



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG  
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA – IO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

A faint, stylized background illustration of a shrimp and a virus particle. The shrimp is depicted in a light brown color, and the virus particle is shown as a yellow, starburst-like structure with a blue arc above it. The entire illustration is overlaid on a light gray grid.

**ATIVAÇÃO DO MECANISMO DE RNA INTERFERENTE (RNAi) VIA *Bacillus subtilis* GENETICAMENTE MODIFICADO CONTRA A REPLICAÇÃO DO VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV) NO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei***

**BIOL. JADE RIET GRAMINHO**

**RIO GRANDE, RS**

**2020**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG**  
**INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA – IO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

**ATIVAÇÃO DO MECANISMO DE RNA INTERFERENTE (RNAi) VIA *Bacillus subtilis* GENETICAMENTE MODIFICADO CONTRA A REPLICAÇÃO DO VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV) NO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei***

**BIOL. JADE RIET GRAMINHO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de **MESTRE** em Aquicultura no Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Marins

Co-orientador: Prof. Dr. Wilson Wasielesky

**RIO GRANDE, RS**  
**FEVEREIRO / 2020**

## SUMÁRIO

1		
2	<b>RESUMO .....</b>	<b>vi</b>
3	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vii</b>
4	<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
5	1.1 <i>Importância e problemas enfrentados na carcinocultura.....</i>	<i>8</i>
6	1.2 <i>Vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) .....</i>	<i>8</i>
7	1.3 <i>RNA de interferência (RNAi).....</i>	<i>13</i>
8	1.4 <i>A utilização de probióticos na carcinocultura .....</i>	<i>16</i>
9	<b>2 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>18</b>
10	2.1 <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>18</i>
11	<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
12	3.1 <i>Universidades envolvidas.....</i>	<i>19</i>
13	3.2 <i>Obtenção das cepas e manutenção dos animais .....</i>	<i>19</i>
14	3.3 <i>Enriquecimento do meio de cultivo em diferentes condições de nutrientes para</i>	
15	<i>produção das dsRNAs.....</i>	<i>20</i>
16	3.4 <i>Validação das dsRNAs na ativação do mecanismo de RNAi .....</i>	<i>20</i>
17	3.5 <i>Utilização das cepas de B. subtilis na alimentação do camarão L.</i>	
18	<i>vannamei.....</i>	<i>21</i>
19	3.6 <i>Extração de RNA dos hemócitos, síntese do cDNA e expressão gênica .....</i>	<i>22</i>
20	3.7 <i>Desafio viral .....</i>	<i>23</i>
21	3.7.1 <i>Pré-tratamento .....</i>	<i>23</i>
22	3.7.2 <i>Manutenção dos animais utilizados e transporte .....</i>	<i>23</i>
23	3.7.3 <i>Preparação do inóculo viral e infecção.....</i>	<i>24</i>
24	3.7.4 <i>Coletas e análises .....</i>	<i>24</i>
25	3.7.5 <i>Carga viral e histopatologia .....</i>	<i>25</i>
26	3.7.6 <i>Análises estatísticas .....</i>	<i>26</i>
27		
28	<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
29	4.1 <i>Enriquecimento do meio de cultivo em diferentes condições de nutrientes para</i>	
30	<i>produção das dsRNAs.....</i>	<i>27</i>
31	4.2 <i>Validação das dsRNAs na ativação do mecanismo de RNAi.....</i>	<i>27</i>
32	4.3 <i>Utilização das cepas de B. subtilis na alimentação do camarão L.</i>	
33	<i>vannamei.....</i>	<i>28</i>
34	4.4 <i>Desafio viral.....</i>	<i>29</i>
35	4.4.1 <i>Expressão dos genes do mecanismo de RNAi.....</i>	<i>29</i>
36	4.4.2 <i>Sobrevivência e carga viral.....</i>	<i>30</i>
37	4.4.3 <i>Histopatologia.....</i>	<i>32</i>
38	4.4.4 <i>Parâmetros físicos-químicos da qualidade de água.....</i>	<i>33</i>
39		
40	<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
41	<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>40</b>
42	<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>41</b>
43	<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>42</b>
44		

## 1    **AGRADECIMENTOS**

2           Agradeço primeiramente a minha família (mãe, vó, mana, Ernani e pai) que  
3   esteve ao meu lado me apoiando e me dando força para continuar. Agradeço  
4   principalmente a minha mãe por sempre ser positiva, por acreditar no meu potencial  
5   quando eu mesma achava que não ia conseguir e pelas várias orações a cada  
6   experimento. Agradeço imensamente a ela por ter me dado força e ter suportado (sei o  
7   quanto foi difícil) todo o sofrimento devido a distância nos experimentos em outros  
8   estados. Além da minha mãe, agradeço imensamente meu pai, por também sempre  
9   demonstrar preocupação a cada resultado dessa dissertação e por todo apoio no  
10   experimento de Florianópolis nas várias horas de percurso me levando e buscando na  
11   universidade.

12           Além da minha família não poderia deixar de agradecer todos os meus amigos  
13   Camila Vian, Jéssika Lopes, Andressa Lopes, Tatiane Bialves, Dennis, Guilherme  
14   Toledo, Cássia Rodrigues, Juan e Christian, por todos os momentos de força com  
15   palavras de carinho e diversão quando mais precisei.

16           Agradeço aos meus amigos/colegas/família do Laboratório de Biologia  
17   Molecular onde convivi durante quase 6 anos (graduação e mestrado). Não posso deixar  
18   de destacar alguns que foram essências para hoje estar defendendo essa dissertação.  
19   Estavam comigo em TODOS os experimentos, sem hora para terminar, na chuva, no  
20   frio, me apoiando, aguentando minhas crises de desespero e choro. Essas pessoas  
21   iluminadas na minha vida são: Luiza, Raíza, Arthur, meu braço direito Laura e Kamila.  
22   Sou eternamente grata a vocês!

23           Ao meu eterno/ídolo/exemplo como pessoa e profissional orientador Luis  
24   Fernando Marins (Luf) que desde a graduação esteve comigo com toda paciência do  
25   mundo (inclusive nas minhas mensagens no final de semana). Ele que nesses 6 anos de  
26   convivência sempre me forneceu muitas oportunidades, como nos experimentos em  
27   Florianópolis e em Fortaleza, sempre preocupado comigo e com as minhas dúvidas.  
28   Sempre foi aquele orientador brincalhão, amigo, mas também um paizão. Sou  
29   eternamente grata por tudo, por moldar quem hoje eu sou e quem eu serei como  
30   cientista. O Luf é meu espelho quem eu quero refletir sempre como profissional.

31           Ao meu coorientador Wilson Wasielesky (Mano) que apesar da convivência ter  
32   sido apenas durante o mestrado, sou muito grata por toda paciência, pelos puxões de

1 orelhas o que me tornou uma pessoa mais profissional, pela disponibilidade, pelos  
2 conselhos, pelo carinho e por sempre proporcionar tudo o que foi necessário para a  
3 realização dos meus experimentos. Também o considero um grande exemplo de pessoa  
4 e profissional.

5 Por fim agradeço a professora Luciane Perazzolo e seu grupo de pesquisa pela  
6 recepção e atenção em seu laboratório da UFSC onde tornou possível a realização dos  
7 experimentos de desafio viral. Ao professor Rodrigo Maggioni pela grande amizade e  
8 preocupação e a todos do CEDECAM por me receber de braços abertos em seu  
9 laboratório na UFC e fazerem me sentir em casa. Não podendo deixar de destacar o  
10 Fagner (amigo que vou levar para a vida toda), a Graça (por ter sido uma mãe no tempo  
11 que tive em Fortaleza) me recebendo na sua casa com todo amor e carinho e a Juliana  
12 Freitas. Agradeço ao professor Luis Romano e a Virgínia por toda paciência, dedicação  
13 e carinho nas análises de histopatologia sempre disponibilizando todo o tempo que eu  
14 precisasse. Ao João Costa Filho e o professor Josef Altenbuchner pelo trabalho  
15 realizado na Alemanha onde foram desenvolvidas as cepas que foram utilizadas nessa  
16 dissertação.

17 A todos os professores e colegas da Pós-Graduação em Aquicultura, por todos os  
18 ensinamentos e pela amizade e ao programa pela ajuda financeira e suporte para  
19 realização da minha dissertação.

20 Agradeço também as Agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de  
21 Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio com a bolsa e a Fundação de Amparo à  
22 Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo financiamento do projeto.

23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

## 1 **RESUMO**

2 Desde 1992, o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) vem causando problemas  
3 para o desenvolvimento da carcinicultura em todo o mundo. Dentre as alternativas para  
4 o combate a esse vírus está a utilização de duplas fitas de RNA (dsRNAs) para bloquear  
5 a expressão dos genes virais através do mecanismo de RNA interferente (RNAi)  
6 presente em eucariontes. A produção e entrega dessas moléculas aos animais pode ser  
7 realizada *in vitro* (através de kits comerciais) ou *in vivo* (como por exemplo, através de  
8 bactérias gram-negativas como *Escherichia coli*). O uso de kits encarece o tratamento e  
9 *E. coli* tem potencial patogênico. Assim, a utilização bactérias probióticas como  
10 bioreatores de dsRNAs pode ser uma alternativa interessante. Dessa forma, esta  
11 dissertação teve como objetivo validar o potencial da cepa probiótica *Bacillus subtilis*  
12 manipulada para produção das dsRNAs, na proteção do camarão *Litopenaeus vannamei*  
13 contra o WSSV. Para isso, foi otimizada a produção dessas moléculas com o acréscimo  
14 de nutrientes aos meios de cultura. As dsRNAs foram extraídas e purificadas do  
15 probiótico e validadas quanto à sua capacidade de ativar o sistema RNAi nos hemócitos.  
16 Adicionalmente o probiótico vivo foi administrado na dieta dos animais e avaliado  
17 quanto à sua capacidade de ativar o sistema RNAi e, também, quanto à sua capacidade  
18 de proteger o camarão contra o WSSV. Os resultados mostraram que o enriquecimento  
19 dos meios de cultura aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a produção das dsRNAs  
20 pelo probiótico. Tanto as dsRNAs purificadas injetadas nos camarões quanto o próprio  
21 probiótico administrado na dieta foram capazes de ativar o sistema RNAi, como  
22 evidenciado pelo aumento da expressão dos genes relacionados *sid1* e *argonata2*.  
23 Também, foi observado que o pré-tratamento por 15 dias com o probiótico é suficiente  
24 para ativar o sistema RNAi. Quando expostos ao vírus, os camarões tratados com o  
25 probiótico geneticamente modificado tiveram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na  
26 carga viral, o que resultou em uma sobrevivência de 34%. Não foram observadas  
27 inclusões virais nas brânquias, cutícula e epitélio gástrico dos sobreviventes. Este estudo  
28 demonstra, pela primeira vez, que uma cepa probiótica geneticamente modificada para  
29 ativar o sistema RNAi contra um gene específico do WSSV é capaz de reduzir a carga  
30 viral e aumentar a sobrevivência do camarão.

31 **Palavras-chave:** dsRNA, probiótico, virose, carcinicultura.

1    **ABSTRACT**

2    Since 1992, the White Spot Syndrome Virus (WSSV) has been causing problems for the  
3    development of shrimp farming worldwide. Among the alternatives to control this virus  
4    is the use of double-stranded RNAs (dsRNAs) to block the expression of viral genes  
5    through the mechanism of RNA interference (RNAi) present in eukaryotes. The  
6    production and delivery of these molecules can be achieved *in vitro* through commercial  
7    kits or *in vivo* through gram-negative bacteria like *Escherichia coli*. The use of kits  
8    makes treatment more expensive and *E. coli* has a pathogenic potential. Thus, the use of  
9    probiotic bacteria as bioreactors of dsRNAs can be an interesting alternative. This  
10   dissertation aimed to validate the potential of a probiotic strain of *Bacillus subtilis*  
11   manipulated for the production of dsRNAs, in the protection of the shrimp *Litopenaeus*  
12   *vannamei* against WSSV. For this, the production of these molecules was optimized  
13   with the addition of nutrients to the culture media. The dsRNAs were extracted and  
14   purified from the probiotic and validated for their ability to activate the RNAi system in  
15   the hemocytes. In addition, the live probiotic was administered to the animals' diet and  
16   assessed for its ability to activate the RNAi system and also for its ability to protect  
17   shrimp against WSSV. The results showed that enrichment of the culture media  
18   significantly ( $p < 0,05$ ) increased the production of dsRNAs by the probiotic. Both the  
19   purified dsRNAs injected into the shrimp and the probiotic administered in the diet were  
20   able to activate the RNAi system, as evidenced by the increased expression of the  
21   related genes *sid1* and *argonaute2*. Also, it was observed that the pretreatment for 15  
22   days with the probiotic is sufficient to activate the RNAi system. When exposed to the  
23   virus, shrimp treated with the genetically modified probiotic had a significant ( $p < 0,05$ )  
24   reduction in viral load, which resulted in a 34% survival. No viral inclusions were  
25   observed in the gills, cuticle and gastric epithelium of the survivors. This study  
26   demonstrates, for the first time, that a probiotic strain genetically modified to activate  
27   the RNAi system against a specific WSSV gene is capable of reducing viral load and  
28   increasing shrimp survival.

29

30    Keywords: dsRNA, probiotic, virus, carcinoculture.

31

# 1 INTRODUÇÃO

## 2 1.1 Importância e problemas enfrentados na carcinocultura

3 Com a pesca estagnada desde a década de 80, a aquicultura é um setor em  
4 constante crescimento produzindo e fornecendo pescado para o consumo humano. Entre  
5 os anos de 1961 e 2016 o consumo global de pescado aumentou entorno de 3,2%  
6 superando o crescimento populacional e excedendo o consumo de proteína oriunda de  
7 animais terrestres (2,8%) (FAO, 2018). De acordo com a FAO (2018), a produção  
8 global de pescado atingiu o pico em cerca de 171 milhões de toneladas em 2016, com a  
9 aquicultura representando 43% do valor total. Dessa forma a aquicultura tornou-se de  
10 excepcional importância social e econômica em diversos países com a China  
11 predominando no ranking de produção. Concomitantemente, a necessidade dessa prática  
12 tende a aumentar ainda mais tendo em vista estimativas populacionais até 2050  
13 (Nadarajah & Flaaten, 2017).

14 A carcinocultura é uma das áreas que mais crescem na aquicultura. Os camarões  
15 peneídeos compõem a família de camarões com maior valor comercial, sendo o  
16 camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* e o camarão-tigre *Penaeus monodon*  
17 os mais cultivados (Wang et al., 2014). O primeiro é considerado o camarão mais  
18 produzido mundialmente em cativeiro sendo responsável por 53% da produção quando  
19 comparado a outros crustáceos (FAO, 2018). Isso se deve ao fato de esta espécie ser  
20 tolerante a variações ambientais, como salinidade, possuir um bom crescimento e por  
21 também se adaptar facilmente a rações comerciais. Contudo, apesar do enorme sucesso,  
22 a criação de camarões em sistemas intensivos vem enfrentando graves surtos de doenças  
23 infecciosas (Lakshmi et al., 2013). Dentre as doenças mais preocupantes estão as  
24 vibrioses como a causada pelo *Vibrio parahaemolyticus* responsável pela Doença de  
25 Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND) (Muthukrishnan et al., 2019) e as viroses  
26 como a causada pelo Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), o Vírus da  
27 Mionecrose Infecciosa (IMNV) e também a virose causada pelo Vírus da Necrose  
28 Hipodérmica e Hematopoiética Infecciosa (IHHNV).

## 29 1.2 Vírus da síndrome da mancha branca (WSSV)

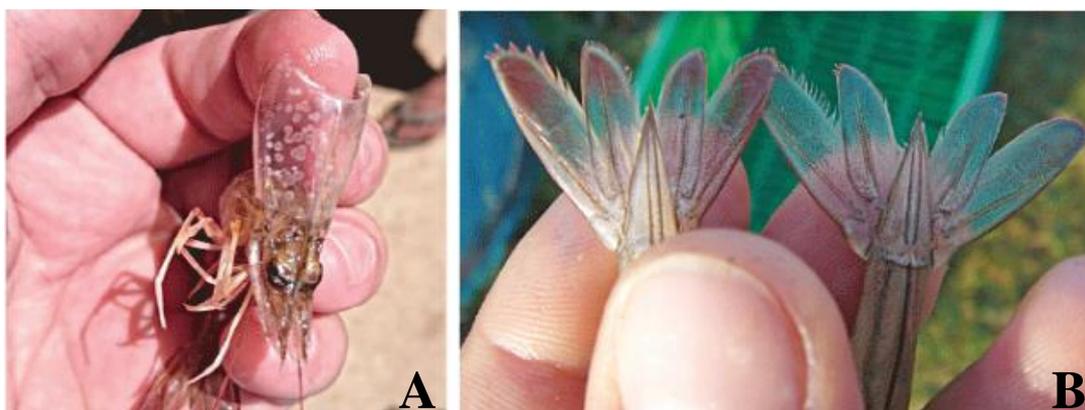
1           Dentre as doenças virais existentes, a Síndrome da Mancha Branca (WSS) é  
2 considerada a principal responsável pela mortalidade dos camarões cultivados. Essa  
3 doença pode ocasionar quase 100% de mortalidade entre três e dez dias de infecção  
4 proporcionando, desta forma, sérios impactos econômicos e sociais (Tang et al., 2018,  
5 Wen et al., 2014). Sua ocorrência foi detectada pela primeira vez em 1992 na China,  
6 seguido das Américas em 1995 (Zhan & Wang, 1998). Nos primeiros surtos dessa  
7 doença, em 1993 na China foi registrada uma perda de US\$ 420 milhões em uma única  
8 temporada. Na Tailândia, no ano seguinte, a perda foi de US\$ 650 milhões e no ano  
9 2000 uma perda de US\$ 1 bilhão nas Américas (Walker & Mohan, 2009). No Brasil, os  
10 estados que demonstraram surtos com essa doença são: Santa Catarina em 2004, Sul da  
11 Bahia em 2008, Paraíba e Pernambuco em 2011, Rio Grande do Norte em 2014 e 2015  
12 e Ceará em 2016 (Nunes & Feijó, 2017). Até os dias atuais essa doença é considerada  
13 uma ameaça, sendo presente na lista de notificação obrigatória da *World Organization*  
14 *for Animal Health* (OIE) atualizada de 2019.

15           O vírus responsável pela enfermidade é um vírus de dupla fita de DNA  
16 pertencente ao gênero *Whispovirus* e família Nimaviridae com um genoma de  
17 aproximadamente 305 kb (Verbruggen et al., 2016; Yang et al., 2001). A manifestação  
18 da doença se deve a alguns fatores de estresse ambiental no cultivo e fatores  
19 fisiológicos. Mudanças drásticas no pH do cultivo, proliferação de bactérias  
20 oportunistas, grande variação na temperatura da água, diminuição do oxigênio  
21 dissolvido, como também, altas densidades de estocagem podem contribuir para a  
22 proliferação do vírus (Nunes & Feijó, 2017). Depois de infectados, esses animais podem  
23 desencadear alguns sinais clínicos como o aparecimento de manchas brancas no  
24 exoesqueleto (Figura 1A), letargia, redução da alimentação e descoloração do  
25 hepatopâncreas e expansão dos cromatóforos no leque caudal (Figura 1B), cutícula  
26 abdominal e cefalotórax (Verbruggen et al., 2016; Nunes & Feijó, 2017). Isso se deve  
27 por esse vírus ocorrer em todos os tecidos de origem mesodermais e ectodermais sendo  
28 a cutícula, estômago e brânquias os órgão mais afetados (Sun et al., 2013).

29

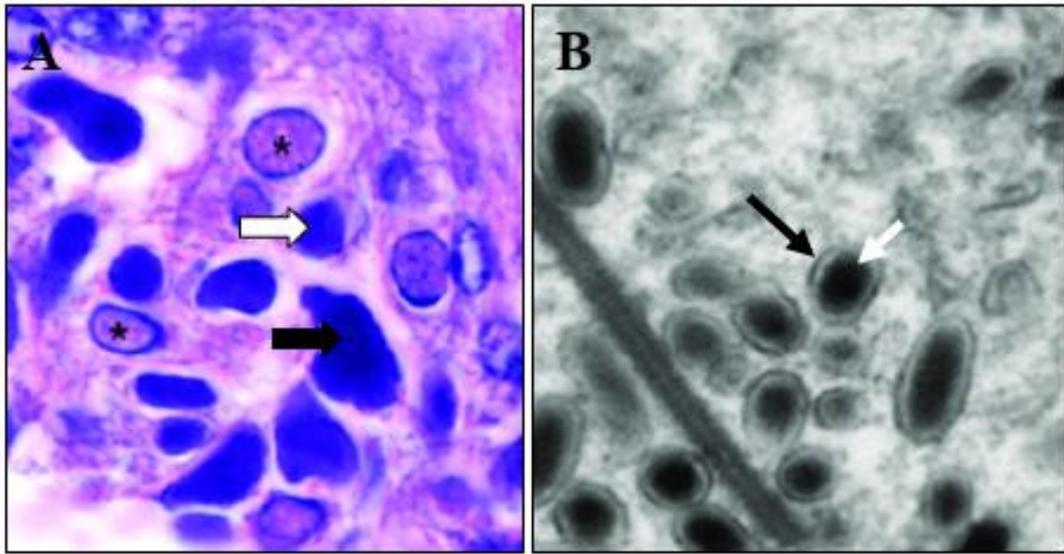
30

1  
2  
3  
4  
5  
6



7 **Figura 1- Alguns sinais clínicos desencadeados pela infecção com o WSSV.**  
8 Adaptado de Nunes e Feijó, 2017. **(A)** Depósitos de cálcio na carapaça **(B)** Expansão  
9 dos cromatóforos no leque caudal quando comparado a um camarão não infectado (lado  
10 direito).

11 Nas células infectadas, núcleos tornam-se hipertrofiados representados por  
12 corpos de inclusão nos tecidos afetados. Núcleos eosinófilos representam uma infecção  
13 em estágios iniciais enquanto núcleos basófilos uma infecção tardia. Os corpos  
14 intracelulares de inclusão são homogeneamente densos com hematoxilina e eosina. As  
15 inclusões nucleares são Feulgen positivas, e também se tem positividade com técnica de  
16 PAS. Além disso, as células infectadas são caracterizadas pela presença de núcleos  
17 hipercromáticos (Figura 2A) (Lightner, 2011). Com relação a morfologia do vírus, os  
18 vírions são grandes e assumem um formato de bastão compostos por um nucleocapsídeo  
19 envolto por um capsídeo trilaminar (Figura 2B) (Durand et al., 1997; Zhan & Wang,  
20 1998). Levando em consideração as vias de transmissão do vírus, estas podem ser  
21 através do canibalismo, consumo de tecido infectados, através de esporos presentes na  
22 água e de mãe para filho (dos reprodutores para as larvas (Nunes & Feijó, 2017). Além  
23 disso, os camarões não são os únicos hospedeiros do WSSV mas também outros  
24 decápodes e copépodos. Ainda, o vírus pode persistir em camarões congelados e ser  
25 transmitidos também depois de cozidos (Durand et al., 2000; Caro et al., 2020).

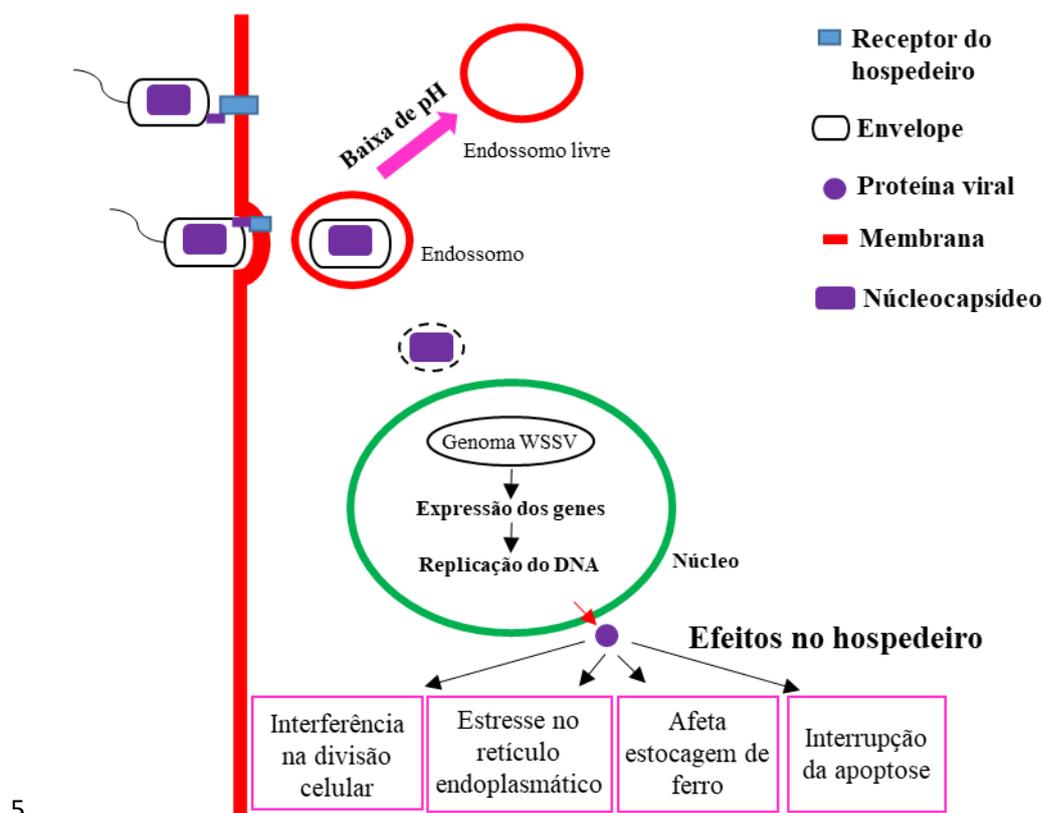


1

2 **Figura 2 – Infecção do WSSV nas células do camarão *L.vannamei*** (Verbruggen et  
 3 al., 2016). (A) Lâmina de hematoxilina-eosina demonstrando a inclusão viral em  
 4 diferentes estágios. \* Inclusão eosinófia expandindo para preencher o núcleo. Seta  
 5 branca representa a progressão da infecção na qual se torna basófila. Já na seta preta,  
 6 representa os núcleo desintegrando e fusionando com o citoplasma (estágio mais  
 7 avançado da infecção). Barra de escala=10 µm. (B) Os virions assumem uma forma  
 8 ovóide. Seta branca representa o nucleocapsídeo dentro de um envelope trilaminar (seta  
 9 preta) Barra de escala=100 µm.

10 A entrada do WSSV nas células hospedeiras basicamente se dá pela interação de  
 11 proteínas do capsídeo viral com os receptores do hospedeiro. Dessa forma, proteínas  
 12 como VP28, VP24, VP26 e VP19 são alvo de estudos ao combate dessa doença. A  
 13 VP28 é a maior proteína presente no envelope nuclear, sendo a principal responsável  
 14 pela interação entre o vírus e a célula hospedeira. Por esse motivo, é umas das proteínas  
 15 mais utilizadas nos estudos demonstrando proteção aos animais desafiados (Hulten et  
 16 al., 2001; Sarathi et al., 2008). Após interação, o vírus penetra na célula do animal  
 17 através de endocitose até chegada ao núcleo onde acontece sua replicação. Neste  
 18 momento ele utiliza maquinarias assim como fontes energéticas do próprio hospedeiro  
 19 para produção das proteínas virais. Essa invasão, pode ocasionar uma série de efeitos  
 20 nas células dos hospedeiros como interrompimento do ciclo celular, estresse no retículo  
 21 endoplasmático devido a alta produção de proteínas virais, a inibição da ligação da

1 ferritina ao ferro impedindo que o animal retenha esse nutriente e o interrompimento do  
 2 processo de apoptose o que é um mecanismo imune contra a replicação viral ( Leu et  
 3 al., 2013; Verbruggen et al., 2016) (Figura 3). O WSSV imunodeprime os animais  
 4 comprometendo o sistema imune e deixando-os suscetíveis a outras doenças.



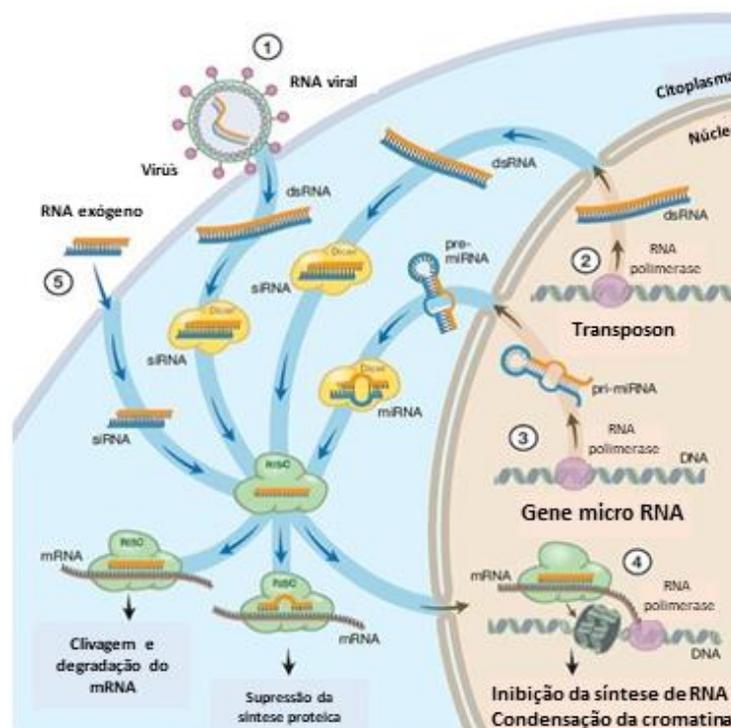
13 Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de combater essa  
 14 virose como, a utilização da proteína VP28, utilização de microRNAs, ações de manejo  
 15 de produção, seleção de reprodutores e larvas livres dessas doenças e estudos de  
 16 indução do sistema imune (Janewanthanakul et al., 2020; Rahman et al., 2018,  
 17 Taengchaiyaphum et al., 2017, Wang & Zhu 2018). O grande problema que circunda o

1 desenvolvimento de uma forma de combate eficiente contra o WSSV é a inexistência de  
2 um sistema imune adaptativo em crustáceos, ou seja, não possuem a capacidade de  
3 memória celular. Entretanto, Kurtz e Franz (2003) sugerem a existência de uma  
4 memória imunológica específica no copépode *Macrocyclus albidus*. Para o combate  
5 aos patógenos grande parte dos invertebrados (incluindo os crustáceos) depende apenas  
6 do sistema imune inato composto por uma defesa celular e humoral. A defesa humoral  
7 consiste na produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs), reações intermediárias de  
8 oxigênio ou nitrogênio e o complexo de cascata enzimático que regula a coagulação ou  
9 melanização da hemolinfa. Já a defesa celular, é composta por tipos de hemócitos  
10 responsáveis por realizar a fagocitose de microrganismos ou encapsulação e reações  
11 citotóxicas (Jiravanichpaisal et al., 2006). Alternativamente, existe um mecanismo  
12 natural chamado RNA de interferência que é capaz de degradar moléculas virais a partir  
13 de duplas fitas de RNA específicas impedindo a replicação viral.

### 14 1.3 RNA de interferência (RNAi)

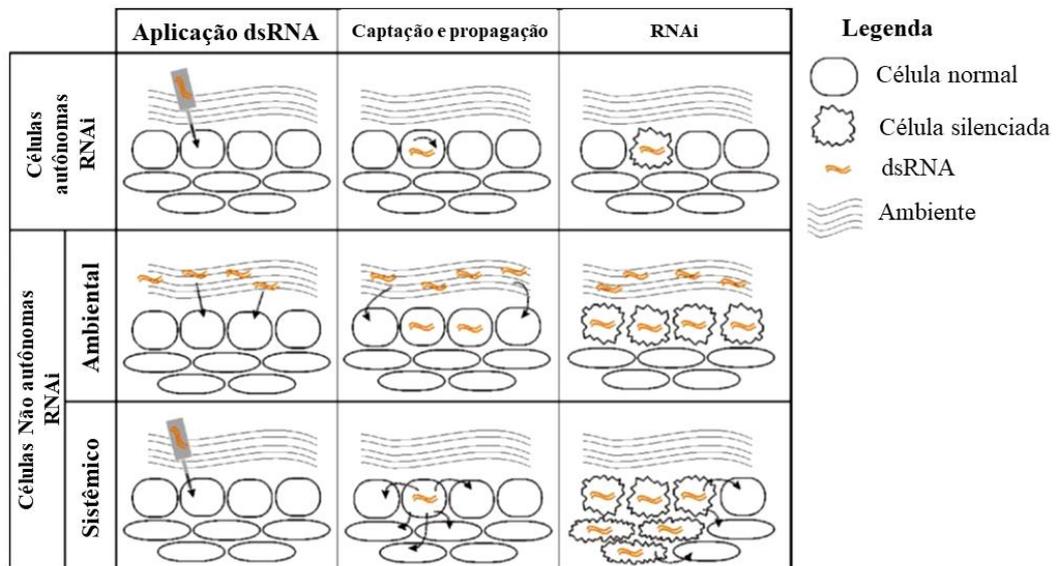
15 O RNAi baseia-se no controle de expressão gênica através do silenciamento  
16 gênico pós-transcricional com a utilização de duplas fitas de RNA endógenas ou  
17 exógenas (miRNAs ou dsRNAs) degradando por homologia o RNA mensageiro alvo  
18 (Figura 4) (Itsathitphaisarn et al., 2017). Esse mecanismo é conservado em eucariotos  
19 como plantas, artrópodos e mamíferos o qual foi descoberto primeiramente no verme  
20 *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998). As dsRNAs, primeiramente são clivadas pela  
21 RNase III Dicer em fragmentos de aproximadamente 22 nucleotídeos os chamados  
22 “*small interfering*” RNAs (siRNAs) para posteriormente atuarem no “*RNA-induced*  
23 *silencing complex*” (complexo RISC) (Bernstein et al., 2001; Hammond et al., 2001).  
24 Este complexo é composto por uma enzima chamada Argonauta (Ago) a qual possui  
25 atividade catalítica utilizando a fita não codificadora do siRNA para encontrar o mRNA  
26 complementar para a clivagem do mesmo (Wilson & Doudna, 2013). Levando em  
27 consideração as dsRNAs exógenas, já foi identificado que estas são internalizadas até o  
28 citoplasma das células através de uma proteína transmembrana chamada “*systemic RNA*  
29 *interference defective*” (Sid1) (Shih & Hunter, 2011). Em *L. vannamei* todas as  
30 proteínas que atuam no mecanismo de RNAi (Lv-Dicer, Lv-Ago e Lv-Sid1) já foram  
31 identificadas e caracterizadas (Chen et al., 2011; Labreuche et al., 2010).

1 Em insetos existem dois tipos de células que envolvem os diferentes  
 2 mecanismos de RNAi, as células autônomas e não autônomas. Nas células autônomas o  
 3 silenciamento pelas dsRNAs é limitado ao local em que foi injetada essas moléculas, já  
 4 nas células não autônomas, a interferência acontece não somente no local em que está  
 5 em contato com as dsRNAs onde o sinal é passado para outras células e tecidos. Sendo  
 6 assim outros dois conceitos de RNAi surgiram como RNAi ambiental e RNAi  
 7 sistêmico. O RNAi ambiental acontece pela absorção das dsRNAs do ambiente como  
 8 por exemplo absorvidas do lúmen intestinal. O RNAi sistêmico leva em consideração a  
 9 passagem do sinal de silenciamento entre as células e também entre tecidos, o que  
 10 indica que a interferência não acontece somente na célula na qual foi colocada em  
 11 contato com as dsRNAs (Huvenne & Smaghe, 2010) (Figura 5).



12

13 **Figura 4 - Mecanismo de RNAi na degradação do RNA endógeno e exógeno** (Fire  
 14 & Mello, 2006). Atuação da enzima Dicer e do complexo RISC. (1) Destruição do RNA  
 15 viral invasor, (2) Eliminação de elementos de transposição, (3) Síntese endógena de  
 16 pequenos RNAs, (4) Silenciamento da transcrição pelo RNAi e (5) maquinaria também  
 17 utilizada em siRNAs exógenos introduzidos experimentalmente.



1

2 **Figura 5 - Mecanismos de RNAi em células autônomas e não autônomas**  
 3 **envolvendo RNAi sistêmico e RNAi ambiental** (adaptado de Huvenne & Smaghe,  
 4 2010). A primeira linha representa as células autônomas do RNAi onde uma molécula  
 5 de dsRNA é aplicada a uma célula normal acontecendo o silenciamento apenas nesta  
 6 célula. No RNAi ambiental (linha seguinte) a dsRNA é absorvida do ambiente celular  
 7 onde o efeito de silenciamento acontece em todas as células que podem absorver essa  
 8 molécula. Já o RNAi sistêmico (última linha) abrange os processos pelos quais o sinal  
 9 de silenciamento é passado da célula que o dsRNA é aplicado para outras células.

10 Dessa forma, o mecanismo de RNAi tem sido alvo de pesquisas como uma  
 11 ferramenta ao combate de doenças como a WSS com a utilização de dsRNAs  
 12 relacionadas a algum gene viral. Uma das regiões mais utilizadas para a produção das  
 13 dsRNAs é o gene codificador da proteína VP28 por ser uma das atuantes na interação  
 14 patógeno-hospedeiro. Esta já vem demonstrando resultados no aumento da proteção  
 15 contra o WSSV (Taengchaiyaphum et al., 2017). Dessa maneira, diferentes estudos são  
 16 desenvolvidos a fim de descobrir a melhor metodologia de produção e entrega das  
 17 dsRNAs ao camarões. Dentre esses, está a produção sintética através de Kits comerciais  
 18 pelo método de injeção intramuscular (Feijó et al., 2015) ou até mesmo utilizando  
 19 microorganismos geneticamente modificados para a produção dessas moléculas sendo  
 20 essas purificadas ou o próprio organismo administrado na alimentação como a  
 21 *Escherichia coli* HT115 (Posiri et al., 2013; Attasart et al., 2013) e com a microalga

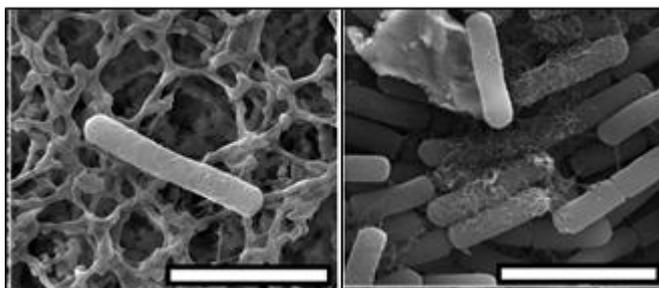
1 *Chlamydomonas reinhardtii* (Charoonnart et al., 2019). Ambas metodologias resultaram  
2 positivamente na proteção contra viroses. Porém a utilização de Kits comerciais  
3 encarece o processo, além disso a injeção intramuscular é inviável em larga escala. Com  
4 relação aos organismos, a utilização de bactérias gram-negativas como *E. coli* pode  
5 causar alguma patogenicidade ao consumidor (Siddhnath et al., 2018) e a utilização da  
6 microalga torna o método laborioso tendo em vista a não colonização intestinal desses  
7 organismos no camarão *L. vannamei*. Uma outra alternativa é a utilização de  
8 organismos probióticos modificados geneticamente para produção das moléculas  
9 antivirais demonstra uma alternativa promissora frente ao cenário atual visto as  
10 propriedades benéficas que estes microrganismos podem proporcionar aos camarões  
11 além de fácil manipulação genética.

#### 12 1.4 A utilização de probióticos na carcinocultura

13 A palavra probiótico vem do Latim “*pro*” que significa a favor e “*bios*” que  
14 significa vida; probióticos são microrganismos vivos que quando utilizados melhoram a  
15 saúde do hospedeiro (Banerjee & Ray, 2017; Newaj-Fyzul et al., 2014). O combate às  
16 doenças nos cultivos é constante, onde qualquer alteração em parâmetros como pH,  
17 oxigênio dissolvido, dióxido de carbono entre outros, podem facilitar o crescimento de  
18 patógenos (Banerjee & Ray, 2017). Sendo assim, os estudos com probióticos, floresceu  
19 em resposta a preocupação com o uso frequente de antibióticos os quais acabam  
20 propiciando resistência nessas bactérias patogênicas, as quais podem ser transmitidas  
21 para humanos devido à ingestão desses animais contaminados (Banerjee & Ray, 2017;  
22 Tanwar et al., 2014). O uso contínuo desses antibióticos acaba fazendo com que as  
23 bactérias naturais da flora desses animais sejam mortas afetando todo o sistema  
24 imunológico, fisiológico e nutricional destes, deixando-os vulneráveis a muitas doenças  
25 (Banerjee & Ray, 2017; Maynard et al., 2012).

26 Pesquisas vem evidenciando os benefícios no uso dos probióticos no camarão *L.*  
27 *vannamei*. Melhorias no crescimento, na resposta imune, qualidade da água do cultivo,  
28 como também na resistência a doenças entre outras já vêm sendo relatadas por alguns  
29 pesquisadores (Xie et al., 2019; Kewcharoen & Srisapoome, 2019). Na criação de  
30 peixes, microrganismos do gênero *Bacillus* proveram um aumento do crescimento,  
31 maior utilização da ração, melhoria na resposta imune, proteção contra doenças, bem

1 como melhoria na qualidade de água (Kuebutornye et al., 2019). *Bacillus subtilis* é uma  
2 das espécies listadas e consideradas como probiótica de acordo com “*Generally*  
3 *Recognized as Safe*” (GRAS). Esta bactéria é gram-positiva não patogênica, aeróbica,  
4 produtora de endósporos, comumente encontrada no solo e formadoras de biofilme  
5 (Wang et al., 2015; Romero, 2013) (Figura 6).



6

7 **Figura 6 – Morfologia de *B. subtilis*** (Adaptado de Wahlen et al., 2018). *B. subtilis* no  
8 processo de formação de biofilme. As barras de escala no canto inferior de cada imagem  
9 representam 3µm.

10 Segundo Hostins et al. (2017), a utilização de *B. subtilis* juntamente com uma  
11 mistura comercial utilizado na dieta do camarão *L. vannamei* além de ser eficaz na  
12 diminuição da densidade de *Vibrio* sp., possui a capacidade de colonizar o trato  
13 intestinal desses animais. Além disso, a cepa 168 desse microrganismo foi a primeira  
14 não patogênica manipulada geneticamente (Anagnostopoulos & Spizizen, 1960). Sua  
15 manipulação genética é considerada relativamente simples devido a natural capacidade  
16 de tornar-se competente a fim de receber DNAs exógenos pela ativação de genes de  
17 competência como os genes *comK* e *comS* (Anagnostopoulos & Spizizen, 1960;  
18 Hamoen et al., 2003). Dessa maneira, é atualmente utilizado na produção de compostos  
19 de interesse industrial (Wang et al., 2019), como também na produção de proteínas  
20 heterólogas de interesse na aquicultura (Santos et al., 2019). Porém apesar da facilidade  
21 na manipulação genética para a produção de proteínas recombinantes, para a  
22 manipulação com finalidade de produção de dsRNAs é necessário a deleção do gene *rnc*  
23 presente nessa bactéria. Esse gene codifica para uma ribonuclease do tipo III  
24 responsável pela clivagem de duplas fitas de RNA (Durand et al., 2012) o que pode  
25 impossibilitar a produção dessas moléculas se este gene não for deletado. Segundo  
26 Durand et al. (2012), esse gene para *B. subtilis* possui uma função antiviral protegendo

1 este organismo contra a expressão de toxinas produzidas por profagos através do  
2 mecanismo antisense.

## 3 **2 OBJETIVOS**

### 4 *2.1 Objetivo geral*

5 O presente trabalho teve como objetivo geral a validação do probiótico *B.*  
6 *subtilis* manipulado para produção de dsRNAs na ativação do mecanismo de RNAi e a  
7 sua atuação no controle da replicação viral do WSSV no camarão *L. vannamei*.

### 8 *2.2 Objetivos específicos*

- 9 **(I)** Otimização da produção das dsRNAs pelo probiótico *B. subtilis* manipulado;  
10  
11 **(II)** Purificação e validação das dsRNAs na ativação do mecanismo de RNAi  
12 pelas dsRNAs produzidas pelo probiótico através de expressão gênica nos  
13 hemócitos do camarão *L. vannamei*;  
14  
15 **(III)** Validação do probiótico administrado vivo na dieta do camarão *L. vannamei*  
16 na ativação do mecanismo de RNAi através da expressão gênica nos  
17 hemócitos;  
18  
19 **(IV)** Desafio viral com camarões previamente alimentados com o probiótico a fim  
20 de avaliar a taxa de sobrevivência, carga viral e a presença de inclusões  
21 virais na cutícula, brânquias e epitélio gástrico.  
22  
23  
24  
25  
26  
27

## 1 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 2 3.1 Universidades envolvidas

3 Universidade Federal do Rio Grande (FURG): Foram realizados os ensaios da  
4 validação da ativação do RNAi pelas dsRNAs e pelo probiótico no Laboratório de  
5 Carcinocultura e as análises histopatológicas no Laboratório de Imunologia e Patologia  
6 de Organismos Aquáticos (LIPOA), ambos localizados na Estação Marinha de  
7 Aquacultura (EMA) do Instituto de Oceanografia (IO). As análises moleculares foram  
8 realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas  
9 (ICB).

10 Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC): O ensaio de desafio viral foi  
11 realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada a Aquicultura pertencente ao  
12 Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, o qual possui autorização  
13 da CIDASC (Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina)  
14 para realizar ensaios com WSSV (ofício número 0274/GAB, emitido em 27/03/2013).

15 Universidade Federal do Ceará (UFC): As análises de carga viral foram  
16 realizadas no Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos  
17 (CEDECAM) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR).

### 18 3.2 Obtenção das cepas e manutenção dos animais

19 Foram utilizadas duas cepas variantes da espécie *Bacillus subtilis* 168 (KM0 (Bs)  
20 e JJBs3 (Bs/dsRNA)). A cepa KM0 foi utilizada no experimento como cepa controle, a  
21 qual não foi manipulada para a produção das dsRNAs. Brevemente, para gerar a cepa  
22 JJBs3 foi utilizada a cepa KM0 para a inserção de genes de competência, seguida de  
23 deleção do gene *mnc* que codifica para uma RNase III que degrada duplas fitas de RNA.  
24 Em seguida, foi inserida uma construção genética constituída pelo promotor  
25 bidirecional P<sub>ylb</sub> controlando a expressão do gene VP28 do WSSV. A manipulação da  
26 cepa foi realizada por Costa Filho (2019). O promotor P<sub>ylb</sub> é caracterizado por controlar  
27 o gene *ylbP*, expresso na fase estacionária de crescimento, que codifica para a N-  
28 acetiltransferase, enzima que atua na modificação pós-traducional em *B. subtilis* (Yu et  
29 al., 2015).

1 Os camarões utilizados foram oriundos da Estação Marinha de Aquicultura  
2 (FURG) onde estavam sendo criados em sistema de bioflocos. As pós-larvas foram  
3 oriundas da empresa Aquatec (Canguaretama, RN), da linhagem Speed Line. Todos os  
4 experimentos foram realizados em água clara onde os animais foram aclimatados  
5 previamente ao início dos tratamentos e averiguados parâmetros físicos e químicos da  
6 água durante todo o período experimental. Além disso, foi realizada troca de água diária  
7 de acordo com a necessidade de cada experimento mantendo os níveis dos compostos  
8 nitrogenados abaixo dos níveis mínimos de tolerância dos animais. A alimentação foi  
9 fornecida diariamente duas vezes ao dia com a ração para camarões juvenis da empresa  
10 Guabi de acordo com 5% da biomassa. Para as coletas, os animais foram finalizados  
11 através do método de hipotermia.

### 12 3.3 Enriquecimento do meio de cultivo em diferentes condições de nutrientes para 13 produção das dsRNAs

14 Com o intuito de avaliar o meio no qual favorece melhor condição nutricional  
15 para a produção das dsRNAs, a cepa JJBs3 foi cultivada em meio *minimal salts* de  
16 Anagnostopoulos & Spizizen (1960) utilizado nos protocolos de transformação de *B.*  
17 *subtilis* com a utilização de glicose e hidrolisado de caseína sendo cultivados *overnight*  
18 a 37°C e 250 rpm. No dia posterior foi preparado o mesmo meio, porém contendo  
19 diferentes concentrações de glicose e hidrolisado de caseína sendo a primeira  
20 concentração glicose 0,5% e hidrolisado de caseína 0,02% (concentração normal), duas  
21 vezes (glicose 1% e hidrolisado de caseína 0,04%) e quatro vezes concentrado (glicose  
22 2% e hidrolisado de caseína 0,08%). Para a produção das dsRNAs, o inóculo da cepa  
23 cultivada anteriormente foi utilizado diluindo os novos cultivos até densidade ótica  
24 (OD<sub>600nm</sub>) 0,1 e cultivados *overnight* a 37°C e 250 rpm. A extração das dsRNAs foi  
25 através do método já utilizado em *Escherichia coli* HT115 (Attasart et al., 2011), com  
26 acréscimo de lisozima a 20 mg/mL na etapa de lise celular (Kit Purelink Genomic  
27 DNA). As amostras foram observadas em gel de agarose 1%, a quantificação foi feita  
28 pelo programa 1 DscanEX (licença Scanalytics, Rockville, MD) e a análise estatística  
29 pelo teste-t de Student's (p<0,05).

### 30 3.4 Validação das dsRNAs na ativação do mecanismo de RNAi

1 Este experimento foi realizado para averiguar o potencial das dsRNAs  
2 produzidas pelo probiótico na ativação do mecanismo de RNAi. Para isto, a cepa JJBs3  
3 foi cultivada nas mesmas condições utilizadas no ítem acima descrito, porém na  
4 condição de quatro vezes concentrado de glicose e hidrolisado de caseína, assim como a  
5 mesma metodologia na extração das dsRNAs foi utilizada. Após extração, as dsRNAs  
6 foram diluídas em solução salina (NaCl 10 mM, Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM) e  
7 injetadas intramuscularmente nos animais 100 µL na proporção de 3 µg/g de camarão.  
8 Este experimento de injeção baseou-se em dois tratamentos em triplicata em tanques de  
9 150 litros contendo 30 animais cada tanque com peso médio de 10 gramas. Dessa  
10 forma, os tratamentos foram divididos em grupo controle, no qual foi injetado somente  
11 solução salina, e o grupo injetado com as dsRNAs extraídas da cepa JJBs3. Sete dias  
12 após a injeção foi coletado 400 µL de hemolinfa de seis animais por tanque totalizando  
13 18 animais por tratamento em uma proporção de anticoagulante (SIC-EDTA) 1:1 e  
14 condicionadas no gelo para extração de RNA dos hemócitos.

### 15 3.5 Utilização das cepas de *B. subtilis* na alimentação do camarão *L. vannamei*

16 Este experimento teve a finalidade de avaliar a ativação, pelo probiótico, do  
17 sistema de RNAi nos hemócitos do camarão. Para isso, o probiótico foi administrado na  
18 dieta dos camarões seguindo o seguinte desenho experimental: três tratamentos em  
19 triplicata com 40 animais em cada tanque de 150 litros com camarões com média de  
20 peso de 6 gramas. Os grupos experimentais foram divididos em: 1) controle, o qual  
21 recebeu somente ração comercial umedecida com solução de NaCl 0,9%, 2) tratamento  
22 com a cepa *B. subtilis* KM0 (Bs) (controle negativo na ativação dos genes) e, 3) o grupo  
23 com a cepa JJBs3 (Bs/dsRNA) na ração. Para o preparo da ração contendo os  
24 probióticos, as duas cepas KM0 e JJBs3 foram cultivadas nas mesmas condições  
25 descritas no ítem 3.3 com a utilização de glicose e hidrolisado de caseína quatro vezes  
26 concentrado em relação a concentração normal. Após o cultivo, foi verificado a OD<sub>600nm</sub>  
27 e padronizadas ambas as cepas para 1,6 a qual foi centrifugada a 5000 g por 10 min a  
28 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foi acrescentado 2 mL de  
29 solução salina (NaCl 0,9%) para lavagem do *pellet* repetindo esse processo duas vezes  
30 (método adaptado de Zokaefar et al. (2012)). Posteriormente à lavagem, foi adicionado  
31 ao *pellet* 10% de solução salina em relação a quantidade de ração sendo suficiente para  
32 umedecê-la. A quantidade do probiótico homogeneizada na ração baseou-se na

1 proporção da quantidade de ração ofertada aos animais, sendo assim 2 mL para cada  
2 grama de ração, ofertando sempre 5% da biomassa dos camarões. Este processo foi  
3 executado diariamente garantindo, assim, a entrega do máximo de probiótico vivo aos  
4 animais.

5 Após 15 e 30 dias, foi coletada hemolinfa de 18 camarões por tratamento. No  
6 primeiro e no último dia experimental também foram realizadas biometrias de todos os  
7 animais.

### 8 *3.6 Extração de RNA dos hemócitos, síntese do cDNA e expressão gênica*

9 Imediatamente após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 2.500 g a 4°C  
10 por 20 min para obtenção dos hemócitos. Logo após, o sobrenadante foi descartado e  
11 adicionado ao *pellet* 1 mL de Trizol (Life technologies, Brasil), seguindo o protocolo do  
12 fabricante para extração de RNA total. O RNA extraído foi tratado com DNase I  
13 (Invitrogen, Brasil) e, posteriormente, quantificado por espectrofotometria (Biodrop,  
14 Isogen). Para obtenção do cDNA foi utilizado o *High Capacity cDNA Reverse*  
15 *Transcription kit* (Applied Biosystems, Brasil).

16 As análises de expressão gênica, foram realizadas de acordo com Livak e  
17 Schmittgen (2001), utilizando os *primers* descritos por Feijó et al. (2015), mostrados na  
18 Tabela 1. Anterior às análises de expressão gênica, foi realizada a eficiência dos *primers*  
19 em diluições seriadas. A diluição escolhida do cDNA foi de 2 vezes e as reações, tanto  
20 de eficiência quanto de expressão, foram realizadas com o *PowerUP SYBR Green*  
21 *Master Mix kit* (Applied Biosystems, Brasil), seguindo a programação de 50°C/2 min,  
22 95°C/2 min seguido de 40 ciclos de 95°C/15 seg e 60°C/15 min. Os genes utilizados  
23 como normalizadores foram *β-actina* e *Eflα* e os genes alvo foram *sid1*, *dicer2* e  
24 *argonauta2*. Todas as reações foram realizadas na *7500 Real-time PCR system* (Applied  
25 Biosystems, Brazil). A estabilidade dos normalizadores foi analisada através do  
26 software *geNorm VBA applet for Microsoft Excel*. A expressão dos genes foi analisada  
27 através de ANOVA de uma via (p<0,05) seguida de Teste de Tukey, comparando as  
28 expressões de cada gene entre os tratamentos em cada tempo de coleta. Foi utilizado  
29 como teste de normalidade o Kolmogorov-Smirnov e de homocedasticidade o teste de  
30 Bartlett.

1

2 **Tabela 1** - Sequência dos *primers* utilizados nas reações de qPCR.

<i>Gene</i>	<i>Primer senso (5'-3')</i>	<i>Primer antisenso (5'-3')</i>	<i>Amplicon (pb)</i>	<i>GenBank</i>
<i>dicer2</i>	AGGAAATGCAATGTCGTGGTT	ACGAGCCCTCCCCCTAGATT	77	HQ541163
<i>sid1</i>	GAAGCGATTGGCAGTCTATGAAC	TGGAAGCCTATCTCTGCAACTTG	62	HM234688
<i>argonaute2</i>	GATGGCATGAAAGTCTGCAGTTG	TGCGCACGACCATCACTAAG	61	HM234690
<i>ef1a</i>	CCACCCTGGCCAGATTCA	GCGAACTTGCAGGCAATGT	75	DQ858921
<i>β-actin</i>	CATCAAGGAGAACTGTGCT	GATGGAGTTGTAGGTGGTCT	114	AF300705

3

### 4 *3.7 Desafio viral*

#### 5 *3.7.1 Pré-tratamento*

6 Anteriormente ao início do experimento, os animais foram analisados quanto a  
7 presença do WSSV, os quais demonstraram estar livres deste patógeno. Antes do  
8 desafio viral os animais foram pré-tratados com a cepa probiótica manipulada  
9 geneticamente durante 15 dias para ativação do mecanismo de RNAi. Para o preparo da  
10 ração a cepa JJBs3 foi cultivada nas mesmas condições descritas no item 3.5.

11 No ensaio, os animais de 3 g foram alocados em tanques de 150 litros onde  
12 foram divididos em dois grupos experimentais: grupo controle, aquele que recebeu  
13 somente ração comercial, e o grupo que recebeu o probiótico que produz as dsRNAs  
14 contra a virose. Esses animais foram pré-tratados durante o período de 15 dias na  
15 Estação Marinha de Aquicultura – EMA (FURG) até o momento da infecção. No grupo  
16 que recebeu a cepa, esta foi inserida na ração de acordo com o experimento anterior em  
17 uma proporção 2:1 (bactéria:ração). Passado esse período, os animais foram  
18 transportados por 800 km via terrestre até o Laboratório de Imunologia Aplicada a  
19 Aquicultura – LIAA (UFSC).

#### 20 *3.7.2 Manutenção dos animais utilizados e transporte*

21 Os parâmetros físico-químicos da água foram averiguados diariamente, a  
22 alimentação administrada foi de acordo com 5% da biomassa e as trocas de água foram  
23 realizadas a cada dois dias. Após o pré-tratamento (item 3.7.1), os animais foram

1 transportados para o Laboratório de Imunologia Aplicada a Aquicultura da UFSC. No  
2 dia do transporte, os animais foram aclimatados com baixa de temperatura gradual até  
3 aproximadamente 20°C. Paralelamente, foi preparada uma água tratada nesta  
4 temperatura para evitar o choque térmico no momento do ensacamento. Para o  
5 transporte os animais com peso médio de 3 gramas foram ensacados com 15 litros de  
6 água totalizando 25 animais por saco. Além disso, em cada saco foi injetado oxigênio.  
7 Quatro sacos por tratamento foram devidamente identificados e transportados com dois  
8 sacos em cada caixa de isopor para manter a temperatura em 20°C.

9 Na UFSC, foram preparados dois tanques de 150 litros para cada tratamento na  
10 pré-sala de infecção onde foi mantida a água com temperatura similar à do transporte.  
11 Após a chegada dos animais, primeiramente os sacos foram colocados dentro dos  
12 tanques para aclimação por 15 minutos para evitar estresse térmico para, então, a  
13 abertura dos sacos. Antes da liberação dos animais, foi realizada a mistura da água em  
14 que os animais estavam sendo transportados, com a água a nova para evitar um estresse  
15 osmótico devido a diferença de salinidade.

### 16 *3.7.3 Preparação do inóculo viral e infecção*

17 O inóculo viral foi preparado a partir do tecido de camarões infectados com o  
18 WSSV, de acordo com Prior et al (2003) e adaptado por Gonçalves et al (2014).  
19 Brevemente, foi utilizado tecidos abdominais de animais infectados, os quais foram  
20 homogeneizados com solução salina estéril (330 mM NaCl, Tris 10 mM, pH 7,4) (1:10  
21 p/v) com auxílio de um liquidificador manual. Essa mistura foi submetida a  
22 centrifugação a 2.000 g por 20 minutos a 4°C e após esse processo, o sobrenadante foi  
23 filtrado por um filtro de membrana de 0,45 µm. O inóculo utilizado no experimento foi  
24 previamente preparado e cedido pelo grupo do Laboratório de Imunologia Aplicada à  
25 Aquicultura da UFSC.

26 A carga viral escolhida para o desafio foi aquela que causa 50% de mortalidade  
27 em 7 dias de infecção de acordo com testes anteriores. Os tratamentos foram realizados  
28 em triplicata totalizando 36 animais por tratamento. Para a infecção, o inóculo puro foi  
29 diluído em Tris NaCl pH 7,2 de forma seriada até obter a diluição necessária. Um  
30 volume de 50 µL da diluição mais 50 µL de Tris NaCl foi injetada nos respectivos

1 tratamentos entre o segundo e o terceiro segmento abdominal. Após infecção, foi  
2 acompanhada a mortalidade.

### 3 *3.7.4 Coletas e análises*

4 Após 15 dias de alimentação com o probiótico, foi coletada hemolinfa de 12  
5 animais de cada tratamento para verificar se o sistema de RNAi estava ativo (análises de  
6 expressão de acordo com o item 3.6) e pleópodos para carga viral basal. No final do  
7 experimento, também foram coletados pleópodos e alguns animais para análises  
8 histológicas.

### 9 *3.7.5 Carga viral e histopatologia*

10 Para análise de carga viral, os pleópodos foram coletados e armazenados em  
11 etanol 70%. O DNA foi extraído com o protocolo padrão PCI-proteinase K (Sambrook  
12 et al., 1989) e quantificados pelo Biodrop. Após quantificação, todas as amostras foram  
13 padronizadas em 100 ng/ $\mu$ L para então a realização da carga viral. As cópias do vírus  
14 foram quantificadas por qPCR Taqman. Cada reação teve um volume total de 10  $\mu$ L  
15 contendo 5  $\mu$ L Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen) 0.3  $\mu$ L  
16 PRIMER F (TGGTCCCGTCCTCATCTCAG) e 0.3  $\mu$ L PRIMER R  
17 (GCTGCCTTGCCGGAATTA) (10  $\mu$ m), 0.15  $\mu$ L da sonda Taqman FAM-  
18 AGCCATGAAGAATGCCGTCTATCACACA-TAMRA, 3.25  $\mu$ L de água e 1  $\mu$ L do  
19 DNA padronizado (Durand & Lightner, 2002). Similarmente preparado, o controle  
20 negativo ao invés do DNA foi adicionado 1  $\mu$ L de água. Para o controle positivo foi  
21 utilizado uma curva de diluição seriada  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  cópias  
22 utilizando o plasmídeo pTOPO-WSSV. Todas as amostras foram realizadas em  
23 duplicata.

24 Para histopatologia os animais foram injetados e armazenados com solução de  
25 Davidson (11,5% de ácido acético, 22% de formalina, 33% de etanol) por 48 horas  
26 depois de transferidos para álcool 70%. O tecido foi desidratado com o uso de álcool em  
27 concentrações crescentes, clarificadas em xileno e incorporados em parafina a 60°C.  
28 Regiões do cefalotórax como brânquias, hepatopâncreas, assim como segmentos do  
29 abdômen foram selecionados e encaminhados para o preparo e coloração com

1 hematoxilina-eosina (Bell & Lightner, 1988) para visualização dos corpos de inclusão  
2 do WSSV (Lightner, 2011).

### 3 *3.7.6 Análises estatísticas*

4 As análises estatísticas das expressões gênicas foram realizadas teste-t de  
5 Student ( $p < 0,05$ ). A carga viral foi analisada por ANOVA de uma via ( $p < 0,05$ ), seguida  
6 de Teste de Tukey. Foi utilizado como teste de normalidade o Kolmogorov-Smirnov e  
7 de homocedasticidade o teste de Bartlett. Já para os dados de mortalidade foi aplicado o  
8 teste de Long-Rank estimado pela metodologia Kaplan-Meier para curva de  
9 sobrevivência.

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

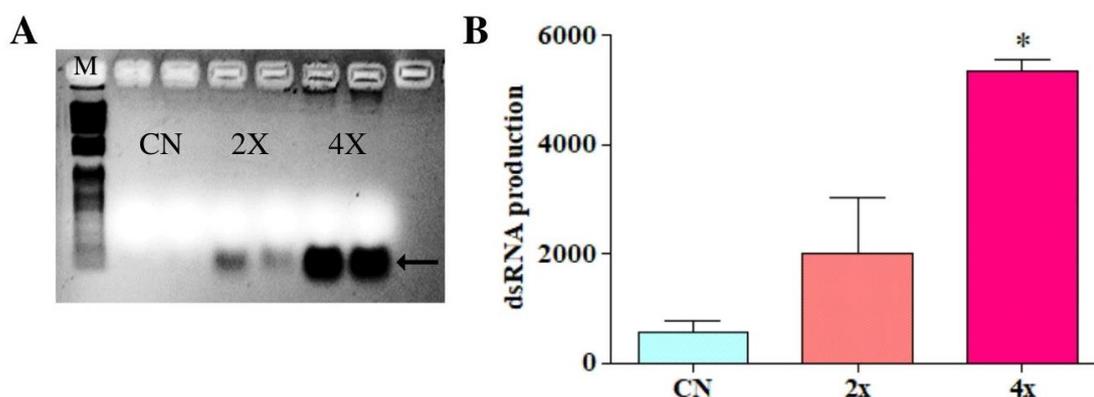
23

24

## 1 4 RESULTADOS

### 2 4.1 Enriquecimento do meio de cultivo em diferentes condições de nutrientes para 3 produção das dsRNAs

4 Os resultados demonstraram que entre a concentração normal e duas vezes  
5 concentrada não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ). Quando comparado a  
6 concentração de duas e quatro vezes, os dados mostraram-se significativamente  
7 diferentes ( $p<0,05$ ) com um aumento de duas vezes na produção das duplas fitas de  
8 RNA. Já na comparação entre a concentração normal e quatro vezes foi observado  
9 diferença significativa ( $p<0,05$ ) com aumento de dez vezes na produção das dsRNAs  
10 (Fig. 7).



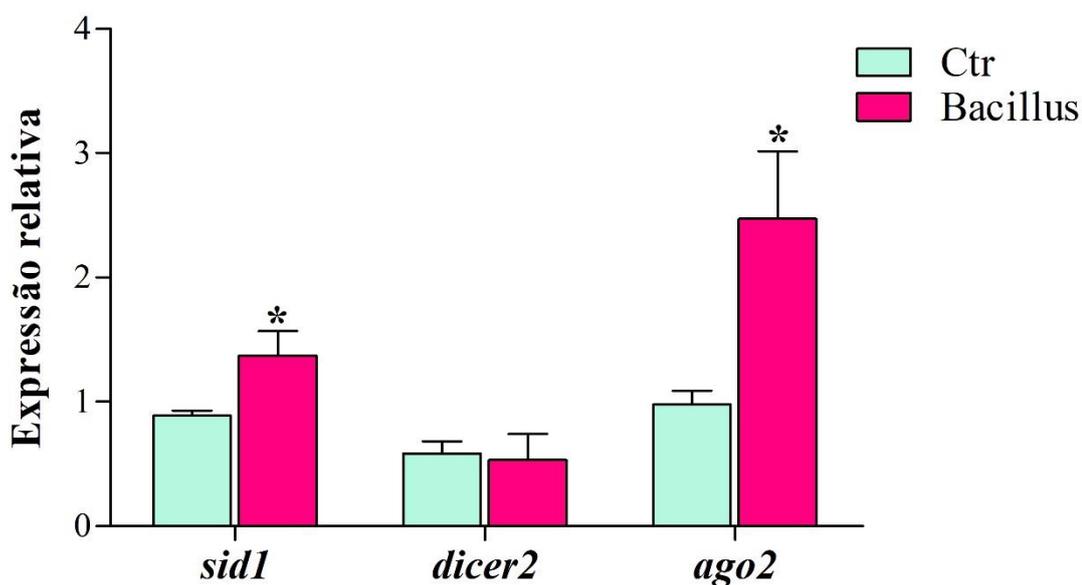
11

12 **Figura 7: Produção das dsRNAs em diferentes condições nutricionais.** (A) Foto do  
13 gel de eletroforese no qual foi utilizado o marcador 1 kb plus (M) para comparar o  
14 tamanho das dsRNAs. CN representa a concentração normal de nutrientes (glicose 0,5%  
15 e hidrolisado de caseína 0,02%); 2x (glicose 1% e hidrolisado de caseína 0,04%); e 4x  
16 (glicose 2% e hidrolisado de caseína 0,08%); (B) Gráfico da quantificação das dsRNAs.  
17 As barras indicam a média da concentração das dsRNAs produzidas no determinado  
18 tratamento com desvio padrão. \* indica diferença estatística pelo teste-t de Student  
19 ( $p<0,05$ ).

### 20 4.2 Validação das dsRNAs na ativação do mecanismo de RNAi

21 Não foi observada nenhuma mortalidade durante todo o experimento, assim  
22 como também o crescimento dos animais não foi afetado pela injeção das dsRNAs.

1 Com relação às expressões gênicas, os genes *sid1* e *argonauta2* (*ago2*) foram induzidos  
2 1,5 e 2 vezes, respectivamente, em relação ao grupo controle. O gene *dicer2* não foi  
3 induzido pelas dsRNAs (Figura 8).



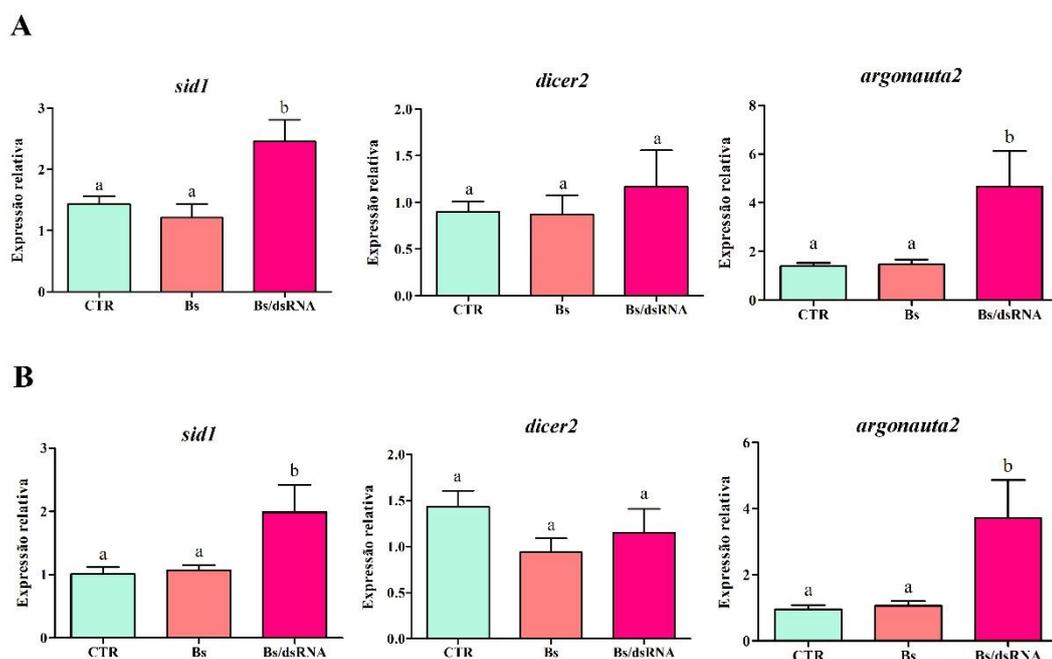
4  
5 **Figura 8 - Expressão relativa dos genes *sid1*, *dicer2* e *argonauta2* após 7 dias da**  
6 **injeção das dsRNAs no camarão *L. vannamei*. Ctr:** grupo controle no qual os animais  
7 foram injetados com solução salina (NaCl 0,9%); **dsRNA:** grupo no qual foram  
8 injetados com as dsRNAs purificadas produzidas pelo *B. subtilis*. As barras indicam a  
9 média da expressão de cada gene no determinado tratamento com erro padrão. \*  
10 indicam diferença significativa pelo teste-t de Student ( $p < 0,05$ ).

11

#### 12 4.3 Utilização das cepas de *B. subtilis* na alimentação do camarão *L. vannamei*

13 Durante todo o período experimental não foi observada mortalidade assim como  
14 o crescimento dos animais não foi afetado após 15 e 30 dias alimentados com ração  
15 suplementada com os probióticos em relação ao grupo controle. Após o período de 15  
16 dias nos quais foram administrados os probióticos aos camarões, o gene *sid1* e  
17 *argonauta2* foram induzidos no grupo tratado com a bactéria na qual produz as dsRNAs  
18 (Bs/dsRNA) quando comparado aos demais grupos, sendo *sid1* induzido 2 vezes e  
19 *argonauta2* 3,2 vezes. O gene *dicer2* não apresentou diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre  
20 os grupos (Figura 9A).

1 No final do experimento, após 30 dias, permaneceu o padrão de indução dos  
 2 genes *sid1* e *argonauta2*, onde *sid1* permaneceu significativamente 2 vezes mais  
 3 induzido e o *argonauta2* 3,8 vezes mais no grupo Bs/dsRNA quando comparado ao  
 4 demais grupos experimentais. O gene *dicer2* não demonstrou diferença estatística  
 5 ( $p>0,05$ ) (Figura 9B).  
 6

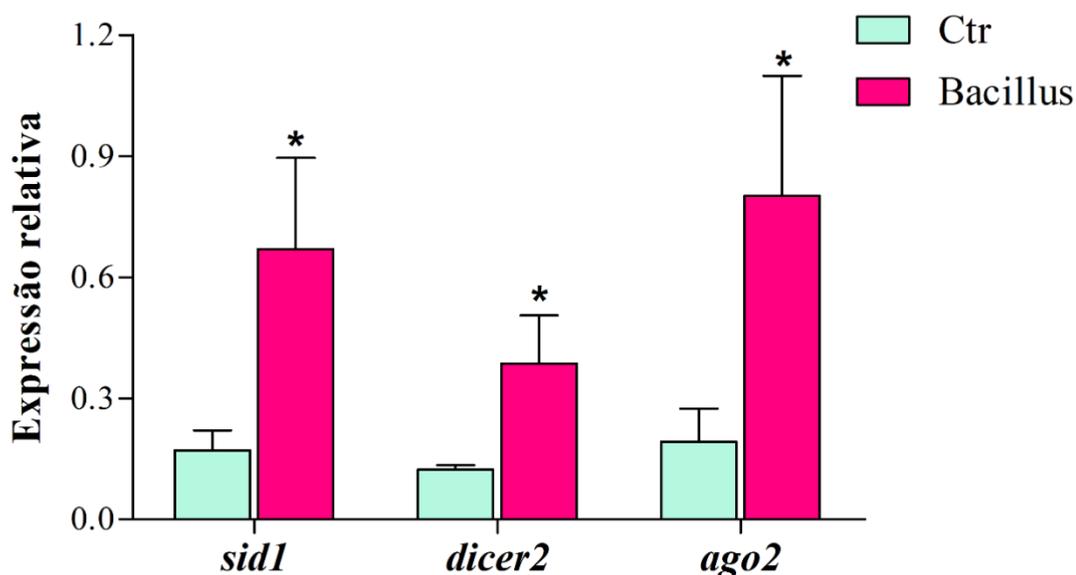


7  
 8 **Figura 9 - Expressão relativa dos genes *sid1*, *dicer2* e *argonauta2* de *L. vannamei***  
 9 **após 15 e 30 dias alimentados com os probióticos. (A)** Expressão 15 dias após  
 10 alimentação com os probióticos; **(B)** Expressão após 30 dias alimentação com os  
 11 probióticos. **Ctr:** grupo controle no qual não foi administrado nenhum dos probióticos;  
 12 **Bs:** grupo alimentado com probiótico sem produção das dsRNA e **Bs/dsRNA:** grupo  
 13 que recebeu o probiótico produtor das dsRNAs contra o vírus. As barras indicam a  
 14 média de cada gene no determinado tratamento com erro padrão. Letras diferentes  
 15 indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ).

#### 16 4.4 Desafio viral

##### 17 4.4.1 Expressão dos genes do mecanismo de RNAi

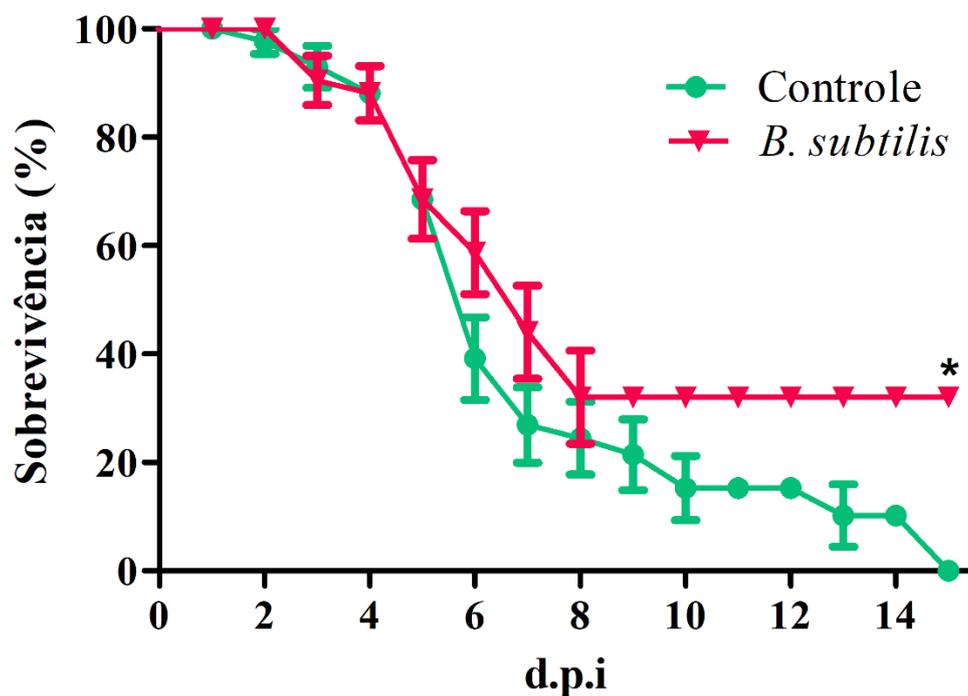
1 Após o período de 15 dias alimentando os animais com o probiótico foi possível  
2 confirmar a ativação do mecanismo de RNAi. O gene *sid1* foi 4 vezes mais induzido no  
3 grupo tratado com o probiótico com relação ao grupo controle e os genes *dicer2* e  
4 *argonauta2* foram 3 e 4 vezes induzidos, respectivamente (Figura 10).



5 **Figura 10 - Expressão relativa dos genes relacionados ao mecanismo de RNAi. Ctr:**  
6 grupo controle no qual foi alimentado apenas com ração comercial. **Bacillus:** o grupo  
7 que recebeu o probiótico manipulado para produção das dsRNA. As barras indicam as  
8 médias dos valores de expressão com erro padrão. \* indicam diferença significativa pelo  
9 teste-t de Student ( $p < 0,05$ ).

#### 10 4.4.2 Sobrevivência e carga viral

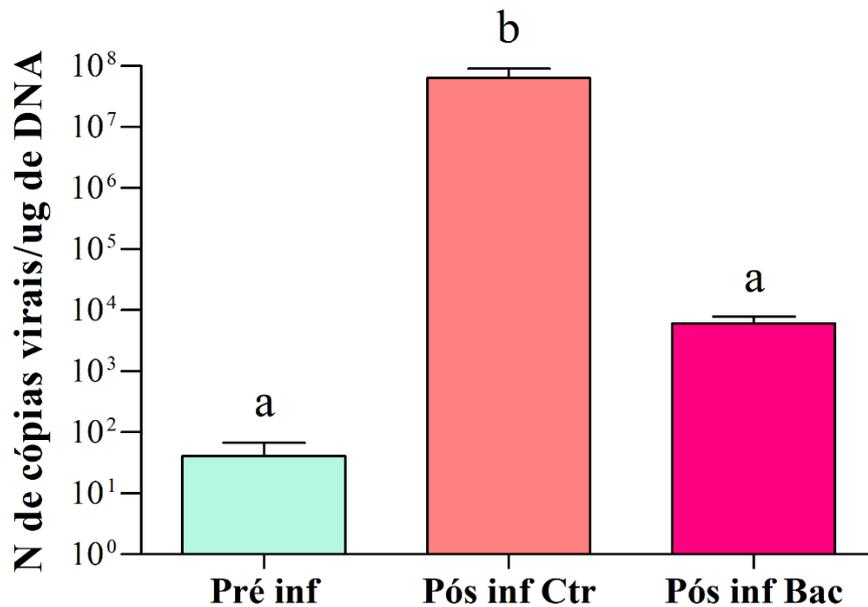
11 No grupo tratado com a cepa probiótica foi observada sobrevivência de 34%. No  
12 grupo controle, como esperado, foi observado 100% de mortalidade em 15 dias após  
13 infecção, enquanto que no grupo tratado foi observada uma estabilização da mortalidade  
14 a partir de 9 dias após a infecção, seguindo sem mortes até o final do experimento. No  
15 último dia foi observada uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos  
16 (Figura 11).



1

2 **Figura 11 - Curva de sobrevivência após infecção com o WSSV. D.p.i** significa dias  
 3 pós infecção. \* Indica diferença significativa. Teste de Long-Rank estimado pela  
 4 metodologia Kaplan-Meier.

5 As análises de carga viral demonstraram que o tratamento que recebeu a cepa  
 6 probiótica foi capaz de diminuir a replicação viral não demonstrando diferença  
 7 estatística com o grupo pré-infecção (Figura 12).



1

2 **Figura 12 - Carga viral desafio WSSV.** **Pré inf** significa a carga viral dos animais  
 3 antes da infecção; **Pós inf Ctr** representam os animais do grupo controle após a  
 4 infecção e **Pós inf Bac** representa o grupo de animais que foram infectados e que  
 5 receberam o probiótico manipulado para a produção das dsRNAs antivirais. As barras  
 6 representam as médias das cargas virais. Letras diferentes indicam diferença  
 7 estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

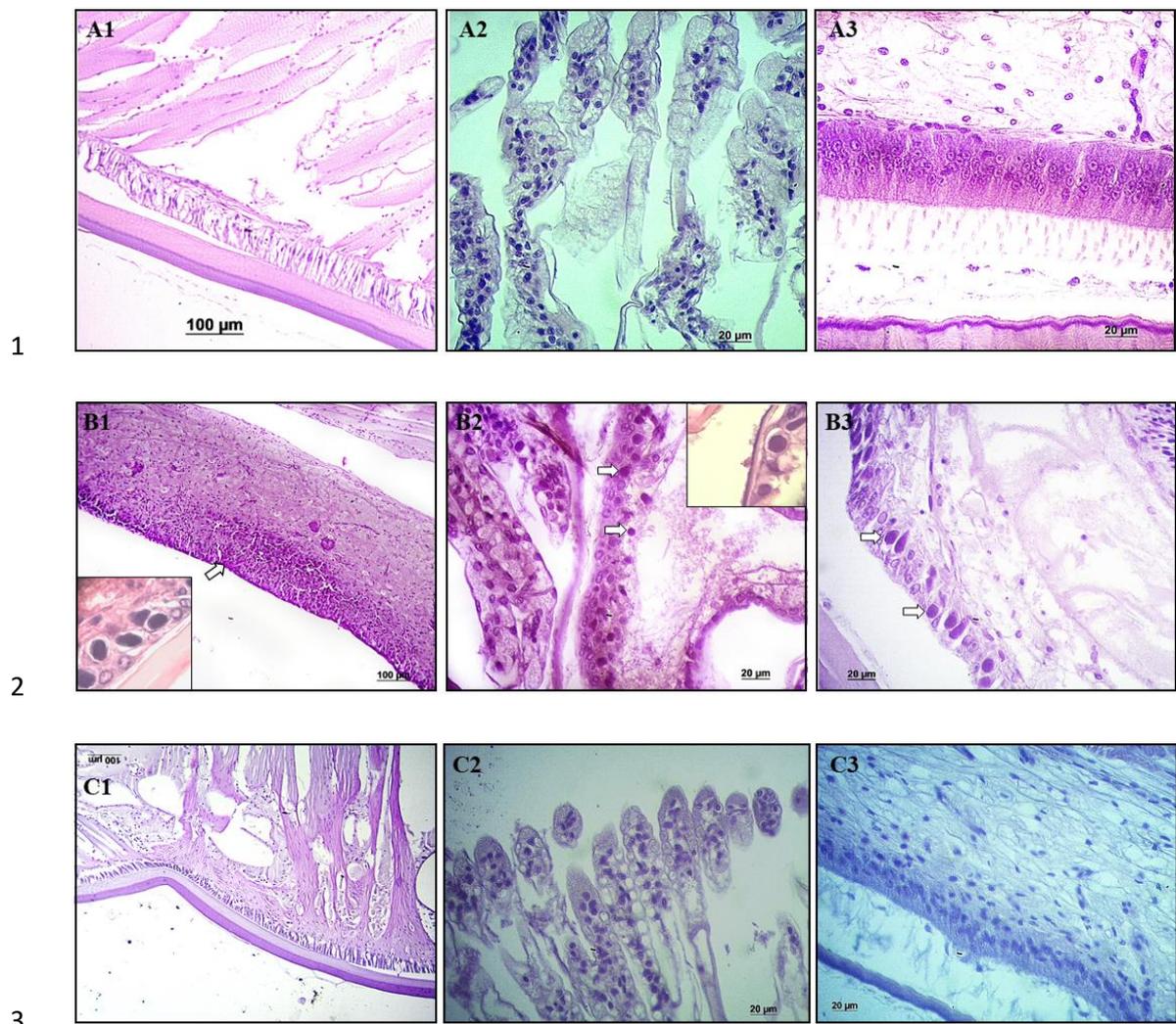
#### 8 *4.4.3 Histopatologia*

9 As análises histopatológicas demonstraram que anteriormente à infecção, os  
 10 principais órgãos normalmente afetados pelo WSSV (cutícula, brânquia e epitélio  
 11 gástrico) estavam livres de lesões (Figura 13A). Já no grupo controle infectado foi  
 12 encontrado um grande número de inclusões virais maduras (Figura 13B),  
 13 diferentemente do grupo que recebeu o probiótico, no qual não foram encontradas  
 14 inclusões virais nos tecidos analisados (Figura 13C).

15

16

17



4 **Figura 13. Análises histopatológicas.** (A) Grupo pré infecção não demonstrando  
 5 lesões; (B) Grupo controle infectado que recebeu apenas ração comercial. Setas brancas  
 6 indicam as inclusões virais nos tecidos e (C) Grupo tratado com o probiótico e infectado  
 7 com tecidos normais sem inclusões virais. (1) Cutícula; (2) Brânquia e (3) Epitélio  
 8 gástrico.

9 *4.4.4 Parâmetros físicos-químicos da qualidade de água*

10 Os dados de qualidade de água (parâmetros físicos e químicos) foram de acordo  
 11 para a espécie para todos os experimentos realizados (Tabela 2 e 3).

12 **Tabela 2: Parâmetros da qualidade de água experimento injeção.** Os valores  
 13 representam a média e o desvio padrão entre os tratamentos. **CTR** (grupo controle)  
 14 **Bacillus** (grupo injetado com as dsRNAs produzidas pelo probiótico manipulado).

	<b>CTR</b>	<b><i>Bacillus</i></b>
<b>pH</b>	7,36 ± 0,65	7,80 ± 0,41
<b>Temperatura °C</b>	24,95 ± 1,74	26,04 ± 1,49
<b>Oxigênio dissolvido (mg/L)</b>	7,61 ± 0,34	7,45 ± 0,24
<b>Amônia (mg/L)</b>	1,1 ± 0,33	1,32 ± 0,41
<b>Nitrito (mg/L)</b>	0,19 ± 0,07	0,23 ± 0,10
<b>Salinidade (mg/L)</b>	25,1 ± 0,48	25,02 ± 0,46
<b>Alcalinidade (mg/L)</b>	138,33 ± 10,4	141,66 ± 10,40

1

2 **Tabela 3: Parâmetros da qualidade de água experimento validação do**  
3 **probiótico na ração.** Os valores representam a média e o desvio padrão entre os  
4 tratamentos. **CTR** (grupo controle), **Bs** (administração do probiótico não transgênico)  
5 **Bs/dsRNA** (grupo administrado o probiótico produtor das dsRNAs).

	<b>CTR</b>	<b>Bs</b>	<b>Bs/dsRNA</b>
<b>pH</b>	7,47 ± 0,35	7,55 ± 0,25	7,63 ± 0,22
<b>Temperatura °C</b>	28,08 ± 1,86	27,29 ± 1,24	27,27 ± 1,43
<b>Oxigênio dissolvido (mg/L)</b>	5,82 ± 0,52	5,9 ± 0,46	6,23 ± 0,36
<b>Amônia (mg/L)</b>	1,45 ± 0,84	1,56 ± 0,79	1,55 ± 0,90
<b>Nitrito (mg/L)</b>	0,53 ± 0,67	0,38 ± 0,37	0,43 ± 0,57
<b>Salinidade (mg/L)</b>	29,02 ± 1,08	28,84 ± 1,03	28,86 ± 1,04
<b>Alcalinidade (mg/L)</b>	147,22 ± 8,78	145,83 ± 9,58	142,5 ± 13,31

6

7 **Tabela 4: Parâmetros da qualidade de água experimento desafio viral.** Os  
8 valores representam a média e o desvio padrão entre os tratamentos. **CTR** (grupo  
9 controle) ***Bacillus*** (grupo tratado com o probiótico produtor das dsRNAs).

	<b>CTR</b>	<b><i>Bacillus</i></b>
<b>pH</b>	7,9 ± 0,15	7,94 ± 0,11
<b>Temperatura °C</b>	24,18 ± 1,35	24,9 ± 1,12
<b>Oxigênio dissolvido (mg/L)</b>	7,07 ± 0,43	6,98 ± 0,39
<b>Amônia (mg/L)</b>	1,06 ± 0,60	1,04 ± 0,45
<b>Nitrito (mg/L)</b>	0,12 ± 0,10	0,11 ± 0,07
<b>Salinidade (mg/L)</b>	23,19 ± 2,51	23,20 ± 2,35
<b>Alcalinidade (mg/L)</b>	161,66 ± 6,83	168,33 ± 8,16

11

12

## 1 5 DISCUSSÃO

2 Desde os primeiros surtos em 1992, o Vírus da Síndrome da Mancha Branca  
3 vem causando perdas econômicas em todo o mundo. A utilização do mecanismo de  
4 RNAi através da síntese das dsRNAs específicas se tornou uma ferramenta importante  
5 de estudo no combate dessa doença (Itsathitphaisarn et al., 2017). A produção dessas  
6 moléculas, assim como a via de entrega aos animais, pode ser realizada através de Kits  
7 comerciais (Escobedo-Bonilla et al., 2014; Feijó et al., 2015), bactérias gram-negativas  
8 como *E. coli* (Posiri et al., 2013; Sanitt et al., 2014) ou, até mesmo, através da utilização  
9 de microalgas (Charoonnart et al., 2019). Essas formas de produção e entrega têm  
10 demonstrado efeitos positivos no combate à replicação viral, porém a utilização de Kits  
11 comerciais encarece o método além de ser inviável em larga escala, enquanto que a  
12 utilização de bactérias gram negativas é questionável por causa do potencial patogênico.  
13 Atualmente, a mortalidade pelo WSSV é menor, como por exemplo no Equador, devido  
14 a ações de manejo, assim como a utilização de sistemas de bioflocos, o qual ocasiona a  
15 melhora na saúde dos animais cultivados (Banco Central do Equador, 2015; Poersch et  
16 al., 2012).

17 Dentre os microrganismos para produção dessas moléculas, espécies probióticas  
18 possuem vantagem devido a já serem comumente administradas nos cultivos de  
19 camarão, as quais são capazes de trazer benefícios aos animais (Kewcharoen &  
20 Srisapoome, 2019; Xie et al., 2019). Para a melhoria na produção dessas moléculas a  
21 utilização de meios ricos nutricionalmente é de grande importância. Como demonstrado  
22 no presente estudo, um meio de cultivo rico aumentou fortemente a produção das  
23 dsRNAs. Mesmo em espécies de *B. subtilis* selvagens, há grande necessidade de um  
24 meio rico em carbono devido à condição nutricional contribuir diretamente no aumento  
25 celular e como consequência na taxa de crescimento proporcionando desta forma, uma  
26 correta divisão e entrega do DNA genômico para as células filhas (Chien et al., 2012).  
27 Zuo et al. (2017) também encontraram maior produção da molécula de interesse com o  
28 acréscimo de glicose no meio de cultivo da espécie *Bacillus licheniformis*. Porém,  
29 outras fontes de carbono podem também contribuir para o aumento da produção de  
30 moléculas de interesse como a utilização do sorbitol (Phulara et al., 2018). Dessa forma,  
31 a limitação de carbono no meio de cultivo favorece o processo de esporulação em altas

1 densidades celulares, contribuindo para um cultivo com maior heterogenicidade entre as  
2 células (Cristiano-Fajardo et al., 2019).

3 Além da produção bem-sucedida, essas dsRNAs foram capazes de ativar o  
4 mecanismo de RNAi no camarão evidenciado pelo aumento da expressão dos genes  
5 *sid1* e *argonauta2* (1,5 e 2 vezes mais respectivamente) comparado ao grupo controle.  
6 Duas formas são utilizadas para produzir essas moléculas: através de kits comerciais e  
7 através da bactéria *E. coli* HT115. Os kits comerciais produzem as dsRNAs *in vitro*  
8 através da utilização de um plasmídeo e uma RNA polimerase. A síntese dessas  
9 moléculas pode ser realizada através de promotores bidirecionais (através do encontro  
10 das fitas complementares) ou promotores unidirecionais (pela formação de grampos de  
11 RNA mensageiro). Essa produção garante um alto grau de pureza das moléculas a  
12 serem injetadas e são funcionais na ativação do sistema de RNAi como demonstrado  
13 por Feijó et al. (2015). O problema dessa utilização é a quantidade limitada das  
14 moléculas produzidas, tornando esse método caro. Além dos kits comerciais, a  
15 utilização de moléculas produzidas pela bactéria *E. coli* HT115 também demonstra ser  
16 eficiente na atenuação da replicação viral como demonstrado por Posiri et al. (2013). No  
17 entanto, levando em consideração que os camarões são produzidos para alimentação  
18 humana, a utilização desse microrganismo se torna questionável devido a essa espécie  
19 ocupar o segundo lugar no ranking da causa de infecções em humanos, segundo  
20 divulgação do Ministério da Saúde em 2018. Dessa forma, probióticos tornam-se uma  
21 alternativa interessante, uma vez que não representam um risco para a saúde do  
22 consumidor e também podem produzir grandes quantidades de moléculas de dsRNA  
23 capazes de ativar o sistema de RNAi como demonstrado no presente estudo. Ao nosso  
24 conhecimento, esta é a primeira descrição de que dsRNAs produzidas e purificadas a  
25 partir de uma espécie probiótica são capazes de ativar genes do sistema de RNA  
26 interferente nos hemócitos do camarão *L. vannamei*.

27 Com o objetivo de validar o probiótico produtor das dsRNAs na dieta do  
28 camarão e, ao mesmo tempo, observar a dinâmica dessa ativação ao longo do tempo, foi  
29 avaliada a expressão dos genes relacionados ao RNAi nos tempos de 15 e 30 dias de  
30 administração aos animais. A cepa probiótica JJBs3 (Bs/dsRNA) foi capaz de ativar o  
31 mecanismo de RNAi aumentando significativamente a expressão dos genes *sid1* e

1 *argonauta2* (2 e 3,2 vezes mais, respectivamente em relação aos grupos controles) no  
2 tempo de 15 dias e 2 e 3,8 vezes mais no tempo de 30 dias. Como não foi observada  
3 diferença estatística entre os dois períodos avaliados na ativação do sistema, fica claro  
4 de que a administração do probiótico manipulado por 15 dias foi suficiente para manter  
5 o sistema RNAi ativado. Dessa forma, este resultado demonstra de que não é necessário  
6 utilizar o probiótico por tempo prolongado para ativar o sistema e manter o animal  
7 preparado para enfrentar um desafio viral, por exemplo. Esta informação é importante  
8 porque representa uma diminuição significativa em termos de custo e manejo dos  
9 animais.

10 Com os resultados da expressão dos genes do mecanismo de RNAi, o período de  
11 15 dias foi escolhido como um pré-tratamento antes da exposição dos animais ao  
12 WSSV. No experimento de desafio viral foi observado que os camarões que receberam  
13 o probiótico produtor das dsRNAs tiveram uma sobrevivência de 34% após 9 dias, não  
14 havendo mais mortalidade até o final do experimento. Além disso, observou-se uma  
15 diminuição drástica da carga viral chegando a um nível próximo da carga basal  
16 observada antes da infecção. Na histopatologia dos animais sobreviventes não foram  
17 observadas as inclusões virais características do WSSV em cutícula, brânquias e epitélio  
18 gástrico. Todos esses resultados demonstram que o probiótico manipulado conseguiu  
19 atenuar a replicação viral em percentual significativo dos camarões desafiados,  
20 provavelmente pela incorporação das duplas fitas a partir do epitélio gástrico, atingindo  
21 a hemolinfa e absorvidas pelos hemócitos através do transportador Sid1.

22 A utilização de probióticos manipulados para produção de dsRNAs antivirais em  
23 *L. vannamei* foi recentemente reportada por Thammasorn et al. (2017). Esses autores  
24 administraram o probiótico *Lactobacillus plantarum* manipulado para produção de  
25 dsRNAs contra o vírus da cabeça amarela (YHV) na dieta do camarão, observando uma  
26 sobrevivência de 30%. Apesar da similaridade com nossos resultados, no trabalho  
27 desses autores não foi observada uma estabilização da mortalidade no grupo tratado  
28 com o probiótico manipulado, diferentemente do que foi demonstrado no presente  
29 estudo. O método de entrega do probiótico, assim como o desafio viral, divergiu entre  
30 os trabalhos. Esses autores pré-trataram os animais por apenas 5 dias e a infecção foi  
31 realizada de forma oral, administrando tecido infectado. No presente estudo, além do

1 período de maior administração do probiótico antes do desafio, esse foi realizado pelo  
2 método de injeção (método mais agressivo). Mesmo com o método mais invasivo, em  
3 nosso estudo foi possível observar uma taxa de sobrevivência considerável, além da  
4 estabilização da mortalidade 9 dias após a infecção. Isso pode estar relacionado à  
5 administração diária do probiótico vivo, tendo em vista a produção do cultivo e mistura  
6 na ração durante todo período experimental. Além disso, na construção genética,  
7 Thammasorn et al. (2017) utilizaram um promotor unidirecional induzido por xilose,  
8 diferentemente do que foi utilizado em nosso estudo, no qual utilizamos o promotor  
9 bidirecional  $P_{y1b}$ , um promotor autoinduzível. Apesar da incerteza do motivo pelo qual  
10 esse promotor possui alta expressão somente na fase estacionária, sabe-se que ele possui  
11 uma alta eficiência na produção de moléculas heterólogas, além da vantagem econômica  
12 por não necessitar o acréscimo de um indutor (Yu et al., 2015).

13       Mesmo com a escolha de um promotor eficiente para a produção das moléculas  
14 e com a administração diária do probiótico vivo por um período capaz de ativar o  
15 mecanismo de RNAi, quais fatores podem estar relacionados para obtenção de uma taxa  
16 de sobrevivência maior do que a obtida neste estudo? O fato dos animais receberem  
17 diariamente o probiótico vivo não garante que os probióticos irão conseguir colonizar  
18 igualmente o trato intestinal de todos os animais. A microbiota intestinal dos camarões  
19 está em constante competição e muda ao longo do desenvolvimento dos animais,  
20 podendo o ambiente em que eles estão inseridos também contribuir para essa  
21 diversidade de microrganismos (Hostins et al., 2017; Garibay-Valdez et al., 2020).  
22 Além da variabilidade na composição do trato intestinal, e por sua vez, a habilidade de  
23 colonização dos probióticos, a variabilidade na carga viral individual também pode  
24 interferir na taxa de sobrevivência. Assim, mesmo com a administração da carga viral  
25 inicial igual para todos os animais, aqueles com melhores condições fisiológicas, ou seja,  
26 que não estejam estressados e se alimentando melhor irão responder à replicação viral  
27 de forma mais eficiente. O canibalismo, por exemplo, é um fator que pode afetar na  
28 composição da carga viral individual durante o período experimental. Dessa forma, a  
29 razão pela qual foi obtido 34% sobreviventes pode estar relacionada a capacidade da  
30 colonização do probiótico no trato intestinal desses sobreviventes juntamente com a  
31 melhor resposta à carga viral devido aos animais estarem fisiologicamente melhor  
32 estabelecidos. Isso reforça a importância que o estresse pode ser um ponto chave no

1 desenvolvimento da doença, como demonstrado por Kathyayani et al. (2019) quando  
2 observaram maior susceptibilidade da doença nos tratamentos estressados com variação  
3 de amônia e pH. A colonização pela cepa de *Bacillus subtilis* aqui utilizada, uma  
4 espécie originalmente do solo, assim como *Lactobacillus plantarum*, originada da saliva  
5 humana, pode não ser eficiente na colonização do trato intestinal do camarão por não  
6 serem nativas desses animais. *L. plantarum*, por exemplo, é conhecida por benefícios  
7 em ações imunoestimulantes em camarões, porém possui tempo de ação curto (Vieira et  
8 al., 2008). Dessa forma, cepas probióticas nativas do trato intestinal, manipuladas para a  
9 produção das dsRNAs poderiam demonstrar um efeito maior na sobrevivência dos  
10 animais por já estarem adaptadas a colonizar o trato. Sabendo do grande potencial que  
11 os probióticos nativos, até mesmo da espécie *B. subtilis* isoladas do trato possuem,  
12 muitos trabalhos de *screening* estão sendo realizados para selecionar as cepas que  
13 possuem maiores fatores benéficos (Zuo et al., 2018; Kim et al., 2020).

14 Por fim, nossos resultados evidenciam que o aumento da condição nutricional do  
15 meio de cultivo proporciona maior produção das moléculas de dsRNAs e que essas  
16 moléculas tanto injetadas quanto o próprio probiótico utilizado na alimentação do  
17 camarão são capazes de ativar o mecanismo de RNAi nos hemócitos do camarão *L.*  
18 *vannamei*. Além disso, a utilização dessa cepa manipulada foi capaz de manter a  
19 sobrevivência dos animais em 34%. Embora atualmente ainda existam restrições na  
20 utilização de microrganismos transgênicos em muitos países, pesquisas vem  
21 demonstrando resultados importantes com bactérias transgênicas produtoras de  
22 moléculas para o tratamento de doenças humanas (Chua et al., 2017). Este estudo traz  
23 pela primeira vez uma cepa probiótica produtora de duplas fitas específicas como uma  
24 ferramenta ao combate ao WSSV.

25

26

27

28

29

## 1 6 CONCLUSÕES

- 2 • O promotor P<sub>y1b</sub> foi eficiente na produção das dsRNAs;
- 3 • O acréscimo de glicose e caseína no meio de cultivo promoveu o aumento na  
4 produção das dsRNAs pelo probiótico *Bacillus subtilis* manipulado;
- 5 • O mecanismo de RNAi foi induzido pelas dsRNAs purificadas do probiótico no  
6 camarão *Litopenaeus vannamei*;
- 7 • A utilização do probiótico manipulado na dieta dos animais foi capaz de ativar o  
8 mecanismo de RNAi após 15 dias de administração;
- 9 • O probiótico manipulado foi capaz de atenuar a replicação viral do WSSV  
10 promovendo 34% de sobrevivência, diminuição da carga viral e impediu o  
11 aparecimento de inclusões virais em brânquias, cutícula e epitélio gástrico.

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

## 1 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

2 A Síndrome da Mancha Branca (WSSV) é uma virose de preocupação contínua  
3 ao longo dos anos desde o seu surgimento nos anos 90 nos cultivos de camarão. A  
4 utilização do mecanismo de RNA de interferência trouxe novas perspectivas de combate  
5 a essa doença. Porém, a forma pela qual as duplas fitas de RNA são produzidas, nos  
6 estudos atuais, são inviáveis economicamente. Aqui podemos validar um probiótico  
7 manipulado geneticamente, na ativação do RNAi no camarão *Litopenaeus vannamei*,  
8 capaz de proteger e diminuir a replicação do WSSV. Apesar de ainda não ser permitido  
9 a utilização comercial de microrganismos transgênicos, essa tecnologia abre portas para  
10 futuras mudanças no que diz respeito à utilização de organismos geneticamente  
11 modificados.

12 Alguns aspectos necessitam ser testados para aprimoramento dos resultados  
13 obtidos como, por exemplo, outros intervalos de tempo em que os probióticos  
14 possivelmente sejam capazes de ativar o mecanismo de RNAi. Isto otimizaria ainda  
15 mais o tempo do pré-tratamento antes de expor ao vírus. Além disso, dados da  
16 frequência da administração desse probiótico e por quanto tempo é mantida a proteção  
17 dos animais, quantidade e formas de entrega são de extrema importância. Apesar de  
18 existirem muitos estudos de microrganismos produtores das dsRNAs, pouco se sabe das  
19 vias pelas quais essas moléculas percorrem até a ativação desse sistema. Portanto, o  
20 estudo dessas vias é importante para entender e otimizar o transporte dessas moléculas  
21 até a ativação do mecanismo, o que pode refletir na melhor resposta de inibição da  
22 replicação viral.

23

24

25

26

27

28

## 1 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 2 Anagnostopoulos, C., Spizizen, J., 1960. Requirements for transformation in *Bacillus*  
3 *subtilis*. J Bacteriol. 81, 741–746.
- 4 Attasart, P., Kaewkhaw, R., Chimwai, C., Kongphom, U., Panyim, S., 2011. Clearance  
5 of *Penaeus monodon* densovirus in naturally pre-infected shrimp by combined ns1  
6 and vp dsRNAs. Virus Res. 159, 79-82.
- 7 Attasart, P., Namramoon, O., Kongphom, U., Chimwai, C., Panyim, S., 2013. Ingestion  
8 of bacteria expressing dsRNA triggers specific RNA silencing in shrimp. Virus  
9 Res. 172, 252-256.
- 10 Banco central del Ecuador, 2015. Información estadística mensual. [online] Disponível  
11 em: <http://contenido.bce.fin.ec/home1/estadisticas/bolmensual/iemensual>.
- 12 Banerjee, G., Ray, A.K., 2017. The advancement of probiotics research and its  
13 application in fish farming industries. Res. Vet. Sci. 115, 66-77.
- 14 Bell, T.A., Lightner, D.V., 1988. A handbook of normal penaeid shrimp histology.  
15 World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- 16 Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J., 2001. Role for a bidentate  
17 ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature. 18, 409 (6818),  
18 363-366.
- 19 Caro, L.F.A., Mai, H.N., Nunan L., Lin, J., Noble, B., Dhar, A.K., 2020. Assessment of  
20 transmission risk in wssv-infected shrimp *Litopenaeus vannamei* upon cooking. J  
21 Fish Dis. 1-9.
- 22 Charoonart, P., Worakajit, N., Zedler, J.A.Z, Meetam, M., Robinson, C.,  
23 Saksmerprome, V., 2019. Generation of microalga *Chlamydomonas reinhardtii*  
24 expressing shrimp antiviral dsRNA without supplementation of antibiotics. Sci  
25 Rep-UK. 9, 3164.
- 26 Chen, Y., Jia, X., Zhao, L., Li, C., Zhang, S., Chen, Y., Weng, S., He, J., 2011.  
27 Identification and functional characterization of Dicer2 and five single VWC

- 1 domain proteins of *Litopenaeus vannamei*. Developmental and Comparative  
2 Immunology. 35, 661-671.
- 3 Chien, A., Hill, N.S., Levin, P.A., 2012. Cell Size Control in Bacteria. Current Biology  
4 22, 340-349.
- 5 Chua, K.J., Kwok, W.C., Aggarwal, N., Sun, T., Chang, M.W., 2017. Designer  
6 probiotics for the prevention and treatment of human diseases. Curr. Opin. Chem.  
7 Biol. 40, 8–16.
- 8 Costa Filho, J., 2019. Edição genômica em probióticos utilizando a técnica  
9 CRISPR/Cas9: uma potencial aplicação no controle de viroses que afetam a  
10 carcinicultura. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Instituto de Oceanografia - IO,  
11 Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, 2019.
- 12 Cristiano-Fajardo, S.A., Flores, C., Flores, N., Tinoco-Valencia, R., Serrano-Carreón,  
13 L., Galindo, E., 2019. Glucose limitation and glucose uptake rate determines  
14 metabolite production and sporulation in high cell density continuous cultures of  
15 *Bacillus amyloliquefaciens* 83. J Biotechnol. 299, 57-65.
- 16 Durand, S., Gilet, L., Condon, C., 2012. The Essential Function of *B. subtilis* RNase III  
17 Is to Silence Foreign Toxin Genes. PLOS Genetics. 8(12).
- 18 Durand, S., Lightner, D.V., Redman, R.M., Bonami, J., 2002. Ultrastructure and  
19 morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). Dis. Aquat. Org.  
20 29, 205-211.
- 21 Durand, S., Lightner, D.V., Redman, R.M., Bonami, J.R., 1997. Ultrastructure and  
22 morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). Dis. Aquat. Org. 29,  
23 205–211.
- 24 Durand, S.V., Tang, K.F.J., Lightner D.V., 2011. commodity shrimp: potential avenue  
25 for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. J Aquat Anim  
26 Health. 12, 128-135.
- 27 Escobedo-bonilla, C.M., Vega-penã, S., Mejía-ruiz, C.H., 2015. Efficacy of double-  
28 stranded RNA against white spot syndrome virus (WSSV) non-structural (orf89,

- 1 wsv191) and structural (vp28, vp26) genes in the Pacific white shrimp *Litopenaeus*  
2 *vannamei*. Journal of King Saud University – Science 27, 182-188.
- 3 FAO, 2018. The state of world fisheries and aquaculture 2016. Food and Agriculture  
4 Organization of the United Nations, Rome.
- 5 Feijó, R.G., Maggioni, R., Martins, P.C.C., Abreu, K.L., Oliveira Neto, J.M., Guertler,  
6 C., Justino, E.B., Perazzolo, L.M., Marins, L.F., 2015. RNAi-based inhibition of  
7 Infectious myonecrosis virus replication in the Pacific white shrimp (*Litopenaeus*  
8 *vannamei*) by dsRNAs targeted to different genome regions. Dis Aquat Organ. 114,  
9 89-98.
- 10 Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, A.S., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998.  
11 Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis*  
12 *elegans*. Nature. 19, 391(6669): 806-11.
- 13 Fire, A.Z., Mello, C.G., 2006. RNA interference. The Nobel Prize in Physiology or  
14 Medicine 2006.
- 15 Garibay-Valdez, E., Martinez-Porchas, M., Calderón, K., Vargas-Albores, F., Gollas-  
16 Galván, T., Martinez-Córdova L., 2020. Taxonomic and functional changes in the  
17 microbiota of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) associated with postlarval  
18 ontogenetic development. Aquaculture, 518, 734842.
- 19 Goncalves, P., Guertler, C., Bachère, E., Souza, C.R.B., Rosa, R.D., Perazzolo, L.M.,  
20 2014. Molecular signatures at imminent death: Hemocyte gene expression profiling  
21 of shrimp succumbing to viral and fungal infections. Dev Comp Immunol. 42, 294-  
22 301.
- 23 GRAS, Generally Recognized as Safe. Microorganisms & Microbial-Derived  
24 Ingredients Used in Food (Partial List). U.S. Food e Drug. Disponível em:  
25 [https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/microorganisms-](https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/microorganisms-microbial-derived-ingredients-used-food-partial-list)  
26 [microbial-derived-ingredients-used-food-partial-list](https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/microorganisms-microbial-derived-ingredients-used-food-partial-list). Acesso em 04 de março.
- 27 Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., Hannon, G.J, 2001.  
28 Argonaute2, a Link between Genetic and Biochemical Analyses of RNAi. Science.  
29 10, 293(5532):1146-50.

- 1 Hamoen, L.W., Venema, G., Kuipers, O.P., 2003. Controlling competence in *Bacillus*  
2 *subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology*. 149, 9-17.
- 3 Hostins, B., Lara, G., Decamp, O., Cesar, D.E., Wasielesky, W., 2017. Efficacy and  
4 variations in bacterial density in the gut of *Litopenaeus vannamei* reared in a BFT  
5 system and in clear water supplemented with a commercial probiotic mixture.  
6 *Aquaculture*. 480, 58–64.
- 7 Huvenne, H., Smagghe, G, 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential  
8 of RNAi for pest control: A review. *J Insect Physiol*. 56, 227-235.
- 9 Itsathitphaisarn, O., Thitamadee, S., Weerachatanukul, W., Sritunyalucksana, K.,  
10 2017. Potential of RNAi applications to control viral diseases of farmed shrimp. *J*  
11 *Invertebr Pathol*. 147, 76-85.
- 12 Janewanthanakul, S., Supungul, P., Tang, S., Tassanakajon, A., 2020. Heat shock  
13 protein 70 from *Litopenaeus vannamei* (LvHSP70) is involved in the innate  
14 immune response against white spot syndrome virus (WSSV) infection. *Dev Comp*  
15 *Immunol*. 102, 103476.
- 16 Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2006. Cell-mediated immunity in  
17 arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization.  
18 *Immunobiology*. 221, 213-236.
- 19 Kathyayani, S.A., Poornima, M., Sukumaran, S., Nagavel, A., Muralidhar, M., 2019.  
20 Effect of ammonia stress on immune variables of Pacific white shrimp *Penaeus*  
21 *vannamei* under varying levels of pH and susceptibility to white spot syndrome  
22 virus. *Ecotox Environ Safe*, 184, 109626.
- 23 Kewcharoen, W., Srisapoome, P., 2019. Probiotic effects of *Bacillus spp.* from Pacific  
24 white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality and shrimp growth, immune  
25 responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains). *Fish and*  
26 *Shellfish Immun*. 94, 175-189.
- 27 Kim, Y.O., Mahboob, S., Viayaraghavan, P., Biji, D., Al-Ghanim, K.A., Al-Misned, A.,  
28 Ahmed, Z., Kwon, J., Na, S.W., Kim, H., 2020. Growth promoting activity of

- 1        *Penaeus indicus* by secondary metabolite producing probiotic bacterium *Bacillus*  
2        *subtilis* isolated from the shrimp gut. Journal of King Saud University – Science, In  
3        Press.
- 4        Kuebutornye, F.K.A., Abarike, E.D., Lu, Y., 2019. A review on the application of  
5        *Bacillus* as probiotics in aquaculture. Fish and Shellfish Immun. 87, 820-828.
- 6        Labreuche, Y., Veloso, A., Vega, E., Gross, P.S., Chapman, R.W., Browdy, C.L., Warr,  
7        G.W., 2010. Non-specific activation of antiviral immunity and induction of RNA  
8        interference may engage the same pathway in the Pacific white leg shrimp  
9        *Litopenaeus vannamei*. Dev Comp Immunol. 34, 1209-1218.
- 10       Lakshmi, B., Viswanath, B., Sai Gopal, D.V.R., 2013. Probiotics as antiviral agents in  
11       shrimp aquaculture. Journal of Pathogens. 2013, 1-13.
- 12       Leu, J., Lin, S., Huang, J., Chen, T., Lo, C., 2013. A model for apoptotic interaction  
13       between white spot syndrome virus and shrimp. Fish Shellfish Immun. 34,1011-  
14       1017.
- 15       Lightner, D.V., 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the  
16       Americas): a review. J Invertebr Pathol 106, 110–130.
- 17       Lightner, D.V., 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the western hemisphere (the  
18       Americas): a review. J Invertebr Pathol. 106(1), 110-30.
- 19       Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using  
20       Real-Time Quantitative PCR and the Double Delta CT Method. Methods 25(4),  
21       402-408.
- 22       Maynard, C.L., Elson, C.O., Hatton, R.D., Weaver, C.T., 2012. Reciprocal interactions  
23       of the intestinal microbiota and immune system. Nature. 489, 231-241.
- 24       Muthukrishnan, S., Defoirdt, T., Ina-Salwany, M.Y., Yusof, F.M., Sharif, M., Ismail,  
25       S.I., Natrah, I., 2019. *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* causing Acute  
26       Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* (Boone, 1931)  
27       isolated from Malaysian shrimp ponds. Aquaculture. 511, 734227.

- 1 Nadarajah, S., Flaaten, O., 2017. Global aquaculture growth and institutional quality.  
2 Mar. Policy. 84, 142-151.
- 3 Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A.H., Austin, B., 2014. Developments in the Use of  
4 Probiotics for Disease Control in Aquaculture. Aquaculture. 431, 1-11.
- 5 Nunes, A.J.P., Feijó, R.G., 2017. O Vírus da Mancha Branca e a convivência no cultivo  
6 de camarão marinho no Brasil. Panorama da Aquicultura. Edição 162,  
7 [https://panoramadaaquicultura.com.br/o-virus-da-mancha-branca-e-a-convivencia-](https://panoramadaaquicultura.com.br/o-virus-da-mancha-branca-e-a-convivencia-no-cultivo-de-camarao-marinho-no-brasil/)  
8 [no-cultivo-de-camarao-marinho-no-brasil/](https://panoramadaaquicultura.com.br/o-virus-da-mancha-branca-e-a-convivencia-no-cultivo-de-camarao-marinho-no-brasil/).
- 9 Phulara, S.C., Chaturvedi, P., Chaurasia, D., Diwan, B., Gupta, P., 2018. Modulation of  
10 culture medium confers high-specificity production of isopentenol in *Bacillus*  
11 *subtilis*. J Biosci Bioeng. 127, 458-464.
- 12 Poersch, L.H., Fóes, G., Krummenauer, D., Romano, L.A., Wasielesky Junior, W.,  
13 2012. Fazenda catarinense volta a operar com sucesso em área afetada pelo vírus da  
14 mancha branca. Panorama da Aquicultura. Edição 130. Disponível em:  
15 [https://panoramadaaquicultura.com.br/biofloco-uma-alternativa-para-camaroes-](https://panoramadaaquicultura.com.br/biofloco-uma-alternativa-para-camaroes-saudaveis/)  
16 [saudaveis/](https://panoramadaaquicultura.com.br/biofloco-uma-alternativa-para-camaroes-saudaveis/).Anagnostopoulos, C., Spizizen, J., 1960. Requirements for  
17 transformation in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 81, 741–746.
- 18 Posiri, P., Ongvarrasopone, C., Panyim, S., 2013. A simple one-step method for  
19 producing dsRNA from *E. coli* to inhibit shrimp virus replication. J Virol Methods.  
20 188, 64-69.
- 21 Prior, S., Browdy, C.L., Shepard, E.F., Laramore, R., Parnell, P.G., 2003. Controlled  
22 bioassay systems for determination of lethal infective doses of tissue homogenates  
23 containing Taura syndrome or white spot syndrome vírus. Dis Aquat Org. 54, 89-  
24 96.
- 25 Rahman, M.M., Keus, H.J., Debnath, P., Shahrier, M.B., Sarwer, R.H., Kudrat-E-Kabir,  
26 Q.A.Z.M., Mohan, C.V., 2018. Benefits of stocking white spot syndrome virus  
27 infection free shrimp (*Penaeus monodon*) post larvae in extensive ghers of  
28 Bangladesh. Aquaculture. 486, 210-216.

- 1 Romero, D., 2013. Bacterial determinants of the social behavior of *Bacillus subtilis*. Res  
2 Microbiol. 164, 788-798.
- 3 Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual.  
4 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 5 Sanitt, P., Attasart, P., Panyim, S., 2014. Protection of yellow head virus infection in  
6 shrimp by feeding of bacteria expressing dsRNAs. J Biotechnol. 179, 26-31.
- 7 Santos, K.O., Costa-filho, J., Riet, J., Spagnol, K.L., Nornberg, B.F., Kütter, M.T.,  
8 Tesser, M.B., Marins, L.F., 2019. Probiotic expressing heterologous phytase  
9 improves the immune system and attenuates inflammatory response in zebrafish fed  
10 with a diet rich in soybean meal. Fish and Shellfish Immun. 93, 652-658.
- 11 Sarathi M., Simon M.C., Venkatesan C., Hameed A.S., 2008. Oral administration of  
12 bacterially expressed vp28dsrna to protect penaeus monodon from white spot  
13 syndrome virus. J Mar Biotechnol. 10, 242–249.
- 14 Shih, J.D., Hunter, C.P., 2011. SID-1 is a dsRNA-selective dsRNA-gated channel. RNA  
15 17, 1057-65.
- 16 Siddhnath, K., Majumdar, R.K., Parhi, J., Sharma, S., Mehta, N.K., Laishram, M., 2018.  
17 Detection and characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* from  
18 carps from integrated aquaculture system. Aquaculture. 487, 97-101.
- 19 Sun, Y., Li, F., Xiang, J., 2013. Analysis on the dynamic changes of the amount of  
20 WSSV in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* during infection. Aquaculture.  
21 376-379, 124-132.
- 22 Taengchaiyaphum, S., Nakayama, H., Srisala, J., Khiev, R., Aldama-Cano, D.J.,  
23 Thitamadee, S., Sritunyalucksana, K., 2017. Vaccination with multimeric  
24 recombinant VP28 induces high protection against white spot syndrome virus in  
25 shrimp. Developmental and Comparative Immunology. 76, 56-64.
- 26 Tang, X., Liang, Q., Liu, L., Sheng, X., Xing, J., Zhan, W., 2018. An optimized double-  
27 antibody sandwich ELISA for quantitative detection of WSSV in artificially  
28 infected crayfish. J. Virol. Methods. 251, 133-138.

- 1 Tanwar, J., Das, S., Fatima, Z., Hameed, S., 2014. Multidrug Resistance: An Emerging  
2 Crisis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 1-7.
- 3 Thammasorn, T., Jitrakorn, S., Charoonart, P., Sirimanakul, S., Rattanarojpong, T.,  
4 Chaturongakul, S., Saksmerprome, V., 2017. Probiotic bacteria (*Lactobacillus*  
5 *plantarum*) expressing specific double-stranded RNA and its potential for  
6 controlling shrimp viral and bacterial diseases. *Aquacult Int.* 25, 1679–1692.
- 7 Van Hulst, M.C.W., Witteveldt, J., Snippe, M., Vlak, J.M., 2001. White spot syndrome  
8 virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp.  
9 *Virology*. 285, 228–233.
- 10 Verbruggen, B., Bickley, L.K., Aerle, R., Bateman, K.S., Stentiford, G.D., Santos,  
11 E.M., Tyler, C.R., 2016. Molecular mechanisms of white spot syndrome virus  
12 infection and perspectives on treatments. *Viruses*. 8, 23.
- 13 Vieira, F.N., Neto, C.C.B., Mouriño, J.L.P., Jatobá, A., Ramirez, C., Martins, M.L.,  
14 Barracco, M.A.A.M., Vinatea, L.A., 2008. Time-related action of *Lactobacillus*  
15 *plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as  
16 immunostimulant. *Pesq. agropec. bras.* 43, 763-769.
- 17 Walker, J.P., Mohan, C.V., 2009. Viral disease emergence in shrimp aquaculture:  
18 origins, impact and the effectiveness of health management strategies. *Rev*  
19 *Aquacult.* 1, 125-154.
- 20 Wang, P., Huang, T., Zhang, X., He, J., 2014. Antiviral defense in shrimp: From innate  
21 immunity to viral infection. *Antivir Res.* 108, 129-141.
- 22 Wang, T., Liang, Y., Wu, M., Chen, Z., Lin, J., Yang, L., 2015. Natural products from  
23 *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. *Chinese J Chem Eng* 23, 744-754.
- 24 Wang, Y., Sun, W., Zheng, S., Zhang, Y., Bao, Y., 2019. Genetic engineering of  
25 *Bacillus sp.* and fermentation process optimizing for diacetyl production. *J*  
26 *Biotechnol.* 301, 2-10.

- 1 Wang, Z., Zhu, F., 2018. Different roles of a novel shrimp microRNA in white spot  
2 syndrome virus (WSSV) and *Vibrio alginolyticus* infection. *Dev Comp Immunol.*  
3 79, 21-30.
- 4 Wen, R., Li, F., Xiang, J., 2014. Function of shrimp STAT during WSSV infection. *Fish*  
5 *& Shellfish Immun.* 38, 354-360.
- 6 Wilson, R.C., Doudna, J.A., 2013. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu*  
7 *Rev Biophys.* 42, 217-39.
- 8 Xie, J., Liu, Q., Liao, S., Fang, H., Yin, P., Xie, S., Tian, L., Liu, Y., Niu, J., 2019.  
9 Effects of dietary mixed probiotics on growth, non-specific immunity, intestinal  
10 morphology and microbiota of juvenile pacific white shrimp, *Litopenaeus*  
11 *vannamei*. *Fish Shellfish Immun.* 90, 456-465.
- 12 Yang, F., Jun, H.E., Lin, X., Li, Q., Pan, D., Zhang, X., Xu, X., 2001. Complete genome  
13 sequence of the shrimp white spot Bacilliform virus. *J Virol.* 75, 11811-11820.
- 14 Yu, X., Xu, J., Liu, X., Chu, X., Wang, P., Tian, J., Wu, N., Fan, Y., 2015.  
15 Identification of a highly efficient stationary phase promoter in *Bacillus subtilis*.  
16 *Scientific Reports*, 5, 18405.
- 17 Zhan, W., Wang, Y., 1998. White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in  
18 China. *J Aquat Anim Health.* 10, 405-410.
- 19 Zokaeifar, H., Balcázar, J.L., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Arshad, A.,  
20 Nejat, N., 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive  
21 enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp,  
22 *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immun.* 33, 683-689.
- 23 Zuo, S., Xiao, J., Zhang, Y., Zhang, X., Nomura, C.T., Chen, S., Wang, Q., 2017.  
24 Rational design and medium optimization for shikimate production in recombinant  
25 *Bacillus licheniformis* strains. *Process Biochem.* 66, 19-27.
- 26 Zuo, Z., Shang, B., Shao, Y., Li, W., Sun, J., 2019. Screening of intestinal probiotics  
27 and the effects of feeding probiotics on the growth, immune, digestive enzyme

- 1 activity and intestinal flora of *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immun. 86,
- 2 160-168.
- 3