



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

LUIZ FAGNER FERREIRA NOGUEIRA

**DIFERENTES FONTES DE dsRNA PARA A ATIVAÇÃO DO MECANISMO DE
RNA DE INTERFERÊNCIA: PROTEÇÃO DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*
CONTRA O VÍRUS DA MIONECROSE INFECCIOSA**

FORTALEZA

2022

LUIZ FAGNER FERREIRA NOGUEIRA

DIFERENTES FONTES DE dsRNA PARA A ATIVAÇÃO DO MECANISMO DE RNA DE
INTERFERÊNCIA: PROTEÇÃO DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* CONTRA O
VÍRUS DA MIONECROSE INFECCIOSA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia e genética de organismos aquáticos.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni

FORTALEZA

2022

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)

N712d Nogueira, Luiz Fagner Ferreira.
Diferentes fontes de dsRNA para a ativação do mecanismo de RNA de interferência: Proteção do camarão
Litopenaeus vannamei contra o vírus da mionecrose infecciosa / Luiz Fagner Ferreira Nogueira. – 2022.
67 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.

1. L. vannamei. 2. RNAi. 3. IMNV. 4. Probiótico. I. Título.

CDD 639.2

LUIZ FAGNER FERREIRA NOGUEIRA

DIFERENTES FONTES DE dsRNA PARA A ATIVAÇÃO DO MECANISMO DE RNA DE INTERFERÊNCIA: PROTEÇÃO DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* CONTRA O VÍRUS DA MIONECROSE INFECCIOSA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia e genética de organismos aquáticos.

Aprovada em: 22/03/2022.

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

Dr. João Costa Filho
Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. Alberto Jorge Pinto Nunes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, criador de todas as coisas, por me guiar e me alimentar espiritualmente nessa etapa da minha vida.

A minha mãe, **Francisca Soares**, por sempre apoiar minhas escolhas e pelo amor incondicional.

Ao meu pai, **Luiz Gonzaga**, e ao meu irmão, **Djavan**, pelo apoio nessa caminhada.

A **Irmã Bernadete** e ao **Francini Guedes**, grandes apoiadores da minha vida estudantil, por me proporcionarem uma ajuda inestimável quando mais precisei.

Aos meus segundos pais, **Dona Rosa e Seu Paulo** (*In memoriam*), pelo acolhimento e ajuda nos momentos mais difíceis dessa trajetória.

Ao meu amor, **Jamille**, grande companheira, pelo incondicional amor e dedicação em todos os momentos da minha vida acadêmica.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Rodrigo Maggioni**, pelos ensinamentos e pela confiança no desenvolvimento dessa tese.

A Dr. **João Costa Filho**, amigo e conselheiro, pelos ensinamentos e pelo incentivo em todas as etapas desse trabalho.

A Msc. **Juliana Freitas**, amiga e parceira, por toda a colaboração e troca de conhecimentos que enriqueceram esse trabalho.

A Msc. **Jade Riet**, amiga e parceira, por toda ajuda investida nesse trabalho e pelos valiosos ensinamentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. **Rubens Feijó**, amigo e parceiro, pelos ensinamentos e colaborações para viabilização dessa tese.

Ao Dr. **Maximiano Dantas**, amigo e companheiro, por ter diminuído um pouco mais a aridez desse doutorado.

Aos técnicos do laboratório, **Graça Coelho e Rafael Rocha**, e aos colegas de pesquisa, **Álvaro, Hudson, Ingrid, Jonathan, Levi, Juliana Gaeta, Marina, Mayara e Raysa**, por toda ajuda e companheirismo dedicada a esse trabalho.

Ao Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR e ao Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos – CEDECAM, pela infraestrutura e equipamentos necessários para a realização desta pesquisa.

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

“A ciência consiste em substituir o saber que parecia seguro por uma teoria, ou seja, por algo problemático”

José Ortega y Gasset
Filósofo e Jornalista

RESUMO

A aquicultura vem crescendo vertiginosamente nos últimos anos em reflexo do aumento da demanda mundial de proteínas de origem aquática. No entanto, a presença de doenças nos organismos cultivados vem gerando fortes quedas na produção. Recentemente, o cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* no Brasil, em especial na região nordeste, vem sofrendo com surtos de doenças de origem viral. O vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) é endêmico dessa região e pode promover desde perda de desempenho zootécnico até mortalidade nos viveiros de cultivo ao redor de 70%. Como alternativa no combate dessa enfermidade, o mecanismo de RNA de interferência, que é ativado na presença de moléculas de duplas fitas de RNA (dsRNA) espécie-específica, vem se mostrando uma alternativa no tratamento de doenças virais em camarões. Contudo, a produção e a entrega dessas moléculas por métodos mais viáveis para o cultivo precisam melhor investigadas. O objetivo desse trabalho é avaliar a proteção de diferentes modelos de expressão de dsRNA *in vivo* no combate ao vírus da mionecrose infecciosa por meio de desafios experimentais. No primeiro capítulo, foram produzidas moléculas de dsRNA-VP28ORF1a por kit comercial e pela cepa *Escherichia coli* HT115 para a terapia via injeção e ração de camarões *L. vannamei* infectados com o IMNV. As moléculas produzidas pela *E. coli* e pelo kit comercial não foram efetivas no silenciamento do vírus. No capítulo dois, foi avaliada a proteção de dsRNA-VP28ORF1a via *Bacillus subtilis* cepa JJBs3 injetadas em camarões *L. vannamei* desafiados com o IMNV a partir da análise de carga viral, histopatológicas e de expressão de genes ligados ao mecanismo de RNAi. Não houve proteção nos grupos que receberam as dsRNA via injeção, mas no grupo que recebeu as moléculas relacionadas ao vírus 10 dias apresentaram um padrão de mortalidade mais lento. observou-se que houve modulação dos genes que receberam essas moléculas. No capítulo três, foi avaliada a proteção da cepa de *B. subtilis* JJBs3 expressando dsRNA-VP28ORF1a incorporada à alimentação de camarões *L. vannamei* desafiados experimentalmente com o IMNV. A eficácia das moléculas de dsRNA foi verificada por análises de carga viral, histopatológicas e de expressão de genes ligados ao mecanismo de RNAi. O grupo que recebeu a cepa JJBs3 expressando a dsRNA-VP28ORF1a teve uma sobrevivência de 49% ao longo de 17 dias de infecção e uma carga viral média semelhante (aproximadamente $3,5 \times 10^3$ cópias virais/ μg de RNA) do grupo que não recebeu o vírus, enquanto o grupo que recebeu a cepa JJBs6 expressando dsRNA não relacionado ao vírus, teve 100% de mortalidade no mesmo período e uma carga viral maior ($1,32 \times 10^7$ cópias virais/ μg de RNA) em relação ao grupo JJBs3. Os resultados apresentados nessa tese indicam que a cepa de *B. subtilis* editada geneticamente

para produção de dsRNA específicas pode ser aplicada como potencial modelo biológico no combate ao vírus da mionecrose infecciosa em camarões de cultivo.

Palavras-chave: *L. vannamei*; RNAi; IMNV; probiótico.

ABSTRACT

Aquaculture has been growing dramatically in recent years because of the increase in world demand for proteins of aquatic origin. However, the presence of diseases in cultivated organisms has generated strong drops in production. Recently, the cultivation of marine shrimp *Litopenaeus vannamei* in Brazil, especially in the northeast region, has been suffering from outbreaks of viral diseases. The infectious myonecrosis virus (IMNV) is endemic to this region and can promote from loss of zootechnical performance to mortality in nurseries around 70%. As an alternative to combat this disease, the RNA interference mechanism, which is activated in the presence of species-specific double-stranded RNA (dsRNA) molecules, has been shown to be an alternative in the treatment of viral diseases in shrimp. However, the production and delivery of these molecules by more viable methods for cultivation need further investigation. The objective of this work is to evaluate the protection of different models of dsRNA expression *in vivo* against the infectious myonecrosis virus through experimental challenges. In the first chapter, dsRNA-VP28ORF1a molecules were produced by a commercial kit and by the *Escherichia coli* HT115 strain for therapy via injection and feed of *L. vannamei* shrimp infected with IMNV. The molecules produced by *E. coli* and by the commercial kit were not effective in silencing the virus. In chapter two, the protection of dsRNA-VP28ORF1a via *Bacillus subtilis* strain JJBs3 injected into *L. vannamei* shrimp challenged with IMNV was evaluated based on viral load, histopathological and gene expression analysis linked to the RNAi mechanism. There was no protection in the groups that received the dsRNAs via injection, but the group that received the virus-related molecules 10 days showed a slower mortality pattern. It was observed that there was modulation of the genes that received these molecules. In chapter three, the protection of the *B. subtilis* JJBs3 strain expressing dsRNA-VP28ORF1a incorporated into the feed of *L. vannamei* shrimp experimentally challenged with IMNV was evaluated. The effectiveness of dsRNA molecules was verified by viral load, histopathological and gene expression analysis linked to the RNAi mechanism. The group that received the JJBs3 strain expressing dsRNA-VP28ORF1a had a 49% survival over 17 days of infection and a similar mean viral load (approximately 3.5×10^3 viral copies/ μg RNA) as the group that did not receive the virus, while the group that received the JJBs6 strain expressing dsRNA unrelated to the virus had 100% mortality in the same period and a higher viral load (1.32×10^7 viral copies/ μg RNA) compared to the JJBs3 group. The results presented in this thesis indicate that the genetically edited *B. subtilis* strain to produce specific dsRNA can be applied as a potential biological model to combat the infectious myonecrosis virus in farmed shrimp.

Keywords: *L. vannamei*; RNAi; IMNV; probiotic.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Cronograma dos Bioensaios com *L. vannamei*. (A) Primeiro grupo experimental em que o dsRNA foi entregue por injeção. (B) Segundo grupo experimental em que o dsRNA foi entregue a partir de bactérias aspergidas na ração..... 24
- Figura 2 – Gel de agarose dos produtos da purificação e da produção de dsRNA pelas cepas de *E. coli* HT115. T: dsRNAs tratadas com DNase e RNase; S/T: dsRNA sem tratamento com DNase e RNase; 1: Cepa não transformada; 2: Cepa com pLITVP28ORF1a; 3: Cepa com pLITIGSF4D. M: Marcador 1Kb Plus DNA Ladder..... 26
- Figura 3 – Percentual de sobrevivência dos grupos experimentais de *L. vannamei* injetados intramuscularmente com vírus. (A) T1 - injeção com tampão TE e tampão salino; T2 - injeção de tampão TE e 100 µl de inóculo IMNV; T3 - injeção de dsRNA-ORF1a a partir de HT115 *E. coli* e inóculo IMNV; T4 - injeção de dsRNA-IGSF4D a partir de HT115 *E. coli* e inóculo IMNV; T5 - injeção de dsRNA-ORF1a sintético e inóculo IMNV. (B) T1 - alimentar com HT115 *E. coli* produzindo dsRNA-ORF1a e inóculo IMNV; T2 - alimentar com HT115 *E. coli* produzindo dsRNA-IGSF4D e inóculo IMNV. * = $p < 0,01$ 27
- Figura 4 – Carga viral IMNV dos grupos experimentais de *L. vannamei* no dia 0 em comparação com os dias 3 e 5 após a infecção. T1 - injeção com tampão TE e tampão salino; T2 - injeção de tampão TE e 100 µl de inóculo IMNV; T3 - injeção de dsRNA-VP28ORF1a a partir de *E. coli* HT115 e inóculo IMNV; T4 - injeção de dsRNA-IGSF4D a partir de *E. coli* HT115 e inóculo IMNV; T5 - injeção de dsRNA-VP28ORF1a sintético e inóculo IMNV. * = $p < 0,01$ e ** = $p < 0,0001$ 28
- Figura 5 – Microscopia de luz de cortes histológicos corados com H&E de camarões *L. vannamei* injetados com (A) tampão TE e tampão salino, (B) tampão TE e 100 µl de inóculo IMNV, (C) dsRNA-ORF1a de HT115 *E. coli* e inóculo IMNV, (D) dsRNA-IGSF4D do inóculo HT115 *E. coli* e IMNV e (E) dsRNA-ORF1a sintético e inóculo IMNV. Músculo estriado (esquelético)

normal (A); setas mostrando áreas necróticas liquefeitas (B, C e, D);
pequenas áreas necróticas liquefeitas (E). Barra de escala 100
µm..... 29

Figura 6 – Percentual de sobrevivência dos grupos de camarões *L. vannamei* injetados intramuscularmente com solução salina (IMNV), moléculas de dsRNA-VP28ORF1a via *B. subtilis* (Bs3), moléculas de dsRNA-IGSF4D via *E. coli* ao longo de 25 dias após a injeção de $1,02 \times 10^5$ cópias do IMNV e extrato de tecido livre de patógenos específicos (SPF)..... 37

Figura 7 – Microscopia ótica de cortes histológicos corados com H&E referentes a camarões injetados com extrato de tecido livre de patógenos específicos e solução salina (SPF) (A); Inóculo IMNV e solução salina (B); Inóculo IMNV e dsRNA IGSF4D via *E. coli* HT115 (C), Inóculo IMNV e dsRNA-VP28ORF1a via *B. subtilis* (D, E e F) A) Tecido muscular sem lesões características do IMNV; B e D) Infiltração hemocítica e Necrose de coagulação; C e E) Necrose de coagulação e liquefação acompanhada de infiltração hemocítica; D) infiltração hemocítica focal no tecido muscular; C e E) Necrose muscular de coagulação; F) Esferóides do órgão linfóide. Barra de escala: 100 µm..... 37

Figura 8 – Número médio de cópias do IMNV em hemócitos de camarões *L. vannamei* injetados intramuscularmente com extrato de tecido livre de patógenos específicos (SPF) e solução salina; Inóculo IMNV e solução salina (IMNV); Inóculo IMNV e dsRNA IGSF4D via *E. coli* HT115 (IGSF4D); Inóculo IMNV e dsRNA-VP28ORF1a via *B. subtilis* (VP28ORF1a [1ª inj]) e Inóculo IMNV e dsRNA-VP28ORF1a via *B. subtilis* 10 dias após injeção das moléculas (VP28ORF1a [2ª inj]) acompanhados por 24 dias. As barras verticais representam a média \pm SEM (n = 9). As diferenças estatísticas em relação ao “2º pré” de cada grupo estão representadas com um asterisco (*) (P<0,01) ou três asteriscos (***) (P <0,0001) 40

Figura 9 – Dinâmica de expressão do *Sid-1* em hemócitos de camarão *L. vannamei* injetados intramuscularmente com: Solução salina e extrato de tecido livre de

patógenos específicos (SPF); Solução salina e inóculo IMNV; dsRNA-IGSF4D via *E. coli*-HT115 e inóculo IMNV; dsRNA-VP28ORF1a via *B. subtilis*-Bs3 e inóculo IMNV. Os dados estão plotados em valores de média±SEM (n=9 camarões em cada ponto). O nível de significância estatística em relação ao “2º dia antes da infecção” de cada grupo é indicado por um (*) (P<0,01), dois (**) (P<0,001) ou três (***) (P<0,0001) asteriscos..... 41

Figura 10 – Dinâmica de expressão do *Dicer-2* em hemócitos de camarão *L. vannamei* injetados intramuscularmente com: Solução salina e extrato de tecido livre de patógenos específicos (SPF); Solução salina e inóculo IMNV; dsRNA-IGSF4D via *E. coli*-HT115 e inóculo IMNV; dsRNA-VP28ORF1a via *B. subtilis*-Bs3 e inóculo IMNV. Os dados estão plotados em valores de média±SEM (n=9 camarões em cada ponto). O nível de significância estatística em relação ao “2º dia antes da infecção” de cada grupo é indicado por um (*) (P<0,01) ou dois (**) (P<0,001) asteriscos..... 42

Figura 11 – Dinâmica de expressão do *Argonauta-2* em hemócitos de camarão *L. vannamei* injetados intramuscularmente com: Solução salina e extrato de tecido livre de patógenos específicos (SPF); Solução salina e inóculo IMNV; dsRNA-IGSF4D via *E. coli*-HT115 e inóculo IMNV; dsRNA-VP28ORF1a via *B. subtilis*-Bs3 e inóculo IMNV. Os dados estão plotados em valores de média±SEM (n=9 camarões em cada ponto). O nível de significância estatística em relação ao “2º dia antes da infecção” de cada grupo é indicado por dois (**) (P<0,001) ou três (***) (P<0,0001) asteriscos..... 43

Figura 12 – Percentual de sobrevivência dos grupos de camarões *L. vannamei* alimentados com as cepas de *B. subtilis* JJBs3 expressando a dsRNA-VP28ORF1a, JJBs6 expressando a dsRNA-IGSF4D e solução salina ao longo de 17 dias após a injeção de $1,02 \times 10^3$ cópias do IMNV (Bs3, Bs6 e IMNV) ou extrato de tecido livre de patógenos (SPF)..... 50

Figura 13 – Carga viral observada no final do experimento. SPF, camarão inoculado com extrato de tecido livre de patógenos e alimentado com ração contendo 35% de proteína bruta; Bs3, camarão desafiado com IMNV e alimentados com a

mistura contendo bactérias JJBs3 (expressando dsRNA-VP28/ORF1a); Bs6 camarão desafiado com IMNV e alimentado com a mistura contendo bactérias JJBs6 (expressando dsRNA-IGSF4D [não relacionada]). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) após um teste de Dunnett, seguindo por uma ANOVA de uma via. As cores correspondem à da figura 12..... 51

Figura 14 – Fotomicrografia de cortes histológicos coradas com H&E referentes a camarões alimentados com rações contendo cepas de *B. subtilis* JJBs3 (D), cepas de *B. subtilis* JJBs6 (B) e solução salina pertencentes ao Controle Negativo (A) e Controle Positivo (C) após 15 dias da infecção experimental por IMNV. A) Tecido muscular normal; B) Infiltrações hemocíticas ; C e D) Necrose de coagulação. As setas indicam as alterações observadas..... 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pesquisas utilizando diferentes fontes moléculas de dsRNA para ativação do mecanismo de RNAi em camarões no combate as principais doenças virais	17
---	----

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
ANOVA	Análise de variância
AUG	Adenosina-Uridina-Guanosina (Códon de iniciação)
BP	<i>Baculovirus penaei</i>
CsCl	Cloreto de césio
dsRNA	Dupla fita de RNA
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
g	Gramas
<i>g</i>	Giros
g/ml	Gramas por mililitro
H ₂ O	Água
HPV	<i>Hepatopancreatic parvovirus</i> - Parvovirose hepatopancreática
IGSF4D	<i>Immunoglobulin superfamily member 4D</i>
IHHNV	<i>Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus</i>
IMN	Doença da Mionecrose Infecciosa
IMNV	<i>Infectious Myonecrosis Virus</i> – Vírus da Mionecrose Infecciosa
KDa	Kilodaltons
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio Dibásico
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio Monobásico
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	<i>World Organisation for Animal Health</i> – Organização Mundial da Saúde Animal
ORF	<i>Open Reading Frames</i> – Quadro de Leitura Aberta
p/v	Peso 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
RISC	Complexo de Silenciamento induzido por RNA
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
<i>rnc</i>	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
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 interferent 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
VP28	<i>Viral Protein 28</i> - Proteína Viral 28
WSSV	<i>White Spot Syndrome virus</i> – Vírus da Síndrome da Mancha Branca
µm	Micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

- ® Marca Registrada
- ™ Trademark (Marca Comercial)
- % Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo geral	20
2.2	Objetivo específico	20
3	CAPÍTULO I - PROTEÇÃO DO CAMARÃO <i>L. vannamei</i> FRENTE AO VÍRUS DA MIONECROSE INFECCIOSA (IMNV) USANDO A <i>E. coli</i> HT115 PRODUZINDO DSRNA	21
3.1	Introdução	21
3.2	Material e métodos	22
3.3	Resultados	26
3.4	Discussão	29
4	CAPÍTULO II - TERAPIA EM CAMARÃO <i>L. VANNAMEI</i> FRENTE AO VÍRUS DA MIONECROSE INFECCIOSA (IMNV) USANDO DSRNA PRODUZIDAS VIA <i>B. SUBTILIS</i>	32
4.1	Introdução	32
4.2	Material e métodos	33
4.3	Resultados	37
4.4	Discussão	44
5	CAPÍTULO III – UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIA PROBIÓTICA EXPRESSANDO DSRNA PARA A PROTEÇÃO DO CAMARÃO <i>LITOPENAUES VANNAMEI</i> CONTRA O VÍRUS DA MIONECROSE INFECCIOSA	46
5.1	Introdução	46
5.2	Material e métodos	47
5.3	Resultados	50
5.4	Discussão	53
6	CONCLUSÕES GERAIS E PERPECTIVAS	56
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei*

Em 2018, estima-se que a produção de crustáceos mundial foi de 9,3 milhões de toneladas, movimentando algo ao redor de 57,1 bilhões de dólares. Desse total, 4,96 milhões toneladas (53%) correspondeu à produção do camarão branco do pacífico *Litopenaeus vannamei* (FAO, 2020). O camarão *L. vannamei* é nativo da costa do Pacífico oriental do México e norte do Peru. Apresenta preferência por água com temperatura superior a 25°C e por áreas de fundo lamacento. É encontrado nos oceanos nas fases adultas, enquanto as formas de larva e juvenis apresentam ocupação em áreas estuarinas. Após a eclosão dos ovos, os estágios larvais são descritos como Náuplio (I a V), Protozea (I a III) e Mysis (I a III) e por último pós-larva, apresentando o formato e as principais características básica de um camarão adulto (DUGASSA; GAETAN, 2018)

A partir dos anos 70, o cultivo de camarões tomou seus primeiros passos, tanto com espécies nativas e logo mais adiante com espécies exóticas. Nos anos 90 o cultivo do camarão *L. vannamei* tomou relevância no contexto nacional, sendo que a região nordeste teve natural protagonismo no desenvolvimento dessa atividade, dada a proximidade e disponibilidade de regiões costeiras além de outras características naturais para o desenvolvimento do cultivo (NUNES, 2001; RODRIGUES; BORBA, 2012). Essa espécie possui elevada rusticidade, aceitação de dietas artificiais, elevada taxa de crescimento, dentre outras características que são de interesse para o seu cultivo.

1.2 Enfermidades virais na carcinicultura

O grande crescimento no cultivo de camarões peneídeos no mundo refletiu no surgimento de doenças infecciosas de rápida e severa disseminação (PEELER, 2012). Como qualquer atividade zootécnica, o desequilíbrio entre as condições ambientais, o estado de saúde do animal e a presença de agentes potencialmente patogênicos nos sistemas de cultivo favorece a ocorrência de surtos (FLEGEL, 2019). No Brasil, no cultivo do camarão *L. vannamei* houve registro de ocorrência de diversos vírus, a saber, vírus da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (IHHNV, BRAZ *et al.*, 2009), vírus da hepatopancreatite (*Hepatopancreatic parvovirus*, HPV) e Baculovirus penaei (*Baculovirus penaei*, BP) (SIQUEIRA BUENO; NASCIMENTO; NASCIMENTO, 1990), vírus da mionecrose infecciosa (*Infectious Myonecrosis*

vírus - IMNV) (LIGHTNER *et al.*, 2004) e o vírus da síndrome da mancha branca (*White spot syndrome virus* – WSSV) (FEIJÓ, *et al.*, 2013; SEIFFERT, 2005). Os métodos de diagnósticos dentro do cultivo de camarões são importantes instrumentos na tomada de decisões. Com viabilização técnica e econômica nos métodos de diagnósticos moleculares, as técnicas de PCR e PCR em tempo real se apresentam como uma ferramenta rápida na obtenção de resultados e capaz de mensurar pequenas quantidades de patógenos.

1.3 O Vírus da Mionecrose Infecciosa

O vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) foi primeiramente registrado no nordeste brasileiro, com impactos econômicos significativos para a indústria nacional do camarão, e no sudoeste da Ásia (ANDRADE *et al.*, 2007; SENAPIN *et al.*, 2011). No período de 2002 a 2011, estima-se que esse vírus tenha promovido perdas econômicas na cifra de 1 bilhão de dólares (LIGHTNER *et al.*, 2012). A ocorrência da doença parece estar ligada ao estresse ambiental, pouco oxigênio dissolvido na água, variações extremas de salinidade e baixa qualidade da alimentação artificial (LIGHTNER *et al.*, 2004), provocando aumento do fator de conversão alimentar (FCA) até mortalidades elevadas que podem atingir 70 % (NUNES; CUNHA-MARTINS; GESTEIRA, 2004).

O vírus possui um formato icosaédrico com 40 nm de diâmetro e uma densidade de 1,366 g/ml em CsCl (POULOS *et al.*, 2006). O seu genoma é composto de uma molécula de dsRNA (*double-stranded RNA*) com 8,6 kpb e provavelmente possui um capsídeo com quatro polipeptídios representado pelos pesos moleculares de 24, 42, 106 e 149 kDa. Apresenta dois quadros de leitura aberta (*Open Reading Frame* - ORF) não sobrepostos, uma na porção 5' (ORF1, nt 136-4.953), codificando para a proteína do capsídeo e para a proteína de ligação ao dsRNA, e outro na porção 3' (ORF2, nt 5.241-7.451) codificando para a RNA polimerase dependente de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase* – RdRp). Por meio de análises filogenéticas do fragmento genômico da RdRp, o IMNV mostrou similaridade com outro vírus (*Giardia lamblia vírus*) membro da família *Totiviridae* (NIBERT, 2007; POULOS *et al.*, 2006; TANG *et al.*, 2008). Ainda por meio de análises moleculares, é possível identificar variantes de maior transmissão e de maior letalidade em viveiros de cultivo de camarão, como vem ocorrendo recentemente no nordeste brasileiro. O IMNV seria o único membro da Família *Totiviridae* que pode infectar invertebrados. O vírus causa necrose da musculatura estriada do abdômen e do cefalotórax. A opacidade da cauda no quinto segmento abdominal com aspecto leitoso é a condição clássica de manifestação da doença, além de haver

necrose das áreas afetadas, em estágios mais avançados. A progressão da doença se estende até o telson e aos urópodos (NUNES; CUNHA-MARTINS; GESTEIRA, 2004).

1.4 O mecanismo de RNA de interferência em camarões

Os primeiros relatos de silenciamento gênico promovidos por moléculas de RNA ocorreram de maneira inesperada em experimentos envolvendo em plantas, fungos e no nematoide *Caenorhabditis elegans* (FIRE *et al.*, 1991; NAPOLI; LEMIEUX; JORGENSEN, 1990; ROMANO; MACINO, 1992). Mais adiante se estabeleceu o conceito de RNA de interferência como sendo um processo de silenciamento gênico pós-transcricional em que um RNA mensageiro pode ser degradado por sequências senso ou antisense espécie-específica resultando em uma diminuição no níveis de transcritos de um gene (FIRE *et al.*, 1991; MONTGOMERY; XU; FIRE, 1998). A indução desse mecanismo se dá pela presença de duplas fitas de RNA (*double strand RNA- dsRNA*) que são processados em siRNA (*Small Interering RNA*) por meio da endonuclease tipo III conhecida como DICER (BERNSTEIN *et al.*, 2001). Uma vez produzidos, os siRNAs podem levar ao reconhecimento e clivagem do RNA mensageiro por meio de complexos de ribonucleoproteínas denominados de complexo de silenciamento induzido por RNAs (*RNA-induced silencing complexes - RISCs*) (PRATT; MACRAE, 2009). Dentro desse processo, os membros da família de proteínas Argonauta são uns dos principais fatores envolvidos no processo de silenciamento guiado por RNA pois são módulos de ligação altamente especializados que acomodam o pequeno componente de RNA - como microRNAs (miRNAs), siRNAs ou RNAs associados ao domínio PIWI (piRNAs) (MEISTER, 2013).

O mecanismo de RNAi foi empregado para o controle de enfermidades virais, a reprodução e o crescimento de camarões de cultivo. A síntese de sequências específicas de dsRNA já foi aplicada na atenuação da replicação do vírus da síndrome de Taura (TSV), vírus de necrose hipodérmica e hematopoiética infecciosa (IHHNV), vírus da síndrome da mancha branca e o vírus da mionecrose infecciosa (LOY *et al.*, 2013; ROBALINO *et al.*, 2005). No entanto, a entrega de dsRNA para ativação do mecanismo é ainda um dos principais gargalos, frente aos custos de produção dessas moléculas *in vitro*. A Tabela 1 apresenta os métodos de produção, as dosagens e as taxas de sobrevivência de grupos de camarões tratados com dsRNA, relacionadas ao combate às viroses em camarões.

Alguns modelos de produção de dsRNA foram abordados com êxito no combate a viroses em camarões. Em alternativa às moléculas produzidas por kits comerciais, a linhagem

HT115 de *Escherichia coli* foi aplicada com êxito para o silenciamento gênico viral por injeção (SARATHI *et al.*, 2010) ou ingestão de dsRNA (ATTASART *et al.*, 2013). Essa bactéria possui mutações pontuais no gene *rnc*, tornando-a deficiente na produção RNase tipo III, específica na degradação de dsRNA. Em ensaios com *Caenorhabditis elegans* e *L. vannamei* mostrou-se que a ingestão da cepa HT115 expressando dsRNA foi capaz de promover uma redução na quantidade de transcritos específicos (SARATHI *et al.*, 2008; TIMMONS; COURT; FIRE, 2001).

Tabela 1 – Pesquisas utilizando diferentes fontes moléculas de dsRNA para ativação do mecanismo de RNAi em camarões no combate às principais enfermidades virais.

Virose	Modelo	Inóculo (cópias virais/injeção)	dsRNA (µg/g de camarão)	Sobrevivência	Referência
WSSV	<i>In vitro</i>	10 ⁴	8 µg/g	30% - 13 dias	Xu et al., (2007)
IMNV	<i>In vitro</i>	10 ⁵	5 µg/g	50% - 20 dias	Loy et al., (2013)
IMNV	<i>in vitro</i>	1.02 x 10 ⁶	2 µg/g	90% - 30 dias	Feijó et al., (2015)
YHV	<i>In vivo</i> (cepa HT115)HT115	4 x 10 ⁴	Oral - 2.4 x 10 ¹¹ UFC g ⁻¹	85% - 6 dias	Sanitt et al., (2014)
YHV	<i>In vivo</i> (cepa HT115)	10 ⁶	0,6 µg/g	Inibiu vírus	Posiri et al., 2013
WSSV	<i>In vivo</i> (cepa HT115)	10 ⁻⁵	3 µg / g	37% - 30 dias	Sarathi et. al., (2010)
WSSV	<i>In vitro</i>	10 ⁴ cópias/µl	10 µg	50 a 60%	Wu et al., (2007)

YHV	<i>In vivo</i> (cepa HT115)	2×10^7 cópias/ μ l	2 μ g / g	70 e 90%	Saksmerprome et al., (2009)
YHV	<i>In vivo</i> (Microalga)	oral	Oral - 4, 5×10^5 células ml^{-1}	50% - 8 dias	Charoonnart et al., (2019)

1.5. Uso de probióticos na aquicultura

Em contraponto ao uso de drogas antimicrobianas, pesticidas e desinfetantes na prevenção de doenças da aquicultura e na promoção do crescimento, que levou à evolução de cepas resistentes de bactérias, o uso de probióticos na aquicultura está aumentando com a demanda por uma produção sustentável e ecológica. Algumas melhorias na utilização de probióticos são evidentes, incluindo melhor valor da alimentação artificial, melhores taxas de digestibilidade de ingredientes utilizados nas formulações de rações, inibição de microrganismos patogênicos por meio de atividades antagônicas, aumento da resposta imune e melhoria da qualidade da água (MARTÍNEZ CRUZ *et al.*, 2012)

Esses probióticos são bactérias inofensivas que ajudam o bem-estar do animal hospedeiro e contribuem, direta ou indiretamente, para proteger o animal hospedeiro contra patógenos bacterianos nocivos. O uso de probióticos na aquicultura está crescendo devido ao fato de a microbiota gastrointestinal de organismos aquáticos ter importância fundamental, tanto no que diz respeito às atividades enzimáticas como na interação hospedeiro-ambiente (FORTE *et al.*, 2019; PANDIYAN *et al.*, 2013).

Entre os muitos candidatos microbianos disponíveis, alguns *Bacillus* têm capacidade de esporulação, que os fazem sobreviver a condições ambientais adversas, não são patogênicos, não são tóxicos e podem produzir substâncias antimicrobianas, tornando-os candidatos mais adequados em comparação com outros probióticos. As espécies de *Bacillus* são bactérias Gram-positivas, quimio-heterotróficas em forma de bastonete, que geralmente são móveis por flagelos peritricos e não têm cápsulas; são anaeróbicos, aeróbicos ou facultativos. Têm a capacidade de produzir esporos que podem ser cilíndricos, ovais ou redondos ou com formato de rim, e são mais resistentes a desinfetantes, secantes e ao calor quando comparados com a sua forma vegetativa (GORDON *et al.*, 1973).

O sequenciamento completo e anotação dos genomas de diversas espécies de *Bacillus* permitiu avanços nas manipulações genéticas desses microrganismos (DONG; ZHANG, 2014). Dentre os métodos de seleção, os sistemas CRISPR-Cas 9 foram recentemente desenvolvidos como ferramentas importantes para a edição do genoma. O sistema de plasmídeo único construído para a edição do genoma de *B. subtilis* supera os problemas dos métodos de seleção-contraseleção, permitindo deleções e introdução de mutações pontuais (ALTENBUCHNER, 2016). Recentemente, Costa Filho (2019) desenvolveu plasmídeos para edição genômica em *B. subtilis* usando o sistema CRISPR/Cas9 com dois objetivos: nocautear o gene *rnc* e integrar genes para produção de dsRNA relacionadas com as viroses WSSV e IMNV. A continuidade desta pesquisa gerou o trabalho de Riet *et al.* (2021) que confirmou o atenuação da replicação do vírus WSS por meio da ingestão dessas bactérias editadas geneticamente em camarões cultivados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficiência de diferentes fontes de dsRNA, por injeção e alimentação, na ativação do mecanismo de RNA interferente e no controle da replicação viral, em camarões *L. vannamei* infectados experimentalmente com o vírus da mionecrose infecciosa.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir moléculas de dsRNA-VP28ORF1a via *E. coli* HT115 e por kit comercial para o silenciamento por RNAi do IMNV em camarões desafiados experimentalmente.
- Investigar a inibição da replicação do IMNV por meio de dsRNA-VP28ORF1a injetável produzidas pela cepa de *B. subtilis* JJBs3.
- Avaliar a proteção a partir da ingestão da cepa de *B. subtilis* JJBs3 expressando dsRNA-VP28ORF1a em camarões *L. vannamei* desafiados experimentalmente com o IMNV.

CAPÍTULO I – PROTEÇÃO DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* FRENTE AO VÍRUS DA MIONECROSE INFECCIOSA (IMNV) USANDO A *E. coli* HT115 PRODUZINDO dsRNA

3.1 INTRODUÇÃO

A produção de organismos aquáticos vem aumentando nos últimos anos, bem como a carcinicultura, sendo o camarão *L. vannamei* uma das principais espécies produzidas. No entanto, as doenças virais afetaram recorrentemente a produção mundial (FAO, 2020). Dentre os vírus mais resilientes, o Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) é responsável por causar mortalidades de 40 a 70% nas fazendas de camarão, promovendo prejuízos econômicos para o setor. Os sintomas do camarão são a necrose muscular, áreas com aspecto esbranquiçado, abdômen avermelhado (NUNES; CUNHA-MARTINS; GESTEIRA, 2004) e danos no tecido muscular e no órgão linfóide (LIGHTNER *et al.*, 2004). O vírus faz parte da família *Totiviridae*, apresenta formato icosaédrico, não envolvido por membrana e possui diâmetro de 40 nm (PANTOJA; LIGHTNER, 2014). O genoma possui aproximadamente 8,6 kpb de dsRNA e contém duas ORFs (Open Reading Frame) com 199 pb de sobreposição. ORF1 codifica para a principal proteína do capsídeo (MCP) e ORF2 codifica para RNA polimerase dependente de RNA (DANTAS *et al.*, 2015; TANG *et al.*, 2008)

A descoberta do mecanismo de RNA de interferência (RNAi) criou perspectivas para a prevenção e tratamento de doenças infecciosas em camarões. Usando essa tecnologia é possível silenciar a expressão gênica e a replicação viral, onde o RNA de fita dupla (*double stranded RNA* - dsRNA) se liga ao RNA mensageiro homólogo e promove a degradação do mesmo (RESHI *et al.*, 2014). Para *L. vannamei*, o mecanismo RNAi já foi utilizado como tratamento viral. Os relatos mostraram que a injeção de dsRNA relacionado ao WSSV (KUMAR *et al.*, 2015) e IMNV (FEIJÓ *et al.*, 2015) foi aplicada com sucesso contra a infecção viral e promoção da sobrevivência do camarão. No entanto, a produção e entrega de dsRNA para aplicação em maior escala precisa ser mais investigada.

O uso de bactérias para a produção de dsRNA relacionado a vírus pode representar uma alternativa para a aplicação de RNAi em fazendas de camarão. Estudos foram feitos usando *E. coli* HT115 para a produção dessas moléculas contra vírus de camarão (POSIRI; ONGVARRASOPONE; PANYIM, 2013; SARATHI *et al.*, 2008). Até o momento, em relação ao IMNV, apenas dsRNAs sintéticas foram usadas (Feijó *et al.*, 2015). O objetivo desse trabalho foi avaliar a inibição da replicação do IMNV em camarões tratados com as moléculas dsRNA-

VP28ORF1a por meio de injeção e na ração produzidas *in vivo* pela *E. coli* HT115.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Cepas bacterianas, condições de cultura e manipulação de DNA

A cepa de *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Brasil) foi utilizada para clonagem de plasmídeos, de acordo com o protocolo do fabricante. Para produzir dsRNA foi utilizada a cepa HT115 de *E. coli* (F-, mcrA, mcrB, IN (rrnD-rrnE) 1, rnc14 :: Tn10 (lisógeno DE3: promotor de lavUV5 - polimerase T7). A estirpe foi propagada em meio LB líquido e em placas de agar LB a 37 ° C. Os antibióticos foram utilizados na concentração final de 100 µg ml⁻¹ para ampicilina e 15 µg ml⁻¹ para tetraciclina. Os plasmídeos foram isolados de *E. coli* usando o *Plasmid prep Mini Spin* (GE HealthCare, Brasil). A purificação dos produtos de PCR e DNAs digeridos foi realizada com o DNA GFX™ PCR e a purificação de gel em banda (GE HealthCare, Brasil).

3.2.2 Construção dos plasmídeos pJVP28ORF1a e pJIGSF4D

A construção do plasmídeo pJVP28ORF1a começou com a aquisição da sequência sintética para produção de dsRNA (gene VP28 - WSSV [613 bp, GenBank: AY422228] e gene ORF1a - IMNV [597 bp, GenBank: AY570982]) clonada no plasmídeo pCloneEZ (Epoch Life Science Inc.). No segundo passo, a sequência alvo foi amplificada utilizando os oligonucleótidos F (5'-AAGGCCTTTGTCGGTAGCTC-3') e R (5'-ATTCTTGATGAAGGCGCGGA-3'). O fragmento foi cortado (enzimas *Bam*HI e *Eco*RI) e clonado no vetor LITMUS 28i para obter o vetor pJVP28ORF1a. No final, o plasmídeo continha a pBR322_origin, resistência à ampicilina e sequência da produção de dsRNA (gene VP28 referente ao WSSV [613 bp, GenBank: AY422228] e ORF1a referente ao IMNV [597 bp, GenBank: AY570982]) transcritas a partir dos dois promotores bidirecionais T7. O mesmo procedimento foi aplicado para construir o plasmídeo pJIG para produzir dsRNA não relacionado (imunoglobulina Zebrafish - IGSF4D; GenBank: AL954312).

3.2.3 Produção de dsRNA usando a *E. coli* HT115 e kit comercial

A produção e extração do dsRNA foi realizada de acordo com o método descrito

por Ongvarrasopone, Roshorm e Panyim (2007). Ambas as cepas foram cultivadas em Luria-Bertani (LB) médium em agitação (250 rpm) com de ampicilina (100 µg/ml) e tetraciclina (12,5 µg/ml) *overnight* à 37°C. As bactérias cultivadas foram inoculadas em novo meio com volume de 50 ml de mesma composição até chegarem a O.D_{600nm} de aproximadamente de 0.4 e adicionado IPTG (0,4 mM) para indução da expressão das dsRNAs por 4 horas (O.D_{600nm} 1.0) à 37°C. As células bacterianas foram precipitadas a 10.000xg por 10 minutos a 25°C e resuspendidas com SDS 0,1% em PBS e em seguida foram fervidas por 10 minutos. Foi adicionado 1,5 ml de tampão ATE (30 mM; de acetato de sódio, 10 mM de Tris HCl PH 8,0; 5 mM de EDTA) e 8,0 µl de RNase A e foram incubadas à 37 °C por 40-60 minutos. O dsRNA foi extraído adicionando 3 ml de TRIzol reagente® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) conforme protocolo do fabricante. Para a produção de dsRNA sintético foi utilizado o sistema T7 RiboMAX™ Express RNAi, de acordo com o protocolo do fabricante. As dsRNAs produzidas usando as cepas bacterianas foram tratados com DNase I e RNase A (Thermo Fisher Scientific, Brasil) de acordo com o protocolo do fabricante para degradação de DNA total e RNA de fita simples, respectivamente. As moléculas foram quantificadas usando o espectrofotômetro Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Maryland, USA) e avaliadas a integridade e tamanho em gel de agarose a 1%.

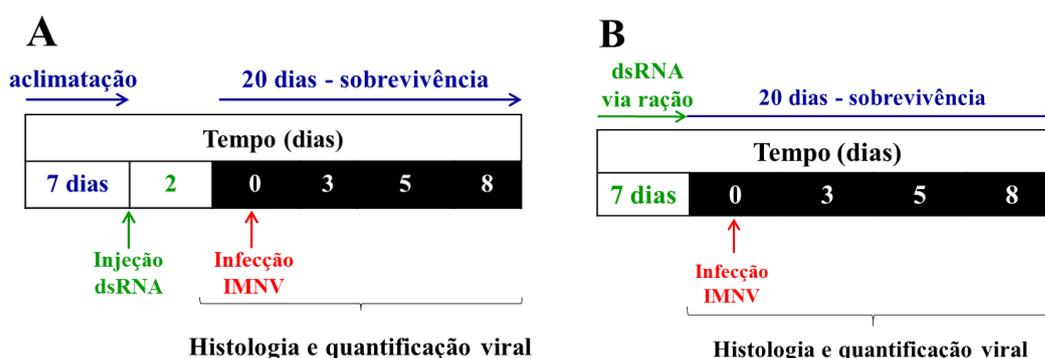
3.2.4 Aquisição e Aclimação dos camarões

Juvenis de *L. vannamei* (5g ± 0,3) foram coletados no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – UFC (LANOA-UFC) e transportados para a unidade de bioensaio do Centro de Estudos e Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos, também da UFC (CEDECAM-UFC). Os camarões foram alocados em dois grupos experimentais (300 camarões. grupo⁻¹), onde os parâmetros da água foram mantidos em salinidade 30, temperatura de 28 ° C, pH 7,2 e 5,5 mg. L⁻¹ de oxigênio dissolvido. Um fotoperíodo de 12 horas claro/ 12 horas escuro foi usado para imitar condições naturais similares às do nordeste brasileiro. Em ambos os grupos foram utilizados uma ração comercial contendo 35% de proteína bruta (P.B) alimentados 4 vezes ao dia numa taxa de 3,5% de peso corporal.dia⁻¹ e 50% de renovação de água diariamente. Os camarões foram aclimatados durante 7 dias e estocados em aquários com volume útil de 100 litros numa biomassa de 75 g por aquário.

3.2.5 Bioensaios

Para o experimento de desafio foi utilizado um inóculo viral elaborado de acordo com Feijó et al. (2015), oriundo de músculos abdominais de camarões diagnosticados como positivos apenas para o vírus da Mionecrose Infecciosa. O inóculo foi validado previamente para este e os demais experimentos (dados não demonstrados). Ao longo do experimento de desafio viral, amostras de hemolinfa foram coletadas individualmente de 9 camarões/grupo randomicamente selecionados, conforme a Figura 1. No primeiro grupo experimental, o dsRNA foi administrado por injeção intramuscular no terceiro segmento abdominal ($5 \mu\text{g g}^{-1}$ de camarão) (Fig. 1A). Os camarões foram cultivados em quatro tratamentos e um controle ($60 \text{ camarões.tratamento}^{-1}$) com quatro repetições cada (3 camarões por litro): T1) injeção intramuscular com $100 \mu\text{l}$ de tampão TE (10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,0) e tampão salino (330 NaCl mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,4); T2) injeção intramuscular de tampão TE e $100 \mu\text{l}$ de inóculo IMNV; T3) injeção intramuscular de dsRNA-ORF1a produzidas a partir da *E. coli* HT115 e inóculo IMNV; T4) injeção intramuscular de dsRNA-IGSF4D a partir da *E. coli* HT115 e inóculo IMNV; T5) injeção intramuscular de dsRNA-ORF1a sintética e inóculo IMNV.

Figura 1 - Cronograma dos bioensaios com *L. vannamei*. (A) Primeiro grupo experimental em que o dsRNA foi entregue por injeção. (B) Segundo grupo experimental em que o dsRNA foi entregue a partir de bactérias aspergidas na ração.



Para o segundo grupo experimental, também foi cultivado em dois tratamentos ($60 \text{ camarões.tratamento}^{-1}$) com quatro repetições cada (3 camarões por litro): T1) Ração com HT115 *E. coli* produzindo dsRNA-VP28ORF1a e inóculo IMNV; T2 - Ração com HT115 *E. coli* produzindo dsRNA-IGSF4D e inóculo IMNV. As dsRNA foi entregue a partir das bactérias borrifadas na ração (Fig. 1B). Esse procedimento foi realizado com $10^8 \text{ bactérias.grama}^{-1}$ para a alimentação, conforme metodologia descrita por Attasart et al. (2013). Após a fase de indução

o pellet contendo bactérias foi ressuspensionado em etanol 70% e mantidas a -20°C para inativação das células. Um hidrolisado de sardinha foi utilizado para a agregação das bactérias e posterior aspersão na ração. Os camarões foram alimentados duas vezes ao dia em uma proporção de 3,5% do peso corporal.dia⁻¹.

3.2.5 Extração de RNA e Síntese de cDNA

Os hemócitos de cada camarão coletado foram isolados do plasma por centrifugação a 1.200 g/10 min/4°C e o RNA total extraído com o reagente TRIzol (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total extraído foi tratado com DNase I por incubação a 37°C por 15 min e sua concentração foi determinada por quantificação espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™). O cDNA foi sintetizado com o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies®) em um volume de 20 µl de reação final contendo 2 µl de RT Buffer (10×), 0,8 µl de dNTPs mix (25×), 2 µl de RT random primers (10×), 1 µl de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U) e 1 µg 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 PCR em Tempo Real.

3.2.6 Quantificação Absoluta do IMNV por RT-qPCR

Para quantificação do número de cópias do IMNV ao longo do ensaio de desafio experimental foram utilizados os primers e sonda de Taqman descritos por Andrade et al. (2007). As reações de RT-qPCR foram realizadas em 10 µl de volume final contendo 5 µl de TaqMan Master Mix (Invitrogen®), 0,3 µl (10 µM) de cada primer IMNV412F (5'-GGACCTATCATA CATAGCGTTTGCA-3') e IMNV545R (5'-AACCCATATCTATTGTCGCTGGAT-3'), 0,15 µl (10µM) da sonda de hidrólise (IMNVp1) (5'-6FAM CCACCTTTACTTTCAATACTAC ATCATCCCCGG TAMRA-3'), 0,2 µl (50×), 1 µl (25-50 ng) de cDNA e 3,05 µl de água ultrapura (Invitrogen®). Um controle negativo contendo todos os reagentes, exceto o cDNA alvo e uma série de diluições do controle positivo pTOPO-IMNV.1 equivalente a 10⁹, 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³ e 10² cópias do IMNV foram adicionados a cada placa de RT-qPCR. O controle positivo pTOPO-IMNV.1 consistiu em uma construção genética resultante da ligação de um amplicon de 593 pb do IMNV (Nº de acesso no GenBank: AY570982, nt 197-789) ao pCR® 2.1-TOPO vector (Invitrogen®).

Para a quantificação do número de cópias do IMNV foi empregada a plataforma 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems®). As condições de ciclagem foram as seguintes: incubação a 50°C por 2 min, seguido da ativação da Platinum®Taq DNA polimerase a 95°C por 2 min, e 40 ciclos de 15 s a 95°C e 30 s 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 *ABI 7500 Real Time PCR systems*® (Applied Biosystems, Foster City, CA). Todas as amostras foram testadas em duplicata e somente consideradas positivas quando da amplificação válida de ambas as réplicas.

3.2.7 Análises Histopatológicas

Os camarões amostrados de cada grupo foram injetados com solução AFA de Davidson (11,5% de ácido acético, 22% de formalina e 33% de etanol) e imersos na mesma solução por 48 horas e, a seguir, mantidos em álcool 70%. Cortes histológicos transversais e longitudinais de 5 µm foram obtidos e submetidos a coloração com hematoxilina–eosina (BELL; LIGHTNER, 1988). Alterações histopatológicas características da IMNV foram investigadas conforme descrito por Lightner (2011).

O cronograma de amostragem e procedimentos dos bioensaios estão descritos na Figura 1. Para as taxas de sobrevivência, foi aplicado o teste Log-Rank entre os grupos em cada dia após a infecção (d.p.i.). As diferenças na evolução da carga viral IMNV foram determinadas por ANOVA de uma via com teste de Dunnett para múltiplas comparações com o tempo 0. O *GraphPad Prism 3.00* para Windows (GraphPad Software, USA) foi utilizado para os testes estatísticos.

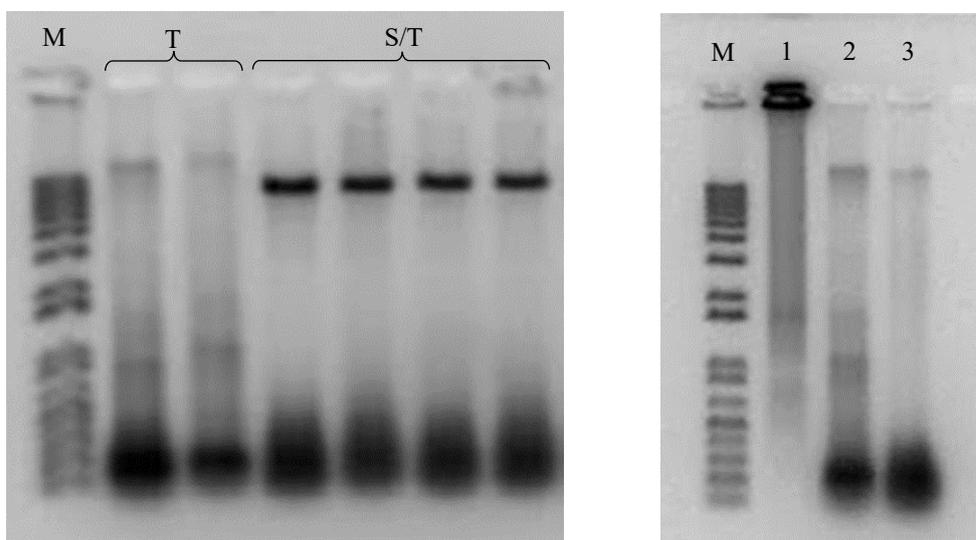
3.3 RESULTADOS

3.3.1 Produção de dsRNA na *E.coli* HT115

Tanto as etapas de tratamento enzimático para purificação das dsRNA quanto a confirmação da produção da molécula apenas nas cepas transformadas foram confirmadas em gel de agarose (figura 2).

Figura 2 – Gel de agarose dos produtos da purificação e da produção de dsRNA pelas cepas de *E.coli* HT115. T: dsRNAs tratadas com DNase e RNase; S/T: dsRNA sem tratamento com

DNase e RNase; 1: Cepa não transformada; 2: Cepa com pLITVP28ORF1a; 3: Cepa com pLITIGSF4D. M: Marcador 1Kb Plus DNA Ladder

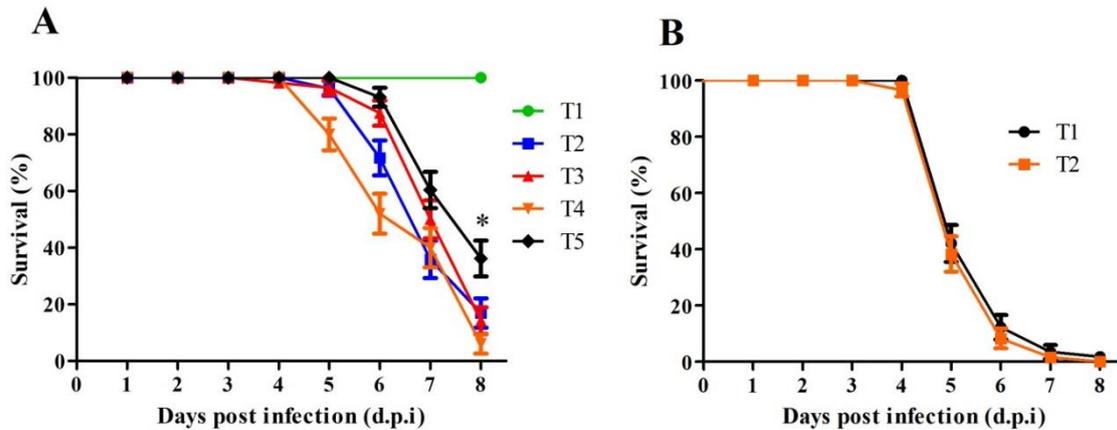


3.3.2 Percentual de sobrevivência

A sobrevivência dos grupos experimentais de *L. vannamei* foi monitorada por 20 dias, período após desafio por injeção intramuscular com inóculo IMNV contendo o equivalente a $1,02 \times 10^5$ cópias de IMNV por μg de RNA (Figura 3). Para o primeiro grupo experimental (Figura 3A), a injeção de dsRNA-VP28ORF1a sintético (T5) foi associada a taxas de sobrevivência de 36% ($p < 0,001$). No entanto, foi observada uma baixa taxa de sobrevivência nos grupos injetados com TE (T2 - 17% de sobrevida), injeção de dsRNA-VP28ORF1a da *E. coli* HT115 (T3 - 14% de sobrevida) e injeção de dsRNA-IGSF4D da *E. coli* HT115 (T4 - sobrevida em 6%), respectivamente. Para o segundo grupo experimental (Figura 3B), a ração com *E. coli* HT115 produzindo dsRNA-VP28ORF1a (T1) em relação a ração com HT115 *E. coli* produzindo dsRNA-IGSF4D (T2) foi associada a uma melhor taxa de sobrevivência entre o dia 4 e 7. No entanto, no dia 8, foi registrada mortalidade total de ambos os tratamentos.

Figura 3 – Percentual de sobrevivência dos grupos experimentais de *L. vannamei* injetados intramuscularmente com o IMNV. (A) T1 – injeção com tampão TE e tampão salino; T2 - injeção de tampão TE e 100 μl de inóculo IMNV; T3 - injeção de dsRNA-ORF1a a partir de HT115 *E. coli* e inóculo IMNV; T4 - injeção de dsRNA-IGSF4D a partir de HT115 *E. coli* e

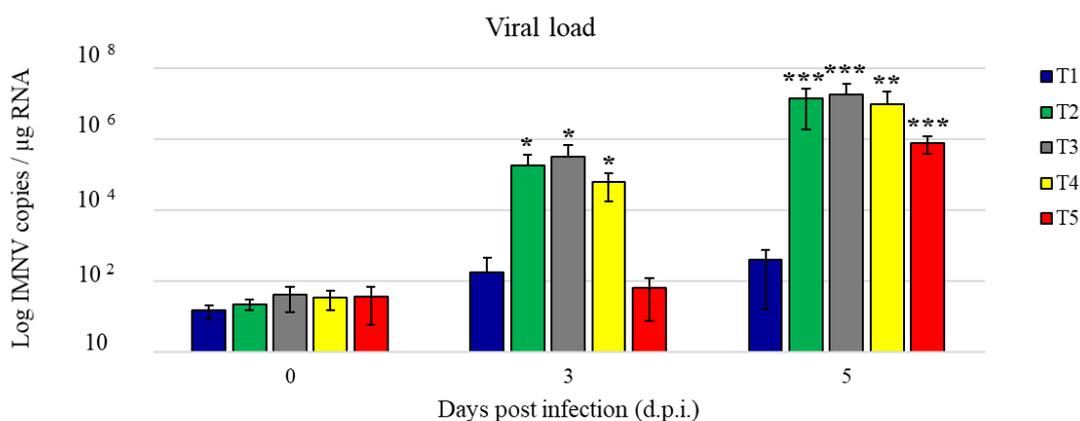
inóculo IMNV; T5 - injeção de dsRNA-ORF1a sintético e inóculo IMNV. (B) T1 - Ração com HT115 *E. coli* produzindo dsRNA-ORF1a e inóculo IMNV; T2 - Ração com HT115 *E. coli* produzindo dsRNA-IGSF4D e inóculo IMNV. * = $p < 0,01$.



3.3.3 Carga viral

Para o primeiro grupo experimental, foram mensuradas as diferenças entre a carga viral de IMNV (cópias de Log IMNV $\mu\text{g RNA}^{-1}$) dos grupos no dia 0 em comparação com os dias 3 e 5 após a infecção (Figura 4). A injeção de dsRNA-ORF1a sintético (T5) foi associada à proteção inicial até as 3 d.p.i. ($p < 0,0001$). No entanto, uma baixa taxa de proteção foi observada nos grupos injetados com tampão TE (T2), injeção de dsRNA-ORF1a de HT115 *E. coli* (T3) e injeção de dsRNA-IGSF4D de HT115 *E. coli* (T4), respectivamente.

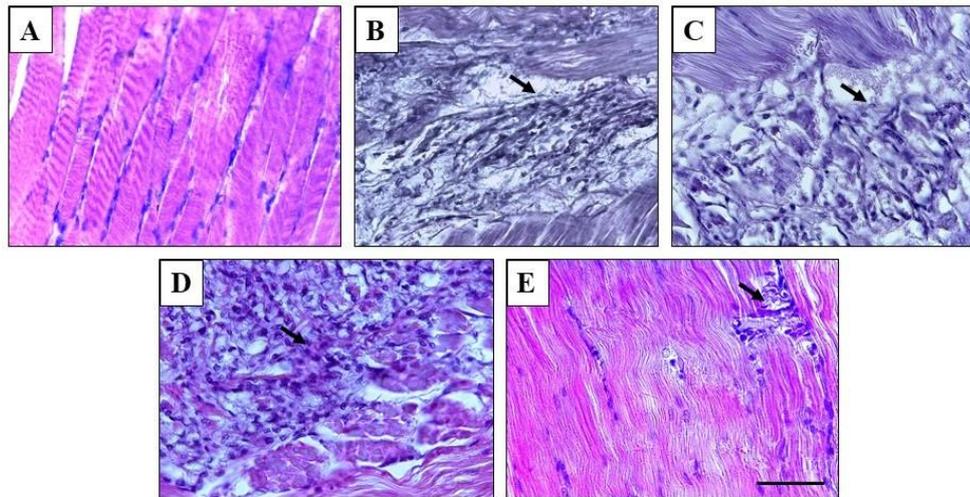
Figura 4 - Carga viral IMNV dos grupos experimentais de *L. vannamei* no dia 0 em comparação com os dias 3 e 5 após a infecção. T1 - injeção com tampão TE e tampão salino; T2 - injeção de tampão TE e 100 μl de inóculo IMNV; T3 - injeção de dsRNA-VP28ORF1a a partir de *E. coli* HT115 e inóculo IMNV; T4 - injeção de dsRNA-IGSF4D a partir de *E. coli* HT115 e inóculo IMNV; T5 - injeção de dsRNA-VP28ORF1a sintético e inóculo IMNV. * = $p < 0,01$, ** = $p < 0,001$ e *** = $p < 0,0001$



3.3.4 Histopatologia

No primeiro grupo experimental após 5 dias após o tratamento, o tratamento injetado com tampão TE e tampão salino (T1) não mostrou alterações histopatológicas no tecido muscular. No entanto, a histopatologia tipificada por áreas necróticas liquefeitas tornou-se evidente entre os grupos com injeção de tampão TE e 100 µl de inóculo IMNV (T2), injeção de dsRNA-ORF1a da *E. coli* HT115 e inóculo IMNV (T3) e injeção de dsRNA-IGSF4D da *E. coli* HT115 e inóculo IMNV (T4). O grupo com injeção de dsRNA-ORF1a sintético e inóculo IMNV (T5) apresentou menos alterações histopatológicas pela infecção por IMNV (Figura 5).

Figura 5 –Microscopia de luz de cortes histológicos corados com H&E de camarões *L. vannamei* injetados com (A) tampão TE e tampão salino, (B) tampão TE e 100 µl de inóculo IMNV, (C) dsRNA-ORF1a de HT115 *E. coli* e inóculo IMNV, (D) dsRNA-IGSF4D do inóculo HT115 *E. coli* e IMNV e (E) dsRNA-ORF1a sintético e inóculo IMNV. Músculo estriado (esquelético) normal (A); setas mostrando áreas necróticas liquefeitas (B, C e, D); pequenas áreas necróticas liquefeitas (E). Barra de escala 100 µm.



3.4 DISCUSSÃO

Perdas econômicas causadas por vírus são o maior desafio para manter e aumentar a produção. Até o momento, as possibilidades de prevenção e tratamento são muito importantes para o futuro desse setor. A manipulação genética das bactérias pode ser utilizada para essa proposta (SARATHI *et al.*, 2008). Neste estudo, o uso do dsRNA da *E. coli* HT115 obteve pouco sucesso na ativação do mecanismo de RNAi contra o IMNV, tanto na administração por injeção e alimentação. Foi demonstrado que a injeção de dsRNA-VP28ORF1a sintético foi associada a melhores taxas de sobrevivência e menor carga viral de camarão IMNV sob desafio de IMNV em comparação com dsRNA-VP28ORF1a da *E. coli* HT115. Esses resultados foram piores que aqueles obtidos por Feijó *et al.* (2015), que demonstraram proteção para camarões contra IMNV usando o dsRNA sintético por injeção. Isso pode ser explicado por se tratar de uma construção genética maior que deve ter impactado no processo de maturação e clivagem do RNA mensageiro.

Trabalhos semelhantes ao conduzido aqui demonstraram que a *E. coli* HT115 pode ser aplicada com sucesso contra vírus de camarão. Sarathi *et al.* (2008) apresentaram que a administração oral de HT115 *E. coli* preveniu *Penaeus monodon* contra a infecção pelo Vírus da Síndrome da Mancha Branca (*White Spot Syndrome Virus - WSSV*). Do mesmo modo, Posiri; Ongvarrasopone; Panyim (2013) mostraram a limitação na replicação do vírus da cabeça amarela (YHV) em *P. monodon* (0,5 g) usando a administração oral de dsRNA específico. Os resultados desses estudos foram interessantes, mas foram utilizadas outras espécies de camarão,

virose e um desafio viral oral, diferente do aplicado neste trabalho. Nesse contexto, o desenvolvimento de trabalhos com a *E. coli* HT115 para o IMNV precisam ser mais estudados.

Em conclusão, o uso da HT115 para este trabalho apresentou resultados limitados para o controle do IMNV no camarão *L. vannamei*. Embora todos os protocolos de produção de duplas fitas de RNA com a HT115 tenham sido seguidos, os resultados obtidos abrem a discussão sobre se esse modelo apresenta a reprodutibilidade e a eficácia necessária para o controle de doenças virais em camarões de cultivo.

Capítulo II – Terapia em camarão *L. vannamei* frente ao vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) usando dsRNA produzidas via *B. subtilis*

4.1 INTRODUÇÃO

A demanda crescente de consumo de alimento de origem aquática no mundo tem atraído vários investimentos e dinamizado as economias locais e globais em estimativas de 401 bilhões de dólares, no ano de 2018. Desse total, a aquicultura movimentou algo ao redor de 263,6 bilhões e o cultivo de crustáceos aproximadamente 69,3 bilhões (FAO, 2020). Contudo, a verticalização dos métodos de produção passa por determinados gargalos tecnológicos e o adensamento de cultivos visando aumento de produção desses organismos favorece o surto de doenças infecciosas que podem inviabilizar a produção.

As enfermidades virais em camarões têm promovido graves perdas econômicas para o setor. Dentre essas doenças, o vírus da Mionecrose Infecciosa (*Infectious Myonecrosis Virus – IMNV*), relatado pela primeira vez no litoral do nordeste brasileiro em 2002, pode causar até 70% de mortalidade em viveiros de cultivo de camarão *L. vannamei* (NUNES; CUNHA-MARTINS; GESTEIRA, 2004) e é caracterizado pela necrose muscular e opacidade da musculatura esquelética. Com aproximadamente 8,2 kb, o genoma do IMNV é composto por uma única molécula de dsRNA e o sequenciamento indica a presença da ORF1 que codifica a proteína do capsídeo e a ORF2 que codifica a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (TANG *et al.*, 2008).

Dentre as alternativas que procuram responder de forma prática ao controle e combate de enfermidades virais em camarões, o mecanismo de RNAi vem sendo abordado como uma ferramenta em que a entrega de dsRNAs homólogas a determinada sequência genômica do vírus podem nocautear a replicação do vírus na célula (ROBALINO *et al.*, 2005). Contudo, os custos envolvidos na produção de dsRNAs inviabilizam sua aplicação em escala comercial, atualmente.

Modelos bacterianos foram desenvolvidos como alternativa para a produção de dsRNAs *in vivo*. A cepa *E. coli* HT115-DE3 foi eficiente na produção de moléculas para o controle do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) (POSIRI; ONGVARRASOPONE; PANYIM, 2013; SARATHI *et al.*, 2008). Recentemente, Riet *et al.* (2021) aplicou a técnica de edição genômica de *B. subtilis*, utilizando o sistema CRISPR/Cas9 para a produção de moléculas de dsRNA com potencial aplicação no combate ao vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) e ao vírus da mionecrose infecciosa (IMNV), gerando uma cepa denominada

JJBs3. Esse capítulo tem como objetivo avaliar a proteção de dsRNA-VP28ORF1a produzida via *B. subtilis* JJBs3 em camarões *L. vannamei* desafiados experimentalmente com o IMNV durante 27 dias de ensaio.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Cepas bacterianas

A descrição de condições de cultivo, manipulação do DNA e produção de dsRNA da cepa *E. coli* HT115 – IGSF4D estão indicados conforme os itens 3.2.1 ao 3.2.3 do capítulo I deste mesmo documento.

A cepa JJBs3 desenvolvida e cedida pelo Instituto de Genética Industrial da Universidade de Stuttgart, Alemanha, para aplicação nesse trabalho é um *B. 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 a eritromicina e ao cloranfenicol (Riet et al. 2021).

4.2.2 Produção de dsRNA usando a JJBs3

A cepa JJBs3 foi inoculada em 30 ml meio mínimo de sais modificado (ANAGNOSTOPOULOS; SPIZIZEN, 1961) [10x ((10 g de (NH₄)₂ SO₄; 70 g de K₂HPO₄; 30 g de KH₂PO₄; 5 g de Tri Na-Citrato 2x H₂O; 1 g MgSO₄ 7xH₂O)] com glicose (20%), caseína (1%) e cloranfenicol (10mg/ml) em densidade ótica (O.D_{600nm}) de 0.1. O meio com o inóculo bacteriano foi mantido em agitação (250 rpm), *overnight* a 37°C. No dia seguinte, o meio de cultivo foi ajustado para a O. D._{600nm} de 1.6 e as células bacterianas foram precipitadas a 10.000 g por 5 minutos a 25°C. O pellet foi tratado com 1,5 ml de lisozima (20mg/ml) e incubado por 4 horas à 37°C. Logo em seguida foi adicionado 1.5 ml de SDS 0,1% e fervido por 2 minutos. Foi adicionado 1,5 ml de tampão ATE (30 mM; de acetato de sódio, 10 mM de Tris HCl PH 8,0; 5 mM de EDTA) e 8,0 µl de RNase A e foram incubadas a 37 °C por 40-60 minutos. O dsRNA foi extraído adicionando 3 ml de TRIzol reagente® e incubou-se por 5 minutos a temperatura

ambiente. Em seguida adicionou-se 2,0 ml de clorofórmio e as amostras foram incubadas por 3 minutos, e 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 g/10 min/ 4 °C. As amostras foram lavadas com 1 ml de etanol 75% e mescladas no vórtex e centrifugadas a 7.500 g/5 min/4 °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. As moléculas foram quantificadas com o espectrofotômetro mini volumétrico NanoDrop 2000 (Thermo Scientific TM).

4.2.3 Condições gerais de manutenção de camarões

300 Juvenis de *L. vannamei* ($5 \pm 0,3$ g) foram coletados no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – UFC (LANOA-UFC) e transportados para a unidade de bioensaios do Centro de Estudos e Diagnóstico de Doenças de Organismos Aquáticos, também da UFC (CEDECAM-UFC). Os parâmetros físico-químicos da água foram mantidos em salinidade 30, 28°C, pH 7,4, 5,5 mg.L⁻¹ de oxigênio dissolvido e fotoperíodo reproduzindo as condições da região nordeste (12h de luz e 12h de escuro). Foi utilizada uma ração comercial contendo 35% de proteína bruta (P.B) e os animais foram alimentados 2 vezes ao dia numa taxa de 3,5% de peso corporal.dia⁻¹ e 50% de renovação de água diariamente. Os camarões foram aclimatados durante 7 dias e estocados em 20 aquários com volume útil de 100 litros numa biomassa de 75 g por aquário.

4.2.4 Tratamento dos camarões com dsRNA produzidas in vivo

Para o experimento de desafio, os camarões foram divididos em cinco grupos (Tabela 2), com 60 camarões cada, e diagnosticados por RT-qPCR para a determinação da carga viral inicial do IMNV de cada camarão.

Tabela 2. Descrição dos grupos e os respectivos tratamentos utilizados.

Grupo	Tratamento
-------	------------

I	Injeção intramuscular de solução salina e extrato de tecido livre de patógenos específicos (SPF) – Controle negativo
II	Injeção intramuscular de solução salina e inóculo IMNV – Controle positivo
III	Injeção intramuscular de dsRNA-IGSF4D (5µg/g de peso corporal) produzidas com a <i>E.coli</i> HT115 e inóculo IMNV
IV	Injeção intramuscular de dsRNA-VP28ORF1a (5µg/g de peso corporal) produzida com o <i>B. subtilis</i> JJBs3 dois dias antes do desafio, e inóculo IMNV
V	Injeção intramuscular de dsRNA-VP28ORF1a (5µg/g de peso corporal) produzida com o <i>B. subtilis</i> JJBs3 dez dias antes do desafio, e inóculo IMNV

Os grupos II, III e IV foram injetados com um volume de 100 µl de inóculo viral contendo aproximadamente $1,02 \times 10^5$ cópias do IMNV dois dias após a injeção das moléculas de dsRNA ou solução salina. O grupo V apenas recebeu a injeção do inóculo viral 10 dias após a injeção da dsRNA-VP28ORF1a.

Ao longo do experimento, amostras de hemolinfa (~100 µl) foram coletadas individualmente de 9 camarões/grupo, randomicamente selecionados dois dias antes da infecção e nos dias 0, 5, 8, 13 e 24 após a injeção do inóculo viral. Após a coleta da hemolinfa, os camarões foram marcados e devolvidos aos seus respectivos aquários e não participaram de coletas subsequentes. Os camarões foram observados duas vezes ao dia para o registro da mortalidade e aparecimento de sinais clínicos macroscópicos característicos da mionecrose infecciosa.

4.2.5 Extração de RNA e Síntese de cDNA

Os hemócitos de cada camarão coletado foram isolados do plasma por centrifugação a 1.200 g/10 min/4°C e o RNA total extraído com o reagente TRIzol (Invitrogen®) e em seguida tratado com DNase I *Amplification Grade* (Invitrogen®), de acordo com os protocolos do fabricante. A concentração do ácido nucléico foi determinada por quantificação em espectrofotômetro mini volumétrico NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™). O cDNA foi sintetizado com o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies®) em um volume de 20 µl de reação final contendo 2 µl de RT Buffer (10×), 0,8 µl de dNTPs mix (25×), 2 µl de RT random primers (10×), 1 µl de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U) e 1 µg 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 PCR em Tempo Real.

4.2.6 Quantificação Absoluta do IMNV por RT-qPCR

Para quantificação do número de cópias do IMNV ao longo do ensaio de desafio experimental foram utilizados os primers e sonda de Taqman descritos por Andrade et al. (2007). As reações de RT-qPCR foram realizadas em 10 µl de volume final contendo 5 µl de TaqMan Master Mix (Invitrogen®), 0,3 µl (10 µM) de cada primer IMNV412F (5'-GGACCTATC ATACATAGCGTTTGCA-3') e IMNV545R (5'-AACCCATATCTATTGTCTCGCTGGAT-3'), 0,15 µl (10µM) da sonda de hidrólise (IMNVp1) (5'-6FAM CCACCTTTACTTT CAATACTACATCATCCCCGG TAMRA-3'), 0,2 µl (50×), 1 µl (25-50 ng) de cDNA e 3,05 µl de água ultrapura (Invitrogen®). Um controle negativo contendo todos os reagentes, exceto o cDNA alvo e uma série de diluições do controle positivo pTOPO-IMNV.1 equivalente a 10⁹, 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³ e 10² cópias do IMNV foram adicionados a cada placa de RT-qPCR. O controle positivo pTOPO-IMNV.1 consistiu em uma construção genética resultante da ligação de um amplicon de 593 pb do IMNV (Nº de acesso no GenBank: AY570982, nt 197-789) ao pCR® 2.1-TOPO vector (Invitrogen®).

Para a quantificação do número de cópias do IMNV foi empregada a plataforma 7500 Real-time PCR system® (Applied Biosystems, Foster City, CA). As condições de ciclagem foram as seguintes: incubação a 50°C por 2 min, seguido da ativação da Platinum® Taq DNA polimerase a 95°C por 2 min, e 40 ciclos de 15 s a 95°C e 30 s 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 ABI 7500 Real Time PCR systems (Applied Biosystems®). Todas as amostras foram testadas em duplicata e somente consideradas positivas quando da amplificação válida de ambas as réplicas.

4.2.7 Análises Histopatológicas

Para a análise histopatológica, foram amostrados 5 camarões/grupo no 8 dia pós infecção. Os camarões amostrados de cada grupo foram injetados com solução AFA de Davidson (11,5% de ácido acético, 22% de formalina e 33% de etanol) e imersos na mesma solução por 48 horas e, a seguir, mantidos em álcool 70%. Cortes histológicos transversais e longitudinais de 5 µm foram obtidos e submetidos a coloração com hematoxilina–eosina (BELL & LIGHTNER, 1988). Alterações histopatológicas característica da IMNV foram investigadas

conforme descrito por Lightner (2011).

4.2.8 Análises estatísticas

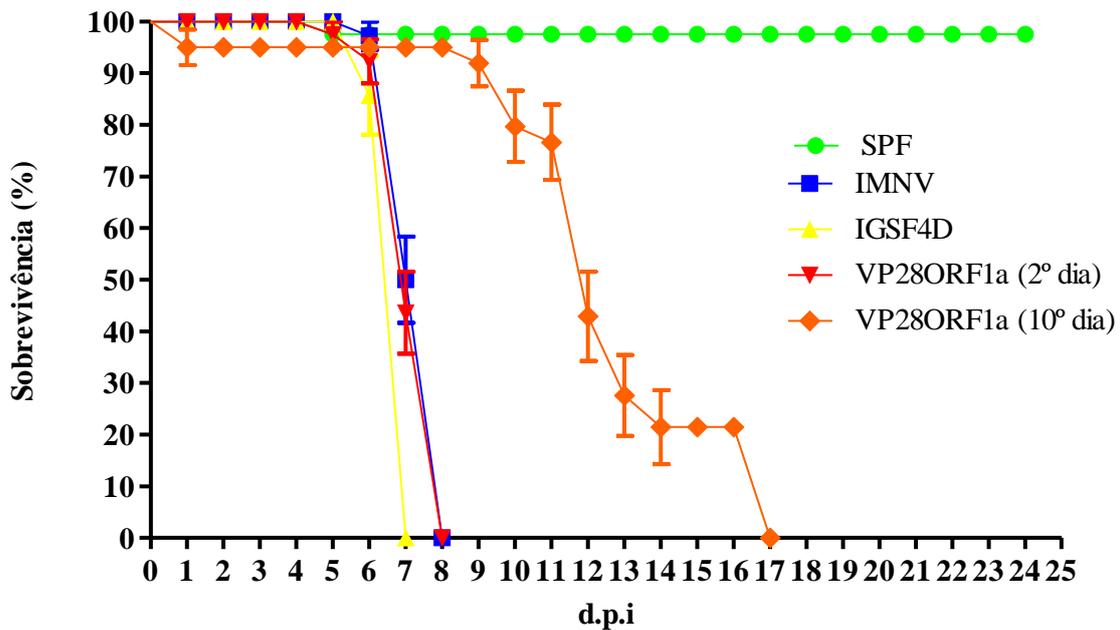
Teste de Log-Rank baseado na estimativa da curva de sobrevivência Kaplan-Meier foi utilizado para verificar diferenças nos níveis de sobrevivência entre os grupos de camarões. Para a análise das diferenças do número de cópias do IMNV e da expressão do mRNA dos genes relacionados ao RNAi foi empregada uma análise de variância de uma via (*One-way Analysis of Variance*, ANOVA) com pós-teste de Dunnett para múltiplas comparações com as amostras coletadas dois dias antes da infecção. Os testes estatísticos foram realizados com o software *GraphPad Prism 3.00* para Windows (GraphPad Software, USA).

4.3. RESULTADOS

4.3.1 Taxas de Sobrevivências dos grupos de camarões desafiados com o IMNV

Os resultados de sobrevivência dos camarões infectados com o IMNV estão demonstrados na figura 6. Não houve mortalidades no grupo de recebeu o extrato de tecido livre de patógenos específicos (SPF). Nos tratamentos que receberam a infecção com IMNV 2 dias depois da injeção de solução salina, dsRNA homólogas (VP28ORF1a) e não homólogas (IGSF4D) ao vírus não foram verificadas diferenças significativas entre as curvas de mortalidade ($P > 0.05$), observando mortalidades acumulada de 100% no 8º dia pós infecção. Não houve sobreviventes no tratamento infectado 10 dias após a injeção da dsRNA VP28ORF1a produzida via *B. subtilis*-JJBs3. No entanto, evidenciou-se uma taxa de mortalidade diária mais lenta nesse grupo quando comparado as curvas de sobrevivência que receberam a primeira infecção, observando mortalidade acumulada de 100% no 17º dia pós infecção e diferença estatística aos grupos (Figura 6). Quando comparada as curvas dos grupos que receberam a dsRNA-VP28ORF1a a partir do dia da infecção há diferença significativa ($P < 0,001$).

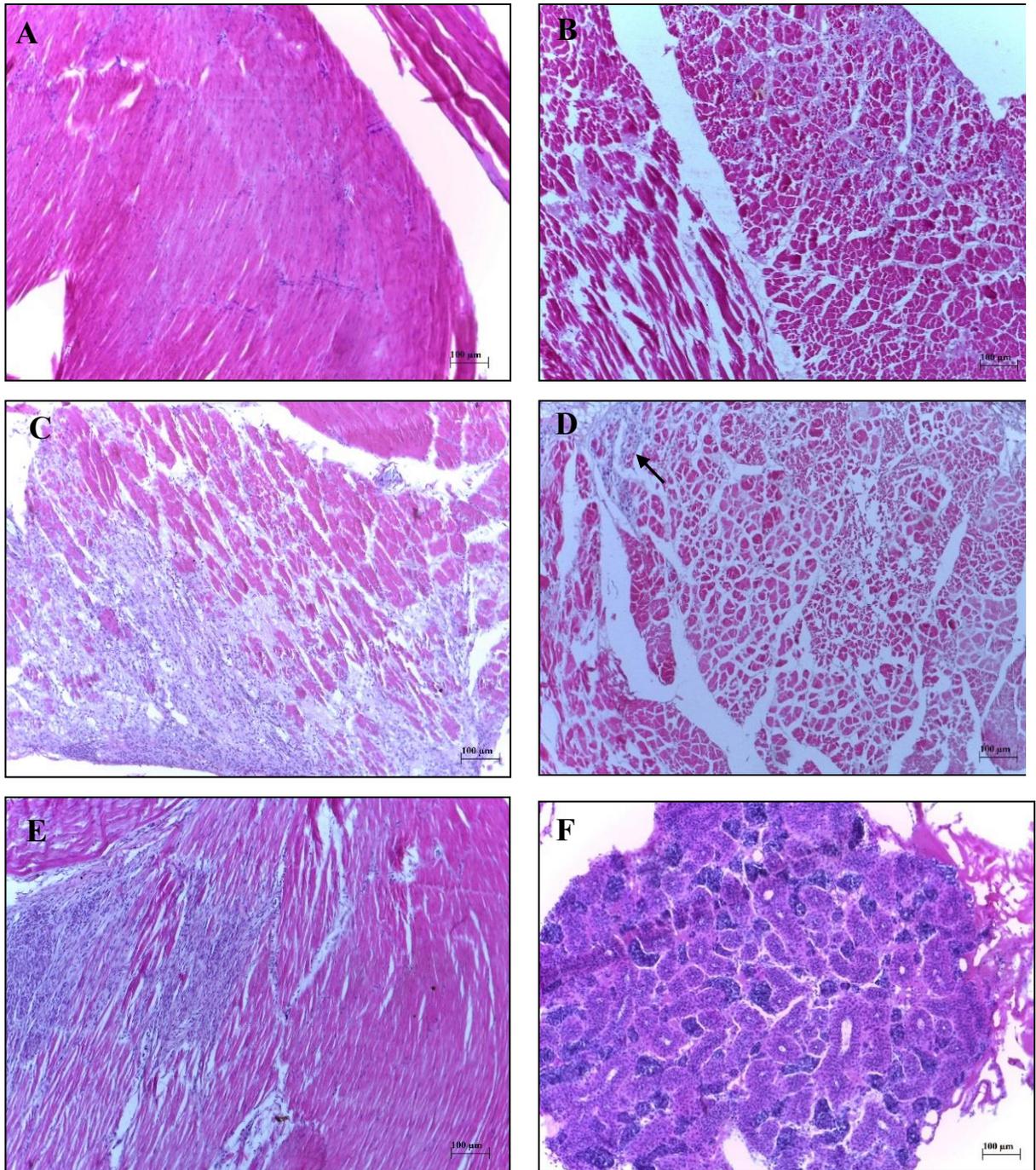
Figura 6 - Percentual de sobrevivência dos grupos de camarões *L. vannamei* injetados intramuscularmente com extrato de tecido livre de patógenos específicos e moléculas de dsRNA-VP28ORF1a via *B. subtilis* (JJBs3) ao longo de 17 dias após a injeção de $1,02 \times 10^5$ cópias do IMNV.



4.3.2 Histopatologia

Nenhuma alteração histopatológica foi encontrada nos camarões que receberam o extrato de tecido livre de patógenos específicos (SPF) (Figura 7A). Infiltrações hemocíticas foram detectadas no músculo dos camarões que receberam as dsRNA-VP28ORF1a dois dias (VP28ORF1a [2 dias] - Figura 7B) e dez dias (VP28ORF1a [10 dias] - Figura 7D) após a infecção. Os grupos tratados com as dsRNA-IGSF4D (Figura 7C) e os injetados com solução salina (Figura 7D) na coleta do 8º dpi. Também foram observadas lesões típicas do IMNV nos camarões que foram injetados com dsRNA-VP28ORF1a (10 dias). Necroses de coagulação, necrose de liquefação, e hipertrofia do órgão linfóide com a presença de esferóides foram observadas nos tratamentos que receberam a infecção. (Figura 7 C, D, E e F).

Figura 7 – Microscopia ótica de cortes histológicos corados com H&E referentes a camarões injetados com extrato de tecido livre de patógenos específicos e solução salina (SPF) (A); Inóculo IMNV e solução salina (B); Inóculo IMNV e dsRNA IGSF4D via *E. coli* HT115 (C), Inóculo IMNV e dsRNA-VP28ORF1a via *B. subtilis* (D, E e F) A) Tecido muscular sem lesões características do IMNV; B e D) Infiltração hemocítica e Necrose de coagulação; C e E) Necrose de coagulação e liquefação acompanhada de infiltração hemocítica; D) infiltração hemocítica focal no tecido muscular; C e E) Necrose muscular de liquefação; F) Esferóides do órgão linfóide. Barra de escala: 100 µm.

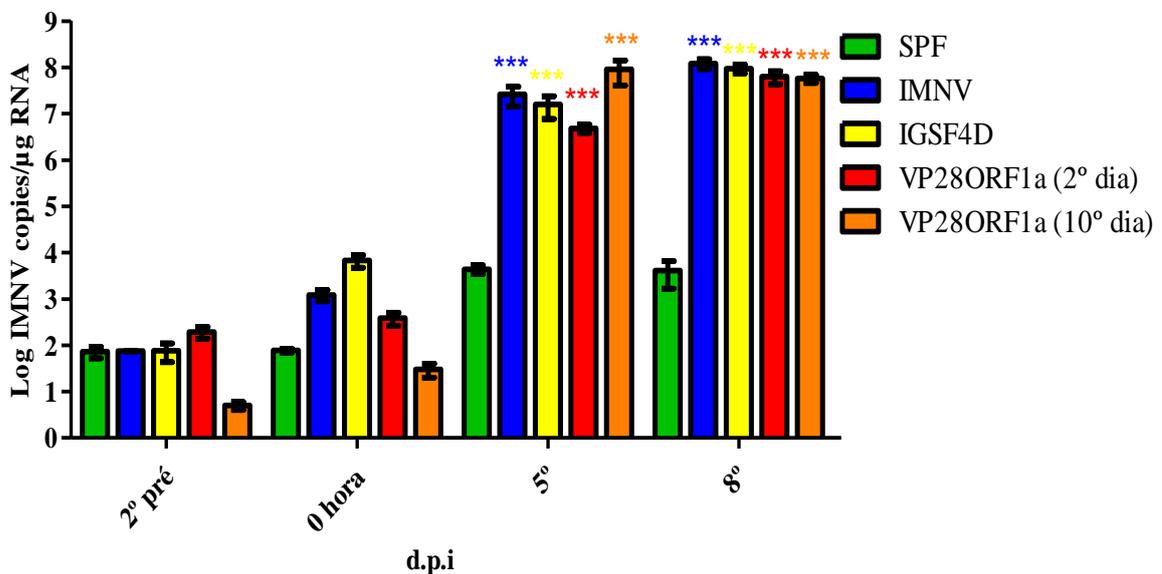


4.3.3 Quantificação dos números de cópias do vírus IMN por RT-qPCR

Os tratamentos e grupos controle não apresentaram diferença significativa entre si

em relação aos números de cópias do IMNV ($P > 0,05$) (Figura 8), observando uma média de $4,27 \times 10^3$ cópias do IMNV μg de RNA⁻¹ antes da infecção. No 5º dia pós infecção, todos os grupos tratados com dsRNA relacionada ou não relacionada ao vírus teve um aumento no número de cópias do IMNV, permanecendo elevada no 8º dia com valores médios de $7,25 \times 10^7$ cópias do IMNV μg de RNA⁻¹. O grupo SPF (controle negativo) não manifestou aumento no número de cópias virais ao longo do experimento, diferindo significativamente dos tratamentos ($P < 0,0001$).

Figura 8 - Número médio de cópias do IMNV em hemócitos de camarões *L. vannamei* injetados intramuscularmente com extrato de tecido livre de patógenos específicos (SPF) e solução salina; Inóculo IMNV e solução salina (IMNV); Inóculo IMNV e dsRNA IGSF4D via *E. coli* HT115 (IGSF4D); Inóculo IMNV e dsRNA-VP28ORF1a via *B. subtilis* (VP28ORF1a [2 dias]) e Inóculo IMNV e dsRNA-VP28ORF1a via *B. subtilis* 10 dias após injeção das moléculas (VP28ORF1a [10 dias]) acompanhados por 24 dias. As barras verticais representam a média \pm SEM (n = 9). As diferenças estatísticas em relação ao “2º pré” de cada grupo estão representadas com três asteriscos (***) ($P < 0,0001$).

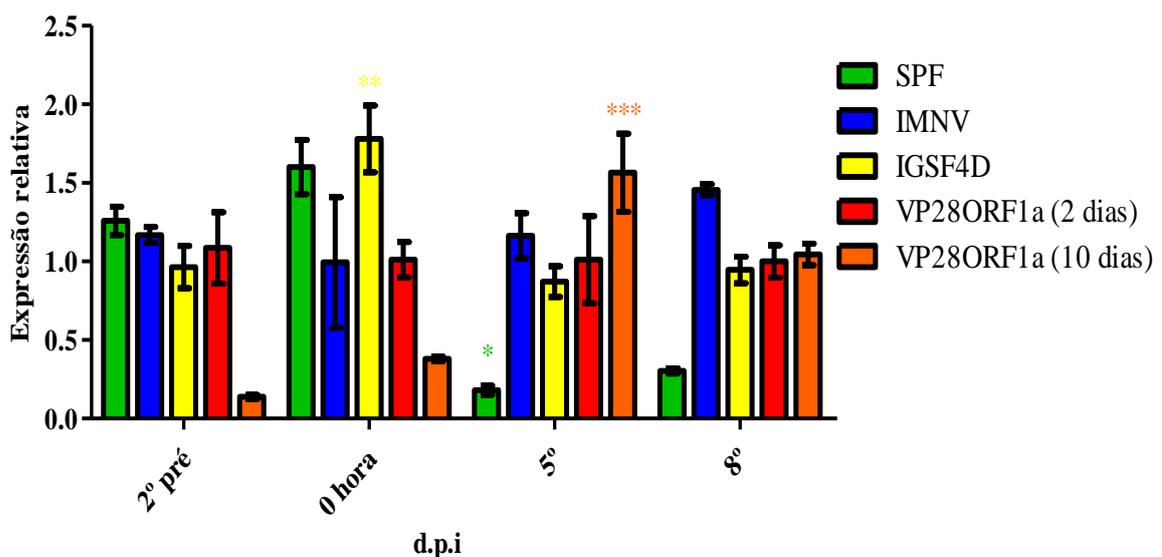


4.3.4. Análise da Expressão de Genes relacionados ao mecanismo de RNAi

4.3.4.1 Gene Sid-1

Dentre os hemócitos dos grupos de camarões injetados com as moléculas de dsRNAs e solução salina, apenas o grupo que recebeu a dsRNA IGSF4D via *E. coli*-HT115 apresentou níveis de expressão do gene *Sid-1* aumentados 1,6 vezes ($P < 0,01$) quando comparados os grupos com o dia da injeção das moléculas e solução salina e 2 dias depois correspondente ao dia da infecção com o IMNV (Figura 9). Nenhuma alteração nos níveis de transcrição do gene *Sid-1* foi observada no grupo que recebeu dsRNA VP28ORF1a via *B. subtilis* 2 dias antes da injeção do vírus. Isso também foi verificado no grupo que recebeu a solução salina e a injeção do vírus IMNV. No entanto, no grupo que foi injetado as dsRNA VP28ORF1a via *B. subtilis*-Bs3 10 dias antes da infecção foi verificado que houve uma regulação de 1,2 vezes para baixo nos níveis de expressão após 7 dias da injeção das moléculas ($P < 0,01$) e regulação de 1,6 vezes para cima depois de 5 dias após a injeção do vírus ($P < 0,0001$).

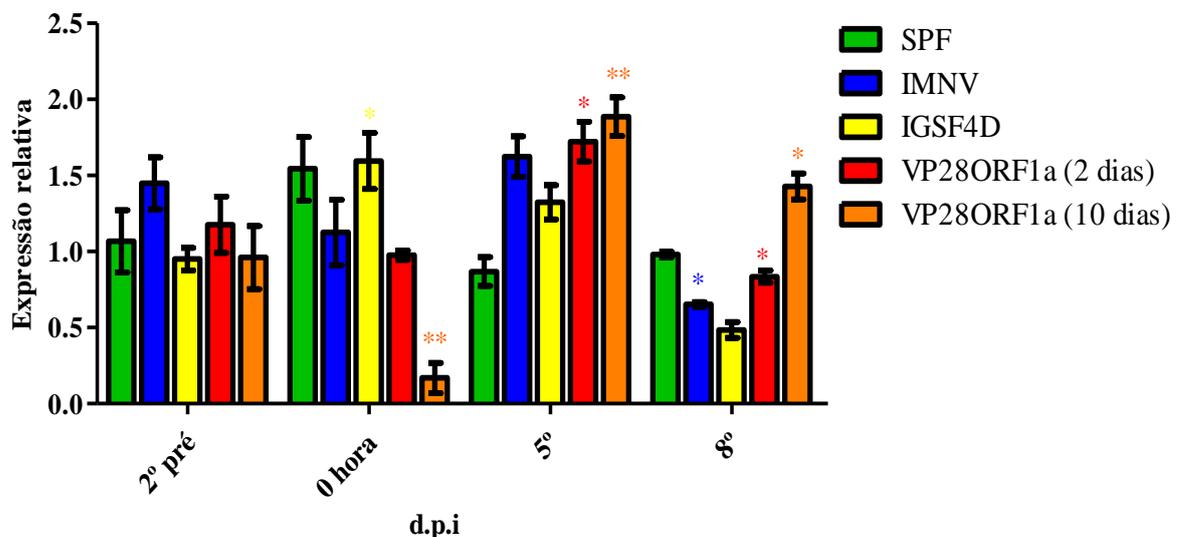
Figura 9 – Dinâmica de expressão do *Sid-1* em hemócitos de camarão *L. vannamei* injetados intramuscularmente com: Solução salina e extrato de tecido livre de patógenos específicos (SPF); Solução salina e inóculo IMNV; dsRNA-IGSF4D via *E. coli*-HT115 e inóculo IMNV; dsRNA-VP28ORF1a via *B. subtilis*-Bs3 e inóculo IMNV. Os dados estão plotados em valores de média \pm SEM (n=9 camarões em cada ponto). O nível de significância estatística em relação ao “2º dia antes da infecção” de cada grupo é indicado por um (*) ($P < 0,01$), dois (**) ($P < 0,001$) ou três (***) ($P < 0,0001$) asteriscos.



4.3.4.2 Gene Dicer-2

Apenas o grupo que recebeu a dsRNA-IGSF4D via *E. coli*-HT115 apresentou uma diferença significativa no nível de transcritos em 1,6 vezes da *Dicer-2* nos hemócitos dos camarões coletados após 2 dias da injeção ($P < 0,01$) (Figura 10). O grupo que recebeu a dsRNA VP28ORF1a 2 dias antes da infecção apresentou uma indução dos transcritos em 51% 5 dias pós infecção ($P < 0,01$). Outro grupo que recebeu a mesma dsRNA homologa ao IMNV e ainda não tinha recebido a injeção do vírus teve uma regulação no nível de transcritos para baixo no 7º e 10º dias pós-injeção da dsRNA ($P < 0,001$) em cerca de 74% e 83%, respectivamente. Ao longo de todo o experimento, os grupos que receberam solução salina (SPF e IMNV) e dsRNA-IGSF4D via *E. coli*-HT115 não foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão da *Dicer-2*. Com 15 dias pós-injeção da dsRNA-VP28ORF1a e 5 dias pós-injeção do IMNV verificou-se um aumento nos níveis dos transcritos ($P < 0,001$).

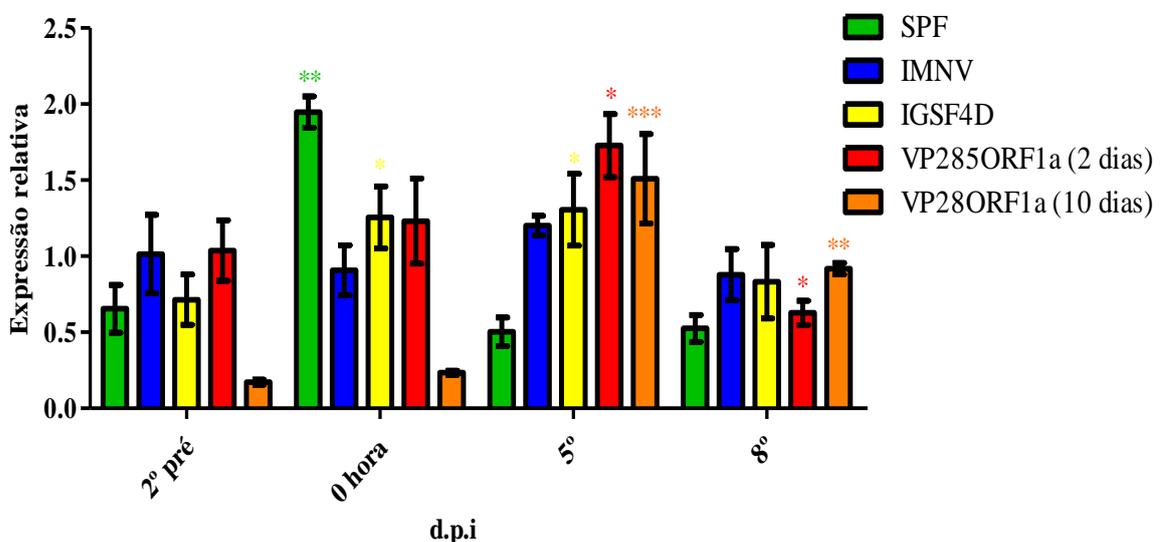
Figura 10 – Dinâmica de expressão do *Dicer-2* em hemócitos de camarão *L. vannamei* injetados intramuscularmente com: Solução salina e extrato de tecido livre de patógenos específicos (SPF); Solução salina e inóculo IMNV; dsRNA-IGSF4D via *E. coli*-HT115 e inóculo IMNV; dsRNA-VP28ORF1a via *B. subtilis*-Bs3 e inóculo IMNV. Os dados estão plotados em valores de média \pm SEM ($n=9$ camarões em cada ponto). O nível de significância estatística em relação ao “2º dia antes da infecção” de cada grupo é indicado por um (*) ($P < 0,01$) ou dois (**) ($P < 0,001$) asteriscos.



4.3.4.3 Gene Argonauta-2

Nenhuma diferença significativa foi detectada nos níveis de transcritos do *Argonauta-2* nos hemócitos dos camarões logo após 2 dias da injeção das moléculas de dsRNA-IGSF4D, dsRNA-VP28ORF1a ou solução salina (Figura 11). Depois de 7 dias, os tratamentos que receberam as dsRNA-VP28ORF1a mostraram níveis de expressões distintos, observando-se uma indução de transcritos em 59% no grupo com 5 dias pós infecção ($P < 0,001$) e uma regulação para baixo em 26% no grupo que ainda não havia recebido a dose viral ($P < 0,001$). A mesma diminuição no nível de transcritos foi observada no grupo que recebeu a injeção de solução salina e inóculo livre de patógenos específicos ($P < 0,001$). No grupo de camarões com 15 dias da injeção de dsRNA-VP28ORF1a e 5 dias de injeção do inóculo IMNV foi observado uma forte indução nos níveis de expressão em 51%, observando um padrão bastante similar com o grupo que recebeu a mesma construção genética considerando o mesmo tempo de exposição ao vírus ($P < 0,0001$). Ainda o elevado nível de expressão foi

Figura 11 – Dinâmica de expressão do *Argonauta-2* em hemócitos de camarão *L. vannamei* injetados intramuscularmente com: Solução salina e extrato de tecido livre de patógenos específicos (SPF); Solução salina e inóculo IMNV; dsRNA-IGSF4D via *E. coli*-HT115 e inóculo IMNV; dsRNA-VP28ORF1a via *B. subtilis*-Bs3 e inóculo IMNV. Os dados estão plotados em valores de média \pm SEM ($n=9$ camarões em cada ponto). O nível de significância estatística em relação ao “2º dia antes da infecção” de cada grupo é indicado por dois (**) ($P < 0,001$) ou três (***) ($P < 0,0001$) asteriscos.



4.4. DISCUSSÃO

A molécula de dsRNA-VP28ORF1a produzidas pelo *B. subtilis* JJBs3 não foram efetivas no controle da replicação viral quando administrada dois dias antes da infecção (VP28ORF1a [2dias]), resultando em 100% de mortalidades nos dois grupos de camarões que receberam as moléculas relacionadas ao vírus ao longo de 24 dias de desafio experimental. No entanto, o grupo que recebeu apenas a injeção do vírus IMN com 10 dias após a injeção das dsRNAs (VP28ORF1a [10 dias]) apresentou um padrão de mortalidade mais lento em relação ao grupo que recebeu o inoculo viral 2 dias antes da infecção. A dsRNA VP28ORF1a foi aplicada em dois espaços de tempo: 2 dias antes da infecção, método desenvolvido por Feijó (2015) e 10 dias antes da infecção, método desenvolvido por Loy (2012). Com a finalidade de avaliar uma proteção em um prazo mais longo, observou-se um padrão de mortalidade mais lenta no grupo que recebeu as duplas fitas 10 dias antes da infecção. Esta observação sugere que i) de fato, foi necessário um tempo maior de incubação de dsRNA para obter melhores resultados no controle na evolução da doença; ii) Sendo camarões diagnosticados como portadores assintomáticos do IMNV, a injeção das moléculas 10 dias antes da infecção ofereceu uma certa resistência ao desafio experimental subsequente. Um período mais longo de preparação dos camarões com uma produção e oferta constante dessas dsRNAs obtidas por probióticos geneticamente editados poderia colaborar para uma melhor proteção no longo prazo contra infecções com IMNV.

Resultados com 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, a produção de dsRNA em modelos *in vivo* para a produção dessas moléculas no combate ao IMNV ainda não foi relatado. O uso da cepa JJBs3 já foi relatada como ativadora dos genes ligados a mecanismo de RNA de interferência em camarões. Tanto as dsRNAs extraídas desta cepa e injetadas quanto a cepa inoculada na ração diariamente foi capaz de aumentar os níveis relativos de transcritos dos genes *sid1* e *argonauta2* (RIET *et al.*, 2021). Nossos achados em relação ao nível de transcritos dos genes ligados ao mecanismo de RNA de interferência foram diferentes, uma vez que percebemos que a modulação da quantidade de RNA mensageiro desses genes foi fortemente associada com a presença do IMNV após a infecção. Isso pode ser explicado pelo fato que o próprio IMNV apresenta uma constituição genética de RNA de dupla fita. Portanto, a presença das dsRNAs injetadas no músculo nos camarões mais a replicação do vírus detectadas nos hemócitos parece ter aumentado o nível de

transcritos dos genes *sid1*, *argonauta2* e *dicer2*.

Embora não havendo proteção frente ao IMNV, a injeção de dsRNA-VP28PORF1a via *B. subtilis* modulou a expressão dos genes *Dicer-2* e *Argonauta-2* no quinto dia pós infecção dos grupos que receberam a dsRNA relacionada. Os mesmos padrões de transcrição foram observados por Feijó et al. (2015). A presença de dsRNA viral oriundo da infecção parece ter impactado diretamente na modulação desses genes. Isso não foi observado no grupo que recebeu o extrato de tecido livre de patógenos. Em conclusão, a produção e injeção das moléculas de dsRNA por meio de bactérias geneticamente editadas foi capaz de conter a evolução da mionecrose infecciosa em camarões infectados. No entanto, efeito de dose-resposta, tempo de exposição e dose de reforço de dsRNAs apresentam variáveis importantes para otimização da técnica empregada. Métodos de obtenção dessas moléculas em cepas de *B. subtilis* devem ser mais investigados.

Capítulo III – Utilização de bactéria probiótica expressando dsRNA para a proteção do camarão *Litopenaeus vannamei* contra o vírus da mionecrose infecciosa

5.1 INTRODUÇÃO

O uso de probióticos na aquicultura traz de uma série de benefícios que melhoram a rentabilidade da atividade. A utilização desses microrganismos pode aumentar a digestibilidade de ingredientes e a resistência a patógenos (MERRIFIELD *et al.*, 2010) como também a biorremediação da água do cultivo (OLMOS *et al.*, 2019). Dentro do grupo dos *Bacillus*, a espécie *Bacillus subtilis* é uma das bactérias mais investigadas para uso probiótico na aquicultura devido a sua versatilidade no uso de nutrientes para seu crescimento, alta secreção de compostos enzimáticos e antimicrobianos, formação de esporos, além de ser reconhecida como segura (*Generally Recognized as Safe - GRAS*) pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration – FDA*) (BALCÁZAR; ROJAS-LUNA; CUNNINGHAM, 2007; OLMOS; PNIAGUA-MICHEL, 2014).

O descobrimento do mecanismo de RNA de interferência para o tratamento de enfermidades virais em camarões possibilitou o surgimento de novas aplicações no combate a essas doenças. A indução desse sistema imune antiviral se dá por meio de moléculas de dsRNA homólogas a fragmentos do genoma viral que são processadas e promove o silenciamento da replicação do vírus (RESHI *et al.*, 2014; ROBALINO *et al.*, 2005). O uso de moléculas de dsRNA sintéticas relacionadas à Proteína Viral 28 (*Viral Protein 28 – VP28*) do WSSV (KUMAR *et al.*, 2015) e ao Quadro de Leitura Aberto 1a (*Open Reading Frame 1a – ORF1a*) do IMNV (FEIJÓ; *et al.*, 2015) foram empregados com sucesso quando foram injetadas na musculatura de camarões que posteriormente iriam ser desafiados com os respectivos vírus.

Entretanto, os métodos de entrega de dsRNAs, especialmente por via oral, vêm sendo avaliados para a aplicação da tecnologia do RNAi em escalas comerciais com custo razoável. O uso de bactérias expressando dsRNA é uma alternativa para a produção dessas moléculas. A *Escherichia coli* HT115 foi eficiente na obtenção de dsRNA contra o WSSV (POSIRI; ONGVARRASOPONE; PANYIM, 2013; SARATHI *et al.*, 2008). Até o momento, dsRNA produzidas por bactérias contra o IMNV ainda não foram usadas. Recentemente, Riet (2021) aplicou a técnica edição genômica de cepas de *B. subtilis* utilizando o sistema CRISPR/Cas9 para a produção de dsRNA. A cepa JJBs3, produzindo moléculas correspondente ao gene VP28 do Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) e a ORF1a do Vírus da

Mionecrose Infecciosa (IMNV), foi capaz de aumentar a sobrevivência em camarões desafiados contra o WSSV. Esse capítulo teve como objetivo avaliar a proteção da cepa de *B. subtilis* JJBs3 expressando dsRNA-VP28ORF1a em camarões *L. vannamei* desafiados experimentalmente com o IMNV a partir de análises de carga viral e durante 32 dias de observação.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 *Crescimento bacteriano e incorporação na ração*

As cepas JJBs3 e JJBs6 desenvolvidas e cedidas pelo Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Rio Grande (FURG/ICB) para aplicação nesse trabalho são *B. subtilis* com deleção do gene *rnc* envolvido na produção da enzima ribonuclease tipo III que atua na degradação de dsRNA. A cepa JJBs3 possui a integração de fragmento do gene da VP28 do vírus da síndrome da mancha branca (*White Spot Syndrome Virus – WSSV*) e da *ORF1a* do vírus da mionecrose infecciosa (*Infectious Myonecrosis Virus – IMNV*). A cepa JJBs6 possui a integração de fragmento do gene da imunoglobulina do peixe *Danio rerio - IGSF4D*. Ambas as sequências são flanqueadas por dois promotores bidirecionais P_{ybl} ativados na fase estacionária de crescimento bacteriano e possuem resistência a eritromicina e ao cloranfenicol.

Diariamente, as cepas eram inoculadas em 30 ml meio mínimo de sais modificado (ANAGNOSTOPOULOS; SPIZIZEN, 1961) com densidade ótica (O.D_{600nm}) de 0.1 em agitação (250 rpm) com cloranfenicol (10mg/ml) *overnight* à 37°C. No dia seguinte, o meio de cultivo foi ajustado para a O.D_{600nm} de 1.6 e as células bacterianas foram precipitadas a 5.000 g por 10 minutos a 4°C. Os pellets foram lavados duas vezes com solução de NaCl 0,9% e precipitados a 5.000 g por 5 minutos a 4°C para retirada de resquícios de meio de cultivo e antibiótico. As células bacterianas foram ressuspensas em solução de NaCl 0,9% e incorporadas em ração comercial com 35% de proteína bruta (10:1 p/v) e secadas por 30 minutos a 60°C. Uma ração incorporada apenas com solução de NaCl 0,9% na mesma proporção foi adotada para alimentação dos grupos controles.

5.2.2 *Tratamento dos camarões com as cepas JJBs3 e JJBs6*

Duzentos camarões juvenis de *L. vannamei* com 6,2 g ($\pm 1,2$) foram coletados em um viveiro de cultivo de baixa salinidade (0,5%) localizado no município de Caucaia (Ceará).

Os camarões foram transportados para o Centro de Diagnóstico de Enfermidade de Organismos Aquáticos (CEDECAM), onde foram aclimatados durante 5 dias em 2 tanques de 500 litros com renovação parcial de água (50% ao dia). Os parâmetros físico-químicos da água foram mantidos em salinidade de 5, 29°C, pH 7,4, OD 5,5 mg/L e fotoperíodo próximo as condições naturais da região nordeste (12 horas de luz e 12 horas de escuro). Após a aclimação, 20 camarões foram previamente diagnosticados por RTqPCR (TaqMan) como portadores assintomáticos do IMNV. Dos camarões amostrados, não houve reação positiva para o WSSV e IHHNV. Os animais foram pesados e distribuídos individualmente em tanques de 5,5 litros com filtros internos com aeração constante, renovação de 50% a cada 2 dias e alimentados com ração comercial com 35% de PB duas vezes ao dia na quantidade de 5% da biomassa.

Para o experimento de desafio, os camarões foram distribuídos em 4 grupos (24 camarões/grupo) assim descritos: **SPF**) Ração comercial com solução de NaCl 0,9% (10:1 p/v) e injeção intramuscular de extrato de tecido livre de patógenos específicos; **IMNV**) Ração comercial com solução de NaCl 0,9% (10:1 p/v) e injeção intramuscular de inóculo IMNV; **Bs6**) Ração comercial com a cepa JJBs6 e injeção intramuscular de inóculo IMNV **Bs3**) Ração comercial com a cepa JJBs3 e injeção intramuscular de inóculo IMNV. Após 15 dias de tratamento com as rações, os grupos IMMV, Bs6 e Bs3 receberam a injeção de 100 µl de inóculo viral contendo aproximadamente $1,02 \times 10^3$ cópias do IMNV e o grupo SPF recebeu a injeção de 100 µl de extrato de tecido livre de patógenos. Os cultivos e as incorporações de bactérias ou de solução salina na ração foi realizado diariamente e durante todo o período experimental.

Amostra de hemolinfa (150 µl) foram coletadas individualmente de 9 camarões/grupo dois dias antes da administração das rações incorporadas e 15 dias após a infecção. Para análises histopatológicas, foram coletados quatro camarões de cada grupo no 15º dia pós infecção. Os camarões foram observados duas vezes ao dia para o registro da mortalidade e aparecimento de sinais clínicos macroscópicos característicos do IMNV. Durante os 32 dias de experimento, os camarões foram alimentados individualmente duas vezes ao dia com as rações incorporadas de bactérias ou solução salinas contendo 35% de proteína bruta em uma quantidade equivalente a 3,5% do peso corporal.

5.2.3 *Extração de RNA e Síntese de cDNA*

Os hemócitos de cada camarão coletado foram isolados do plasma por centrifugação a 1.200 g/10 min/4°C e o RNA total extraído com o reagente TRIzol

(Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total extraído foi tratado com DNase I por incubação a 37°C por 15 min e sua concentração foi determinada por quantificação em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™). O cDNA foi sintetizado com o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies®) em um volume de 20 µl de reação final contendo 2 µl de RT Buffer (10×), 0,8 µl de dNTPs mix (25×), 2 µl de RT random primers (10×), 1 µl de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U) e 1 µg 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 PCR em Tempo Real.

5.2.4 Quantificação Absoluta do IMNV por RT-qPCR

Para quantificação do número de cópias do IMNV ao longo do ensaio de desafio experimental foram utilizados os primers e sonda de Taqman descritos por Andrade (2007). As reações de RT-qPCR foram realizadas em 10 µl de volume final contendo 5 µl de TaqMan Master Mix (Invitrogen®), 0,3 µl (10 µM) de cada primer IMNV412F (5'-GGACCTATCATAAC ATAGCGTTTGCA-3') e IMNV545R (5'-AACCCATATCTATTGTCGCTGGAT-3'), 0,15 µl (10µM) da sonda de hidrólise (IMNVp1) (5'-6FAM CCACCTTTACTTTCAATACT ACATCATCCCCGG TAMRA-3'), 0,2 µl (50×), 1 µl (25-50 ng) de cDNA e 3,05 µl de água ultrapura (Invitrogen®). Um controle negativo contendo todos os reagentes, exceto o cDNA alvo e uma série de diluições do controle positivo pTOPO-IMNV.1 equivalente a 10⁹, 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³ e 10² cópias do IMNV foram adicionados a cada placa de RT-qPCR. O controle positivo pTOPO-IMNV.1 consistiu em uma construção genética resultante da ligação de um amplicon de 593 pb do IMNV (Nº de acesso no GenBank: AY570982, nt 197-789) ao pCR® 2.1-TOPO vector (Invitrogen®).

Para a quantificação do número de cópias do IMNV foi empregada a plataforma 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems®). As condições de ciclagem foram as seguintes: incubação a 50°C por 2 min, seguido da ativação da Platinum®Taq DNA polimerase a 95°C por 2 min, e 40 ciclos de 15 s a 95°C e 30 s 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 a plataforma ABI 7500 Real Time PCR systems (Applied Biosystems®). Todas as amostras foram testadas em duplicata e somente consideradas positivas quando da amplificação válida de ambas as réplicas.

5.2.5 Análises Histopatológicas

Os camarões amostrados de cada grupo foram injetados com solução AFA de Davidson AFA (11,5% de ácido acético, 22% de formalina e 33% de etanol) e imersos na mesma solução por 48 horas e mantidos em álcool 70%. Cortes histológicos transversais e longitudinais de 5 µm foram obtidos e submetidos a coloração com hematoxilina–eosina (BELL & LIGHTNER, 1988). Alterações histopatológicas características do IMNV foram investigadas conforme descrito por Lightner (2011).

5.2.6 Análises estatísticas

Teste de Log-Rank baseado na estimativa da curva de sobrevivência Kaplan-Meier foi utilizado para verificar diferenças nos níveis de sobrevivência entre os grupos de camarões. Para a análise das diferenças do número de cópias do IMNV foi empregada uma análise de variância de uma via (One-way Analysis of Variance, ANOVA). Os testes estatísticos foram realizados com o software *GraphPad Prism 3.00* para Windows (GraphPad Software, USA).

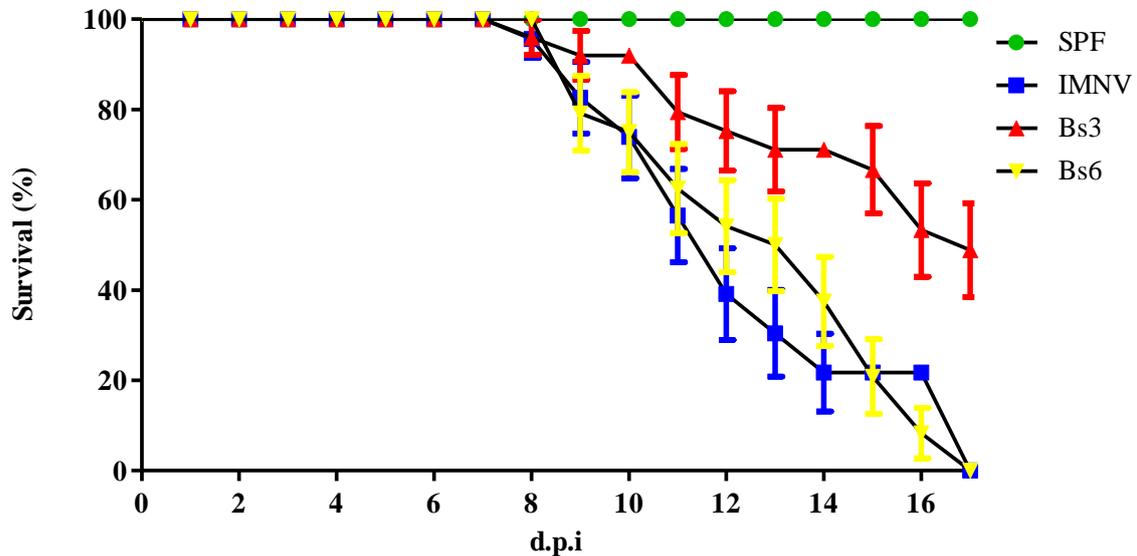
5.3 RESULTADOS

5.3.1 Sobrevivência dos camarões desafiados com o IMNV

Os resultados do experimento de exposição dos camarões ao IMNV estão demonstrados na Figura 12. O grupo que recebeu a cepa de *B. subtilis* JJBs3 expressando a dsRNA-VP28ORF1a incorporada na ração se mostrou mais efetiva na inibição da mortalidade frente a infecção com o IMNV ao longo de 17 dias, observando-se uma sobrevivência de 49%. Por outro lado, os grupos que receberam a cepa de *B. subtilis* JJBs6 expressando a dsRNA-IGSF4D ou solução salina morreram no 17º d.p.i. Nenhuma diferença estatística foi verificada entre as curvas de sobrevivência dos grupos que receberam a JJBs6 ou solução salina ($P < 0,05$).

Figura 12 - Percentual de sobrevivência dos grupos de camarões *L. vannamei* alimentados com as cepas de *B. subtilis* JJBs3 expressando a dsRNA-VP28ORF1a, JJBs6 expressando a dsRNA-

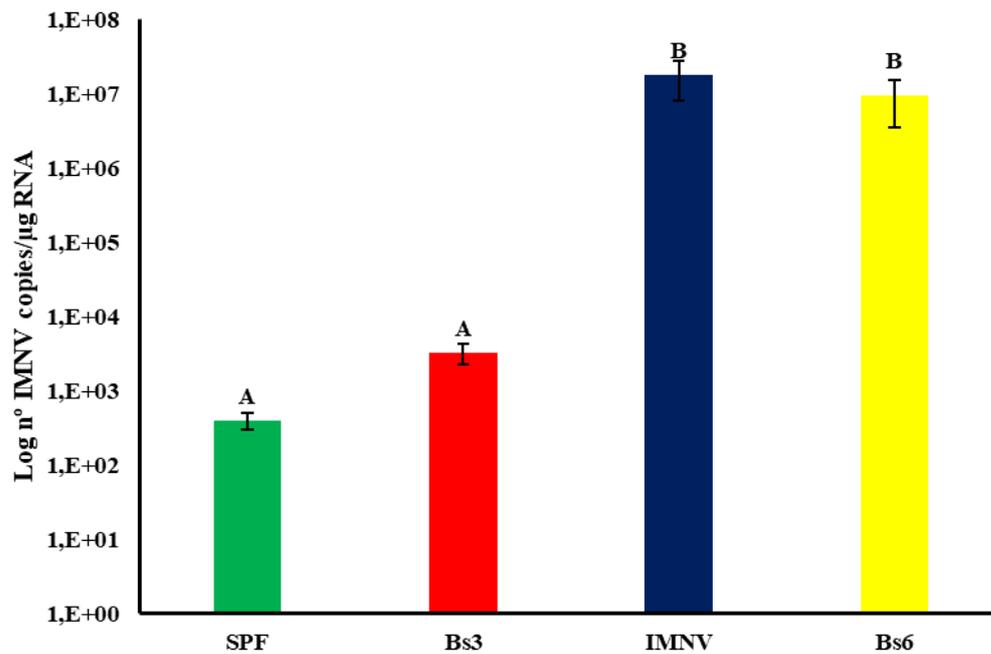
IGSF4D e solução salina ao longo de 17 dias após a injeção de $1,02 \times 10^3$ cópias do IMNV (Bs3, Bs6 e IMNV) ou extrato de tecido livre de patógenos (SPF).



5.3.2 Carga viral dos camarões desafiados com o IMNV

Ao final do experimento, a carga viral foi significativamente menor ($p < 0,05$) no grupo tratado com a cepa JJBs3, que expressa a dsRNA VP28/ORF1, quando comparado com o grupo infectado (Figura 13). Notavelmente, a JJBs6, que expressa uma dsRNA não relacionada ao vírus IMN, não foi capaz de reduzir a replicação viral.

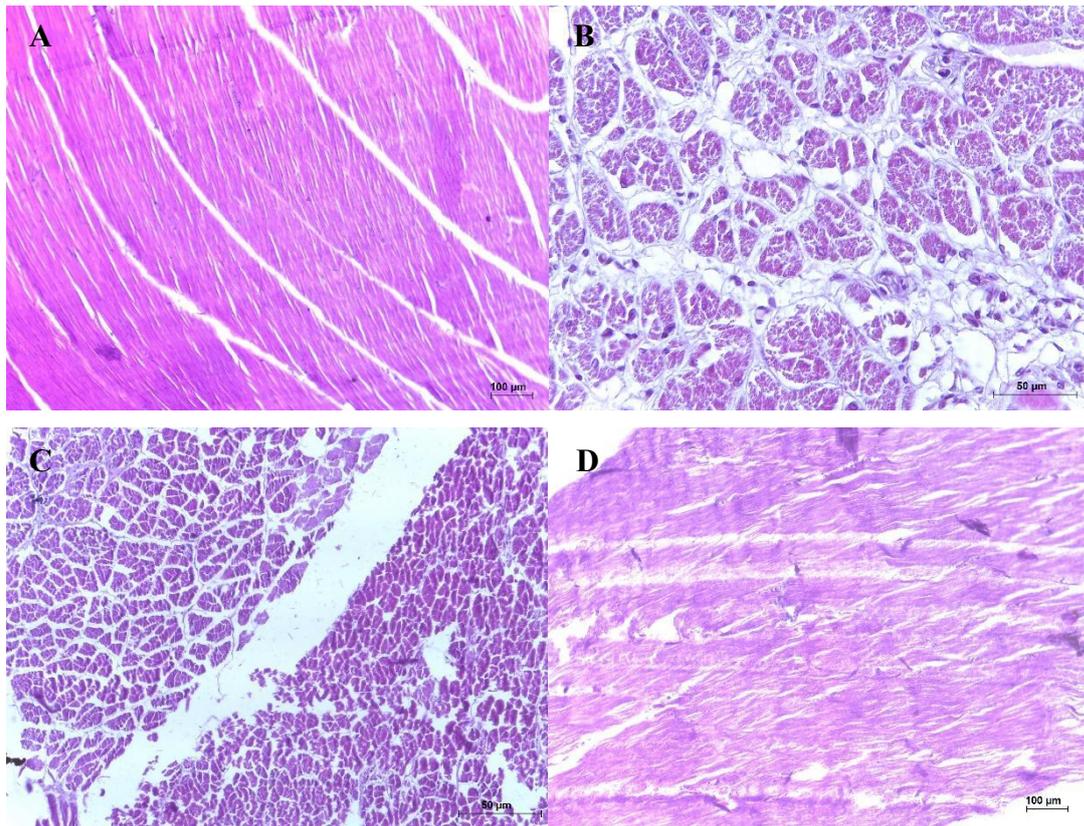
Figura 13 – Carga viral observada no final do experimento. **SPF**, camarão inoculado com extrato de tecido livre de patógenos e alimentado com ração contendo 35% de proteína bruta; **Bs3**, camarão desafiado com IMNV e alimentados com a mistura contendo bactérias JJBs3 (expressando dsRNA-VP28/ORF1a); **Bs6** camarão desafiado com IMNV e alimentado com a mistura contendo bactérias JJBs6 (expressando dsRNA-IGSF4D [não relacionada]). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) após um teste de Dunnett, seguindo por uma ANOVA de uma via. As cores correspondem às da Figura 12.



5.3.3 Análises histopatológicas

O tratamento SPF não foi encontrada alterações histológicas após 15 dias de injeção (Figura 14A). Nos tratamentos IMNV, Bs6 e Bs3 apresentaram alterações característica do vírus IMN após 15 dias da injeção, como infiltrações hemocíticas, necroses de coagulação ou liquefação no tecido muscular.

Figura 14 – Fotomicrografia de cortes histológicos coradas com H&E referentes a camarões alimentados com rações contendo cepas de *B. subtilis* JJBs3 (D), cepas de *B. subtilis* JJBs6 (B) e solução salina pertencentes ao Controle Negativo (A) e Controle Positivo (C) após 15 dias da infecção experimental por IMNV. A) Tecido muscular normal; B) Infiltrações hemocíticas ; C e D) Necrose de coagulação.



5.4 DISCUSSÃO

A mionecrose infecciosa é considerada agente etiológico importante e vem promovendo perdas nas produções de camarão alguns lugares no mundo (PRASAD et al., 2017). Estudos já relataram que o uso de dsRNAs exógenas e específicas para o IMNV promovem a ativação do mecanismo de RNA de interferência, barrando a replicação viral e, conseqüentemente, a evolução da doença (FEIJÓ et al., 2015; LOY et al., 2013). A sequência genética com homologia para uma região da ORF1a do IMNV, integrada nas cepas utilizadas no presente estudo (Riet et al., 2021), já tinha sido relatada como eficiente para a inibição dos transcritos do IMNV e redução dos índices de mortalidade de camarões desafiados com esse vírus tratados com moléculas dsRNA (FEIJÓ et al., 2015). Contudo, o uso de um modelo de

produção de dsRNAs alternativo aos kits comerciais ainda não tinha sido proposto para este vírus. O sistema de RNA de interferência é considerado uma tecnologia promissora e deve ser adaptada para o uso em escalas comerciais (POSIRI et al., 2013).

Dentre os grupos de camarões desafiados com IMNV no presente estudo, o grupo alimentado com ração contendo a cepa JJBs3 demonstrou uma sobrevivência de 50% após 17 dias da injeção do inóculo viral e uma menor carga viral ao final do experimento. Esses resultados evidenciam que a utilização da cepa Bs3 pode ser considerada como uma bactéria probiótica capaz de controlar e combater o IMNV experimentalmente. Utilizando a mesma cepa, Riet et al. (2021) verificaram uma sobrevivência de 34% em camarões injetados com um inóculo contendo o WSSV, mostrando que a cepa JJBs3 expressando uma única dupla fita de RNA relacionada as duas viroses foi capaz de aumentar a sobrevivência em camarões desafiados em pelo menos um destes vírus. A utilização dessa cepa probiótica em um desafio de coinfeção com os dois vírus supracitados seria o próximo passo a ser avaliado. Além da utilização de bactérias probióticas, o uso da manipulação genética para diminuição de transcritos de mais de um vírus se torna vantajoso, uma vez que em ambientes de cultivo a possibilidade de ocorrência de coinfeção viral é elevada (FEIJÓ *et al.*, 2013; VIEIRA-GIRAO *et al.*, 2015).

Um modelo de entrega de dsRNA que utiliza um microrganismo, a *E. coli* HT115 apresenta uma alternativa para o controle de doenças de origem viral em camarões. Contudo, há limitações para a aplicação em ambientes de cultivo, uma vez que a entrega dessas moléculas devem passar por etapas de purificação ou inativação dessa bactéria (ATTASART *et al.*, 2013; SARATHI *et al.*, 2008; TIRASOPHON; ROSHORM; PANYIM, 2005). Nesse trabalho, o *B. subtilis* geneticamente modificado para expressão de dsRNAs relacionada ao IMNV dispensa as etapas anteriormente citadas, uma vez que se trata de uma bactéria probiótica amplamente reconhecida como segura na indústria de alimentos e já integram dietas comerciais do camarão *L. vannamei* para ganho de performance no cultivo (SADAT *et al.*, 2018)

Houve uma diminuição do número de cópias virais apenas no grupo tratado com a cepa JJBs3, que expressa a sequência correspondente ao IMNV. Análises histopatológicas demonstraram as lesões teciduais causadas pelo vírus no desafio, não sendo visto qualquer alteração. O grupo tratado com a cepa JJBs6 não conferiu nenhum tipo de proteção frente a infecção experimental nem diminuição dos transcritos virais. O uso da cepa probiótica que expressa uma sequência não relacionada ao IMNV ajuda a afirmar que a sequência integrada na cepa JJBs3 foi específica para a degradação do RNA mensageiro viral e que o uso do *B. subtilis* na alimentação diária dos camarões desafiados não conferiu nenhum tipo de proteção.

O presente estudo demonstra que um probiótico geneticamente modificado pode aumentar a sobrevivência de camarões infectados experimentalmente com o IMNV. O desenvolvimento de tecnologias para garantir o uso destes microrganismos com o mínimo de riscos associados é de fundamental importância para sua aplicação na carcinicultura.

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

No capítulo I o uso da HT115 apresentou resultados limitados para o controle do IMNV no camarão *L. vannamei*. Embora todos os protocolos de produção de duplas fitas de RNA com a HT115 tenham sido seguidos e ser um modelo bem-sucedido na produção dessas moléculas *in vivo*, os resultados obtidos abriu uma discussão sobre se esse modelo apresenta a reprodutibilidade e a eficácia necessária para o controle de doenças virais em camarões de cultivo.

No capítulo II a produção e injeção das moléculas de dsRNA por meio de bactérias probióticas geneticamente editadas foi capaz de conter a evolução da mionecrose infecciosa em camarões infectados. No entanto, efeito de dose-resposta, tempo de exposição e dose de reforço de dsRNAs apresentam variáveis importantes para otimização da técnica empregada.

No capítulo III a ingestão de um probiótico geneticamente modificado foi capaz de reduzir a evolução agressiva do IMNV no camarão *L. vannamei*. Esse resultado reforça a capacidade da programação de probióticos no combate da doenças virais primeiramente relatada por RIET et. al. (2021) em experimento com WSSV. A cepa JJBs3 utilizada nesse trabalho foi capaz de induzir o mecanismo de RNA de interferência e diminuir os níveis de transcritos virais do IMNV.

Por ainda existir contenções legais acerca do uso de organismos geneticamente modificados em sistemas de produção aquícola, o aprimoramento das técnicas de manipulação genética visando minimizar os riscos associados na implementação dessas bactérias é de fundamental importância para a aplicabilidade dessa tecnologia na carcinicultura. Nessa tese foi relatada a capacidade de um probiótico modificado expressando dsRNA para diminuição da replicação do vírus da mionecrose infecciosa em camarões desafiados. O desenvolvimento de tecnologias na manipulação genética mais precisas e seguras desses microrganismos podem levar a criação de terapias antivirais com aplicação na produção de camarão.

Seguem algumas sugestões de desdobramentos desse trabalho para serem desenvolvidos no âmbito da carcinicultura:

- I. Validação da capacidade de proteção cepa JJBs3 frente a um ensaio de coinfeção viral IMNV e WSSV;

- II. Elaborar ensaios de consorciação dessas cepas probióticas geneticamente modificadas com cepas nativas do cultivo de camarões para avaliação de desempenho e se há prejuízo no cultivo;
- III. Desenvolver novas cepas específicas com apenas uma única sequência de dsRNA correspondente a um vírus. Por conter uma única sequência específica para um vírus, espera-se um efeito mais efetivo no controle da doença;
- IV. Otimizar o protocolo de purificação de dsRNA em cepas probióticas para adequação em etapas de administração intramuscular dessas moléculas. Além de ser uma etapa crucial para validação do efeito de silenciamento, a opção de injetar as moléculas em reprodutores de camarão para produção de proles com potencial efeito de RNAi resistentes;
- V. Bioenriquecer artêmias com cepas probióticas expressando dsRNAs para administração e formulação de dietas ativadoras dos mecanismos de RNA de interferência. Esse passo seria uma evolução na técnica de entrega dessas moléculas para o controle de doenças virais em camarões.

REFERÊNCIAS

- ALTENBUCHNER, Josef. Editing of the *Bacillus subtilis* Genome by the CRISPR-Cas9 System. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 17, p. 5421–5427, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.01453-16>. Acesso em: 17 ago. 2018.
- ANAGNOSTOPOULOS, C.; SPIZIZEN, John. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 81, n. 5, p. 741–746, 1961. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JB.81.5.741-746.1961>. Acesso em: 11 ago. 2021.
- ANDRADE *et al.* Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of Infectious myonecrosis virus (IMNV). **Aquaculture**, v. 264, n. 1–4, p. 9–15, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.030>. Acesso em: 30 set. 2018.
- ATTASART, Pongsopée *et al.* Ingestion of bacteria expressing dsRNA triggers specific RNA silencing in shrimp. **Virus Research**, v. 171, n. 1, p. 252–256, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.11.012>. Acesso em: 20 nov. 2018.
- BALCÁZAR, José Luis; ROJAS-LUNA, Tyrone; CUNNINGHAM, David P. 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**, v. 96, n. 2, p. 147–150, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.04.008>. Acesso em: 20 dez 2017.
- BELL, TA; LIGHTNER, DV. **A handbook of normal penaeid shrimp histology**. Luisiana: World Aquaculture Society, 1988.
- BERNSTEIN, Emily *et al.* Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 363–366, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35053110>. Acesso em: 13 jul. 2017.
- BRAZ, Regina de Fátima dos Santos *et al.* Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Penaeus vannamei* cultured in northeastern Brazil. **Aquaculture**, v. 288, n. 1–2, p. 143–146, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.11.021>. Acesso em: 13 jul. 2017.
- CHAROONNART, Patai *et al.* Generation of microalga *Chlamydomonas reinhardtii* expressing shrimp antiviral dsRNA without supplementation of antibiotics. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39539-x>. Acesso em: 12 jul. 2020.
- DANTAS, Márcia Danielle A *et al.* Analysis of new isolates reveals new genome organization and a hypervariable region in infectious myonecrosis virus (IMNV). **Virus research**, v. 203, p. 66–71, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.03.015>. Acesso em: 12 abr. 2019
- DONG, Huina; ZHANG, Dawei. Current development in genetic engineering strategies of *Bacillus* species. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 63, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-63>. Acesso em: 29 nov. 2019.

DUGASSA, Hailu; GAETAN, De Gyse. Biology of White Leg Shrimp, *Penaeus vannamei*: Review. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, v. 10, n. 2, p. 5–17, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.5829/idosi.wjfm.2018.05.17>. Acesso em: 3 abr. 2019.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action**. Rome, 2020. ISSN 15289303. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/ca9229en>. Acesso em: 4 jan. 2022.

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**, v. 380–383, p. 1–5, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2012.11.026>. Acesso em: 22 ago. 2019.

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**, v. 380–383, n. February 2007, p. 1–5, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.11.026>. Acesso em: 1 dez. 2017.

FEIJÓ, Rubens Galdino *et al.* RNAi-based inhibition of infectious myonecrosis virus replication in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Diseases of Aquatic Organisms**, , v. 114, n. 2, p. 89–98, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3354/dao02853>. Acesso em: 13 jul. 2017.

COSTA 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**. 1–71 f. 2019. - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2019. Acesso em: 25 ago. 2020.

FIRE, Andrew. *et al.* Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. **Development**, v. 113, n. 2, p. 503–514, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/dev.113.2.503>. Acesso em: 13 jan. 2019.

FLEGEL, Timothy W. A future vision for disease control in shrimp aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 50, n. 2, p. 249–266, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jwas.12589>. Acesso em: 17 jun. 2020.

FORTE, Jamille Martins. *et al.* Multienzymatic capacity of cultivable intestinal bacteria from captive *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) shrimp reared in green water. **Aquaculture International**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00431-0>. Acesso em: 03 jan. 2020.

GORDON, Ruth *et al.* **The genus Bacillus**. Washington, D.C.: Agricultural Research Service, U.S. Dept. of Agriculture; For sale by Supt. of Docs., U.S. G.P.O., 1973.

KUMAR, Anil *et al.* Double Stranded RNA Simultaneously Targeting Four White Spot Syndrome Virus (WSSV) genes Provides Protection against WSSV in *Litopenaeus vannamei*. **International Journal of Marine Science and Ocean Technology**, v. 2, n. 2, p. 5–10, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.19070/2577-4395-140002>. Acesso em: 3 de dez. 2018.

LIGHTNER, D. V. *et al.* Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 174–183, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.006>. Acesso em 17 de out. 2019

LIGHTNER, D. V. *et al.* Infectious Myonecrosis- New Disease in Pacific White Shrimp. **Global Aquaculture Advocate**, October 2004, p. 85 - 90, 2004. Disponível em : [https://www.globalseafood.org/advocate/infectious-myonecrosis-new-disease-in-pacific-white-shrimp/#:~:text=Infectious%20myonecrosis%20\(IMN\)%20was%20recently,by%20persistent%20low%2Dlevel%20mortalities](https://www.globalseafood.org/advocate/infectious-myonecrosis-new-disease-in-pacific-white-shrimp/#:~:text=Infectious%20myonecrosis%20(IMN)%20was%20recently,by%20persistent%20low%2Dlevel%20mortalities). Acesso em: 13 fev. 2020.

LIGHTNER, D. V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 106, n. 1, p. 110–130, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.012>. Acesso em: 15 out. 2020.

LOY, J. Dustin *et al.* dsRNA provides sequence-dependent protection against infectious myonecrosis virus in *Litopenaeus vannamei*. **Journal of General Virology**, v. 93, n. 4, p. 880–888, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/vir.0.038653-0>. Acesso em: 20 ago. 2019.

LOY, J. 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**, v. 105, n. 1, p. 57–64, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3354/dao02600>. Acesso em: 14 fev. 2020.

MARTÍNEZ CRUZ, Patricia *et al.* Use of Probiotics in Aquaculture. **ISRN Microbiology**, v. 2012, p. 1–13, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.5402/2012/916845>. Acesso em: 16 jun. 2020.

MEISTER, Gunter. Argonaute proteins: Functional insights and emerging roles. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 7, p. 447 - 459, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrg3462>. Acesso em: 30 dez 2020.

MERRIFIELD, Daniel L. *et al.* The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**, v. 302, n. 1–2, p. 1–18, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.007>. Acesso em: 4 de abr. 2019.

MONTGOMERY, Mary K.; XU, Siqun; FIRE, Andrew. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 26, p. 15502–15507, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15502>. Acesso em: 27 ago. 2020.

NAPOLI, Carolyn; LEMIEUX, Christine; JORGENSEN, Richard. Ozone oxidation products of organic materials. **Marine Pollution Bulletin**, v. 2, n. 1, p. 279–289, 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0025-326x\(76\)90099-0](https://doi.org/10.1016/0025-326x(76)90099-0). Acesso em: 7 out. 2020.

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**, v. 88, n. 4, p. 1315–1318, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/vir.0.82681-0>. Acesso em: 8 out. 2020.

NUNES, Alberto Jorge Pinto. O Cultivo de Camarões Marinhos no Nordeste do Brasil | Revista Panorama da Aqüicultura. **Panorama da Aqüicultura**, São Paulo, 2001. Disponível em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/o-cultivo-de-camaroes-marinhos-no-nordeste-do-brasil/>. Acesso em: 29 nov. 2019.

NUNES, Alberto Jorge Pinto; CUNHA-MARTINS, Pedro Carlos; GESTEIRA, Tereza Cristina Vasconcelos. Carcinicultura Ameaçada. **Panorama da Aqüicultura**, v. 83, p. 37–51, 2004. Disponível em: www.panoramadaaquicultura.com.br/Paginas/revistas/83/carcinicultura83.asp. Acesso em: 25 abr. 2019.

OLMOS, Jorge *et al.* *Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution. **Archives of Microbiology** **2019 202:3**, v. 202, n. 3, p. 427–435, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S00203-019-01757-2>. Acesso em: 6 out. 2021.

OLMOS, Jorge; PNIAGUA-MICHEL, J. *Bacillus subtilis* A Potential Probiotic Bacterium to Formulate Functional Feeds for Aquaculture. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 06, n. 07, p. 361–365, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000169>. Acesso em 30 jan. 2020.

ONGVARRASOPONE, Chalermpon; ROSHORM, Yaowaluck; PANYIM, Sakol. A Simple and Cost Effective Method to Generate dsRNA for RNAi Studies in Invertebrates. **ScienceAsia**, v. 33, n. 1, p. 35–39, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2007.33.035>. Acesso em: 16 nov. 2019.

PANDIYAN, Priyadarshini *et al.* Probiotics in aquaculture. **Drug Invention Today**, v. 5, n. 1, p. 55 - 59, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dit.2013.03.003>. Acesso em: 20 fev. 2020.

PANTOJA, C. R.; LIGHTNER, D. V. Enfermedades virales del camarón. *In*: MORALES, Q. Vielka; CUÉLLAR-ANJEL, Jorge (org.). **Guía Técnica – Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos**. 2. ed. Panamá: OIRSA, 2014. v. 53, p. 99–166. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>. Acesso em: 14 abr. 2019.

PEELER, Edmund J. Costs and benefits of freedom from shrimp diseases in the European Union. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 110, n. 2, p. 188 -195, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.01.014>. Acesso em: 30 jan. 2020.

POSIRI, Pratsaneeyaporn; ONGVARRASOPONE, Chalermpon; PANYIM, Sakol. A simple one-step method for producing dsRNA from E. coli to inhibit shrimp virus replication. **Journal of Virological Methods**, v. 188, n. 1–2, p. 64–69, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.11.033>. Acesso em: 12 abr. 2021.

POULOS, Bonnie T. *et al.* Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 4, p. 987–996, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/vir.0.81127-0>. Acesso em: 13 set. 2020.

PRATT, Ashley J.; MACRAE, Ian J. The RNA-induced silencing complex: A versatile gene-silencing machine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 27, p. 17897 - 17901, 2009.

Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.R900012200>. Acesso em: 3 mai. 2021.

RESHI, Mohammad Latif *et al.* RNA interference technology used for the study of aquatic virus infections. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 40, n. 1, p. 14–23, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.008>. Acesso em: 15 abr. 2021.

RIET, Jade *et al.* *Bacillus subtilis* expressing double-strand RNAs (dsRNAs) induces RNA interference mechanism (RNAi) and increases survival of WSSV-challenged *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 541, p. 736–834, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736834>. Acesso em: 17 dez. 2021.

ROBALINO, J. *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**, v. 79, n. 21, p. 13561–13571, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.21.13561-13571.2005>. Acesso em: 13 jul. 2017.

RODRIGUES, Josemar; BORBA, E Marcelo. Carcinicultura brasileira : estatísticas e revelações. **Feed & Food - ABCC**, Sorocaba, p. 40–42, 2012.. Disponível em: <https://abccam.com.br/wp-content/uploads/2013/12/Carcinicultura-Brasileira - Estat%C3%ADsticas-e-Revela%C3%A7%C3%B5es-ABRIL-2013.pdf>. Acesso em: 27 dez. 2021.

ROMANO, Nicoletta; MACINO, Giuseppe. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 22, p. 3343–3353, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb02202.x>. Acesso em: 17 de jan. 2021.

SADAT, Nasim Hoseini Madani *et al.* The effects of dietary probiotic Bacilli (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) on growth performance, feed efficiency, body composition and immune parameters of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 5, p. 1926–1933, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ARE.13648>. Acesso em: 9 nov. 2021.

SAKSMERPROME, Vanvimon *et al.* A novel and inexpensive application of RNAi technology to protect shrimp from viral disease. **Journal of Virological Methods**, v. 162, n. 1–2, p. 213–217, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.08.010>. Acesso em: 30 dez. 2020.

SANITT, Poohrawind; ATTASART, Pongsopée; PANYIM, Sakol. Protection of yellow head virus infection in shrimp by feeding of bacteria expressing dsRNAs. **Journal of Biotechnology**, v. 179, n. 1, p. 26–31, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.03.016>. Acesso em: 14 jan. 2022.

SARATHI, M. *et al.* Efficacy of bacterially expressed dsRNA specific to different structural genes of white spot syndrome virus (WSSV) in protection of shrimp from WSSV infection. **Journal of Fish Diseases**, v. 33, n. 7, p. 603–607, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01157.x>. Acesso em: 18 fev. 2022.

SARATHI, M. *et al.* Silencing VP28 gene of white spot syndrome virus of shrimp by

bacterially expressed dsRNA. **Marine Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 198–206, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10126-007-9052-y>. Acesso em: 18 jan. 2022.

SEIFFERT, W. Q. A mancha Branca em Santa Catarina. **Revista da ABCC**, Recife, p. 34–37, 2005. Disponível em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/a-mancha-branca-em-santa-catarina/#:~:text=O%20v%C3%ADrus%20da%20s%C3%ADndrome%20da,afetado%20mais%20de%2020%20pa%C3%ADses>. Acesso em: 13 out. 2021.

SENAPIN, Saengchan *et al.* False rumours of disease outbreaks caused by infectious myonecrosis virus (IMNV) in the whiteleg shrimp in Asia. **Journal of negative results in biomedicine**, v. 10, n. 1, p. 10, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1477-5751-10-10>. Acesso em: 10 dez. 2020.

SIQUEIRA BUENO, Sérgio Luiz; NASCIMENTO, Roberto Meyer; NASCIMENTO, Ivana. Baculovirus penaei Infection in *Penaeus subtilis*: A New Host and a New Geographical Range of the Disease. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 21, n. 3, p. 235–237, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1990.tb01028.x>. Acesso em: 29 nov. 2019.

TANG, Jinghua *et al.* Infectious myonecrosis virus has a totivirus-like, 120-subunit capsid, but with fiber complexes at the fivefold axes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 45, p. 17526–17531, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0806724105>. Acesso em: 20 jan. 2022.

TIMMONS, Lisa; COURT, Donald L.; FIRE, Andrew. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. **Gene**, v. 263, n. 1–2, p. 103–112, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00579-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00579-5). Acesso em: 17 set. 2021.

TIRASOPHON, Witoon; ROSHORM, Yaowaluck; PANYIM, Sakol. Silencing of yellow head virus replication in penaeid shrimp cells by dsRNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 334, n. 1, p. 102–107, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.06.063>. Acesso em: 13 jul. 2017.

VIEIRA-GIRAO, P. R. N. *et al.* Low Salinity Facilitates the Replication of Infectious Myonecrosis Virus and Viral Co-Infection in the Shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 06, n. 02, p. 1–6, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000302>. Acesso em: 14 jan. 2018.

WU, Yue *et al.* Inhibition of white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei* shrimp by sequence-specific siRNA. **Aquaculture**, v. 271, n. 1–4, p. 21–30, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.06.029>. Acesso em: 18 out. 2021

XU, Jianyang; HAN, Fang; ZHANG, Xiaobo. Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. **Antiviral Research**, v. 73, n. 2, p. 126–131, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.08.007>. Acesso em: 13 jul. 2017. Acesso em: 12 dez. 2020.