sérgio Luiz de Siqueira; MEYER, Roberto Meyer; NASCIMENTO, Ivana. *Baculovirus Penaei* infection in *Penaeus subtilis*: A new host and a new geographic range of the disease. **Journal of the World Aquaculture Society**, [S.l.], v. 21, n. 3. p. 235-237, 1990.

CHAROONNART, Patai; PURTON, Saul; SAKSMERPROME, Vanvimon. Applications of Microalgal Biotechnology for Disease Control in Aquaculture. **Biology**, [S.l.], v. 7, p. 1-14, 2018.

CHEN, Yi-Hong *et al.* Identification and functional characterization of Dicer2 and five single VWC domain proteins of *Litopenaeus vannamei*. **Developmental & Comparative Immunology**, [S.l.], v. 35, p. 661-671, 2011.

COELHO-MELO, Maria Verônyca *et al.* Molecular characterization of infectious myonecrosis vírus (IMNV) isolated from the shrimp *Litopenaeus vannamei* farmed in Ceará State, Brazil. **Lat. Am. Journal of Aquatic Research**, [S.l.], v. 42, p. 649-652, 2014.

COSTA, Andreza *et al.* Immune assesment of farm-reared *Penaeus vannamei* shrimp naturally infected by IMNV in NE Brazil. **Aquaculture**, [S.l.], v. 291, p. 141-146, 2009.

DANTAS, Márcia Danielle *et al.* Analysis of new isolates reveals new genome organization and a hypervariable region in infectious myonecrosis virus (IMNV). **Virus Research**, [S.l.], v. 203, p. 66-71, 2015.

DHAR, Arun *et al.* Diversity of single-stranded DNA containing viruses in shrimp. **Virus Disease**, [S.l.], v. 30, p. 1-15, 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES (FAO). **Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases**. Roma: FAO/ Fisheries and Aquaculture Department, 2001. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i7989t.pdf>. Acesso em: 06 mar. 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES (FAO). **Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPND) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304)**. Roma: FAO/ Fisheries and Aquaculture Department, 2013. Disponível em: <http://www.fao.org/3/i3422e/i3422e00.htm>. Acesso em: 05 abr. 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES (FAO). **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018**. Roma: FAO/ Fisheries and Aquaculture Department, 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2019.

FAUCE, Kathy La; OWENS, Leigh. RNA Interference with Special Reference to Combating Viruses of Crustacea. **Indian Journal of Virolog**, [S.l.], v. 23, p. 226-243, 2012.

FEIJÓ, Rubens Galdino *et al.* Infectious myonecrosis virus and white spot syndrome virus co-infection in pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farmed in Brazil. **Aquaculture**, [S.l.], v. 380-383, p. 1-5, 2013.

FEIJÓ, Rubens Galdino. **Mecanismo de RNA de interferência (RNAi) como uma ferramenta biotecnológica para a sanidade e reprodução do camarão branco *Litopenaeus vannamei***. 2014. 120 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014. Disponível em: https://ppgaquicultura.furg.br/images/Teses/2014/Tese_Rubens_Feijo_2014.pdf. Acesso em: 1 abr. 2018.

FEIJÓ, Rubens Galdino *et al.* RNAi-based inhibition of infectious myonecrosis virus replication in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Diseases of aquatic organisms**, [S.l.], v. 114, p. 89-98, 2015.

FILHO, João Costa. **Engenharia genética em probióticos para ativação do sistema de RNA interferente (RNAi) em camarões: uma potencial aplicação no controle de doenças virais**. 2019. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2019.

FLEGEL, Timothy *et al.* Presence of multiple viruses in non-diseased, cultivated shrimp at harvest. **Aquaculture**, [S.l.], v. 240, p. 55 – 68, 2004.

FU, Ling-Lin *et al.* *In vivo* assessment for oral delivery of *Bacillus subtilis* harboring a viral protein (VP28) against white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, [S.l.], v. 322-323, p. 33-38, 2011.

GELEY, Stephan.; MULLER, Christiane. RNAi: ancient mechanism with a promising future. **Experimental Gerontology**, [S.l.], v. 39, p.985-998, 2004.

GESTEIRA, T. C. V.; ANDRADE, T. P. Registros da ocorrência de algumas enfermidades em um cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) no Estado do Ceará. In: CONGRESSO BRASILEIRO SOBRE CRUSTÁCEOS (Resumos), 2002, São Pedro. **Sociedade Brasileira de Carcinologia**. São Paulo, 2002. p. 51.

HASSON, Ken W. *et al.* Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. **Diseases of Aquatic organisms**, [S.l.], v. 23, p. 115-126, 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção da pecuária municipal 2018. **Produção de camarão em recuperação, impulsionada pelo Rio Grande do Norte**. Rio de Janeiro. 2018. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2018_v46_br_informativo.pdf. Acesso em: 13 jan. 2020.

JI, Pei-Feng; YAO, Cui-Luan; WANG, Zhi-Yong. Immune response and gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns. **Fish & Shellfish Immunology**, [S.l.], v. 27, p. 563-570, 2009.

JIRAVANICHPAISAL, Pikul *et al.* White spot syndrome virus (WSSV) interaction with crayfish hemocytes. **Fish Shellfish Immunology**, [S.l.], v. 20, p. 718-727, 2006.

JOHNSON, Karyn; HULTEN, Marielle; BARNES, Andrew. “Vaccination” of shrimp against viral pathogens; phenomenology and underlying mechanisms. **Vaccine**, [S.l.], v. 26, p. 4885-4892, 2008.

KULCHESKI, Franceli; MARGIS, Rogério. Pequenos RNAs e aplicações de RNAi em plantas. *In*: RESENDE, Rodrigo Ribeiro (CNPq). **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria: Fundamentos e aplicações**. São Paulo: Editora Blucher, 2017. p. 675-708.

LABREUCHE, Yannick *et al.* Non-specific activation of antiviral immunity and induction of RNA interference may engage the same pathway in the Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Developmental and Comparative Immunology**, [S.l.], v. 34, p. 1209-1218, 2010.

LEE, SoYoung; SÖDERHÄLL, Kenneth. Early events in crustacean innate immunity. **Fish & Shellfish Immunology**, [S.l.], v. 12, p. 421-437, 2002.

LIGHTNER, Donald; REDMAN, R. M.; BELL, T. A. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. **Journal of Invertebrate Pathology**, [S.l.], v. 42, p. 62-70, 1983.

LIGHTNER, Donald. The penaeid shrimp virus TSV, IHHNV, WSSV and YHV: Status in: the Americas, available diagnostic methods and management strategies. **Journal Applied Aquaculture**, [S.l.], v. 9, p. 27-52, 2008.

LIGHTNER, Donald; PANTOJA, Carlos. Infectious Myonecrosis (IMV): current status report on the biology of etiological agent and development of diagnostic methods. *In*: FENACAM – Feira Nacional do Camarão, 2004; Rio Grande do Norte, **Anais**, 2004, p. 22.

LIGHTNER, Donald *et al.* Infectious Myonecrosis: New Disease in Pacific White Shrimp. **The advocate Global Aquaculture Alliance**, [S.l.], out. 2004. Disponível em: <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/infectious-myonecrosis-new-disease-in-pacific-white-shrimp/>. Acesso em: 8 abr. 2019.

LIGHTNER, Donald. Biosecurity in shrimp farming: Pathogen Exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. **Journal of the World Aquaculture Society**, [S.l.], v. 36, p. 229-248, 2005.

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

LIU, Haipeng; SÖDERHÄLL, Kenneth. JIRAVANICHPAISAL, Pikul. Antiviral immunity in crustaceans. **Fish Shellfish Immunology**, [S.l.], v. 27, p. 79-88, 2009.

LIU, Kuan-Fu *et al.* Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. **Fish & Shellfish Immunology**, [S.l.], v. 28, p. 837-844, 2010.

LIU, Huiquan *et al.* Evolutionary genomics of mycovirus-related dsRNA viruses reveals cross-family horizontal gene transfer and evolution of diverse viral lineages. **BMC Evolutionary Biology**, [S.l], v.12, n. 91, p. 91, 2012.

LIU, Hong-Ling *et al.* A real-time PCR for the detection of infectious myonecrosis virus in penaeid shrimp. **Journal Invertebrate Pathology**, [S.l], v. 113, p. 237-9, 2013.

LIVAK, Kenneth; SCHMITTGEN, Thomas. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C T}$ Method. **Methods**, [S.l], v. 25, p. 402-408, 2001.

LOY, Dustin *et al.* dsRNA provides sequence-dependent protection against infectious myonecrosis virus in *Litopenaeus vannamei*. **Journal of General Virology**, [S.l], v. 93, p. 880-888, 2012.

LOY, Dustin *et al.* Sequence-optimized and targeted double-stranded RNA as a therapeutic antiviral treatment against infectious myonecrosis virus in *Litopenaeus vannamei*. **Diseases of aquatic organisms**, [S.l], v. 105, p. 57-64, 2013.

MARTINS, Pedro Carlos Cunha. **Influência das condições ambientais e das técnicas de manejo de produção sobre a ocorrência de enfermidades na criação de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, no Estado do Ceará**. 2003. 117 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/1640/TesePCCM.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 12 ago. 2018.

MARTINS, Pedro Carlos Cunha. Cultivo de camarão marinho. *In*: SILVA-SOUZA, A.T. (Org.). **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**. Maringá: Editora ABRAPOA, 2006. p 121-135.

MARUEKAWONG, Kamonwan *et al.* Involvement of LvSID-1 in dsRNA uptake in *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, [S.l], v. 482, p. 65-72, 2018.

MATHEW, Suseela *et al.* Changes in tissue defence system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [S.l], v. 145, p. 315-320, 2007.

MITTAL, Vivek. Improving the efficiency of RNA interference in mammals. **Nature Reviews Genetics**, [S.l], v. 5, p. 355–65, 2004.

MOSS, Shaun *et al.* The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture. **Journal of Invertebrate Pathology**, [S.l], v. 110, p. 247– 50, 2012.

MOTESDEOCA, Mercedes *et al.* La respuesta inmunitaria celular del camarón *Litopenaeus vannamei* al WSSV y su utilidade em el control de la enfermedad en los estanques. **El mundo acuicola**, [S.l], v. 8, p. 50-55, 2001.

MULLER, Isabel *et al.* Genotyping of white spot syndrome virus (WSSV) geographical isolates 23 from Brazil and comparison to other isolates from the Americas. **Disease of Aquatic Organisms**, [S.l.], v. 88, p. 91-98, 2010.

NATARAJAN, Anusha *et al.* An Elegant Analysis of White Spot Syndrome Virus Using a Graphene Oxide/Methylene Blue based Electrochemical Immunosensor Platform. **Scientific Reports**, [S.l.], v. 7, n. 46169, 2017.

NIBERT, Max L. '2A-like' and 'shifty heptamer' motifs in penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, a monosegmented double-stranded RNA virus. **Journal of General Virology**, [S.l.], v. 88, p. 1315-1318, 2007.

NILSEN, Pal *et al.* White spot syndrome virus VP28 specific double-stranded RNA provides protection through a highly focused siRNA population. **Scientific Reports**, [S.l.], v. 7, p. 1028, 2017.

NUNAN, Linda; LIGHTNER, Donald. Optimized PCR assay for detection of white spot syndrome virus (WSSV). **Journal of Virological Methods**, [S.l.], v.171, p. 318-321, 2011.

NUNES, Alberto Jorge Pinto; MARTINS, Pedro Carlos Cunha; GESTEIRA, Tereza Cristina Vasconcelos. Carcinicultura Ameaçada. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v.14, p.37-57, 2004.

OIE – Office International Epizooties. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (2012)**. Paris: OIE, 2012. Disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online/>. Acesso em 09 mar. 2019.

OIE – Office International Epizooties. **Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos**. Crustacean. Paris: OIE, 2017. Disponível em: http://www.oie.int/index.php?id=2439&L=2&htmfile=chapitre_ihnh.htm. Acesso em 07 jan. 2019.

OIE – Office International Epizooties. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals (2018)**. Crustacean. Paris: OIE, 2018.

OIE – Office International Epizooties. **Manual of diagnostic tests for aquatic animals**. Crustacean. Paris: OIE, 2019.

OLIVEIRA-NETO, João Mafaldo. **Investigação da ocorrência dos Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) e da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV) em camarões coletados em área sob influência de efluentes da carcinicultura**. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Programa de Pós Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006. Disponível em: http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/1304/1/2006_dis_jmdoliveiraneto.pdf. Acesso em: 15 jun. 2018.

OLIVEIRA, Raffael *et al.* In silico single strand melting curve: a new approach to identify nucleic acid polymorphisms in Totiviridae. **BMC Bioinform**, [S.l.], v. 15, p. 1-14, 2014.

OLMOS, Jorge; PANIAGUA-MICHEL, J. *Bacillus subtilis* A Potential Probiotic Bacterium to Formulate Functional Feeds for Aquaculture. **Journal Microbial Biochemical Technology**, [S.l], v. 6, p. 361-365, 2014.

PANTOJA, Carlos *et al.* Nonsusceptibility of primate cells to Taura Syndrome Virus. **Emerging Infectious Diseases**, [S.l], v. 10, p. 2106-2112, 2004.

PANTOJA, Carlos; LIGHTNER, Donald. Enfermedades virales del camarón. In: MORALES, Vielka; CUÉLLAR-ANJEL, Jorge. **Guia Técnica – Patología e inmunología de camarones penaeidos**. Panamá: OIRSA, 2014. p. 382 p.

PINHEIRO, Ana C. A. S *et al.* Epidemiological status of Taura syndrome and Infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil). **Aquaculture**, [S.l], v. 262, p. 17-22, 2007.

POULOS, Bonnie *et al.* Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. **Journal of General Virology**, [S.l], v. 87, p. 987-996, 2006.

PRASAD, Kurcheti Pani *et al.* Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) – An alarming viral pathogen to Penaeid shrimps. **Aquaculture**, [S.l], v. 477, p. 99-105, 2017.

PRIOR, Sarah *et al.* Controlled bioassay systems for determination of lethal infective doses of tissue homogenates containing Taura syndrome or white spot syndrome virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, [S.l], v. 54, p. 89-96, 2003.

PRUDER, Gary. Biosecurity: application in aquaculture. **Aquacultural Engineering**, [S.l], v. 32, p. 3-10, 2004.

RATTANAROJPONG, Triwit *et al.* Recombinant baculovirus mediates dsRNA specific to rr2 delivery and its protective efficacy against WSSV infection. **Journal of Biotechnology**, [S.l], v. 229, p. 44–52, 2016.

ROBALINO, Javier *et al.* Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? **Journal of virology**, [S.l], v. 79, p. 13561-13571, 2005.

ROBALINO, Javier *et al.* Double-stranded RNA and antiviral immunity in marine shrimp: inducible host mechanisms and evidence for the evolution of viral counter-responses. **Developmental and Comparative Immunology**, [S.l], v. 31, p. 539-547, 2007.

ROBALINO, Javier *et al.* Advances in genomics and genetics of Penaeid shrimp. In: FLETCHER, Garth; RISE, Matthew. **Aquaculture biotechnology**, Oxford, UK, 2011, p. 21-42.

ROCHA, Itamar Paiva; RODRIGUES Josemar. O agronegócio do Camarão cultivado em 2003. **ABCC**. Recife, p. 19. 2004. Disponível em: <https://abccam.com.br/wp-content/uploads/2013/12/o-agronegocio-do-camarao-cultivado-2003-Itamar-e-josemar-2004.pdf>. Acesso em: 12 set. 2018.

RODRIGUES, Josemar; BORBA, Marcelo. Carcinicultura Brasileira: Estatísticas e revelações. **Feed&food**, Sorocaba, v. 1, n. 1, p.40-40, 2013.

ROUX, Michelle *et al.* The lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). **Journal of Virology**, [S.l.], v. 77, p. 7140-7149, 2002.

SANCHEZ-ÁLVAREZ, Ana *et al.* Production of specific dsRNA against white spot syndrome virus in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Aquaculture Research**, [S.l.], v. 49, p. 480-491, 2018.

SANO, T. *et al.* Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v.89, p.10104-10108, 1992.

SAKSMERPROME, Vanvimon *et al.* A novel and inexpensive application of RNAi technology to protect shrimp from viral disease. **Journal Virol Methods**, [S.l.], v. 162, p 213-217, 2009.

SARATHI, M. *et al.* Oral administration of bacterially expressed VP28dsRNA to protect *Penaeus monodon* from white spotsyndrome virus. **Marine Biotechnol**, [S.l.], v. 10, p. 242–249, 2008.

SEIFFERT, Walter Quadros; WINCKLER, Sérgio; MAGGIONI, Daniela. A mancha branca em Santa Catarina. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 15, p. 51-53, 2005.

SENAPIN, Saengchan *et al.* Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. **Aquaculture**, [S.l.], v. 266, p. 32-38, 2007.

SILVA, S. M. B.; PINHEIRO, A. C. S. A.; COIMBRA, M. R. M. Quantification of Infectious myonecrosis virus in diferente tissues of naturally infected Pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei*, using real-time PCR with SYBR Green chemistry. **Journal of Virological Methods**, [S.l.], v. 177, p. 197-201, 2011.

SILVA, Suzianny Maria Bezerra Cabral *et al.* *Artemia franciscana* as a vector for infectious myonecrosis virus (IMNV) to *Litopenaeus vannamei* juvenile. **Journal Invertebrate Pathology**, [S.l.], v. 126, p1-5, 2015.

SÖDERHALL, Kenneth; CERENIUS, Lage. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, [S.l.], v. 198, p. 116-126, 2004.

SONG, Yen-Ling *et al.* Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. **Fish and Shellfish Immunology**, [S.l.], v. 114, p. 317-331, 2003.

SOOWANNAYAN, Chumporn *et al.* Ginger and its component shogaol inhibit *Vibrio* biofilm formation in vitro and orally protect shrimp against acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). **Aquaculture**, [S.l.], v. 504, p. 139-147, 2019.

TABLER, Martin; SFINGER, Heinz. Infectivity studies on different potato spindle tuber viroid (PSTV) RNAs synthesized in vitro with the SP6 transcription system. **The EMBO Journal**, [S.l], v. 4, p. 2191-2199, 1985.

TANG, Jinghua *et al.* Infectious myonecrosis virus has a totivirus-like, 120-subunit capsid, but with fiber complexes at the fivefold axes. **PNAS**, [S.l], v.105, n.4 5, p.17.526-17.531, 2008.

TEIXEIRA-LOPES, Marília Alves *et al.* Differential diagnosis of active hypodermal and hematopoietic necrosis virus based on gene choice and reverse transcription coupled with PCR. **Genetics Molecular Research**, [S.l], v. 9, p. 2025–2031, 2010.

TEIXEIRA-LOPES, Marília Alves *et al.* Natural co-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and infectious myonecrosis virus (IMNV) in *Litopenaeus vannamei* in Brazil. **Aquaculture**, [S.l], v. 312, p. 212–216, 2011.

THAMMASORN, Thitiporn *et al.* Large-scale production and antiviral efficacy of multi-target double-stranded RNA for the prevention of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. **BMC Biotechnology**, [S.l], v. 15, p. 1-10, 2015.

VALENÇA, Anita Rademaker; MENDES, George Nilson. Interferência de diferentes métodos de aclimação na sobrevivência de pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, [S.l], v. 31, p. 9-16, 2009. Disponível em: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/307/307>. Acesso em: 10 jan 2019.

WALKER, Peter; MOHAN, C. V. Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins, impact and the effectiveness of health management strategies. **Aquaculture**, [S.l], v. 1, p.125–154, 2009.

WANG, Xiao-Hong *et al.* RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. **Science**, [S.l], v. 312, p. 452-454, 2006.

YAO, Xuemei *et al.* A Dicer-1 gene from white shrimp *Litopenaeus vannamei*: expression pattern in the processes of immune response and larval development. **Fish and Shellfish Immunology**, [S.l], v. 29, p. 65-70, 2010.

YEH, Shinn-Pyng *et al.* Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infection hematopoietic necrosis virus. **Fish & Shellfish Immunology**, [S.l], v. 26, p. 582-588, 2019.