UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LOIANE SAMPAIO TAVARES

**Isolamento, identificação fenogenotípica e avaliação da indução de
apoptose por estirpe brasileira de *Frog virus 3-like*, oriunda de
*Lithobates catesbeianus***

Pirassununga
2018

LOIANE SAMPAIO TAVARES

Isolamento, identificação fenogenotípica e avaliação da indução de apoptose por estirpe brasileira de *Frog virus 3-like*, oriunda de *Lithobates catesbeianus*

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa

Pirassununga
2018

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

TT231i Tavares, Loiane Sampaio
 Isolamento, identificação fenogenotípica e
 avaliação da indução de apoptose por estirpe
 brasileira de Frog virus 3-like, oriunda de
 Lithobates catesbe / Loiane Sampaio Tavares ;
 orientador Ricardo Luiz Moro Sousa. --
 Pirassununga, 2018.
 101 f.

 Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
 em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
 Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

 1. Ranavirus. 2. Anfíbios. 3. Brasil. 4. Cultivo
 celular. I. Sousa, Ricardo Luiz Moro , orient. II.
 Título.

LOIANE SAMPAIO TAVARES

Isolamento, identificação fenogenotípica e avaliação da indução de apoptose por estirpe brasileira de *Frog virus 3-like*, oriunda de *Lithobates catesbeianus*

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociência Animal

Data de aprovação: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora:

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição _____

Presidente da Banca Examinadora

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição _____

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição _____

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por me amparar nos momentos difíceis, pela proteção e por guiar o meu caminho, colocando pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais eu certamente não teria conseguido.

À minha Mãe, Gislaine Sampaio Furio, meu exemplo, minha força, meu tudo. Obrigada pelo amor imenso, pelo suporte financeiro e por me apoiar em cada uma das etapas de minha vida. Você sempre será a razão das minhas conquistas. Junto a este agradecimento, um especial ao Bruno Barreto. Eu sou uma pessoa melhor ao seu lado, obrigada por seu amor, amizade, alegria e paciência. Por apoiar minhas decisões e compreender minhas ausências. Por “segurar a peteca” comigo e me fazer acreditar que eu posso sempre mais do que imagino. Agradeço ainda às minhas filhas de quatro patas (Maria Eduarda, Sophie, Manuela e Clarinha (anjinho)), pelo amor puro e verdadeiro, que enche o meu coração.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa. Agradeço imensamente por todas as oportunidades e pela confiança, por sua dedicação e paciência. Obrigada pelos ensinamentos, não só científicos, mas também de vida.

Agradeço aos amigos e colegas dos Laboratórios Multiusuário de Microbiologia e Higiene Zootécnica – FZEA/USP, pelos bons momentos (e “Cafés!”), compartilhados ao longo destes anos de mestrado: Anna Alencar, Andrea Vasquez, Amanda Gomes, Profa. Andrezza, Bárbara, Carolina Bedoya, Jenny, Marcela Jimenez, Maria Fernanda, Marcelo Reis, Marcelo Cândido, Samara Maganha, Silvia Seraphin, Sabrina, Tatiana Ranieri, Thais Corrêa e Waldelucy.

À Samara Maganha, em especial, por toda a sua ajuda com “as celulinhas”.

À Thais Corrêa, amiga que sempre esteve presente nas angústias e nas alegrias durante estes anos, obrigada por cada palavra amiga, por cada consolo e pela amizade. Agradeço por não ter medido esforços em “n” etapas deste trabalho, fundamentais para a execução deste. Obrigada por tudo!

À Mayara Carvalho, aluna de iniciação científica, pela ajuda e por sua sempre pronta disposição.

À Dr^a. Claudia Maris Ferreira, pela concessão das amostras para a realização deste trabalho.

À Dr^a Ana M. Cristina R. P. F. Martins pela doação dos anticorpos primários.

A todos que contribuíram com subsídios, em especial: Fabiana Bressan, por todas “as dicas” com os protocolos da apoptose; Julia Benassi, pelo auxílio na utilização do microscópio de fluorescência; aos técnicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP e a Dr^a Marcia Catroxo pela releitura das amostras.

A todos os meus amigos fora da USP, especialmente Bianca Vanderley, Caroline Pieri, Fabio Santa Chiara, Jussara Maria e Mirela Gilhio, sempre prontos para comemorarem cada passo por mim avançado, obrigada pela amizade e força, que fazem toda a diferença para o meu sucesso.

Aos professores da FZEA/USP que, com os conhecimentos transmitidos, contribuíram para a minha formação profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa de mestrado (Processo nº 2016/25506-2), assim como à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), também pela concessão de bolsa de mestrado (código de financiamento 001).

Por fim, deixo aqui registrado os meus mais sinceros agradecimentos, a todos que de forma direta ou indireta, aqui mencionados ou não, contribuíram para a concretização deste trabalho, com grandes ou pequenos gestos que se fizeram tão importantes. O meu muito obrigada!

***Temos o destino que merecemos.
O nosso destino está de acordo
com os nossos méritos.***

(Albert Einstein)

RESUMO

TAVARES, L. S. **Isolamento, identificação fenogenotípica e avaliação da indução de apoptose por estirpe brasileira de *Frog virus 3-like*, oriunda de *Lithobates catesbeianus*.** 2018. 100f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

O gênero *Ranavirus*, especialmente a espécie *Frog virus 3* (FV3), é considerado uma ameaça crescente às populações de anfíbios em diversas partes do mundo, desencadeando surtos que frequentemente resultam em mortalidade em massa e perdas econômicas substanciais. Neste sentido, propusemos o isolamento de uma estirpe patogênica de FV3-*like*, associada a surto com alta mortalidade de anfíbios adultos (*Lithobates catesbeianus*) em uma ranicultura do Estado de São Paulo, Brasil, bem como a caracterização molecular e fenotípica do vírus isolado. No mais, objetivamos verificar a possível indução de morte celular por apoptose por essa estirpe. O isolamento viral foi realizado a partir de fragmentos de órgãos de animais que vieram à óbito, os quais foram inoculados em células BF-2 (*Lepomis macrochirus*). A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi conduzida com *primers* específicos e dirigidos para duas regiões altamente conservadas do genoma dos ranavírus: MCP e 53R. O sequenciamento parcial do gene que codifica a proteína principal do capsídeo (MCP) foi realizado, seguido de alinhamento e análise filogenética com outros ranavírus. Outras técnicas diagnósticas, incluindo microscopia eletrônica de transmissão, imunofluorescência indireta e *Western blot* foram utilizadas na caracterização e confirmação do isolamento. Dois marcadores apoptóticos foram utilizados para investigar a possível ativação da apoptose em células BF-2 infectadas e amostradas de 4 à 16 horas, incluindo a ativação de caspases efetoras e a fragmentação do DNA celular pelo ensaio de TUNEL. Obtivemos o isolamento de uma estirpe de FV3-*like* com efeitos citopáticos típicos para ranavírus. A PCR confirmou a presença de DNA viral nas culturas de células BF-2 infectadas, com resultados positivos para os oligonucleotídeos direcionados para MCP e 53R. A análise da sequência nucleotídica obtida para MCP revelou alta homologia (99%) com *Frog virus 3*, espécie-tipo do gênero *Ranavirus* (família *Iridoviridae*) e, na reconstrução filogenética, a cepa isolada mostrou ser intimamente relacionada com outros ranavírus detectados no Brasil. As micrografias eletrônicas mostraram partículas icosaédricas em células BF-2 infectadas, com nucleocapsídeo medindo cerca de 150 nm, semelhante aos ranavírus. No ensaio de imunofluorescência indireta, células BF-2 infectadas com o isolado FV3-*like*, apresentaram marcação de imunofluorescência positiva para MCP, enquanto que MCP foi demonstrada por um ensaio de *Western blot*, onde observamos um polipeptídeo com massa molecular estimada em 50 kDa. Por fim, verificamos que o isolado FV3-*like* é capaz de induzir apoptose em células BF-2, uma vez que foram detectadas caspases efetoras em todos os tempos experimentais, sugerindo ser um mecanismo caspase-dependente. A fragmentação do DNA celular, claramente observada em todos os tempos experimentais, confirmou a indução de apoptose pela estirpe brasileira de FV3-*like*. Os resultados aqui obtidos tornam-se a base para diversos estudos futuros, podendo ainda contribuir como subsídio para a melhor compreensão dos surtos provocados por estes vírus no país.

Palavras-chave: *Ranavirus*. Anfíbios. Brasil. Cultivo celular.

ABSTRACT

TAVARES, L. S. **Isolation, phenogenotypic identification and evaluation of the induction of apoptosis by Brazilian strain of *Frog virus 3-like*, from *Lithobates catesbeianus*.** 2018. 100pp. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

The genus *Ranavirus*, especially the *Frog virus 3* (FV3) species, is considered a growing threat to amphibian populations in various parts of the world, triggering outbreaks that often result in mass mortality and substantial economic losses. In this sense, it was proposed the isolation of a pathogenic FV3-like strain associated with an outbreak with high mortality of adult amphibians (*Lithobates catesbeianus*) in a frog farm in the State of São Paulo, Brazil, as well as the molecular and phenotypic characterization of the isolated virus. In addition, we aimed to verify the possible induction of the mechanism of cell death by apoptosis by this strain. Virus isolation was performed from organ fragments of animals that died, which were inoculated into BF-2 cells (*Lepomis macrochirus*). The polymerase chain reaction (PCR) technique was conducted with specific primers and directed to two highly conserved genome regions of the ranavirus: MCP and 53R. Partial sequencing of the gene encoding the major capsid protein (MCP) was performed, followed by alignment and phylogenetic analysis with other ranaviruses. Other diagnostic techniques, including transmission electron microscopy, indirect immunofluorescence and Western blot were used in the characterization and confirmation of the isolation. Two apoptotic markers were used to investigate the possible activation of apoptosis in infected BF-2 cells and sampled from 4 to 16 hours, including the activation of effector caspases and the fragmentation of cellular DNA by the TUNEL assay. We obtained the isolation of an FV3-like strain with typical cytopathic effects for ranavirus. PCR confirmed the presence of viral DNA in cultures of infected BF-2 cells, with positive results for MCP and 53R oligonucleotides. Analysis of the nucleotide sequence obtained for MCP revealed high homology (99%) with *Frog virus 3*, type species member of the genus *Ranavirus* (family *Iridoviridae*) and, in phylogenetic reconstruction, the isolated strain showed to be closely related to other ranaviruses detected in Brazil. Electron micrographs showed icosahedral particles in infected BF-2 cells, with a nucleocapsid measuring about 150 nm, similar to ranaviruses. In the indirect immunofluorescence assay, BF-2 cells infected with the FV3-like isolate showed positive immunofluorescence labeling for MCP, whereas MCP was demonstrated by a Western blot assay, where we observed a polypeptide with a molecular mass estimated at 50 kDa. Finally, we verified that the FV3-like isolate is able to induce apoptosis in BF-2 cells, since effector caspases were detected at all experimental times, suggesting to be a caspase-dependent mechanism. The fragmentation of cellular DNA, clearly observed at all experimental times, confirmed the induction of apoptosis by the Brazilian FV3-like strain. The results obtained here become the basis for several future studies, and may contribute as a subsidy to better understand the outbreaks caused by these viruses in the country.

Keywords: *Ranavirus*. Amphibians. Brazil. Cell culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção global da ranicultura entre 2000 e 2016.....	20
Figura 2 – Exemplares de girinos, imago e rã adulta de <i>Lithobates catesbeianus</i> ...	21
Figura 3 – Representação esquemática da estrutura do vírion: Gênero <i>Ranavirus</i> .	26
Figura 4 – Diagrama esquemático do ciclo de replicação dos ranavírus.....	29
Figura 5 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da linhagem celular Fathead minnow (FHM) infectada com FV3.....	30
Figura 6 – Efeito citopático de EHNV em células BF-2	34
Figura 7 – Vias de morte celular por apoptose	40
Figura 8 – Esquema das inoculações realizadas em cultivo de células BF-2	48
Figura 9 – Esquema da técnica de TUNEL com marcação de DNA fragmentado ...	59
Figura 10 – Cultura de células BF-2 inoculadas com as passagens P1 e P2 da amostra TA2 e seus efeitos citopáticos.....	61
Figura 11 – Cultura de células BF-2 inoculadas com as passagens P3 à P5 da amostra TA2 e seus efeitos citopáticos.....	63
Figura 12 – Cultura de células BF-2 em frasco de T25 cm ² inoculada com a passagem P4 da amostra TA2	64
Figura 13 – Gel de agarose 1,5%, evidenciando as amplificações para MCP	65
Figura 14 – Gel de agarose 1,5%, evidenciando as amplificações para 53R.....	66
Figura 15 – Distribuição das concordâncias e porcentagem de similaridade da sequência obtida para o gene MCP, amostra TA2, gerada pelo programa BLAST.....	67

Figura 16 – Filograma representando a reconstrução filogenética para a cepa FV3- <i>like</i> isolada na presente investigação.....	68
Figura 17 – Micrografia eletrônica de transmissão de células BF-2 infectada com o isolado <i>Frog virus 3-like</i> evidenciando nucleocapsídeos no citoplasma celular.....	70
Figura 18 – Micrografia eletrônica de transmissão de células BF-2 infectada com o isolado <i>Frog virus 3-like</i>	70
Figura 19 – Imunofluorescência indireta para o isolado <i>Frog virus 3-like</i> em células BF-2 infectadas	72
Figura 20 – Imunodeteção por <i>Western blot</i> da proteína principal do capsídeo (MCP) do isolado <i>Frog virus 3-like</i> em lisado de células BF-2	73
Figura 21 – Ativação das caspases –3/7 em células BF-2 infectadas com isolado <i>Frog virus 3-like</i>	75
Figura 22 – Fragmentação do DNA pela técnica de TUNEL em células BF-2 infectadas com isolado <i>Frog virus 3-like</i>	78

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Espécies e isolados do gênero *Ranavirus*, seguidos da lista de vírus ainda não aprovados como espécies dentro do gênero25
- Tabela 2** – *Primers* utilizados para detecção dos genes MCP e 53R de FV3, contendo a sequência de nucleotídeos, produto esperado, gene alvo e a referência de acesso.....50
- Tabela 3** – Sequências nucleotídicas utilizadas na reconstrução filogenética, com indicação do nome da espécie ou isolado, país onde foi detectado, classe do hospedeiro e respectivos números de acesso no GenBank...53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATV	<i>Ambystoma tigrinum virus</i>
BF-2	<i>Bluefill fry</i> (linhagem celular)
BIV	<i>Bohle iridovirus</i>
CARD	Domínio de recrutamento e ativação de caspases
CO ₂	Dióxido de carbono
DFV	Doctor fish virus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dUTPase	Deoxiuridina-trifosfatase
ECP	Efeito citopático
ECV	<i>European catfish virus</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tretra acético
EHNV	<i>Epizootic haematopoietic necrosis virus</i>
eIF-2 α	Fator de iniciação da tradução em eucariotos
EPC	<i>Epithelioma papulosum cyprini</i> (linhagem celular)
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Org. das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FHM	<i>Pimephales promelas</i> -Fathead minnow (linhagem celular)
FV3	<i>Frog virus 3</i>
GIV	Grouper iridovirus
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia Viral
IFN	Interferon
IL	Interleucina
kbp	Quilo pares de bases
kDa	Quilodaltons
kg	Quilograma
MCP	Proteína principal do capsídeo
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i> (meio de cultivo celular)
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
mg	miligrama
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
mL	mililitro

MOI	Multiplicidade de infecção
NKs	Células Natural Killers
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
ORF	Quadro aberto de leitura
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	Pares de base
PBS	Tampão salino fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PKR	Proteinoquinase R
RGV	Rana grylio iridovirus
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
SCRV	<i>Santee-Cooper ranavirus</i>
SDS	Duodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro fetal bovino
SGIV	<i>Singapore grouper iridovirus</i>
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TCID ₅₀	Tissue Culture Infective Dose (50%)
TNFR	Superfamília dos fatores de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP NickLabeling</i>
UI	Unidades internacionais
UV	Radiação Ultravioleta
η m	nanômetro
μ g	micrograma
μ L	microlitro
μ M	micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Aquicultura: ranicultura	18
2.2	Gênero <i>Ranavirus</i>	24
2.2.1	Estrutura do vírion	25
2.2.2	Propriedades genômicas	26
2.2.3	Replicação viral	27
2.2.4	Aspectos epidemiológicos	30
2.2.5	Patogênese	32
2.2.6	Diagnóstico	33
2.2.7	Tratamento e profilaxia	35
2.3	Resposta imune à infecção por <i>Ranavirus</i>	35
2.4	Apoptose	37
2.4.1	Ranavírus e apoptose	41
3	OBJETIVOS	44
3.1	Objetivo geral	44
3.2	Objetivos específicos	44
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	Amostras biológicas	45
4.2	Cultivo e manutenção de células BF-2	45
4.3	Isolamento viral em cultivo de células	46
4.3.1	Preparo dos inóculos	46
4.3.2	Inoculação em células BF-2	46
4.4	Produção de estoques virais	48
4.5	Extração do DNA	49
4.6	Amplificação por PCR: Genes MCP e 53R	49
4.6.1	Gene MCP	50
4.6.2	Gene ORF-53R	51
4.6.3	Análise eletroforética dos produtos amplificados	51
4.7	Sequenciamento Nucleotídico	51
4.7.1	Alinhamento das Sequências Nucleotídicas	52
4.7.2	Reconstrução filogenética	52
4.8	Titulação viral em placas por diluição limitante	54

4.9	Microscopia eletrônica de transmissão	54
4.10	Imunofluorescência indireta	55
4.11	Imunodeteção por <i>Western Blotting</i>	56
4.12	Apoptose	58
4.12.1	Ensaio de ativação das caspases 3/7	58
4.12.2	Deteção da fragmentação do DNA	59
5	RESULTADOS	61
5.1	Isolamento viral.....	61
5.2	Confirmação do isolamento viral por PCR	65
5.3	Alinhamento nucleotídico	66
5.3.1	Análise filogenética	67
5.4	Determinação do Título viral (TCID ₅₀)	69
5.5	Microscopia Eletrônica de Transmissão de isolado viral	69
5.6	Imunofluorescência indireta	71
5.7	<i>Western blotting</i>	73
5.8	Deteção das caspases 3/7	74
5.9	Deteção da fragmentação do DNA celular	77
6	DISCUSSÃO.....	80
7	CONCLUSÕES.....	88
	REFERÊNCIAS	89
	ANEXOS.....	101

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é uma atividade importante na obtenção de alimentos, que cresce mais rapidamente do que qualquer outro setor de alimentos de origem animal, segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2018). Dentro das atividades que englobam o setor, a ranicultura é projetada como uma alternativa do agronegócio que se apresenta ao mercado de forma atraente, baseada nas características zootécnicas da espécie utilizada mundialmente, *Lithobates catesbeianus* (rã-touro), que possui rápido crescimento e prolificidade, e nas propriedades organolépticas de sua carne, que oferece alto valor proteico e baixo teor de gordura (FERREIRA; PIMENTA; PAIVA NETO, 2002; SEIXAS FILHO; PEREIRA; MELLO, 2017; PIRES et al., 2006).

No entanto, como observado em outros setores de produção animal, a intensificação da criação de rãs frequentemente acarreta maior exposição dos animais a vários tipos de patógenos, o que favorece o aparecimento de doenças, tornando-se assim um obstáculo, pois pode tornar a atividade onerosa e pouco lucrativa. Isto por que a intensificação da produção se associa muitas vezes a fatores estressantes, como o canibalismo e a competição por espaço e alimento, que desencadeiam a imunossupressão dos animais, aumentando-se assim a susceptibilidade dos animais aos patógenos, favorecendo por fim a ocorrência de surtos epizooticos (ANTONUCCI et al., 2012; HIPOLITO, 2004; MAZZONI, 2003).

Dentre os agentes etiológicos de origem viral com importância econômica para a ranicultura, os ranavírus se destacam, pois são altamente virulentos, desencadeando surtos com altas taxas de mortalidade na maioria dos casos, não existindo tratamentos específicos ou vacinas disponíveis, sendo de difícil controle, com grandes dispêndios financeiros, impactando negativamente o setor (DUFFUS et al., 2008; MAZZONI et al., 2009; OIE, 2018a).

Os ranavírus, cuja doença é denominada ranavirose, são considerados uma ameaça emergente, sendo durante as últimas décadas a espécie tipo *Frog Virus 3* (FV3) mundialmente associada a eventos de mortandade não só de anfíbios criados comercialmente ou de vida livre, mas também de peixes e répteis, portanto caracterizando-se também como uma ameaça à biodiversidade (CHINCHAR; WALTZEK, 2014; JANCovich et al., 2010). No mais, a transmissão entre diferentes

classes taxonômicas pode ocorrer, sendo isolados de anfíbios possivelmente transmissíveis a peixes (CHINCHAR, 2002).

Os ranavírus já foram associados a infecções em pelo menos 105 espécies de anfíbios ao redor do mundo (DUFFUS et al., 2015) e, diante do impacto, todos os ranavírus que infectam anfíbios foram classificados como de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal (*World Organisation for Animal Health – OIE*) (OIE, 2018a).

Na ranavirose, as taxas de morbidade e mortalidade variam em função de diversos fatores, como a imunocompetência do hospedeiro frente à infecção viral, que é fortemente influenciada segundo o estágio de desenvolvimento dos anfíbios, sendo as formas larvais e os animais recém metamorfoseados os mais susceptíveis, além dos adultos imunossuprimidos (GRAYFER et al., 2015; ROBERT et al., 2005). As infecções virais resultam frequentemente em danos celulares irreparáveis e, para se proteger, as células do hospedeiro utilizam, entre outros mecanismos, da apoptose como uma via de morte celular para diminuir a disseminação dos vírus pelos tecidos. No entanto, dada a importância da apoptose na defesa do hospedeiro, observa-se que muitos vírus podem manipular este mecanismo em vantagem própria, induzindo ou inibindo-a e subvertendo a resposta imunológica do hospedeiro (O'BRIEN, 1998; TEODORO; BRANTON, 1997).

O correto diagnóstico laboratorial da ranavirose, segundo indica a OIE (2018b), depende de um conjunto de resultados obtidos por meio de diferentes métodos diagnósticos, tendo-se por padrão-ouro o isolamento viral em cultura de células e a confirmação da presença do vírus por técnicas que visem a detecção do genoma viral, dos antígenos virais ou do vírus em si.

Diante do contexto apresentado, estudos que visem o isolamento e a caracterização de estirpes do gênero *Ranavirus*, especialmente as implicadas em surtos envolvendo anfíbios, tornam-se importantes, pois contribuem para a compreensão da patogênese da infecção por esses agentes nesta classe animal. Além disso, abordagens que investiguem os mecanismos imunes, como a apoptose, podem contribuir com subsídios na investigação de potenciais alvos terapêuticos, aprimorando-se os conhecimentos da interação entre vírus e células. A expectativa é que, em última análise, investigações como anteriormente citadas possam colaborar na prevenção e monitoramento da ranavirose, particularmente dos problemas ecológicos e econômicos desencadeados pelos ranavírus.

O objetivo deste estudo foi descrever o isolamento em cultura de células de uma variante de ranavírus, oriunda de *Lithobates catesbeianus*, responsável por surto, bem como caracterizá-la com base nas suas propriedades estruturais e moleculares. Além disso, objetivamos investigar se a morte celular observada *in vitro* pela estirpe é desencadeada por apoptose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aquicultura: ranicultura

Por definição, aquicultura refere-se à uma atividade multidisciplinar que envolve intervenções no processo de criação de organismos aquáticos a fim de aumentar a produtividade (FAO, 2014). A atividade se subdivide em algumas especialidades principais, a saber: ranicultura (criação de rãs), piscicultura (criação de peixes), carcinicultura (criação de caranguejos, siris e camarões), malacocultura (criação de moluscos), algicultura (criação de macro ou microalgas) e a criação de jacarés (TAVARES-DIAS; MARIANO, 2015). Trata-se de um setor altamente diversificado que, para além das diversas espécies cultiváveis, conta com diferentes ambientes de produção (água doce, salobra, salgada; criação costeira, oceânica), sob variados sistemas (lagoas, sistemas de canais, tanques com recirculação de água, viveiros, dentre outros) e possibilidades de níveis de intensidade (extensivo, semi-intensivo e intensivo) (BONDAD-REANTASO, 2005).

A aquicultura é uma atividade importante na produção de alimentos e, no ano de 2016, a produção aquícola mundial (com exceção das plantas aquáticas) alcançou 80 milhões de toneladas, com o valor desta produção estimado em 231,6 bilhões de dólares, o que a consagra como o setor de alimentos de origem animal que mais avança no mundo todo, ultrapassando a cadeia suína, avícola e bovina (FAO, 2018; OECD, 2018). Do total, os peixes se destacam como os organismos aquáticos mais produzidos no mundo, seguido dos moluscos, crustáceos e demais animais, onde incluem-se as rãs (FAO, 2018).

Embora a produção aquícola ainda seja discretamente menor que a produção pesqueira, a aquicultura continua contribuindo mais do que a pesca extrativista na obtenção de alimentos para o consumo humano (FAO, 2018). No mais, a aquicultura apresenta-se como uma das práticas futuras mais promissoras para as décadas seguintes, a ser explorada de forma sustentável e eficiente por disponibilizar mais rapidamente fontes de proteína para a crescente população mundial (LIAO; CHAO, 2009).

Segundo últimas projeções estatísticas publicadas pela FAO, espera-se que a produção mundial aquícola continue em expansão e que totalize cerca de 109 milhões de toneladas em 2030, um crescimento próximo a 37% em relação ao ano de 2016.

Para a América Latina, em particular, as perspectivas futuras também são positivas e projeta-se um crescimento importante de 49%, saltando de 2,7 milhões de toneladas para mais de 4 milhões de toneladas até 2030 (FAO, 2018).

O Brasil, que ocupa a segunda posição de maior aquicultor da América Latina (FAO, 2018), possui vocação inegável para o melhor desenvolvimento do setor, tanto pelos seus recursos hídricos, quanto pela diversidade de clima e geografia favoráveis, rica biodiversidade, produção significativa de grãos para a fabricação de ração e progressivo mercado interno, tornando-o como um dos poucos países capazes de atender à crescente demanda por pescados, sobretudo por meio da aquicultura (CREPALDI et al., 2006; PINHEIRO, 2014).

Atividade zootécnica inserida no âmbito geral da aquicultura, a ranicultura, baseia-se no desenvolvimento de técnicas que visam a criação de todas as fases de vida das rãs, cujo objetivo principal é a produção de carne de rã (CRIBB; AFONSO; FERREIRA, 2013), sendo esta incluída na definição de pescado, segundo aponta o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (BRASIL, 2017).

Dentre os métodos existentes para a criação de rãs, citam-se os métodos extensivos, semi-extensivos e intensivos (LONGO, 1987). Por se tratar de uma atividade que possui uma série de especificações biológicas, o ranário, que compreende a unidade produtiva de criação, pode se subdividir em vários setores zootécnicos incluindo o setor de reprodução, de desenvolvimento embrionário, girinagem e metamorfose, setor amplamente diversificado que engloba todas as fases de vida dos girinos; setor de pré-engorda, com o manejo dos imagos e o setor de engorda final, que contempla o manejo das rãs; além da indústria de abate e processamento, segmentos de insumos e comercialização dos produtos (CRIBB; AFONSO; FERREIRA, 2013).

A produção ranícola em âmbito mundial, segundo indica o último relatório publicado pela FAO (FAO, 2018), totalizou em média 96 mil toneladas para o ano de 2016, notando-se assim um saldo positivo quando comparado ao ano de 2015, com produção de 90 mil toneladas (Figura 1). No mais, observa-se um crescimento mundial notório e progressivo da ranicultura ao longo da década, tendo por base os anos de 2007 (78 mil toneladas), 2010 (82 mil toneladas) e 2012 (86 mil toneladas) (FAO, 2016).

Figura 1 - Produção global da ranicultura entre 2000 e 2016.

Legenda: Gráfico demonstrando a produção global de rãs, em toneladas, durante os anos 2000 a 2016, evidenciando saldo médio positivo ao longo do período.

Fonte: FAO. Fishery Statistical Collections: Global Aquaculture Production 1950-2016: banco de dados. (FAO, 2016). Disponível em:

http://www.fao.org/figis/servlet/tabselector?tb_ds=aquaculture&tb_mode=table&tb_act=select&tb_grp=species. Acesso em: 22 de agost. de 2018.

Dentre os principais produtores mundiais de carne de rã figuram alguns países pertencentes ao continente Asiático, como Taiwan, Indonésia, Vietnã e China, que juntos suprem parte da demanda dos principais importadores de carne de rã do mundo, representados pelo continente europeu (Bélgica, França, Itália, dentre outros) e EUA (ALTHERR et al. 2011).

No Brasil, a produção de rãs iniciou-se na década de 30, com a importação de matrizes da espécie *Lithobates catesbeianus*, família *Ranidae*, que é naturalmente encontrada no leste da América do Norte e conhecida popularmente como rã-touro (LIMA; AGOSTINHO, 1988). A espécie, apesar de exótica, se adaptou perfeitamente às condições climáticas do país, onde as temperaturas permanecem altas quase o ano todo, apresentando características zootécnicas atraentes como crescimento precoce (7 meses a 1 ano para terminação), rusticidade e prolificidade, sendo atualmente toda a produção comercial nacional concentrada na rã-touro (FERREIRA;

PIMENTA; PAIVA NETO, 2002; SEIXAS FILHO; PEREIRA; MELLO, 2017). (Figura 2).

Figura 2 - Exemplos de girinos, imago e rã adulta de *Lithobates catesbeianus*

Legenda: A: fase de girino, onde ocorre a metamorfose. B: Exemplar de imago, que compreende a fase recém-metamorfoseada. C: rã adulta em fase de engorda.
Fonte: CRIBB, A. Y.; AFONSO, A. M.; FERREIRA, C. M. **Manual técnico de ranicultura**. Brasília, DF: EMBRAPA. 2013. - (A e B) <http://www.ranariosantaana.com.br> (C).

Dados nacionais sobre a produção de rãs são escassos. Mais recentemente, segundo aponta o levantamento estatístico realizado pela FAO, a ranicultura brasileira estagnou no período de 2008 a 2012, totalizando cerca de 600 toneladas anuais, com declínio da produtividade ao longo dos anos, estimando-se 300 toneladas para o ano de 2016 (FAO, 2018). O último dado oficial do Brasil menciona que os estados brasileiros que possuem maior representatividade na produção nacional são, respectivamente, o estado de São Paulo, Goiás, Rio de Janeiro e Minas Gerais (BRASIL, 2007).

O Brasil, mesmo atrás dos grandes produtores mundiais, em termos de quantidade produzida, é pioneiro em tecnologias aplicáveis a criação de rãs em

cativeiro. Comparativamente, os países asiáticos possuem parte de sua produção baseada no extrativismo, fornecendo ao mercado rãs selvagens, e parte baseada na criação semi-intensiva, o que preocupa a comunidade científica em relação à redução das populações naturais de anfíbios e transmissão de doenças (AFONSO, 2012; ALTHERR et al., 2011). Ao contrário, o Brasil experimentou avanços tecnológicos notáveis nos últimos anos, tornando-se modelo e tendo por base apenas a criação em ciclos fechados do tipo intensivo no país (CRIBB; AFONSO; FERREIRA, 2013).

Ao aumento no consumo global de alimentos, soma-se a crescente preocupação da população com a saúde, fazendo-a buscar consequentemente por alimentos mais saudáveis, o que tem elevado a demanda por produtos da pesca como um todo (CREPALDI et al., 2006). Diante deste contexto, a carne de rã possui excelente qualidade nutricional, sendo assim benéfica para a saúde humana, possuindo altos índices de aminoácidos e elevado teor proteico, com cerca de 16-18% de proteína de alta digestibilidade. Do mais, quando comparada a outras carnes, apresenta baixo teor de gordura (0,3g/100g), colesterol e sódio, sendo desta forma recomendada por nutricionistas. Ainda, possui cunho medicinal por ser hipoalergênica e assim indicada por médicos nas dietas de crianças que apresentem intolerância a outras proteínas de origem animal e pode ser aplicada a dietas hipocalóricas (GONÇALVES; OTTA, 2008; NÓBREGA et al., 2007; PIRES et al., 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que as pessoas se alimentem de pescados ao menos duas vezes por semana, sugerindo um consumo *per capita* de 12 kg ao ano (LUNDSTEDT; RODRIGUES; MORO, 2016). Não existem dados acerca do consumo *per capita* de rãs no Brasil; contudo, o consumo de carne de rã no país é ainda pequeno, não sendo devidamente valorizados os variados atributos nutricionais que possui. Ainda, por ser qualificada como uma carne exótica e nobre, acredita-se que a maioria dos consumidores do país apresentem uma renda média superior e nível sociocultural elevado (CARRARO, 2008).

Para Lima, Teixeira e Costa (2006), o preço elevado da carne de rã está entre os principais entraves enfrentados no comércio interno, o que restringe o consumo da população e consequentemente reduz a oferta e caracteriza o elevado custo de produção. Outros fatores limitantes incluem o preconceito quanto ao aspecto físico da carcaça inteira por parte dos consumidores, o que desestimularia o consumo e a falta de hábito (WEICHERT; MELLO; ESPINDOLA, 2007). Para driblar alguns destes obstáculos, de acordo com Ferreira, Pimenta e Paiva Neto (2002), ações devem ser

concentradas na maximização do processamento da carne e no desenvolvimento de subprodutos, fatia de mercado ainda pouca explorada e com potencial, bem como na redução do preço das rações, principal insumo utilizado na ranicultura.

Além dos entraves supracitados enfrentados pelo setor, as altas taxas de mortalidade frequentemente observadas, somam-se aos altos custos da produção, decorrentes muitas vezes de falhas no manejo, do canibalismo entre os animais, instalações inadequadas e da ocorrência de doenças provocadas por agentes infecciosos. Sendo assim, um dos grandes desafios da ranicultura concentra-se na ocorrência de enfermidades causadas por vários tipos de patógenos, resultantes da intensificação da produção, muitas vezes associada a fatores estressores do ambiente de cultivo, como problemas com a qualidade da água e a alta densidade populacional, que resultam em imunossupressão e criam um ambiente favorável aos surtos epizooticos (ANTONUCCI et al., 2012; HIPOLITO, 2004; MAZZONI, 2003).

Um maior enfoque tem sido dado aos aspectos sanitários produtivos da ranicultura em virtude do incremento da produção na última década e da evolução dos conhecimentos a respeito do manejo. Sendo assim, diferentes agentes etiológicos já foram associados a doenças infecciosas no setor e relatados na literatura, incluindo os de origem bacteriana (*Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* spp., *Mycobacterium* spp. e *Staphylococcus aureus*); fúngica, com o *Batrachochytridium dendrobatidis* como o mais importante e diversos parasitas (*Longibucca catesbeianae*, *Lernaea cyprinacea*, *Cryptosporidium* e *Giardia* spp.) (HIPOLITO; BACH, 2002).

Quanto aos agentes virais, os vírus são amplamente reconhecidos como os patógenos que afetam mais negativamente o setor aquícola como um todo, sobretudo devido aos seus efeitos devastadores com altas taxas de mortalidade, pela difícil prevenção e controle, além da elevada suscetibilidade dos animais jovens, inexistência de tratamentos efetivos e conhecimento limitado da patogênese das doenças virais e dos mecanismos de resposta imune em animais aquáticos (CRANE; HYATT, 2011; DEWITTE-ORR, 2006). Para a ranicultura em particular, não seria diferente; o gênero *Ranavirus* ocupa papel de destaque por acarretar grandes perdas na produção ranícola e por estar envolvido no declínio das populações naturais de anfíbios em todo o mundo, sendo considerado uma ameaça emergente e assim de notificação obrigatória (CHINCHAR, 2002; DUFFUS et al., 2008; MAZZONI et al., 2009).

2.2 Gênero *Ranavirus*

Entre as doenças virais reconhecidamente importantes para animais aquáticos, destaca-se a ranavirose, que ao longo das últimas décadas tem sido responsável por grande impacto econômico e ecológico (JANCOVICH et al., 2010; CHINCHAR; WALTEZEK, 2014). As ranaviroses são desencadeadas por ranavírus pertencentes ao gênero *Ranavirus* da família *Iridoviridae*, recentemente classificada em duas subfamílias: *Alphairidovirinae* e *Betairidovirinae* (CHINCHAR et al., 2017). A subfamília *Alphairidovirinae* compreende três gêneros, incluindo o gênero *Ranavirus*, com espécies capazes de infectar uma elevada gama de vertebrados ectotérmicos, estando associados a eventos de mortandade de anfíbios, répteis e peixes, e os gêneros *Megalocytivirus* e *Lymphocystisvirus*, que infectam exclusivamente peixes. A subfamília *Betairidovirinae*, por sua vez, compreende os gêneros *Iridovirus* e *Chloriridovirus*, conhecidos pela infecção de invertebrados, especialmente artrópodes (CHINCHAR et al., 2017; GRAY; MILLER; HOVERMAN, 2009; MARSCHANG, 2011; JANCOVICH et al., 2015).

Existem atualmente sete espécies oficialmente reconhecidas e atribuídas ao gênero *Ranavirus*: *Ambystoma tigrinum virus* (ATV), *Epizootic haematopoietic necrosis virus* (EHNV), *Bohle iridovirus* (BIV), *Santee-Cooper ranavirus* (SCRV), *European catfish virus* (ECV), *Singapore grouper iridovirus* (SGIV) e FV3, que é o membro mais bem caracterizado da família *Iridoviridae* (CHINCHAR et al., 2017; CHINCHAR; WALTZEK, 2014; JANCOVICH et al., 2012). Dentro de cada espécie existem ainda isolados geneticamente distantes, ainda não reconhecidos como espécie pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (*International Committee on the Taxonomy of Viruses*) (ICTV) (JANCOVICH et al., 2012) (Tabela 1).

Segundo Jancovich et al. (2012), as espécies do gênero *Ranavirus* são diferenciadas baseando-se em diversos critérios moleculares, a incluir: os perfis de restrição, obtidos após a utilização de enzimas de restrição que revelam o polimorfismo em fragmentos de DNA, análise da sequência genômica, perfis das proteínas dos ranavírus, bem como especificidade de hospedeiros. Ademais, para distinguir os *Ranavirus* de outros gêneros da família *Iridoviridae*, leva-se em consideração a similaridade do gene MCP, que codifica a proteína principal do capsídeo (*major capsid protein*), sendo altamente conservado nas espécies de *Ranavirus*, além da presença do gene que codifica a enzima metiltransferase,

responsável por metilar o DNA viral, do teor de G+C, do diâmetro das partículas virais, da doença clínica como um todo e da gama de hospedeiros (CHINCHAR et al., 2017; WILLIAMS; BARBOSA-SOLOMIEU; CHINCHAR, 2005).

Tabela 1 – Espécies e isolados do gênero *Ranavirus*, seguidos da lista de vírus ainda não aprovados como espécie dentro do gênero

Espécies	Isolados
<i>Ambystoma tigrinum virus</i>	Ambystoma tigrinum virus (ATV) [Regina ranavirus]
<i>Epizootic haematopoietic necrosis virus</i>	Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV)
<i>Bohle iridovirus</i>	Bohle iridovirus (BIV)
<i>Santee-Cooper ranavirus</i>	Santee-Cooper ranavirus (SCRV) [Largemouth bass vírus (LMBV)]
<i>European catfish virus</i>	European catfish virus (ECV) [European sheatfish vírus (ESV)]
<i>Singapore grouper iridovirus</i>	Singapore grouper iridovirus (SGIV)
<i>Frog virus 3</i>	Frog virus 3 (FV3) [Tiger frog virus (TFV)]
Possíveis espécies	
Grouper iridovirus (GIV)	
Rana esculenta virus (REIR)	
Common midwife toad virus (CMTV)	
Andrias davidianus ranavirus (ADRV)	
Cod iridovirus (COIV)	
Short-finned eel ranavirus (SERV)	
Pike-perch iridovirus (PPIV)	
Ranavirus maxima (RMAX)	

Fonte: Adaptado de JANCOVICH, J. K. et al. *Ranavirus taxonomy and phylogeny*. In: GRAY, M.J.; CHINCHAR, V.G. **Ranavirus: Lethal pathogens of ectothermic vertebrates**. New York: Springer Open, 2015. []: Sinônimos.

2.2.1 Estrutura do vírion

Ranavírus são vírus grandes, com aproximadamente 150 a 200 nm de diâmetro, com um genoma composto por uma única molécula linear de DNA de fita dupla com tamanho variável de 104 a 140 kbp, dependendo da espécie considerada (EATON et al., 2007; JANCOVICH et al., 2012). Com simetria icosaédrica, o vírion é constituído por um capsídeo proteico icosaédrico, formado em grande parte pela proteína MCP (40%), que apresenta domínios altamente conservados e um peso

molecular próximo a 50 kDa, uma membrana polipeptídica-lipídica intermediária, que estabiliza o capsídeo, e um núcleo central composto pelo genoma viral e proteínas associadas, sendo as partículas infecciosas envelopadas ou não, o que é dependente do modo de saída viral da célula hospedeira infectada (CHINCHAR et al., 2009) (Figura 3).

Figura 3 – Representação esquemática da estrutura do vírion: Gênero *Ranavirus*

Legenda: Desenho esquemático do vírion não envelopado, evidenciando o capsídeo, membrana intermediária e o genoma DNA, e do vírion envelopado, com enfoque nas proteínas de superfície e na membrana externa.

Fonte: Adaptado de Viralzone, Swiss Institute of Bioinformatics, 2009 http://viralzone.expasy.org/all_by_species/585.html. Acesso em: 02 de jul de 2018.

2.2.2 Propriedades genômicas

Ranavírus apresentam um genoma com aproximadamente 49-57% de G+C, sendo este altamente metilado com a finalidade da suposta proteção do DNA viral frente a uma endonuclease codificada por estes vírus, com exceção da espécie SGIV, e permutado circularmente com terminações redundantes, o que é resultante da formação de concatâmeros durante a replicação viral (CHINCHAR, 2002; JANCovich et al., 2015).

Embora as sequências genômicas completas de mais de onze espécies de ranavírus, incluindo a FV3, e outros isolados já tenham sido determinadas, as funções da grande maioria dos genes são desconhecidas, tendo-se por base a homologia com

genes de outros organismos (JANCOVICH et al., 2015). O genoma do FV3 não possui regiões de íntrons e conta com aproximadamente 98 ORFs (*Open reading frame* - Quadro aberto de leitura) (TAN et al., 2004), que codificam proteínas envolvidas na replicação, reparo e transcrição do DNA, proteínas com função estrutural e no metabolismo nucleotídico, e ainda proteínas exclusivas da espécie FV3, muitas com funções desconhecidas, incluindo várias que provavelmente contribuam para a virulência e evasão do sistema imune (GRAY; MILLER; HOVERMAN, 2009; GRAYFER et al., 2015).

Dentre estes produtos gênicos, particularmente aqueles necessários à replicação e transcrição viral, estão a DNA polimerase e as duas subunidades da RNA polimerase II, ambas codificadas pelos ranavírus, bem como proteínas estruturais, a incluir MCP. Quanto aos que desempenham função no metabolismo nucleotídico, podem ser citados as enzimas timidilato sintase, dUTPase (Deoxiuridina-trifosfatase) e ribonucleotídeo redutase (WHITLEY et al., 2011). Ademais, no gênero *Ranavirus*, genes relacionados à virulência e evasão do sistema imune incluem um homólogo do fator de iniciação da tradução em eucariotos (eIF-2 α), denominado de vIF-2 α , único confirmado até então (JANCOVICH; JACOBS, 2011), uma hidroxisteróide desidrogenase homóloga, vCARD, DNA metiltransferase e uma ribonuclease III-like, ambas identificadas através de homologia com vírus pertencentes a outras famílias (GRAYFER et al., 2015).

2.2.3 Replicação viral

O ciclo de replicação dos ranavírus foi elucidado em parte, tendo-se como modelo a espécie FV3, membro melhor caracterizado dentro da família *Iridoviridae*. FV3, *in vitro*, é capaz de infectar células de peixes, répteis, anfíbios e mamíferos, sob temperatura ótima de replicação que varia de 26 a 30°C, sendo a replicação inibida a temperaturas superiores a 32°C, o que poderia restringir a replicação *in vivo* a certo número de hospedeiros. Ademais, a infectividade dos ranavírus é perdida a pH entre 2,0-3,0 e a temperaturas acima de 50°C (BRAUNWALD; NONNENMACHER; TRIPIER-DARCY, 1985; CHINCHAR et al., 2009; CHINCHAR; WALTZEK, 2014).

Conforme já exposto, dentre os ranavírus existem partículas envelopadas ou não e, embora ambas sejam infecciosas, os vírions envelopados possuem uma maior infectividade, o que sugere a função proeminente de uma ou mais proteínas presentes

no envelope que auxiliariam a entrada do vírion na célula (BRAUNWALD; NONNENMACHER; TRIPIER-DARCY, 1985; WILLIAMS; BARBOSA-SOLOMIEU; CHINCHAR, 2005). Em suma, os ranavírus entram na célula hospedeira via endocitose mediada por receptor (partículas envelopadas) ou por fusão com a membrana plasmática celular (partículas não envelopadas), sendo que a replicação do DNA ocorre em duas etapas, no núcleo e no citoplasma, utilizando-se tanto de enzimas do hospedeiro quanto virais (CHINCHAR, 2002; CHINCHAR; WALTZEK, 2014; LIU et al., 2016).

Após a liberação do material genético, o DNA viral é translocado ao núcleo celular, onde ocorre a primeira fase do processo replicativo com a transcrição dos genes precoces imediatos (PI) e precoces tardios (PT), através da RNA polimerase II do hospedeiro, tendo como molde o genoma viral. Além disso, a capacidade da RNA polimerase II em catalisar a transcrição viral dos genes PI e PT parece ser dependente da presença de duas outras proteínas virais, uma delas a proteína trans-ativadora associada ao vírion (VTAP). Na sequência, ocorre a síntese de cópias do genoma viral, ainda no núcleo, mediante ação de uma DNA polimerase viral expressa como produto da transcrição dos genes PI (CHINCHAR, 2002; GOORHA, 1982).

O DNA viral sintetizado atua como molde e é transportado do núcleo para o citoplasma celular, no qual ocorre o segundo estágio da replicação, com a metilação do DNA viral no citoplasma, por ação de uma DNA metiltransferase codificada pelos ranavírus, que supostamente protege o DNA do ataque endonucleolítico celular (GOORHA et al. 1984). Além do mais, tem sido sugerido que a metilação do DNA ocorra a fim de impedir a indução da resposta imune inata do hospedeiro via receptor Toll-like 9 (WILLIAMS; BARBOSA-SOLOMIEU; CHINCHAR, 2005).

Dentro do citoplasma, um segundo ciclo de síntese de DNA viral ocorre e resulta na formação de concatâmeros de DNA. A transcrição dos genes tardios, que são traduzidos em proteína estruturais, ocorre no citoplasma e são catalisados pela RNA polimerase II codificada pelos ranavírus. Assim, proteínas estruturais virais e o DNA são empacotados em vírions, nos locais de morfogênese viral. Os vírions se acumulam no citoplasma, formando grandes arranjos paracristalinos característicos dos iridovírus, deixando a célula por lise ou via brotamento a partir da membrana plasmática celular, onde adquirem o envelope (Figura 4 e 5) (CHINCHAR; WALTZEK, 2014; WILLIAMS; BARBOSA-SOLOMIEU; CHINCHAR, 2005).

Figura 4 – Diagrama esquemático do ciclo de replicação dos ranavírus

Legenda: Os vírions entram na célula por duas vias possíveis. No núcleo celular, ocorrem os eventos iniciais da replicação viral, a incluir a síntese do genoma e a transcrição dos genes precoces imediatos e tardios. O DNA viral é transportado até o citoplasma, onde é metilado e utilizado como molde para a formação dos concatâmeros. Nos locais de montagem do vírião unem-se ao DNA viral proteínas estruturais codificadas pelos ranavírus. Os vírions sintetizados podem ser encontrados no citoplasma de forma livre, em arranjos paracristalinos ou em brotamento a partir da membrana plasmática.

Fonte: Adaptado de JANCOVICH, J. K. et al. *Ranavirus replication: Molecular, cellular and immunological events*. In: GRAY, M.J.; CHINCHAR, V.G. **Ranavirus: Lethal pathogens of ectothermic vertebrates**. New York: Springer Open, 2015.

Figura 5 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da linhagem celular Fathead minnow (FHM) infectada com FV3

Legenda: Painel à esquerda: Núcleo (N), condensação da cromatina (CC), indicativo de apoptose, * locais de montagem das partículas virais e arranjo paracristalino na seta maior. Setas menores indicando a saída do vírion por brotamento. Painel à direita: A1 e A2: fase intermediária do capsídeo. A3: capsídeo vazio. A4 e A5: vírion maduros. C e E: partículas virais aberrantes. As três setas indicam membranas que podem atuar como arcabouço para a montagem do vírion, juntamente com capsídeos intermediários.

Fonte: CHINCHAR, V. G., WALTZEK, T. B., SUBRAMANIAM, K. *Ranaviruses and other members of the family Iridoviridae: Their place in the virosphere. Virology*, New York, v. 511, p. 259- 271, 2017.

A replicação viral *in vitro* induz alterações celulares denominadas de forma geral, de efeito citopático, que é reconhecido pela formação de corpúsculos de inclusão, acompanhados de arredondamento das células e lise da monocamada celular, podendo ser detectado rapidamente dentro de horas pós-infecção (AHNE et al., 1997). Ranavírus também demonstram induzir morte celular por apoptose, através de alterações características como condensação da cromatina, formando inclusões citoplasmáticas onde se processa a morfogênese das partículas virais, e fragmentação do DNA (CHINCHAR et al., 2003).

2.2.4 Aspectos epidemiológicos

Classificados como patógenos emergentes, com distribuição geográfica e gama de hospedeiros em expansão, os ranavírus têm recebido maior atenção nas últimas décadas, sobretudo devido ao aumento dos relatos de morbidade e mortalidade de anfíbios, répteis e peixes em decorrência de infecções por esses agentes, demonstrando a importância econômica e ecológica destes patógenos frente

aos organismos aquáticos (CHINCHAR; WALTEZEK, 2014; GRAY; MILLER; HOVERMAN, 2009; LESBARRÉRES et al., 2011). Os ranavírus podem infectar pelo menos 175 espécies em 52 famílias de vertebrados ectotérmicos, sendo responsabilizados parcialmente pelo declínio global da população de anfíbios, com potencial para causar extinções. Para os anfíbios, a infecção por ranavírus já foi relatada em pelo menos 105 espécies, sendo este número subestimado (DUFFUS et al., 2015).

Infecções com ranavírus têm sido observadas em todo o mundo, com relatos em pelo menos 25 países (DUFFUS et al., 2015). Assim, diversos membros do gênero *Ranavirus* já foram identificados a partir de anfíbios em cinco continentes, incluindo Oceania, Ásia, América do Norte, Europa e América do Sul (CUNNINGHAM; TEMS; RUSSELL, 2008; DUFFUS et al., 2008; GALLI et al., 2006; GENG et al., 2011; JANCovich et al., 1997; MAZZONI et al., 2009; ZHOU et al., 2013), em répteis na Ásia, Oceania, América do Norte e Europa (DE VOE et al., 2004; CHEN; ZHENG; JIANG, 1999; HUANG et al., 2009; HYATT et al., 2002; MARSCHANG et al., 1999; WINZELER; HAMILTON; TUBERVILLE, 2015), e em peixes na Oceania, Ásia, Europa e América do Norte (AHNE; SCHLOTFELDT; THOMSEN, 1989; BORZYM; KARPINSKA; REICHERT, 2015; PENG et al., 2002; PLUMB et al., 1996; PRASANKOK; CHUTMONGKONKUL; KANCHANAKHAN, 2005).

No Brasil, dados sobre a ocorrência de infecções causadas por ranavírus são restritas. A primeira descrição da circulação de FV3 no país foi realizado por Mazzoni et al. (2009), que constatou mortalidade massiva em girinos (*Lithobates catesbeianus*, anteriormente descrita como *Rana catesbeiana*) criados comercialmente, no período de 2003 a 2005 no estado de Goiás, com taxa de mortalidade que alcançou entre 95 a 100%. No ano de 2006, FV3 foi associado a um evento de mortalidade de girinos em raniculturas uruguaias e brasileiras (GALLI et al., 2006). Mesquita (2014) detectou ranavírus e os associou a rãs que apresentavam síndrome vestibular. Mais recentemente, Oliveira et al. (2017) identificaram molecularmente FV3 em *Lithobates catesbeianus* obtidas de cultivos comerciais do estado de São Paulo. A descrição da infecção por ranavírus em peixes no Brasil foi realizada por Almeida-Queiroz et al. (2014), através da identificação de sequências genômicas de ranavírus em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), coletadas após a ocorrência de surtos sequenciais no estado do Ceará e Bahia.

Indicativo de sua ampla gama de hospedeiros, FV3 tem a habilidade de infectar não só diversas espécies de anuros, mas também tartarugas, salamandras e peixes, com diferentes níveis de susceptibilidade (CHINCHAR; WALTZEK, 2014; DUFFUS et al., 2015). FV3 tem sido isolado de hospedeiros aparentemente saudáveis, sugerindo forma de latência dentro de um hospedeiro imunocompetente, indicando que alguns hospedeiros poderiam atuar como reservatório (GRAYFER et al., 2015). Ainda, a transmissão interclasses, em termos taxonômicos, entre diferentes vertebrados ectotérmicos têm sido demonstrada, sendo isolados ranavírus primeiramente de anfíbios, a partir dos quais podem infectar peixes via infecção experimental ou natural (CHINCHAR, 2002).

As epizootias da doença parecem ser sazonais, com maior ocorrência no verão (CHINCHAR et al., 2009). A transmissão natural dos ranavírus pode ocorrer pelo contato direto com animais infectados, ingestão de tecido infectado ou exposição indireta pela água (OIE, 2018a), onde a via e a magnitude de transmissão estão diretamente correlacionadas com a densidade de hospedeiros e fatores ambientais (BRENES et al., 2014). Possíveis fômites incluem superfícies contaminadas, tais como barcos, sapatos, redes, dentre outros (OIE, 2018a).

2.2.5 Patogênese

A patologia associada aos ranavírus em vertebrados pode manifestar-se de forma sistêmica, subclínica ou levar a uma infecção persistente (BRUNNER et al., 2015; WILLIAMS; BARBOSA-SOLOMIEU; CHINCHAR, 2005). As manifestações clínicas da infecção por ranavírus, incluindo FV3, variam e incluem letargia, natação errática, perda da flutuabilidade, anorexia, apatia e ataxia, podendo resultar em mortalidade significativa (WILLIAMS; BARBOSA-SOLOMIEU; CHINCHAR, 2005). A mortalidade e a morbidade são dependentes de fatores como dose viral e virulência, espécie, idade, origem geográfica e resposta imune do hospedeiro, via de transmissão (direta e/ou indireta), persistência ambiental e fatores estressores (GRAYFER et al., 2015). Para FV3 em especial, a maioria das infecções em anfíbios adultos e sadios são atenuadas ou inibidas pelo sistema imunológico, apresentando mortalidade mínima; no entanto, para anfíbios recentemente metamorfoseados e adultos imunocomprometidos as taxas de mortalidades são frequentemente altas, podendo chegar a 100% (GANTRESS et al., 2003; ROBERT et al., 2005).

Hemorragias multifocais cutâneas, eritema e edema da pele, exoftalmia, necrose e hemorragia sistêmica são manifestações clínicas tipicamente observadas para os ranavírus (MORRISON et al., 2014; SCHOCK; BOLLINGER; COLLINS, 2009). A elevada patogenicidade destes patógenos tem sido atrelada ao seu tropismo por tecidos hematopoiéticos. Histologicamente, a infecção por ranavírus envolve a necrose focal ou generalizada de órgãos como os rins, fígado, baço e trato gastrointestinal (MORRISON et al., 2014; WILLIAMS; BARBOSA-SOLOMIEU; CHINCHAR, 2005).

2.2.6 Diagnóstico

Os ranavírus que infectam anfíbios são listados como de notificação obrigatória à OIE, portanto existem recomendações a serem seguidas para o correto diagnóstico da ranavirose (OIE, 2018a). Segundo o Manual de Testes de Diagnósticos para Animais Aquáticos (OIE, 2018b), a confirmação de ranavírus como agente etiológico de evento de mortalidade requer a associação de múltiplas ferramentas diagnósticas; no entanto, o isolamento viral em cultura de células é considerado o método padrão-ouro para ranavírus, devido a alta especificidade e sensibilidade, sendo a técnica direcionada para a vigilância de girinos, animais metamorfoseados e adultos, tanto no diagnóstico presuntivo, quanto confirmatório.

O isolamento viral em cultura de células, que detecta a presença de vírions infecciosos, ou seja, capazes de se replicar e causar doença, pode ser realizado em algumas linhagens celulares, mas a linhagem celular BF-2 (Bluegill fry, ATCC® CCL 91), é a mais utilizada pelos laboratórios de referência (OIE, 2018b). Ranavírus possuem tropismo por órgãos principais como fígado, baço, rins, pulmões e coração de anfíbios, peixes e répteis, sendo o *pool* destes órgãos apropriado como amostra de eleição no isolamento viral. O efeito citopático causado pela infecção dos ranavírus em culturas de células é um aspecto importante, compreendido em lise focal das células, acompanhado da destruição da monocamada celular ao longo dos dias de infecção (Figura 6); no entanto, somente a aparência do efeito citopático desencadeado não é suficiente para indicar a presença de ranavírus (MILLER et al., 2015).

Figura 6 – Efeito citopático de EHNV em células BF-2

Legenda: Efeito citopático da espécie EHNV evidenciando a presença de focos de lise na monocamada celular, com células arredondadas nas margens (setas).

Fonte: MILLER, D. L. et al. Comparative Pathology of Ranaviruses and Diagnostic Techniques. In: GRAY, M. J.; CHINCHAR, V. G. **Ranavirus**: lethal pathogens of ectothermic vertebrates. New York: Springer Open, 2015.

Sendo assim, a confirmação da presença de ranavírus deve ser realizada por outros métodos, como os baseados na reação em cadeia da polimerase - *Polymerase chain reaction* (PCR), que detectam a presença do ácido nucleico viral. Com esta finalidade, um dos genes-alvo mais utilizados na confecção de *primers* é o gene MCP, dada a sua alta conservação para as espécies de *Ranavirus* (HOLOPAINEN et al., 2009; TIDONA et al., 1998). Além de MCP, outros marcadores como os genes da DNA polimerase e da DNA metiltransferase, codificadas por estes vírus, já foram utilizados como alvo (HOLOPAINEN et al., 2009; IWANOWICZ et al., 2013). O sequenciamento de DNA dos produtos obtidos na PCR, também incluído no manual da OIE, pode confirmar o resultado positivo e permite ainda a categorização das espécies (MILLER et al., 2015).

A associação de diferentes técnicas para a identificação apropriada dos ranavírus incluem métodos que detectam diretamente os vírus, como a microscopia eletrônica de transmissão, através da visualização do tamanho e formato icosaédrico das partículas virais, ou pela hibridização *in situ*, através da utilização de sondas.

Ademais, métodos que visam a detecção dos antígenos virais, geralmente direcionados ao MCP, com marcação indireta com anticorpos e conjugados fluorescentes, podem ser utilizados, o que permite a detecção de ranavírus em culturas de células ou em tecidos (AHNE et al., 1998; OIE, 2018b). Para além dos métodos apresentados, as observações histológicas de lesões características podem fornecer evidências preliminares de ranavirose, juntamente com o estado clínico ou achados patológicos no animal infectado (MILLER et al., 2015).

2.2.7 Tratamento e profilaxia

Não existem tratamentos específicos ou vacinas disponíveis para as ranavirose. Desta forma, a melhor estratégia de controle são as medidas preventivas, dentre as quais estão a manutenção da qualidade da água, quarentena para os animais a serem introduzidos e a minimização do estresse, através de densidade populacional adequada (MCDERMOTT; PALMEIRO, 2013). Dentre os métodos efetivos para a inativação dos ranavírus, segundo aponta a OIE (2018b), estão a utilização de álcool 70%, hipoclorito de sódio 3%, monopersulfato de potássio 1% (Virkon®) e o tratamento térmico acima de 60°C, durante 15 minutos.

2.3 Resposta imune à infecção por Ranavirus

O entendimento sobre a resposta imunológica desencadeada pelos *Ranavirus*, em especial FV3, avançou na última década para os anfíbios, empregando-se como modelo a espécie de rã *Xenopus laevis* (GRAYFER et al., 2015). Morales et al. (2010) ao avaliarem a resposta inata de anfíbios adultos *Xenopus laevis* infectados por FV3, observaram o aumento de leucócitos peritoneais semelhantes a macrófagos no primeiro dia pós-infecção, seguido do recrutamento peritoneal das NKs em três dias, com pico de linfócitos T em 6 dias. Neste mesmo estudo, demonstraram a rápida expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α , que se correlacionam com o rápido recrutamento dos leucócitos, demonstrando uma resposta pró-inflamatória rápida e bem ordenada. Em experimento que objetivou comparar a resposta inata em girinos e adultos *Xenopus laevis*, ambos infectados com FV3, verificou-se que os girinos apresentaram expressão gênica reduzida e retardada de IL-1 β , TNF- α e Interferon-gama (IFN- γ) quando comparados aos adultos.

Curiosamente, ao estimularem os girinos com *Escherichia coli* inativada, observou-se a rápida indução destes genes que, segundo os autores, poderia ser explicado por fatores como a evasão imune de FV3 e a deficiência em receptores nos girinos (DE JESÚS ANDINO et al. 2012). Grayfer, Andino e Robert (2015), ao realizarem a clonagem e o sequenciamento de IFN de *Xenopus laevis* (XL-IFN), demonstraram que os girinos possuem defesa mediada por XL-IFN, sendo transitoriamente protegidos, o que, no entanto, não impediu a morte destes animais.

A forma pela qual os ranavírus se disseminam pelos órgãos ainda não é clara; entretanto, em anfíbios, aponta-se para o papel dos macrófagos e monócitos infectados que atuariam como portadores e disseminariam estes vírus para múltiplos tecidos distais e locais (GRAYFER et al., 2015). Outrossim, como observado em outros vírus como o Herpes simplex vírus e o vírus da imunodeficiência adquirida, que ao infectarem os macrófagos permanecem em estado de latência (COIRAS et al., 2009; WECK et al., 1999), acredita-se que os ranavírus também possam utilizar-se deste recurso, com referência à infecção persistente no hospedeiro e potencial reservatório viral (ROBERT et al., 2014).

Alguns autores sugeriram que os macrófagos de *Xenopus laevis* poderiam atuar como portadores de FV3, que permaneceria em latência em animais assintomáticos (MORALES et al., 2010; ROBERT et al., 2011). Robert et al. (2014) apresentaram evidências concretas do papel dos macrófagos na persistência de FV3 em *Xenopus laevis* adultos e assintomáticos, sendo possível a reativação do vírus e reestabelecimento da infecção anteriormente latente. Recentemente, Andino et al. (2016) propuseram que a disseminação de FV3 para os tecidos neurais de *Xenopus laevis* se dá através dos macrófagos, que transportariam os ranavírus até mesmo para órgãos menos permissíveis como o cérebro. Os autores ainda detectaram o aumento da expressão de genes pró-inflamatórios no cérebro dos girinos, como TNF- α , IL- β , IFN do tipo I e MHC de classe II, sugerindo que a maior susceptibilidade dos girinos possa ocorrer devido às estratégias dos ranavírus em evadir das respostas imunes e não da ausência de uma resposta imunológica.

Gantress et al. (2003), ao avaliarem a resposta imune adaptativa em adultos *Xenopus laevis*, demonstraram que esses animais produzem uma resposta humoral após infecção secundária de FV3, resultando em depuração viral antecipada e em geração de anticorpos do isotipo IgY anti-FV3, equivalentes funcionalmente ao isotipo IgG de mamíferos. Demonstrou-se, na mesma espécie, que os linfócitos T citotóxicos

(CD8) desses animais estão implicados criticamente no reconhecimento e na depuração de FV3 e que, após uma infecção secundária, esses desenvolvem IgY e uma resposta mais rápida dos linfócitos T citotóxicos, indicativo de memória imunológica (MANIERO et al., 2006).

Holopainen, Tapiovaara e Honkanen (2012) avaliaram a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias em células epiteliais de origem piscícola EPC (*Epithelioma papulosum cyprini*), frente à infecção por quatro ranavírus distintos, EHNV, FV3, ECV e o isolado ainda não reconhecido DFV (Doctor fish virus). Todos os ranavírus induziram a expressão de β 2-microglobulina, em diferentes tempos, sugerindo que a resposta imune adaptativa pode ser induzida pelos ranavírus. Especificamente, as espécies FV3 e EHNV induziram notável expressão de IL-1 β e TNF- α , indicando uma forte resposta pró-inflamatória.

Mais recentemente, em estudo com *microarray*, tendo-se como modelo a linhagem celular FHM (*Pimephales promelas*) infectada com FV3 selvagem ou com um mutante (“nocaute”) de FV3 para o gene vIF-2 α , observou-se que 8 horas pós-infecção a regulação positiva transcricional maior, de 4 vezes ou mais, para os genes como IFN, fatores reguladores de IFN, Mx, MHC de classe I, IL-1 β , IL-8, IL-17 e IL-12, induzida pela estirpe selvagem quando comparada com a magnitude transcricional induzida pela infecção com a estirpe mutante (CHENG et al., 2014). Ou-Yang et al. (2012) demonstraram que a vacinação experimental com SGIV inativado, em peixes da espécie *Epinephelus coioides*, induziu a expressão potente de genes imunes como IL-1 β , IL-8, ISG15, Mx1 e MHC de classe I e II, e posteriormente respostas específicas celular e humoral, com quantidade substancial de anticorpos específicos no soro desses animais.

2.4 Apoptose

Durante muito tempo, a morte celular foi considerada um mecanismo passivo e degenerativo, até que em 1972 o termo apoptose, do grego “*apo* = separação e *ptosis* = queda”, foi introduzido por Kerr, Wyllie e Currie, para designar um tipo de morte celular altamente regulada e ativa, com nenhum ou pouco efeito sobre células circunvizinhas e que desempenha função vital durante o desenvolvimento embrionário e na manutenção da homeostase de diferentes tecidos, de modo que a proliferação

celular (mitose) esteja em equilíbrio com a morte celular (apoptose) (SAVITSKAYA; ONISHCHENKO, 2015; ULUKAYA; ACILAN; YILMAN, 2011; WEI; FAN; YU, 2008).

Além da apoptose, existem outros processos de morte celular descritos; no entanto, a remoção de células infectadas por vírus é frequentemente associada com apoptose ou necrose que resultam em morfologia proeminentemente distinta. Em contraste à apoptose, a necrose refere-se à morte celular acidental e passiva em decorrência de danos fisiológicos ou patológicos, culminando em resposta inflamatória devido sobretudo ao aumento do volume celular, seguido de ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo intracelular (FINK; COOKSON, 2005; NIKOLETOPOULOU et al., 2013).

Uma das características moleculares mais marcantes da apoptose é a ativação das caspases, uma família de cisteína-proteases que reconhecem e clivam substratos que possuam resíduos de ácido aspártico e que estão presentes no citoplasma celular na forma de pró-enzimas inativas, sendo ativas quando da presença de estímulo estressante que gere dano ao DNA. Na cascata apoptótica, estas enzimas são classificadas em caspases iniciadoras, como as caspases 2, 8, 9 e 10 e em caspases efetoras ou apoptóticas, que compreendem as caspases 3, 6 e 7, grupo mais importante visto que após a ativação destas a apoptose se torna irreversível (CHANG; YANG, 2000; GRUTTER, 2000).

Uma vez ativas, as caspases efetoras acarretam as alterações apoptóticas bioquímicas e morfológicas típicas que culminam em morte celular, pois clivam diversos substratos intracelulares, como o complexo proteico ICAD, do inglês “*inhibitor of CAD*” (inibidor de CAD), dando origem à CAD, do inglês “*caspase activated DNase* (DNA ativada por caspase), endonuclease que degrada o DNA entre os nucleossomos. Outras proteínas, como a PAK2 (quinase 2 ativada por p21) e a gelsolina por exemplo, quando clivadas pelas caspases efetoras, produzem alterações morfológicas típicas da apoptose, incluindo os corpos apoptóticos e a formação dos “*blebs*” na membrana celular (CHANG; YANG, 2000; HENGARTNER, 2000).

O estímulo de ativação da apoptose ocorre por duas vias principais, chamadas de vias extrínseca e intrínseca, que convergem na ativação das caspases. Para a via extrínseca, a ativação se dá por meio de receptores de morte presentes na superfície celular, tais como os da superfamília dos fatores de necrose tumoral (TNFR), por meio de sinais externos à célula, que levam a ativação das caspases iniciadoras, que

amplificam o sinal de morte pela clivagem das caspases efetoras, as quais clivam os componentes celulares importantes para a caracterização da apoptose, como os supracitados acima. Em contrapartida, a via intrínseca inicia-se por estímulos oriundos do interior celular que resultam em alterações na permeabilidade membranaar mitocondrial, permitindo a liberação do citocromo C e de proteínas pró-apoptóticas ao citosol, resultando também na ativação da cascata de caspases (ELMORE, 2007; HENGARTNER, 2000) (Figura 7).

Além das duas vias principais de ativação da apoptose, existe uma via suplementar que envolve os linfócitos T citotóxicos e as células *natural killer* (NK), mediante a liberação das proteínas perforina e granzima B, que provocam a ativação direta das caspases efetoras (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008). No mais, a apoptose também pode ser desencadeada por vias independentes da ativação das caspases, através de fatores mitocondriais, como pela translocação da endonuclease G e do fator de indução da apoptose (AIF) para o núcleo celular, onde cooperam diretamente na condensação da cromatina, fragmentação do DNA e morte celular (CHANG; YANG, 2000).

Figura 7 – Vias de morte celular por apoptose

Legenda: Representação esquemática das vias extrínseca (a) e intrínseca (b) da apoptose. A via extrínseca é iniciada através da interação de receptores de morte presentes na membrana plasmática com seus ligantes respectivos, e a comunicação com a mitocôndria nesta via é realizada pela proteína BID. A via intrínseca, ou mitocondrial, é desencadeada por estresse intracelular. Ambas as vias convergem na ativação das caspases efectoras 3 e 7, que induzem apoptose. Para a via intrínseca, a permeabilização membranar mitocondrial (MMP) resulta em mecanismos dependentes das caspases, quando da liberação do citocromo c (CYT C) e de proteínas pró-apoptóticas ao citoplasma, com a formação do apoptossoma e ativação das caspases efectoras e de mecanismos independentes das caspases, desencadeada por fatores mitocondriais.

Fonte: Adaptado de: GALLUZZI, L., BLOMGREN, K., KROEMER. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. **Nat. Rev. Neurosci.**, London, v. 10, n. 7, p. 481-494, 2009.

De forma geral, quanto à modulação da apoptose, a proporção entre moléculas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas determina se a célula deve ou não corresponder ao estímulo apoptótico (WEI; FAN; YU, 2008). Como exemplo, na presença de um dano irreparável ao DNA celular, a proteína supressora tumoral p53 induz apoptose através do aumento da expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax (do inglês, *Bcl-2 associated X protein*), alterando assim a razão entre Bax e o grupo de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (do inglês, *B-cell lymphoma protein 2*). Ademais, vários são os

inibidores da apoptose que atuam bloqueando a ativação das caspases por ligações diretas ou em demais vias da cascata (ULUKAYA; ACILAN; YILMAN, 2011).

As alterações morfológicas características, resultantes desses eventos bioquímicos, quando avaliadas em conjunto, são critérios confiáveis para se detectar a ocorrência de apoptose (CARMONA-GUTIERREZ et al., 2010; HÄCKER, 2000). Morfologicamente, as células apoptóticas podem ser reconhecidas por propriedades que incluem a condensação da cromatina, que se concentra junto à membrana nuclear, e pela perda da aderência à matriz extracelular e às células vizinhas. Ocorrem protusões na membrana plasmática, frequentemente denominadas de “*blebs*”. O citoplasma e o núcleo celular se condensam, e o DNA se fragmenta devido à ação das endonucleases. As organelas geralmente permanecem intactas e vacúolos citoplasmáticos podem ser observados. A célula desintegra-se em corpos apoptóticos que podem conter qualquer parte do material celular, o que permite a rápida e eficiente remoção por macrófagos, sem desencadear resposta inflamatória, sendo a exposição da fosfatidilserina na superfície celular um sinal para a fagocitose desses (BLAGOSKLONNY, 2000; HACKER, 2000; TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008).

2.4.1 Ranavírus e apoptose

No transcorrer de uma infecção viral, a apoptose atua prontamente na remoção de células infectadas por vírus, limitando assim a sua multiplicação e disseminação, protegendo o hospedeiro de danos adicionais. No entanto, os vírus podem desenvolver estratégias a fim de se utilizarem desse mecanismo em vantagem própria, inibindo ou atrasando a apoptose, alcançando assim altos títulos e aumentando as chances de propagação sistêmica devido sobretudo ao retardo da resposta imunológica, ou do contrário, induzindo a apoptose na célula hospedeira, disseminando dessa forma a progênie viral sem desencadear um processo inflamatório, o que é dependente de seu estágio replicativo, podendo ocorrer de forma simultânea (COLLET, 2014; O'BRIEN, 1998; TEODORO; BRANTON, 1997).

Integrantes do gênero *Ranavirus* demonstraram induzir apoptose em estudos *in vitro*, a saber: FV3 (CHINCHAR et al., 2003; HOLOPAINEN; TAPIOVAARA; HONKANEN, 2012; PHAM et al., 2015), EHNV (ESSBAUER; AHNE, 2002; HOLOPAINEN; TAPIOVAARA; HONKANEN, 2012), ECV (HOLOPAINEN;

TAPIOVAARA; HONKANEN, 2012), GIV (LAI et al., 2008; PHAM et al., 2012), SGIV (HUANG et al., 2011) e RGV (Rana grylio iridovirus) (HUANG et al., 2007).

FV3 induziu apoptose em linhagem celular derivada de macrófagos de peixes, pela evidência de dois marcadores apoptóticos: fragmentação do DNA e exposição de fosfatidilserina na membrana celular. Em contraste, alterações apoptóticas não foram observadas em três linhagens de origem epitelial (RTL-W1 – fígado, RTgut-GC - trato gastrointestinal e RTgill-W1 - guelras) e em células da linhagem de fibroblastos (RTG-2 – gónadas e RTHDF – pele), quando infectadas com FV3 (PHAM et al., 2015).

Segundo Chinchar et al. (2003), a apoptose induzida por FV3 inicia-se 6 a 7 horas pós infecção e, provavelmente, resulte do bloqueio da tradução celular e ativação da proteinoquinase R (PRK) por FV3, depois de catalisar eIF-2 α , evento esse já vinculado à indução de apoptose por outros vírus. Essbauer e Ahne (2002) demonstram que a apoptose induzida pela espécie EHNV foi bloqueada por um inibidor específico da PKR, o que sugere novamente o seu envolvimento na indução da apoptose durante a infecção pelos ranavírus.

Chinchar et al. (2003) ressaltaram ainda que a apoptose induzida por FV3 não requer a expressão gênica viral, visto que tanto a infecção por vírions infecciosos e não infecciosos (inativados por luz UV ou calor) desencadeiam apoptose. No entanto, ainda não foi determinado se esta é desencadeada direta ou indiretamente por proteínas associadas ao vírion. Pham et al. (2012) também evidenciaram que GIV, quando inativado por luz UV, pode induzir apoptose em duas linhagens celulares. Ademais, Chinchar et al. (2003) ainda relatam que a apoptose pode ser bloqueada por um inibidor de caspases, indicando que a apoptose induzida por FV3 é provavelmente caspase dependente. Huang et al. (2007), demonstraram que o isolado RGV induz apoptose através de uma via caspase dependente, com ativação das caspases 3 e 9. Além disso, RGV induziu a fragmentação do DNA celular, a condensação da cromatina e alterações na dinâmica das mitocôndrias, com acentuada fragmentação mitocondrial, indicativo de apoptose mediada pela via intrínseca (mitocondrial).

De modo contrário, como exposto acima, Cheng et al. (2015) demonstram que a espécie GIV, cujo genoma codifica um gene anti-apoptótico do domínio de recrutamento de caspases (CARD), pode bloquear a apoptose durante a infecção *in*

vitro, o que pode ser um indicador de que o vírus evoluiu com vistas a equilibrar os processos apoptóticos durante a infecção.

De fato, a indução ou a inibição da apoptose é resultado do estreito balanço existente entre os vírus, com seus mecanismos anti ou pró-apoptóticos e a defesa antiviral do hospedeiro, perfazendo-se assim a necessidade de estudos que investiguem e explorem esses mecanismos para que seja possível uma melhor compreensão e possível modulação da resposta imune antiviral, inibindo assim a replicação dos vírus, com a potencial aplicação futura de compostos agindo sobre novos alvos terapêuticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi isolar uma estirpe patogênica de *Frog virus 3-like* proveniente *Lithobates catesbeianus*, em evento de alta mortalidade registrado em ranário comercial do estado de São Paulo, Brasil, confirmá-la por caracterização molecular e fenotípica e ainda verificar a possível ativação do mecanismo de morte celular por apoptose induzido pela estirpe.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar *Frog virus 3-like* de tecidos de *Lithobates catesbeianus* em culturas de células BF-2 e observar o efeito citopático desencadeado pela infecção viral;
- Confirmar o isolamento viral por diagnóstico molecular, utilizando dois marcadores (MCP e 53R);
- Realizar a caracterização molecular através do sequenciamento nucleotídico parcial do DNA viral obtido, com análises comparativa e filogenética utilizando-se outras sequências homólogas depositadas em banco de dados
- Caracterizar fenotipicamente as partículas virais por meio da técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- Confirmar o isolamento viral através da imunodeteção da proteína principal do capsídeo (MCP), por meio de ensaio de imunofluorescência e *Western blot*;
- Investigar a possível indução de apoptose pela detecção de caspases ativas 3/7 e pela fragmentação nuclear (TUNEL) em células BF-2 infectadas com estirpe brasileira de *Frog virus 3-like*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras biológicas

As amostras de tecidos, identificadas por TA1, TA2, TA4 e TA5, utilizadas no isolamento viral foram obtidas a partir de quatro rãs-touro adultas (*Lithobates catesbeianus*), procedentes de ranário comercial localizado no município de Tapiratiba, Estado de São Paulo, e que apresentaram positividade ao diagnóstico molecular para FV3, realizado no Laboratório de Higiene Zootécnica da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP. A coleta dos animais que vieram a óbito foi realizada durante a ocorrência de um surto de ranavirose com alta mortalidade, verificado na propriedade durante as estações da primavera-verão do ano de 2016. De cada animal, foram coletados o fígado, rins e baço, os quais foram estocados em freezer a -20°C até o início do processamento para o isolamento. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FZEA-USP, sob protocolo nº 7819150118 (ANEXO A).

4.2 Cultivo e manutenção de células BF-2

As células BF-2 (*Lepomis macrochirus*, bluegill ATCC® CCL 91) foram cultivadas em frascos descartáveis de 25cm² ou 75cm² (Corning®, EUA), em estufa (COM-19AIC CO₂ incubator – Parasonic®) à temperatura de 25°C e atmosfera com 5% de CO₂. Os frascos continham meio mínimo essencial (*Minimum essential medium* (MEM) - Gibco®, EUA), acrescido de 1% de L-Glutamina 100 x (Gibco®, EUA), 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®, EUA), 2 µg/mL do antifúngico anfotericina B (Fungizone® Gibco®, EUA) e dos antibióticos penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100µg/mL) (PenStrep - Gibco®, EUA).

Os subcultivos (passagens) da linhagem foram realizados aproximadamente a cada 7 dias, quando os frascos apresentavam confluência celular entre 80% a 90%. Para tal, após descarte do meio de cultura, adicionava-se tampão salino fosfato (*Phosphate buffered saline* (PBS) 1X pH 7.2 - Gibco®, EUA) ao frasco para a lavagem da monocamada celular. O PBS era descartado e as células dissociadas do frasco

pelo método de tripsinização com tripsina-EDTA em PBS (3X) (*Trypsin* – EDTA 0,5% 10X – Gibco®, EUA), durante 10 minutos, a 25°C. Após inativação da tripsina-EDTA pela adição de MEM suplementado, aproximadamente 80% das células em suspensão eram desprezadas ou o volume total dividido em novos frascos na proporção de 1:3, completando-se o volume final do frasco com MEM suplementado (25cm² – 5 mL e 75cm² – 10 mL), conforme descrito anteriormente.

4.3 Isolamento viral em cultivo de células

4.3.1 Preparo dos inóculos

Os inóculos foram obtidos a partir da maceração do fígado, baço e rins dos animais. Para tanto, as quatro amostras (TA1, 2, 4 e 5), foram individualmente alíquotadas em *pools* contendo 25 mg/*pool*, em microtubos que foram mantidos em gelo. Com o auxílio de gral e pistilos esterilizados, as amostras foram maceradas separadamente e re-suspensas em 500µL de MEM (Gibco®, EUA), mantido a 4°C contendo 2 µg/mL de anfotericina B (Fungizone® Gibco®, EUA), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100µg/mL) (PenStrep - Gibco®, EUA), até a formação de uma suspensão. Ao término da maceração, as amostras foram transferidas para microtubos e centrifugadas a 1.500 × *g* por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi coletado e diluições seriais deste foram realizadas na razão de 1:10 e 1:100 (em duplicata), com a finalidade de diminuirmos a toxicidade celular e possíveis contaminações, seguindo assim a metodologia recomendada pela OIE (OIE, 2018b).

4.3.2 Inoculação em células BF-2

Para a inoculação das suspensões obtidas, as células foram preparadas para o ensaio com 24 horas de antecedência. Frascos de 75cm² (Corning®, EUA) contendo células BF-2 sob confluência de 80% foram utilizados no preparo de placas de 24 poços (Corning®, EUA). Previamente ao plaqueamento, uma vez dissociadas pela tripsinização, o número de células foi estimado por contagem em câmara de Neubauer. Em síntese, 100 µL da suspensão celular foi homogeneizada com 100 µL de Azul de Tripán 0,4% (Sigma-Aldrich® EUA), e uma alíquota foi aplicada na câmara

de Neubauer, assegurando-se uma densidade próxima a 8×10^4 células/mL. As células semeadas foram mantidas conforme as condições de cultivo apresentadas, com um volume final de 1000 μ L de MEM suplementado por poço.

No momento da inoculação, o meio de cultura de cada poço foi removido e as células lavadas com 1 mL de PBS 1X pH 7,2 (Gibco®, EUA), sendo posteriormente aplicados 100 μ L do inóculo nas monocamadas semiconfluentes, nas diluições previamente realizadas, em duplicatas, a saber: inóculo concentrado, diluições 1:10 e 1:100. Paralelamente, células foram inoculadas com MEM (Gibco®, EUA) suplementado com 2% de SFB (Gibco®, EUA), seguindo o mesmo procedimento, como controle negativo. Em estufa a 25°C e 5% de CO₂, as placas foram brevemente e suavemente agitadas a cada 10 minutos, por um período de 1 hora, com a finalidade de facilitar a adsorção viral.

Ao término da incubação, o inóculo foi retirado e adicionou-se 1 mL de MEM (Gibco®, EUA) de manutenção, suplementado com 2% de SFB (Gibco®, EUA). O monitoramento diário das placas foi realizado, com observação detalhada da monocamada celular em microscópio óptico invertido (Eclipse TS100 - Nikon®) nas objetivas de 4x e 10x, conectado a um sistema de aquisição de imagem, para a visualização de possível efeito citopático (ECP) ao decorrer sete dias, comparando-se as inoculações com os controles negativos, correspondentes à células mantidas em MEM com 2% de SFB. Posteriormente, todas as placas que apresentaram ECP ou não foram submetidas a três ciclos de congelamento (-80 °C) e descongelamento, promovendo assim lisados celulares, e as amostras transferidas para microtubos, que foram conservados a -80 °C.

Passagens sucessivas, às cegas, em placas de 24 poços, foram adotadas a partir de todas as amostras obtidas na primeira inoculação (P1), sendo repetidas ininterruptamente até a 5ª passagem (P5). Para tal, placas de 24 poços foram igualmente semeadas e inoculadas com 500 μ L dos sobrenadantes de cada amostra, obtidos após os ciclos de congelamento e descongelamento. Após 1 hora de incubação, completou-se o volume do poço para 1000 μ L com MEM (Gibco®, EUA) de manutenção acrescido de 2% de SFB (Gibco®, EUA). As placas foram mantidas a 25°C, sob atmosfera com 5% de CO₂, e as culturas diariamente observadas para a presença de efeito citopático comparando-se as inoculações com os controles negativos, sendo posteriormente fotodocumentadas (Figura 8).

4.4 Produção de estoques virais

Estoques virais de trabalho e para a composição do biobanco do Laboratório de Higiene Zootécnica da FZEA/USP foram realizados. Para tanto, a quarta passagem (P4) da amostra TA2 foi propagada em frascos de 25cm² (Corning®, EUA) em culturas de células BF-2, com densidade celular próxima de 2×10^5 células/mL. A propagação foi realizada inoculando-se 1000 µL do sobrenadante da P4 em células BF-2, que foram mantidas a 25°C e 5% de CO₂, em MEM (Gibco®, EUA) de manutenção suplementado com 2% de SFB (Gibco®, EUA). Sete dias após a inoculação, todo o conteúdo do frasco foi recolhido e centrifugado a $4000 \times g$ durante 5 minutos, a 4 °C, para sedimentação dos restos celulares. O sobrenadante foi separado em alíquotas que foram registradas com nome, data e passagem e armazenadas a -80°C. O isolamento viral foi confirmado pela realização de PCR utilizando-se o material genético viral extraído do sobrenadante celular da quinta passagem (P5).

Figura 8 - Esquema das inoculações realizadas em cultivo de células BF-2

Legenda: Amostras de fígado, baço e rins, oriundas de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), foram utilizadas no isolamento viral. Os tecidos foram pesados em *pool*, macerados em MEM adicionado de anfotericina B, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina em gral com pistilo, e centrifugados para sedimentação tecidual. Diluições seriais do sobrenadante (1:10 e 1:100) foram inoculadas, em duplicadas, em culturas de BF-2, com 1 hora de adsorção. Monitorou-se diariamente as inoculações para o aparecimento de ECP e, após congelamento e descongelamento a -80°C, passagens às cegas foram implementadas. O estoque viral de trabalho foi obtido através da inoculação da P4 em frasco de 25cm².

Fonte: Própria autoria.

4.5 Extração do DNA

Para se confirmar o isolamento viral realizou-se a extração do DNA viral através do *kit Wizard SV Genomic DNA Purification System* (Promega®, EUA), com algumas modificações em relação ao protocolo original. Para tanto, foram utilizados 500 µL do sobrenadante celular, aos quais foram adicionados 150 µL de tampão de lise (*SV Lysis Buffer*), com agitação por 10 segundos em vórtex. Em seguida, todo o volume foi transferido para um conjunto composto por coluna e tubo coletor, que foi centrifugado a 14.000 rotações por minuto (rpm) durante 3 minutos, em temperatura ambiente. O conteúdo do tubo coletor foi descartado, a coluna recolocada no mesmo e então adicionou-se 650 µL da solução de lavagem (*Wash solution*) à coluna, seguido de centrifugação a 14.000 rpm, por 2 minutos, a temperatura ambiente. O mesmo procedimento de lavagem, centrifugação e descarte da solução de lavagem, foi repetido por mais 3 vezes. Após a última lavagem, centrifugou-se o conjunto a 14.000 rpm por 3 minutos, a temperatura ambiente, para a secagem da coluna e a mesma foi transferida para um novo microtubo esterilizado. O DNA foi eluído em 60 µL de água livre de nuclease, previamente aquecida a 65°C, com incubação por 10 minutos a 20°C. A concentração do DNA extraído e a qualidade, a qual pode ser determinada por meio da razão 260/280 nm, foram mensuradas através de espectrofotometria (DS-11/DS-11+ Spectrophotometer - DeNovix®, EUA), assegurando-se assim a concentração máxima de 250 ng/µL, ideal para a enzima TaqDNA polimerase utilizada nas reações de PCR. O DNA foi estocado a -20 °C até a sua utilização.

4.6 Amplificação por PCR: Genes MCP e 53R

Para a confirmação do isolamento viral, realizou-se a técnica da PCR. Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), descritos na Tabela 2, foram empregados na amplificação de fragmentos dos genes MCP e 53R, dois marcadores moleculares altamente conservados no DNA de FV3.

Tabela 2 – *Primers* utilizados para detecção dos genes MCP e 53R de FV3, contendo a sequência de nucleotídeos, produto esperado, gene alvo e a referência de acesso

Primer	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Gene Alvo	Referência
MCP1F	AACCCGGCTTTCGGGCAGCA	321	MCP	MARSH et al. (2002)
MCP1R	CGGGGCGGGGTTGATGAGAT			
MCP2F	ATGACCGTCGCCCTCATCAC	625	MCP	MARSH et al. (2002)
MCP2R	CCATCGAGCCGTTTCATGATG			
53R F	TGAGGGGAACAATCTCTGGT	440	53R	CORRÊA ¹ (2018)
53R R	TTAACCCTGTGGGCCCGG			

F= forward R= reverse. ¹Informação pessoal, fornecida por Thaís Camilo Corrêa: thaiscorrea@usp.br.

Fonte: Própria autoria.

4.6.1 Gene MCP

Dois pares de *primers* foram utilizados com o objetivo de amplificar fragmentos do gene MCP, resultando em 321 pb para o fragmento denominado MCP1 e 625 pb para o MCP2. As reações foram preparadas em tubos de 0,2 mL e consistiram de 12,5 µL de GoTaq® Colorless Master Mix (2x) (Promega®, EUA), 1 µL de cada *primer* a 10 µM (MCP1 F/R ou MCP2 F/R), 2 µL do DNA extraído (<250 ng) e 8,5 µL de água livre de nuclease, totalizando 25 µL. Como controle negativo da reação adotou-se água livre de nucleasse em substituição ao DNA *template*. Como controle positivo, foi utilizado um isolado de FV3-*like*, pertencente ao biobanco do Laboratório de Higiene Zootécnica – FZEA/USP, isolado por Alencar (2016), cujo DNA foi extraído com a utilização do mesmo protocolo descrito no item 4.4. As amplificações foram feitas em termociclador Swift MaxPro - Esco® e as condições de ciclagem incluíram incubação inicial a 94 °C por 3 min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s; anelamento a 50 °C por 30 s e extensão de 1 min a 72 °C, seguido de 1 ciclo de 10 min a 72 °C.

4.6.2 Gene ORF-53R

Para a amplificação de parte do gene que codifica a proteína denominada *Myristylated membrane protein* (ORF53R), um par de *primers* foi utilizado, resultando no produto de 440 pb, respectivo ao conjunto 53RF e 53RR. Uma reação com volume final de 25 µL foi preparada em tubos de 0,2 mL com 12,5 µL de GoTaq® Colorless Master Mix (2x) (Promega®, EUA), 1 µL de cada *primer* a 10 µM (53RF – 53RR), 2 µL do DNA extraído (<250 ng) e 8,5 µL de água livre de nuclease. Controles negativos e positivos foram igualmente incluídos na reação, como descrito para o gene MCP. O programa de amplificação utilizado foi o seguinte: desnaturação inicial a 94 °C durante 5 min; seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s; anelamento a 56 °C por 45 s e extensão de 1 min e 15 s a 72 °C, finalizando com uma etapa de 10 min de extensão final a 72 °C.

4.6.3 Análise eletroforética dos produtos amplificados

Os produtos da PCR foram homogeneizados em corante *Blue-Orange Loading Dye* (6X) (Promega, EUA) e aplicados em gel de agarose a 1,5%, em tampão de corrida Tris-ácido acético-EDTA 1X, pH 8 (TAE), sob voltagem constante de 90 V. Para se determinar o tamanho dos produtos amplificados foi incluído um marcador molecular de 100 pb (DNA *ladder*- Invitrogen®, EUA). A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada através da transluminação do gel em luz ultravioleta (UV), após corá-lo em *Diamond - Nucleic Acid Dye* (Promega®, EUA), durante 40 minutos. O gel foi fotografado para a documentação dos resultados através do Sistema de Captura de Imagem L-Pix (Loccus Biotecnologia, BR).

4.7 Sequenciamento Nucleotídico

O produto obtido na PCR foi purificado utilizando-se o kit ExoSap-IT® (USB Affymetrix®, EUA). Para tal, após a confirmação da amplificação, uma alíquota de 5 µL do *amplicon* de MCP2 (625 pb), foi acrescida de 2 µL das enzimas *Exonuclease I recombinante* (Exo) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP), seguindo a incubação recomendada pelo fabricante: 37°C por 15 minutos, para a degradação do excesso de *primers* e nucleotídeos, e 80°C por 15 minutos, para inativação das enzimas. A

amostra purificada foi encaminhada para o sequenciamento na empresa Helixxa (Paulínia/SP), junto com os *primers* utilizados na reação de PCR, sendo utilizada a plataforma Applied Biosystems®, sequenciador automático Series 3500 *Genetic Analyzer* e método de Sanger.

4.7.1 Alinhamento das Sequências Nucleotídicas

Os eletroferogramas das sequências geradas (*foward/reverse*) foram verificados visualmente no programa CodonCode Aligner v. 8.0.2, e a sequência consenso editada com o programa BioEdit v. 7.2.6. Posteriormente, através do *software* BLAST, foi realizada a busca de similaridade da sequência editada com outras outras sequências disponíveis no GenBank. O alinhamento múltiplo da sequência nucleotídica obtida com outras sequências para o gênero *Ranavirus* depositadas no GenBank foi realizado através da programa ClustalW, incorporado no pacote de programas BioEdit, utilizando-se, para tanto, dos parâmetros em “*default*”, para posterior reconstrução filogenética.

4.7.2 Reconstrução filogenética

Para a análise filogenética foram utilizadas 38 sequências homólogas do gênero *Ranavirus* depositas no GenBank, conforme indicado na tabela 3, alinhadas conforme mencionado em 4.7.1. A reconstrução filogenética pelo método de máxima verossimilhança para sequências de 452 bp, relativas ao gene MCP de *Frog virus 3-like*, foi realizada com o programa IQ-TREE v. 1.6.7.1 (NGUYEN et al., 2015), sendo previamente determinado o melhor modelo evolutivo através do programa ModelFinder (KALYAANAMOORTHY et al., 2017), de acordo com o critério de informação Bayesiano (Bayesian Information Criterion, BIC). Os valores de suporte nodal pelo método de bootstrap foram determinados para 1000 pseudo-réplicas. A árvore filogenética obtida foi visualizada com o programa FigTree v. 1.4.3 (RAMBAUT, 2012).

Tabela 3 – Sequências nucleotídicas utilizadas na reconstrução filogenética, com indicação do nome da espécie ou isolado, país onde foi detectado, classe do hospedeiro e respectivos números de acesso no GenBank

Espécie/isolado	Origem	Classe	Acesso GenBank
<i>Frog virus 3 (FV3)</i>	Brasil	Anfíbio	DQ897669
<i>Frog virus 3 (FV3)</i>	Brasil	Anfíbio	MG573200
<i>Frog virus 3 (FV3)</i>	Brasil	Anfíbio	MG573201
<i>Frog virus 3 (FV3)</i>	Brasil	Anfíbio	KT154966
<i>Frog virus 3 (FV3)</i>	Brasil	Anfíbio	KT154964
<i>Frog virus 3 (FV3)</i>	Brasil	Anfíbio	KT154965
<i>Frog virus 3 (FV3)</i>	Brasil	Anfíbio	MH016573
<i>Frog virus 3 (FV3)</i>	EUA	Anfíbio	AY548484
<i>Frog virus 3 (FV3)</i>	Holanda	Anfíbio	MF360246
<i>Frog virus 3 (FV3)</i>	EUA	Peixe	KF646249
Tiger frog virus (TFV)	China	Anfíbio	AF389451
Soft-Shell Turtle Iridovirus (STIV)	China	Réptil	EU627010
Grouper iridovirus (GIV)	China	Peixe	AY666015
Rana grylio iridovirus (RGV)	China	Anfíbio	JQ654586
Singapore grouper iridovirus (SGIV)	Singapura	Peixe	AY521625
Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNv)	Austrália	Peixe	FJ433873
<i>Ambystoma tigrinum virus (ATV)</i>	EUA	Anfíbio	AY150217
Common midwife toad virus (CMTV)	Holanda	Anfíbio	NC_039034
<i>European catfish virus (ECV)</i>	Hungria	Peixe	KT989885
<i>European catfish virus (ECV)</i>	Itália	Peixe	FJ358608
<i>European sheatfish virus (ESV)</i>	Alemanha	Peixe	FJ358609
Andrias davidianus Ranavirus (ADRV)	China	Anfíbio	KC865735
Chinese giant salamander iridovirus (GSIV)	China	Anfíbio	KF512820
<i>Bohle iridovirus (BIV)</i>	Austrália	Anfíbio	NC_038507
Tortoise Ranavirus isolate (TRI)	Alemanha	Réptil	KP266743
Testudo hermanni isolate (THI)	Suiça	Réptil	KP266741
<i>Santee-Cooper ranavirus (SCRV)</i>	Tailândia	Peixe	KU507317
Short-finned eel ranavirus (SERV)	Nova Zelândia	Peixe	NC_030394
Doctor fish virus (DFV)	Alemanha	Peixe	FR677324
Guppy virus 6 (GV6)	Alemanha	Peixe	FR677325
Rana esculenta virus (REIR)	Itália	Anfíbio	FJ358611
Rana esculenta virus (REIR)	Dinamarca	Anfíbio	FJ515796
Cod iridovirus (COIV)	Dinamarca	Peixe	KX574342
Pike-perch iridovirus (PIV)	Finlândia	Peixe	KX574341
Ranavirus maxima (RMAX)	Dinamarca	Peixe	GU391285
Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) *	China	Peixe	AF371960
<i>Lymphocystis disease virus 1 (LCDV1) *</i>	Alemanha	Peixe	L63545
<i>Invertebrate iridescent virus 3 (IIV3) *</i>	EUA	Artrópode	DQ643392

* Grupos externos: sequências de outros gêneros.

Fonte: Própria autoria.

4.8 Titulação viral em placas por diluição limitante

A quantificação do título viral foi determinada através da diluição limitante do estoque viral de trabalho (quinta passagem - P5), mantido congelado a -80°C . Cultivos de células BF-2 foram utilizados no preparo de microplacas de 96 poços (Corning®, EUA), contendo a densidade de $1,5 \times 10^4$ células/mL por poço e mantidas em MEM (Gibco®, EUA) de manutenção com adição de 10% de SFB (Gibco®, EUA). As placas foram incubadas em estufa de CO_2 a 5% e a 25°C durante 24 horas, período este compreendendo a adesão celular em monocamada.

Para a infecção, diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-8} da suspensão viral foram preparadas em MEM com 2% de SFB (Gibco®, EUA). Após 24 horas de incubação das placas, o meio de cultivo dos poços foi removido e a monocamada celular inoculada com 50 μL de cada diluição, nos oito poços por coluna, em duplicata. Após inoculação, as placas foram incubadas em estufa de CO_2 , durante 60 minutos a 25°C , com agitação suave a cada 10 minutos para adsorção viral às células. Após este período, foram acrescentados 50 μL de MEM com 2% de SFB (Gibco®, EUA), suplementado com L-Glutamina, antibióticos e antifúngico, conforme anteriormente descrito, totalizando o volume de 100 μL . Como controle negativo, as três últimas colunas das placas foram inoculadas com MEM a 2% de SFB (Gibco®, EUA). Seguiu-se então a incubação em estufa a 25°C com 5% de CO_2 por 7 dias, com monitoramento diário do ECP em microscópio óptico invertido (Eclipse TS100 - Nikon®) em objetivas de 4X e 10X. O título viral infeccioso foi calculado segundo o método proposto por Reed e Munch (1938), sendo expresso em $\text{DICT}_{50}/\text{mL}$, que se refere a dose infectante do agente em cultivo tecidual, do inglês “*tissue culture infection dose*” (TCID_{50}) e representa a maior diluição viral que resulta em efeito citopático em 50% das células inoculadas.

4.9 Microscopia eletrônica de transmissão

Para a visualização da morfologia viral, culturas de células foram infectadas com o isolado *Frog virus 3-like* e submetidas a microscopia eletrônica de transmissão (MET) por meio de cortes ultrafinos. Assim, células BF-2 semeadas em frascos de 25 cm^2 (3×10^5 células/mL) com MEM a 2% de SFB (Gibco®, EUA), foram infectadas com

a P5, na multiplicidade de infecção (MOI) de 1, perfazendo 1 hora de adsorção em volume reduzido, sob atmosfera com 5% de CO₂ e a 25°C. Posteriormente, o volume do frasco foi completado para 5 mL com MEM a 2% de SFB (Gibco®, EUA), acrescido de antibiótico, antifúngico e glutamina, conforme anteriormente descrito.

Após 96 horas de infecção, quando da ocorrência evidente de ECP sobre a monocamada celular, as células foram coletadas do frasco mecanicamente por meio de espátulas esterilizadas (*cell scrapers* - Corning, EUA) e centrifugadas a 500 × g por 5 minutos a 25°C. Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi fixado em solução composta por glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,4 durante 2 horas, à temperatura ambiente (25°C). Uma vez fixadas, a solução de fixação foi desprezada e as células lavadas por 3 vezes em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,4, através de centrifugações a 500 × g por 5 minutos a 25°C.

As etapas seguintes foram conduzidas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina da USP – Ribeirão Preto/SP. Em síntese, a amostra foi pós-fixada em tetróxido de ósmio 2%, a 4°C, por 2 horas e, em seguida, desidratações em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, 95%) durante 10 minutos foram realizadas. Uma desidratação final, com acetona absoluta, foi feita em duas etapas com duração de 20 minutos cada. Desidratadas, as células foram infiltradas em resina epóxie acetona 100% (proporção 1:1) por 24 horas, à temperatura ambiente (25°C). A inclusão foi realizada em estufa a 60°C, por 72 horas, em moldes de resina epóxi (Araldite®). Cortes ultrafinos foram realizados com micrótomo, montados em lâminas, contrastados e visualizados em microscópio eletrônico de transmissão.

4.10 Imunofluorescência indireta

Células BF-2 foram ressuspensas em MEM acrescido de 10% de SFB (Gibco®, EUA), contadas em câmara de Neubauer e semeadas na densidade de 2 × 10⁵ células por poço em placa de 6 poços (Kasvi®, BR), onde lamínulas esterilizadas foram previamente depositadas sob o fundo dos poços. Após o período de incubação e adesão das células às lamínulas, sendo mantidas à temperatura de 25°C em estufa com 5% de CO₂ por 24 horas, o MEM foi removido dos poços e as células infectadas

com o isolado viral, utilizando-se uma MOI de 5, diluídas em MEM suplementado com 2% de SFB.

Passadas 72 horas de infecção, todo o MEM foi removido, as células lavadas com PBS 1X pH 7,2 (Gibco®, EUA) e fixadas nas lamínulas com 1000 µL de paraformaldeído 3,7% diluído em PBS 1X por 15 minutos, à temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e permeabilizadas com 1000 µL de Triton X-1000, a 3% (Merck, EUA) em PBS, por 10 minutos. Em seguida, lavou-se por três vezes as células com PBS 1X e incubou-se em 1000 µL de solução de bloqueio dos sítios inespecíficos, composto por albumina sérica bovina (BSA) 1% em PBS por 30 minutos, em temperatura ambiente. Como controle negativo, células não infectadas foram mantidas em MEM contendo 2% de SFB na ausência do vírus e processadas da mesma maneira.

Sequencialmente, as lamínulas foram retiradas dos poços e montadas em lâminas de vidro. Para a realização da marcação das células (infectadas e controles), preparou-se uma câmara úmida revestindo a superfície interna de uma placa de acrílico com papel filtro umedecido, evitando-se assim o ressecamento das lamínulas durante a marcação e a superfície externa com papel alumínio, com vistas a impedir a penetração da luz, o que poderia interferir com a fluorescência do anticorpo.

Na câmara preparada, as lamínulas foram incubadas *overnight* à temperatura ambiente, com anticorpo primário policlonal anti-iridovírus (anti-MCP, AbCam®, EUA), diluído em PBS na concentração 1:50000. No dia seguinte, as lamínulas foram lavadas por 3 vezes com PBS 1X e procedeu-se a incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (anti-rabbit IgG - A11008, Invitrogen®, EUA), conjugado com fluorocromo Alexa Fluor 488e diluído em PBS na concentração 1:1000, com incubação de 1 hora. Por fim, as lamínulas foram novamente lavadas com PBS 1X por 3 vezes e o núcleo das células marcado com Hoechst (ImmunoChemistry®, EUA), na proporção a 0,5% v/v, seguido de duas lavagens com PBS 1X. As lâminas foram protegidas da luz e visualizadas em microscopia de fluorescência (Axio Vert. A1 - ZEISS®) e as imagens capturadas pelo software ZEN2008.

4.11 Imunodeteção por *Western Blotting*

A técnica de *Western Blotting* foi realizada visando a imunodeteção da proteína principal do capsídeo - MCP. Para tanto, 100 µL do isolado *Frog virus 3-like*

(P5), em duplicata, foi homogeneizado em tampão desnaturante Laemmli 2x (Bio-Rad®, EUA) e incubado a 95 °C, por 5 minutos para fervura. Como controle positivo do ensaio, uma alíquota de 100 µL do isolado FV3-*like* por Alencar (2016) foi utilizada, sendo igualmente processada. Em seguida, 10 µL de cada amostra foi submetida a técnica de SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), em gel comercial de poliacrilamida 10% (Mini-PROTEAN® TGXTM - Bio-Rad®, EUA) e tampão de corrida Tris-Glicina-SDS 1X (Tris 25 mM, Glicina 0,25 mM, SDS 0,1% e água destilada q.s.p 1 L), durante 1 hora e 30 minutos à 100 V.

Após a separação na etapa de SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas do gel de poliacrilamida para uma membrana de polivinildina difluorada (PVDF) 0,2µm, procedimento realizado através do sistema turbo de transferência (Trans-Blot®*TurboTM Transfer System* - Bio-Rad®, EUA), durante 3 minutos, segundo as recomendações do fabricante. Após a transferência, a membrana foi lavada rapidamente com tampão TBS-T 1X e bloqueada em seguida, em solução de bloqueio composta por 10 mL de TBS-T 1X com BSA 5%, durante uma hora em agitador horizontal, a temperatura ambiente, evitando-se assim a ligação inespecífica dos anticorpos à membrana de nitrocelulose.

Para a detecção de MCP, a membrana foi incubada com o anticorpo primário policlonal anti-iridovírus (AbCam®, EUA), diluído na concentração 1:6000, na própria solução de bloqueio, com incubação *overnight* a 4°C, sob agitação suave. No dia seguinte, o anticorpo primário foi retirado e a membrana lavada por cinco vezes, por dois minutos cada, com TBS-T 1X. O anticorpo secundário, anti-coelho IgG, conjugado com peroxidase (Rhea Biotech, Brasil), foi diluído a 1:4000 em TBS-T 1X com 1% de BSA, e incubado durante 1 hora sob agitação.

Na sequência, a membrana foi lavada cinco vezes, por dois minutos cada, com TBS-T 1X e revelada utilizando-se um sistema quimioluminescente (*Clarity MaxTM Western ECL Substrate* - Bio-Rad®, EUA). Ao término, a membrana foi visualizada e digitalizada pelo fotodocumentador *ChemiDocMP Imaging System* (Bio-Rad®, EUA), e a massa molecular da proteína calculada, tendo-se como padrão o marcador molecular *Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards* (Bio-Rad®, EUA).

4.12 Apoptose

Dois marcadores apoptóticos, incluindo a ativação das caspases 3/7, evento característico das fases iniciais da apoptose e a fragmentação do DNA, característica apoptótica tardia, foram utilizados para avaliar a possível indução da apoptose desencadeada pelo isolado *Frog virus 3-like*.

4.12.1 Ensaio de ativação das caspases 3/7

A fim de se constatar a atividade das caspases apoptóticas efetoras 3 e 7, utilizou-se o FAM-FLICA® *Caspase-3/7 Assay Kit* (Immunochemistry Technologies®, EUA), segundo as especificações do fabricante, o qual se baseia na utilização de uma sonda conjugada com fluoróforo verde, que se liga irreversivelmente às caspases 3 e 7 ativas presentes nas células vivas, tornando-se covalentemente acoplado a estas.

Para isso, 8×10^4 células BF-2 foram semeadas em placas de 24 poços (Corning, EUA) em MEM completo com 10% de SFB (Gibco®, EUA) e mantidas na estufa por 24 horas. Passado o período de adesão, as células foram infectadas com FV3-*like* com uma MOI de 20 e incubadas em estufa à 25°C com 5% de CO₂. Quando do período de amostragem, realizada em 4, 8, 12 e 16 horas pós infecção, incubaram-se as células infectadas com o reagente FAM-DEVD-FMK 30X na diluição 1:30 por 1 hora em câmera escura, com leve agitação a cada dez minutos. Simultaneamente, células não infectadas e na mesma densidade celular foram incluídas como controle negativo para cada ponto de amostragem, sendo mantidas na presença de MEM completo e igualmente incubadas com o reagente. Para o controle positivo da apoptose, células BF-2 (8×10^4 células/mL) foram separadamente tratadas com 1000 µL de camptotecina (Sigma-Aldrich®, EUA) em MEM com concentração final de 100 µM, durante 16 horas a 25°C, composto este que inibe a ação da enzima DNA topoisomerase I, induzindo apoptose. Passado o tempo de incubação, o reagente foi descartado e as células lavadas uma vez com 1000 µL de MEM completo (10% de SFB) (Gibco®, EUA), seguido de três lavagens com 1000 µL do tampão de lavagem fornecido pelo kit (Apoptosis Wash Buffer 1X). Os núcleos celulares foram contracolorados com Hoechst 33342 a 0,5% v/v (ImmunochemistryTechnologies®, EUA), por 10 minutos, protegido da luz e, em seguida, as células lavadas com o

tampão de lavagem e fixadas com 500 μ L da solução fixadora que consta no kit, sendo mantidas a 4°C até a última amostragem.

As placas foram analisadas em microscópio invertido de fluorescência (Axio Vert.A1–Zeiss[®]), com filtro verde para a identificação das caspases (faixa de excitação e emissão de 492 nm – 520 nm) e filtro azul para a avaliação da coloração nuclear por Hoechst (faixa de excitação e emissão de 350 nm – 461 nm), sendo as imagens processadas através do programa ZEN 2008.

4.12.2 Detecção da fragmentação do DNA

Para avaliar a ocorrência da fragmentação do DNA, realizou-se o ensaio de TUNEL, do inglês *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*, utilizando-se o kit *In Situ Cell Death Detection Fluorescein* (Roche[®], Alemanha), que consiste basicamente na incorporação de uma sonda conjugada com o corante fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC) à extremidade 3' - OH exposta quando da clivagem do DNA, via enzima *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase* (TdT), que resulta na emissão de fluorescência verde que sinaliza assim a clivagem específica do DNA, compatível com a ocorrência de apoptose (Figura 9).

Figura 9 – Esquema da técnica de TUNEL com marcação de DNA fragmentado

Legenda: Observa-se na figura a marcação do DNA fragmentado, evento resultante do processo apoptótico, em decorrência da exposição dos radicais 3' OH. A marcação ocorre através da incorporação do conjugado fluorescente FITC pela enzima TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*), resultando em fluorescência das quebras das fitas de DNA. Fonte: Própria autoria.

Para tal, placas de 24 poços foram preparadas com células BF-2 (8×10^4 células/mL) com a antecedência de 24 horas e infectadas com FV3-*like* a uma MOI de 20, sendo mantidas a 25°C em atmosfera com 5% de CO₂. Em diferentes de tempos de amostragem, 4, 8, 12 e 16 horas pós-infecção, as células foram fixadas com 1000 µL de paraformaldeído 3,7 % em PBS pH 7,2 (Gibco®, EUA) por 30 minutos, sob temperatura ambiente. Controles negativos, correspondentes a células não infectadas com a mesma densidade celular, foram incluídos no ensaio para cada tempo de amostragem e igualmente processados. Após a fixação, as células foram lavadas três vezes com 1000 µL de PBS e armazenadas no mesmo a 4°C até a última amostragem.

As células foram permeabilizadas com 1000 µL de 0,1% de Triton X-100 (Merck, EUA) em PBS pH 7,2 (ThermoFisher, Gibco®, EUA) gelado por 5 minutos. Após a permeabilização, foram lavadas com PBS e incubadas no mix de reagentes do *kit* na proporção de 90% de solução marcadora composta pelo conjugado fluorescente e 10% da solução enzimática TdT por 1 hora, a 37°C, em câmara úmida e escura. Como controle positivo da fragmentação do DNA, células foram incubadas em solução de DNase (RQ1 RNase free DNase, 50U/mL, tampão de reação 10x RQ1 DNase e água ultrapura milliQ com volume final de 100 µL - Promega, EUA) em câmara úmida e escura por 1 hora a 37°C, sendo posteriormente marcadas com o reagente da mesma maneira. Por fim, todas as amostras foram lavadas com 1000 µL de PBS e incubadas com o corante nuclear Hoechst 33342 a 0,5% v/v (Immunochemistry Technologies®, EUA), por 10 minutos no escuro, seguido de última lavagem com 1000 µL de PBS. As células foram avaliadas em microscópio de fluorescência invertido (Axio Vert. A1 - ZEISS®), com excitação de 450/500 nm e emissão de 515/565 nm para o TUNEL e as imagens analisadas através do programa ZEN 2008.

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento viral

Quatro amostras de tecidos (TA1, TA2, TA4 e TA5), provenientes de *pool* de órgãos de *Lithobates catesbeianus*, foram submetidas ao protocolo de isolamento viral em culturas de células BF-2, sendo a amostra nomeada por TA2 a que apresentou ECP condizente com a replicação viral nas culturas celulares ao longo das passagens, realizadas às cegas. O ECP resultante do processo replicativo de FV3-*like* foi observado discretamente na primeira passagem (P1) da amostra TA2 em culturas celulares, e de forma evidenciada a partir da segunda passagem (P2). Na fase inicial do ECP, as alterações morfológicas foram caracterizadas pela formação de agregados celulares, que se apresentaram pontualmente na monocamada celular de forma refratária, conforme observado na figura 10.

Figura 10 – Cultura de células BF-2 inoculadas com as passagens P1 e P2 da amostra TA2 e seus efeitos citopáticos

Legenda: **A:** monocamada de células BF-2 semeadas em placas de 24 poços (Corning®, EUA), mantidas em MEM com 2 % de SFB (Gibco®, EUA) e inoculadas com a passagem 1

(P1), na diluição 1:100, sete dias pós-inoculação. Observa-se o início do ECP caracterizado pela presença de células levemente agregadas, quando em comparação ao controle negativo, representado pela letra **B**, que apresenta células BF-2 com característica típica. **C**: Inoculação da segunda passagem (P2), na diluição 1:100, em monocamada de células BF-2, sete dias pós-inoculação, com ECP mais evidenciado, caracterizado pela presença de células nitidamente agregadas com apresentação refringente (Ponta de seta). **D**: Controle negativo da P2. Todas as imagens foram obtidas ao microscópio modelo Eclipse TS 100 – Nikon®, aumento de 10X.

Fonte: Própria autoria.

A partir das passagens sucessivas, às cegas, em placas de 24 poços, compreendendo a passagem 3 (P3), passagem 4 (P4) e passagem 5 (P5), todas nas diluições 1:100 do inóculo viral, observou-se o desenvolvimento progressivo do ECP condizente para os vírus pertencentes ao gênero *Ranavirus*. Para a P3, sete dias pós-inoculação, o exame microscópico das culturas celulares infectadas revelou a presença de placas de agregação celular pela monocamada, caracterizadas pela presença de células arredondadas e refringentes, com o desprendimento de algumas células. Para a P4, após 7 dias de inoculação, foram observados efeitos citopáticos que incluíram a presença de múltiplas placas de agregados celulares por toda a extensão da monocamada celular, além do alongamento citoplasmático das células adjacentes as placas, em forma de “ponte”. Quando da inoculação da P5, observou-se sete dias pós-infecção, a progressão do ECP com a elevação e o desprendimento dos agregados celulares da monocamada celular e a perda das células por lise, conforme visualizado na figura 11.

Figura 11 - Cultura de células BF-2 inoculadas com as passagens P3 à P5 da amostra TA2 e seus efeitos citopáticos

Legenda: **A:** monocamada de células BF-2 semeadas em placas de 24 poços (Corning®, EUA) e inoculadas com a passagem 3 (P3), sete dias pós-inoculação, com observação de ECP caracterizado pela presença de agregados celulares com células arredondadas e refringentes (ponta da seta), aumento de 10x. **B:** Controle negativo da P3. **C:** inoculação com a passagem 4 (P4), sete dias pós-inoculação, revelando a presença de multiplacas de agregação (ponta das setas) com células arredondadas e o alongamento citoplasmático das células adjacentes às placas, resultando no aspecto de “ponte” (cabeça da seta), aumento de 4x. **D:** controle negativo da P4. **E:** inoculação com a passagem 5 (P5), sete dias pós-inoculação, com ECP caracterizado pela presença de múltiplas placas com células arredondadas por toda a monocamada celular e progressão com o desprendimento das placas (ponta da seta), aumento de 4x. **F:** Controle negativo da P5. Imagens obtidas no microscópio modelo Eclipse TS 100 – Nikon®. Fonte: Própria autoria.

Com vistas a se obter um estoque viral de trabalho, utilizado nesta dissertação, a quarta passagem (P4) da amostra TA2 foi propagada em frascos de 25 cm². Quando desta inoculação, observou-se efeito citopático típico para o gênero *Ranavirus* em células BF-2, correspondente à presença de focos de lise na monocamada celular, marcado pelo arredondamento das células nas margens das áreas líticas e destruição progressiva da monocamada celular (Figura 12).

Figura 12 - Cultura de células BF-2 em frasco de T25 cm² inoculadas com a passagem P4 da amostra TA2

Legenda: **A-B**: Monocamadas de células BF-2 semeadas em frascos T25cm² (Corning®, EUA) com MEM a 2% de SFB (Gibco®, EUA), inoculadas com a quarta passagem (P4) da amostra TA2, 5 dias pós-infecção, evidenciando o ECP característico para ranavírus em células BF-2, caracterizado pela presença de focos líticos na monocamada celular com a presença de células arredondadas nas bordas (ponta das setas), aumento de 4x. **C**: progressão do ECP, com destruição parcial da monocamada celular, 7 dias pós-infecção, aumento de 4 x. **D**: monocamadas de células BF-2 no dia da inoculação, aumento de 10x. Imagens obtidas pelo microscópio modelo Eclipse TS 100 – Nikon®
Fonte: Própria autoria.

5.2 Confirmação do isolamento viral por PCR

O isolamento da estirpe viral foi confirmado através de diagnóstico molecular pela técnica de PCR, através da extração do DNA do sobrenadante da 5ª passagem da amostra TA2 inoculada nas células BF-2. Três marcadores moleculares foram utilizados para regiões distintas e conservadas do genoma de FV3. Através de amostra de DNA extraída da P5, a detecção do genoma viral foi possível e foram obtidos produtos de amplificação com tamanhos esperados para o gene MCP, de 321pb para MCP1 e de 625 pb para MCP2, bem como para o gene 53R, com tamanho esperado de 440pb, conforme apresentado nas figuras 13 e 14, respectivamente, mostrando bandas positivas intensas. Os controles negativos não apresentaram amplificações indicando que não houve inespecificidade ou possíveis contaminações, e do contrário, observou-se a amplificação do controle positivo na altura esperada.

Figura 13 – Gel de agarose 1,5%, evidenciando as amplificações para MCP

Legenda: Gel de eletroforese de agarose a 1.5% em TAE, corado com *Diamond* (Promega, EUA), exibindo *amplicons* de PCR compatíveis com fragmentos esperados de segmentos genômicos do gene MCP de FV3, obtidos a partir do DNA viral extraído da P5 inoculada em culturas de BF-2. Os produtos obtidos possuem 321pb e 625pb, para MCP1 e MCP2, respectivamente. **(1)** Marcador molecular de 100bp (Promega, EUA). **(2)** Amostra TA2 (positiva) **(3)** Controle positivo. **(4)** Controle negativo. **(6)** Amostra TA2 (positiva). **(7)** Controle positivo. **(8)** Controle negativo. Fonte: Própria autoria.

Figura 14 – Gel de agarose 1,5%, evidenciando as amplificações para 53R

Legenda: Gel de eletroforese de agarose 1,5% em TAE, corado com *Diamond* (Promega, EUA), exibindo *amplicon* de PCR compatível com fragmento esperado de segmento genômico do gene 53R de FV3, obtido a partir do DNA viral extraído da P5 inoculada em culturas de células BF-2. O produto obtido possui 440pb. **(1)** Marcador molecular de 100bp (Promega, EUA). **(2)** Amostra TA2 (positiva). **(3)** Controle positivo. **(4)** Controle negativo. Fonte: Própria autoria.

5.3 Alinhamento nucleotídico

O produto obtido na PCR relativo à região de MCP foi sequenciado com vistas a se caracterizar molecularmente a estirpe isolada. Através do programa BLAST, a sequência obtida foi alinhada com outras sequências homólogas, observando-se um grau de identidade de 99% com o gene MCP de FV3, confirmando a identificação molecular e o isolamento viral. A sequência obtida apresentou *score* de similaridade com mais de 200 sequências depositadas (Figura 15 – A), sendo as dez primeiras sequências homólogas apresentadas na Figura 15 – B. Também apresentou um valor de E significativo e igual a zero para genomas completos de FV3, como os identificados pelo número de acesso no GenBakKJ175144.1 e AY548484. 1, o que indica que o alinhamento não foi obtido meramente ao acaso.

Figura 15– Distribuição das concordâncias e porcentagem de similaridade da sequência obtida para o gene MCP, amostra TA2, gerada pelo programa BLAST

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

B

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Trioceros melleri ranavirus isolate C16002, complete genome	813	813	100%	0.0	99%	MG953520.1
☐ Trioceros melleri ranavirus isolate C16001, complete genome	813	813	100%	0.0	99%	MG953519.1
☐ Terrapene carolina carolina ranavirus isolate TCA16001, complete genome	813	813	100%	0.0	99%	MG953518.1
☐ Lacerta monticola ranavirus major capsid protein (MCP), gene, partial cds	813	813	100%	0.0	99%	KM516719.1
☐ Frog virus 3 isolate SSME, complete genome	813	813	100%	0.0	99%	KJ175144.1
☐ Frog virus 3 major capsid protein gene, complete cds	813	813	100%	0.0	99%	FJ459783.1
☐ Frog virus 3 major capsid protein (MCP), gene, complete cds	813	813	100%	0.0	99%	DQ897669.1
☐ Frog virus 3, complete genome	813	813	100%	0.0	99%	AY548484.1
☐ Frog virus 3 viral core protein (mcp), gene, complete cds	813	813	100%	0.0	99%	U36913.1
☐ Rana catesbeiana virus TW07-440 major capsid protein gene, complete cds	808	808	100%	0.0	99%	FJ207464.2

Legenda: **A**: distribuição das 100 concordâncias (*matches*) no programa BLAST, quando comparadas com a sequência obtida do isolado viral, amostra TA2. **B**: Primeiras dez sequências com alinhamento similares ao isolado viral, incluindo a porcentagem de identidade (*Ident.*), o número de acesso no GenBank (*Acession*) e o (*E value*), parâmetro de confiança do alinhamento.

5.3.1 Análise filogenética

Com base na sequência de nucleotídeos da região de MCP foi construída uma árvore filogenética, com espécies e isolados de diferentes localidades, apresentada na figura 16, o que demonstrou que a estirpe isolada se agrupou no mesmo clado que sequências brasileiras de FV3.

Figura 16 - Filograma representando a reconstrução filogenética para a cepa FV3-*like* isolada na presente investigação.

Legenda: Reconstrução filogenética de sequências de MCP por máxima verossimilhança utilizando o programa IQ-TREE com modelo de substituição TVMe+G4 e 1000 pseudo-réplicas para determinação dos valores de suporte nodal por bootstrap, estando indicados os valores $\geq 80\%$ junto aos nós. Os nomes das sequências compreendem o respectivo número de acesso ao GenBank, o acrônimo do genótipo e o país de origem da detecção do genótipo. A sequência referente à estirpe isolada está denominada como FV3_TA2_BRA, destacada em vermelho, assim como o valor de bootstrap do ramo no qual se insere, igual a 90%. A barra de escala estima a distância filogenética das sequências nucleotídicas.

5.4 Determinação do Título viral (TCID₅₀)

A titulação viral do isolado *Frog virus 3-like* foi determinada através de diluição limitante e estimativa da dose viral capaz de provocar alterações patológicas em 50% das culturas de células inoculadas (TCID₅₀/mL), sendo determinada através do cálculo proposto por Reed e Munch (1938). O título viral infeccioso obtido para a quinta passagem (P5) do isolado FV3-*like* em células BF-2, amostra TA2, foi igual a 10^{3,8} TCID₅₀/mL, com efeito citopático observado em mais de 50% das culturas celulares, em relação ao campo visual observado, até a diluição 10⁻². Desta forma, o título de 10^{3,8} TCID₅₀/mL foi utilizado no cálculo da MOI para os demais ensaios.

5.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão de isolado viral

A MET de células BF-2 infectadas com isolado Frog vírus 3-*like*, amostra TA2, revelou a presença de partículas virais de formato icosaédrico no citoplasma celular, medindo aproximadamente 150 nm, exibindo assim formato e tamanho condizentes para os vírus que englobam o gênero *Ranavirus* (Figura 17). Vírions deixando a célula BF-2 também foram visualizados, através do brotamento da membrana citoplasmática da célula infectada. Com a micrografia eletrônica foi observado ainda o núcleo da célula BF-2, evidenciado pela presença de cromatina condensada e concentrada na região perinuclear, sugestivo de célula em processo apoptótico (Figura 18).

Figura 17 – Micrografia eletrônica de transmissão de células BF-2 infectada com isolado *Frog virus 3-like* evidenciando nucleocapsídeos no citoplasma celular

Legenda: Na micrografia eletrônica podem ser visualizados a presença de nucleocapsídeos densos de *Frog virus 3-like* presentes no citoplasma de célula BF-2, com tamanho próximo a 150 nm, ressaltando a característica icosaédrica (ponta das setas). Barra representativa de 150 nm, correspondente ao aumento de 100 mil vezes.

Crédito: Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina – USP – Ribeirão Preto/SP.

Figura 18 – Micrografia eletrônica de transmissão de células BF-2 infectada com isolado *Frog virus 3-like*

Legenda: **A:** As setas indicam vírions brotando da membrana citoplasmática de célula BF-2 infectada. A cabeça da seta evidencia a presença de nucleocapsídeo denso presente no

citoplasma celular. **N**: Núcleo celular, com condensação da cromatina concentrada na região perinuclear indicada pela sigla **CC**, sugestivo de célula em apoptose. Barra representativa de 600 nm, correspondente ao aumento de 20 mil vezes. **B**: Micrografia apresentada na imagem A em “zoom”, ressaltando partícula viral de formato icosaédrico e de consistência densa presente no citoplasma de célula BF-2 infectada (ponta de seta).

Crédito: Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina – USP – Ribeirão Preto/SP.

5.6 Imunofluorescência indireta

A técnica de imunofluorescência indireta foi realizada visando a detecção da proteína principal do capsídeo (MCP) de FV3 em células experimentalmente infectadas. As culturas em monocamada de células BF-2 infectadas por 72 horas com o isolado *Frog virus 3-like* apresentaram positividade para a marcação da proteína viral MCP pelo anticorpo policlonal anti-iridovírus (AbCam®, EUA), utilizado na diluição 1:50000, com emissão de fluorescência verde, resultante da contra-marcação pelo anticorpo secundário marcado com fluoróforo (anti-rabbit IgG-A11008, Invitrogen®-Alexa Fluor 488), figura 19, painel A-C. Observamos que a reação de imunofluorescência indireta para o isolado foi caracterizada pela detecção sugestiva de fluorescência verde tanto no núcleo, quanto no citoplasma celular de células BF-2 infectadas, atestado pela contra-marcação dos núcleos celulares por Hoechst (azul), como consta na figura 19, painel D-F. O controle da fluorescência, realizado em cultura de células BF-2 não infectadas e incubadas com o anticorpo primário e secundário, foi negativo para a detecção de FV3 por anticorpo anti-iridovírus, sendo descontada a fluorescência verde basal do anticorpo secundário dos resultados aqui apresentados. Figura 19, painéis J-M.

Figura 19 - Imunofluorescência indireta para isolado *Frog virus 3-like* em células BF-2 infectadas

Legenda: Células BF-2 foram semeadas num total de 2×10^5 células sob lamínulas depositadas em placa de 6 poços e infectadas com o isolado *Frog virus 3-like* durante 72 horas. Realizou-se imunofluorescência com o anticorpo primário policlonal anti-iridovírus, anti MCP e com anticorpo secundário marcado com fluoróforo verde. Os núcleos celulares foram contra-corados com Hoechst (azul).

A, B, C: Painéis com imagens positivas para marcação com o anticorpo anti-iridovírus, com evidente detecção de fluorescência verde correspondente à marcação indireta de MCP de *Frog virus 3-like*, objetiva 20 X. **D:** Demonstra-se a fluorescência verde presente de forma sugestiva no núcleo e no citoplasma de células BF-2 infectadas, correspondente à marcação de MCP de FV3 (ponta da seta). **E:** captura do mesmo painel apresentado em D, com marcação do núcleo celular por Hoechst (azul) (ponta da seta), confirmando a presença de células submetidas à infecção viral. **F:** Painel ilustrando a sobreposição das imagens individualmente obtidas em D e E, para os dois filtros (verde e azul), ressaltando a marcação fluorescente verde sugestiva para o núcleo e para o citoplasma das células BF-2 infectadas (ponta da seta). **G, H, I:** Núcleo celular de célula BF-2 infectada com isolado FV3-like, positivo para a marcação de MCP (G), seguido respectivamente da contra marcação por Hoechst (azul - H) e da sobreposição das imagens (I). **J:** Controle negativo com células não-infectadas com

fluorescência basal verde, descontada dos resultados. **L:** Captura do mesmo painel apresentado em J, com marcação dos núcleos celulares por Hoechst (azul), confirmando a presença de células no controle negativo. **M:** Painel ilustrando a sobreposição das imagens individualmente obtidas em J e L, objetiva 63X (D-M). Imagens adquiridas em microscópio modelo Axio Vert. A1 - ZEISS®.

Fonte: Própria autoria.

5.7 Western blotting

Células BF-2 infectadas com o isolado FV3-*like* foram submetidas à técnica de *Western Blotting*, onde foi utilizado um anticorpo primário policlonal específico para iridovírus (anti-iridovírus - AbCam®, EUA). A figura 20 mostra a fotodocumentação da membrana que revelou o reconhecimento pelos anticorpos específicos anti-MCP de iridovírus de proteínas com tamanho aproximado de 50 kDa, tanto para a amostra em duplicata do isolado *Frog virus 3-like*, quanto para o controle positivo utilizado no ensaio (estirpe FV3-*like*), correspondentes à MCP de FV3. Proteínas de maior e menor peso molecular (por volta de 70kDa e abaixo de 20 kDa) também foram reconhecidas pelo anticorpo policlonal para ambas amostras testadas, sugerindo potencial formação de agregados e/ou hidrólise de unidades de MCP, contendo epítomos reconhecidos pelo soro policlonal utilizado.

Figura 20 – Imunodeteção por *Western blot* da proteína principal do capsídeo (MCP) do isolado *Frog virus 3-like* em lisado de células BF-2

Legenda: **M:** Marcador de massa molecular (*Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards* - Bio-Rad®, EUA). **2:** Controle positivo [*FV3-símile*, ALENCAR (2016)]. **3 e 4:** Amostra em

duplicata de lisado de células BF-2 infectadas com isolado *Frog virus 3-like*, ressaltando a presença de bandas (ponta da seta) de aproximadamente 50 kDa. O mesmo perfil foi observado para o controle positivo.

Fonte: Própria autoria.

5.8 Detecção das caspases 3/7

A verificação da capacidade do isolado FV3-*like* induzir morte celular por apoptose em células BF-2 foi examinada através da atividade das caspases 3/7, com o uso de marcador específico aos sítios ativos das caspases 3/7 (FAM-FLICA®). Caspases efetoras 3/7 ativas foram detectadas em células BF-2 infectadas com o isolado *Frog virus 3-like* em todos os tempos de infecção: às 4, 8, 12 e 16 horas pós-infecção, com emissão de forte fluorescência verde (Figura 21 - A1, B1, C1, D1), diferentemente do observado para o controle de cada tempo de infecção, que apresentou marcação negativa para as caspases 3/7 (Figura 21 - A4, B4, C4, D4). De forma similar às células infectadas, células BF-2 estimuladas com camptotecina 100 µM também apresentaram marcação positiva para as caspases 3/7 (Figura 21 – E1). Assim sendo, é possível inferir que o isolado *Frog virus 3-like* induziu apoptose nas células BF-2 e que a apoptose foi dependente da ativação da cascata de caspases.

Figura 21 – Ativação das caspases3/7 em células BF-2 infectadas com isolado Frog virus-*like*
continua

Figura 21 – Ativação das caspases3/7 em células BF-2 infectadas com isolado Frog virus-like
conclusão

Legenda: Células BF-2 foram infectadas com isolado *Frog virus 3-like* e às 4, 8, 12 e 16 horas pós-infecção foram duplamente marcadas com FAM-FLICA® caspases-3/7 e Hoechst. **A1, B1, C1, D1**: painéis com células infectadas caspases 3/7 positivas. **A2, B2, C2, D2**: células contra coradas com Hoechst, com marcação para os núcleos celulares, evidenciando-se possível fragmentação do DNA. **A3, B3, C3, D3**: Painéis com a sobreposição das imagens obtidas individualmente para os filtros verde e azul. **A4-A6, B4-B6, C4-C6, D4-D6**: Painéis com os controles negativos, com a presença de células vivas e marcação negativa para caspases-3/7, seguida da contramarkação dos núcleos celulares por Hoechst de forma uniforme e da sobreposição das imagens obtidas para os filtros verde e azul. Objetiva 20X. **E1-E3**: Células BF-2 tratadas com camptotecina com marcação positiva para as caspases 3/7, seguida da contramarkação dos núcleos celulares por Hoechst e da sobreposição das imagens obtidas individualmente para os filtros verde e azul. Objetiva 63X.

Imagens adquiridas em microscópio modelo Axio Vert. A1 - ZEISS®.

Fonte: Própria autoria.

5.9 Detecção da fragmentação do DNA celular

Para confirmar a indução da apoptose, células BF-2 foram igualmente infectadas como no ensaio das caspases e 4, 8, 12 e 16 horas pós-infecção foram submetidas ao ensaio de TUNEL, contemplando um outro importante marcador apoptótico. Para a realização do ensaio foi adicionado um controle positivo, correspondente a células BF-2 tratadas com DNase por 1 hora, visando a indução enzimática da fragmentação do DNA. Os resultados obtidos corroboram com os resultados apresentados para o ensaio da ativação das caspases - 3/7 e confirmam que o isolado *Frog virus 3-like* induz apoptose nas células BF-2, o que foi atestado pela presença de núcleos fragmentados positivos para marcação com o corante FITC, com emissão de fluorescência verde para todos os tempos de infecção (Figura 22 - A1, B1, C1, D1). Um perfil de marcação similar foi observado para as células do controle positivo, com fluorescência verde, a partir das quebras das fitas de DNA (Figura 22 – E1) e, do contrário, para os controles negativos das infecções nenhuma ou pouca fluorescência foi detectada, sendo determinada como basal (Figura 22 – A4, B4, C4, D4).

Figura 22 - Fragmentação do DNA pela técnica de TUNEL em células BF-2 infectadas com isolado *Frog virus 3-like*

continua

Figura 22 - Fragmentação do DNA pela técnica de TUNEL em células BF-2 infectadas com isolado *Frog virus 3-like*

conclusão

Legenda: Células BF-2 foram infectadas com isolado FV3-like e 4, 8, 12 e 16 horas pós-infecção marcadas pela técnica de TUNEL (FITC) e contracoradas com Hoechst.

A1, B1, C1, D1: Painéis com células infectadas TUNEL positivas. **A2, B2, C2, D2:** células contra coradas com Hoechst. **A3, B3, C3, D3:** Painéis com a sobreposição das Imagens obtidas individualmente para os filtros verde e azul. **A4-A6, B4-B6, C4-C6, D4-D6:** Painéis com os controles negativos com células vivas e com resultado basal para a marcação por TUNEL, seguido da marcação dos núcleos celulares por Hoechst e da sobreposição dos campos obtidos para o filtro verde e azul. **E1-E3:** Células BF-2 tratadas com DNase, com marcação positiva para TUNEL, seguido da contramarkagem dos núcleos celulares com Hoechst e da sobreposição das imagens obtidas individualmente para os filtros verde e azul. Imagens adquiridas em microscópio modelo Axio Vert. A1 - ZEISS®, Objetiva 20x.

Fonte: Própria autoria.

6 DISCUSSÃO

Os vírus do gênero *Ranavirus*, especialmente FV3, apresentam uma grande e incontestável importância ecológica e econômica para os anfíbios, devido aos inúmeros surtos relatados ao redor do mundo, com expressivas taxas de mortalidade, e que vêm crescendo exponencialmente ao longo dos anos (DUFFUS et al., 2015; GENG et al., 2011; GREEN; CONVERSE; SCHRADER, 2002; MAZZONI et al., 2009; MILLER et al., 2007; STARK et al., 2014). Dada a sua importância, no presente trabalho, descrevemos o isolamento de uma estirpe de *Frog virus 3-like* patogênica, associada a um surto com alta mortalidade de anfíbios adultos da espécie *Lithobates catesbeianus*, procedentes de ranicultura comercial localizada no Estado de São Paulo, Brasil. Além do isolamento em cultura de células, utilizamos aqui várias abordagens confirmatórias, incluindo as preconizadas pela OIE (2018b), que sugere a associação de diferentes métodos na identificação apropriada dos ranavírus quando associados em casos de morte. Desta forma, melhor caracterizamos genotipicamente e fenotipicamente o isolado viral, indicando claramente se tratar de uma estirpe pertencente ao gênero *Ranavirus*, intimamente relacionada com FV3. No mais, ainda investigamos uma característica patológica da cepa de FV3-like isolada: a capacidade de induzir apoptose.

O isolamento dos ranavírus em cultura de células é estabelecido como o método padrão-ouro de detecção pela OIE, pois possibilita a obtenção de vírus viáveis, sendo o ECP resultante da replicação destes vírus característico (OIE, 2018b). A estirpe de FV3-like aqui isolada induziu ECP condizente com a replicação viral de forma evidenciada a partir da segunda passagem em células BF-2, com a progressão do efeito ao longo das passagens. O ECP se iniciou pela formação de placas celulares refringentes, com o arredondamento de células infectadas, progredindo para o alongamento do citoplasma celular, resultando no efeito de “ponte”, como aqui mencionado, e relatado por Miller et al. (2015), que descreveram através de comunicação pessoal por G. Chinchar, que o ECP de ranavírus possui a “aparência de rede” em cultura de células FHM (Fathead minnow), semelhante ao observado neste estudo. De forma similar, o ECP inicialmente caracterizado por múltiplas placas de agregados celulares focais na monocamada celular também foi observado por Zhang et al. (2001), quando da infecção celular com isolados de FV3.

O ECP estabelecido como característico para os ranavírus foi observado quando da passagens sucessivas da estirpe de FV3-*like* em frascos de cultivo, pela presença de focos de lise na monocamada celular e de células arredondadas às margens dos focos, resultando em dano completo às células com o decorrer da infecção, como consta no Manual de Testes de Diagnósticos para Animais Aquáticos da OIE (2018b). No mais, o ECP aqui visualizado foi consistente ao observado para outros ranavírus isolados de anfíbios, incluindo por exemplo o isolado CMTV (BALSEIRO et al., 2009) e a espécie BIV (WEIR et al., 2012), bem como cepas de FV3 isoladas no Brasil (ALENCAR, 2016; MAZZONI et al., 2009). Uma vez isolado, foi possível a determinação do título viral, que foi de $10^{3,8}$ TCID₅₀/mL, sendo desta forma obtido quantidade razoável de vírus para a composição de um estoque viral.

As mudanças na arquitetura celular das células infectadas com FV3 ocorrem devido a manipulação da síntese macromolecular celular em prol dos transcritos virais, o que acarreta em profundas mudanças organizacionais do citoesqueleto celular, que incluem a redução dos microtubos, com alguns permanecendo intactos, e a reorganização dos filamentos intermediários em torno dos locais de montagem dos vírions, que com a progressão da infecção levam ao destacamento das células, observando-se assim focos de lise (CHINCHAR, 2002; MURTI, GOORHA, 1983).

Técnicas moleculares têm sido utilizadas como abordagem na detecção e classificação dos ranavírus, através das propriedades genômicas destes, por meio de PCR, análise eletroforética e sequenciamento dos produtos obtidos (MILLER et al., 2015). Para esta finalidade, a amplificação do gene que codifica a proteína principal do capsídeo dos iridovírus, MCP, tem sido frequentemente utilizada (ALLENDER; BUNICK; MITCHELL, 2013; GENG et al., 2011; GEORGE et al., 2014; MARSH et al., 2002), além de ser o marcador recomendado pela OIE (OIE, 2018b). No entanto, outras regiões conservadas do genoma dos ranavírus podem atuar como alvo na constatação dos resultados, a exemplo do gene que codifica a proteína de membrana 53R (ORF 53R), aparentemente necessária para a montagem dos vírions (WHITLEY et al., 2010; ZHAO et al., 2008). Neste sentido, para a confirmação da identidade do isolado viral realizamos um ensaio de PCR baseado na amplificação parcial destas duas regiões altamente conservadas do genoma dos ranavírus: MCP e ORF53R.

Para a amplificação parcial de MCP, utilizamos dois pares de *primers* descritos na literatura (MARSH et al., 2002); já para a amplificação do gene que codifica a

proteína 53R, *primers* foram projetados (CORRÊA, 2018, informação pessoal)¹ com base na sequência de *Frog virus 3*, nº AY548484, depositada no GenBank. Produtos de PCR foram obtidos com sucesso para ambos os conjuntos de oligonucleotídeos, a partir do DNA extraído de células infectadas, em comparação ao controle negativo e positivo, sugerindo que a estirpe pertence ao gênero *Ranavirus*. No Brasil, sequências genômicas de ranavírus foram detectadas utilizando-se o gene MCP como alvo por Galli et al. (2006) e Mazzoni et al. (2009), em evento de mortalidade envolvendo girinos (*Lithobates catesbeianus*) da região centro-oeste do país e mais recentemente por Alencar (2016) e Oliveira (2017), em rãs adultas (*Lithobates catesbeianus*) da região sudeste, mostrando ser um marcador eficiente.

Para compreendermos a relação filogenética da estirpe isolada com outras estirpes do Brasil e de outras localidades, além de atestarmos a sua identidade, foi realizado o sequenciamento parcial de MCP, que possui sequências nucleotídicas altamente conservadas, mas ainda com grau de variabilidade suficiente para distinção de estirpes, sendo portanto um alvo adequado para estudos filogenéticos (BLACK; MEREDITH; PRICE, 2017; HYATT et al., 2000; JANCOVICH et al., 2015; TIDONA et al., 1998). A análise da sequência obtida para o gene MCP demonstrou que a estirpe isolada possui uma identidade de 99% com *Frog virus 3*, espécie do gênero *Ranavirus*, o que confirma o resultado obtido por PCR e o isolamento de uma estirpe intimamente relacionada com a espécie tipo.

Diversos estudos utilizaram a amplificação parcial de MCP em análises filogenéticas, a exemplificar Qin et al. (2003), ao isolarem SGIV de peixes doentes (*Epinephelus tauvina*) em Singapura, e Mazzoni et al. (2009), no Brasil, ao caracterizarem um isolado de FV3-like oriundo de girinos doentes (*Lithobates catesbeianus*). Black, Meredith e Price (2017), ao compararem a reconstrução filogenética obtida através de sequências parciais de MCP, com um método multigênico a partir de genomas completamente sequenciados, utilizando-se os mesmos isolados virais, observaram que a reconstrução da árvore filogenética de MCP ofereceu sinal filogenético razoável, concluindo que estas sequências podem ser utilizadas para atribuir isolados aos principais tipos de vírus do gênero *Ranavirus*.

¹ Thais Camilo Corrêa: thaiscorrea@usp.br

No mais, a alta identidade (99%) foi observada com isolados de regiões demograficamente diferentes e de duas classes taxonômicas distintas: isolados de salamandra (*Ambystoma maculatum*, KJ175144), rã (*Lithobates pipiens*, AY548484), tartaruga (*Terrapene carolina*, MG953518) e camaleão (*Trioceros melleri*, MG953520). O conceito de que os ranavírus infectam diferentes classes de vertebrados ectotérmicos, incluindo anfíbios, répteis e peixes é amplamente estabelecido (DUFFUS et al., 2015), sendo ainda a transmissão interclasses taxonômicas possível (BRENES et al., 2014). Nossas constatações preliminares, corroboram com o relatado por Mao, Hedrick e Chinchar (1997) de que existem relações entre os ranavírus de diferentes hospedeiros e de diferentes regiões demográficas. No entanto, na análise filogenética, a sequência nucleotídica obtida para o gene MCP agrupou-se filogeneticamente no mesmo clado que outras sequências detectadas no Brasil, o que demonstra que estes vírus estabelecidos no país têm sofrido aparentemente poucas alterações genômicas na região do gene MCP; no entanto, é possível que outras regiões genômicas estejam sob intensidades diferenciadas de variabilidade, particularmente aqueles associadas a virulência das estipes, haja visto, as características dos surtos já registrados no país, com graus diferenciados de mortalidade.

Ranavírus exibem simetria icosaédrica e tamanho que varia de 150 a 200 nm de diâmetro (EATON et al., 2007, JANCOVICH et al., 2012). Na análise das micrografias eletrônicas obtidas por MET, observamos a presença de partículas virais intracelulares e vírions deixando a célula BF-2, com tamanho próximo a 150 nm de diâmetro e simetria icosaédrica, compatível com o fenótipo esperado, confirmando a morfologia da estirpe de FV3-like isolada. No mais, as características morfológicas aqui observadas são semelhantes às descritas por autores que identificaram ranavírus no Brasil, por meio da técnica de MET (ALENCAR, 2016; MAZZONI et al., 2009; NEVES et al., 2016). Não foi possível a visualização de arranjos paracristalinos no citoplasma de células BF-2 infectadas, como visualizado por Alencar (2016) no Brasil, e por outros autores para outros isolados (QIN et al., 2003; SIVASANKAR et al., 2017), provavelmente por uma falha no tempo de amostragem, realizada com avançado efeito citopático. Com a microscopia óptica, também foi observado a condensação da cromatina celular de célula BF-2 infectada, atribuída à atividade da replicação viral e apoptose (CHINCHAR et al., 2003), posteriormente confirmada.

Dois imunoensaaios foram empregados com base nas propriedades antigênicas da proteína principal do capsídeo - MCP, com peso molecular aproximado de 50 kDa (CHINCHAR et al., 2009; JANCovich et al., 2012).

Em um ensaio de imunofluorescência indireta realizado em culturas de células BF-2 infectadas com a estirpe de FV3-*like* e incubadas com anticorpos policlonais anti-MCP de iridovírus, obtivemos marcação de imunofluorescência positiva para MCP nas culturas infectadas por 72 horas, com sinais de fluorescência distribuídos de forma sugestiva tanto no citoplasma, quanto no núcleo das células, o que requer investigações futuras em termos do real papel exercido pela MCP durante a replicação viral, uma vez que MCP é uma proteína estrutural do vírion, sendo sua expressão e acúmulo ocorrendo no citoplasma da célula, já na fase tardia do ciclo replicativo. Resultado similar foi observado por Lin et al. (2014), que detectaram GIV em culturas de células utilizando anticorpos monoclonais anti-GIV, observando sinais de fluorescência no citoplasma e no núcleo celular, sugerindo um papel adicional de MCP durante a replicação de GIV. Se MCP sofre translocação para o núcleo para alguma finalidade é dado que requer maiores estudos. Outras investigações foram conduzidas com anticorpos experimentalmente desenvolvidos, incluindo por exemplo os anticorpos monoclonais desenvolvidos por Shi et al. (2003), anti-MCP de SGIV e por Zhao et al. (2007), anti-MCP de STIV (Soft-Shelled Turtle Iridovirus), ambos com a detecção de fluorescência em células infectadas.

Para confirmarmos a imunodeteção de MCP da estirpe de FV3-*like* isolada, conduzimos um ensaio de *Western blot* com os anticorpos anti-MCP de iridovírus. Na revelação da membrana, observamos uma banda referente a um polipeptídeo cuja massa molecular foi estimada em 50 kDa, correspondente ao tamanho esperado para MCP dos ranavírus. No mais, polipeptídeo de maior peso molecular (~70 kDa), também foi observado, assim como fragmentos menores (< 20kDa), sendo o mesmo perfil visualizado para o controle positivo utilizado, sugerindo a presença de transcritos de MCP em diferentes fases, gerando proteínas de diferentes massas que reagiram com os anticorpos, ou ainda a formação de agregados protéicos de MCP ou eventos de hidrólise de unidades da proteína.

Por fim, investigamos se a cepa de FV3-*like* isolada é capaz de induzir morte celular por apoptose em células de origem piscícola BF-2. Os resultados obtidos no presente estudo, através do ensaio das caspases e TUNEL, demonstraram que a infecção por FV3-*like* induz apoptose nas células, constatado pela marcação positiva

de caspases efetoras e pela fragmentação do DNA de células infectadas, além da observação prévia da condensação da cromatina celular.

Estes resultados corroboram com os achados de Chinchar et al. (2003), onde células FHM (Fathead minnow) infectadas com FV3 sofreram apoptose indicada pela condensação da cromatina e fragmentação do DNA celular. No mais, estes autores monitoraram as células FHM quanto à presença de corpos apoptóticos pela marcação nuclear com Hoechst, quando da incubação com um inibidor de caspases. Como resultado, não foram encontradas evidências de apoptose, sugerindo este ser um mecanismo dependente da ativação de caspases. Nossos resultados aqui apresentados reforçam a ideia de que a apoptose induzida por FV3 é caspase-dependente, uma vez que detectamos caspases 3/7 ativas, que são caspases efetoras e resultam no processo apoptótico, em todos os tempos das infecções experimentais.

Condizente com a fragmentação do DNA celular induzida por FV3-like, confirmada *in situ* por meio do ensaio de TUNEL, Holopainen, Tapiovaara e Honkanen (2012), ao avaliarem a ocorrência de apoptose em células EPC (*Epithelioma papulosum cyprini*) infectadas com FV3, observaram a presença de núcleos fragmentados pela coloração por Hoechst, sugerindo apoptose. Outros ranavírus demonstraram induzir apoptose em células susceptíveis, a incluir por exemplo GIV (LAI et al., 2008; PHAM et al., 2012), EHNV (ESSBAUER; AHNE, 2002), SGIV (HUANG et al., 2011) e RGV (HUANG et al., 2007). De forma similar ao observado neste estudo, a apoptose induzida por RGV resulta na fragmentação do DNA e também ocorre por uma via celular dependente de caspases (HUANG et al., 2007). Ainda, segundo estes autores, a apoptose desencadeada por RGV ocorre pela via intrínseca, dependente das mitocôndrias, uma vez que foi constatado a fragmentação mitocondrial quando da infecção.

O mecanismo molecular que resulta na indução da apoptose em células infectadas pelos ranavírus é ainda desconhecido (GRAYFER et al., 2015). De forma interessante, os ranavírus demonstraram induzir apoptose mesmo quando inativados por radiação ou calor, sendo, portanto, a infecção produtiva não necessária, o que sugere a participação de proteínas presentes nos vírions na indução direta do mecanismo apoptótico ou a ativação de receptores de morte da superfamília TNF (fator de necrose tumoral) por um suposto receptor viral, que possivelmente desencadearia apoptose (CHINCHAR et al., 2003; GRAYFER et al., 2015; HUANG et

al., 2007). Além disso, acredita-se que a apoptose de células infectadas poderia ocorrer em razão da ativação da proteinoquinase R (PKR), o que seria um sinal de alerta celular, uma vez que PKR leva ao bloqueio da tradução celular (GRAYFER et al., 2015).

Huang et al. (2011) demonstraram que SGVI, isolado de peixes garoupa e que infecta exclusivamente peixes, pode induzir morte celular por apoptose ou não, dependente do tipo de célula que infecta. Em células hospedeiras originadas do baço de garoupa, observou-se a indução de morte celular por outra via, que não apoptose, enquanto que para células não hospedeiras (FHM, Fathead minnow) a apoptose foi evidenciada pela degradação do DNA e ativação das caspases, o que abre investigações futuras para a cepa de FV3-*like* aqui isolada, na premissa de entender se a apoptose induzida em células BF-2, que é de origem piscícola, é igualmente observada em células de anfíbios ou répteis, que são os principais hospedeiros.

De fato, o tempo de co-existência entre os vírus e os hospedeiros, permitiram o estreito balanço entre a indução ou a inibição da apoptose, sendo este mecanismo um elo central na sobrevivência de ambos. Se por um lado, a resposta antiviral desenvolvida pelo hospedeiro envolve vias que levam a ativação da apoptose, na tentativa de limitar a replicação e impedir que os vírus alcancem altos títulos, por outro, a apoptose acaba por contribuir com a patogênese das doenças virais, pois os vírus desenvolveram mecanismos reguladores, que a antagonizam. Assim, para sobreviver, os vírus lançam de mecanismos anti-apoptóticos, maximizando a produção viral, ou pró-apoptóticos, espalhando a progênie viral para células vizinhas, sem desencadear uma resposta inflamatória acentuada (BENEDICT; NORRIS; WARE; 2002; O'BRIEN, 1998; TEODORO; BRANTON, 1997), o que caracteriza a necessidade de estudos que investiguem e explorem esse mecanismo de morte, para que melhor possamos compreender possíveis vias de modulação da resposta anti-viral e assim desenvolver potenciais compostos capazes de inibir a replicação dos vírus.

Nesta dissertação, isolamos e caracterizamos uma estirpe de FV3-*like* patogênica, responsável por um importante surto em anfíbios; no entanto, não sabemos se a estirpe aqui isolada é de fato mais virulenta, por ter desencadeado alta taxa de mortalidade em anfíbios adultos, ou se o fenômeno observado é resultado de fatores estressores ambientais, o que torna os animais mais vulneráveis às infecções virais. Neste sentido, este estudo torna-se a base para futuras caracterizações

moleculares, na busca por possíveis fatores de virulência dessa estirpe isolada de circulação no Brasil.

7 CONCLUSÕES

Frog virus 3-like foi isolado a partir de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), o que permitiu a visualização dos efeitos citopáticos esperados para ranavírus.

Confirmamos o isolamento pela detecção do genoma viral utilizando-se dois marcadores altamente conservados e caracterizamos molecularmente a cepa isolada, evidenciando-se um alto grau de similaridade com a espécie tipo *Frog virus 3*, observando-se também agrupamento filogenético com outras sequências de FV3 do Brasil.

A morfologia da cepa de FV3-like isolada foi confirmada por MET, pela presença de partículas virais de formato e tamanho esperados.

Confirmamos o isolamento viral pela marcação positiva fluorescente de MCP em células infectadas e pela presença de um polipeptídeo de cerca de 50 kDa no *Western blot*.

Demonstramos que a estirpe de *Frog virus 3-like* isolada no Brasil induz apoptose em células BF-2, constatada através de duas características importantes deste tipo de morte: marcação positiva de caspases efetoras 3/7 e a presença de núcleos fragmentados.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, A. M. Ranicultura se consolida com cadeia produtiva operando em rede interativa. **Visão Agric.**, Piracicaba, n. 11, 2012.
- AHNE, W. et al. Comparison of European systemic piscine and amphibian iridoviruses with *epizootic haematopoietic necrosis virus* and *frog virus 3*. **Zentralbl. Veterinarmed. B.**, Berlin, v. 45, n. 6, p. 373-383, 1998.
- AHNE, W. et al. Special topic review: Iridoviruses associated with *Epizootic haematopoietic necrosis* (EHN) in aquaculture. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, Dordrecht, v. 13, p. 367-373, 1997.
- AHNE, W.; SCHLOTFELDT, H. J.; THOMSEN, I. Fish viruses: isolation of na icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus from sheatfish (*Silurus glanis*). **J. Vet. Med. B.**, Berlin, v. 36, n. 5, p. 333-336, 1989.
- ALENCAR, A. L. F. **Isolamento e caracterização de estirpe de Frog virus 3-símile detectada em rãs-touro gigante (*Lithobates catesbeianus*) no Estado de São Paulo**. 2016. 60 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.
- ALLENDER, M. C.; BUNICK, D.; MITCHELL, M. A. Development and validation of Taqman quantitative PCR for detection of frog virus 3-like virus in eastern box turtles (*Terrepenne carolina carolina*). **J. Virol. Methods.**, Amsterdam, v. 188, n. 1-2, p. 121-125, 2013.
- ALMEIDA-QUEIROZ, S. R. et al. Primeira detecção de *Ranavirus* associado a surtos sequenciais de mortalidade na tilapicultura brasileira. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 13., 2014, Maringá. **Anais...** maringá: ABRAPOA, 2014. p. 60.
- ALTHERR, S. et al. **Canapés to extinction**: the international trade in frogs' legs and its ecological impact. A report by Pro Wildlife, Defenders of Wildlife and Animal Welfare Institute. Munich, Washington, 2011.
- ANDINO, F. J. et al. *Frog virus 3* dissemination in the brain of tadpoles, but not in adult *Xenopus*, involves blood brain barrier dysfunction. **Sci. Rep.**, London, v. 6, art. 22508, 2016.
- ANTONUCCI, A. M. et al. *Longibucca catesbeianae* (nematoda: cylindrocorporidae) of the bullfrog, *Lithobates catesbeianus* (anura: amphibia) from frog farms in the state of São paulo, Brazil. **Neotrop. Helminthol.**, Peru, v. 6, n. 1, p. 75-83, 2012.
- BALSEIRO, A. et al. Pathology, isolation and molecular characterization of a ranavirus from the common midwife toad *Alytes obstetricans* on the Iberian Peninsula. **Dis. Aquat. Organ.**, Germany, v. 84, n. 2, p. 95-104, 2009.

BENEDICT, C. A.; NORRIS, P. S.; WARE, C. F. To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. **Nat. Immunol.**, New York, v. 3, n. 11, p. 1013-1018, 2002.

BLACK, Y.; MEREDITH, A.; PRICE, S. J. Detection and reporting of ranavirus in Amphibians: evaluation of the roles of the World organisation for animal health and the published literature. **J. Wildl. Dis.**, Ames, v. 53, n. 3, p. 509-520, 2017.

BLAGOSKLONNY, M. V. Cell death beyond apoptosis. **Leukemia**, London, v. 14, p.1502-1508, 2000.

BONDAD-REANTASO, M. G. et al. Disease and health management in asian aquaculture, **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 132, p. 249-272, 2005.

BORZYM, E.; KARPINSKA, T. A.; REICHERT, M. Outbreak of ranavirus infection in sheatfish *Silurus glanis* (L.), in Poland. **Pol. J. Vet. Sci.**, Germany, v. 18, n. 3, p. 607-611, 2015.

BRASIL. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de origem Animal. **Diário Oficial da União**, Poder Legislativo, Brasília, DF, 30 de mar. Seção 1, p. 3.

BRAUNWALD, J.; NONNENMACHER, H.; TRIPIER-DARCY, F. Ultrastructural and biochemical study of *Frog virus 3* uptake by BHK-21 cells. **J. Gen. Virol.**, London, v. 66, p. 283-293, 1985.

BRENES, R. et al. Transmission of ranavirus between ectothermic vertebrate hosts. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 3, art. e92467, 2014.

BRUNNER, J. L. et al. Ranavirus ecology and evolution: from epidemiology to extinction. In: GRAY, M. J.; CHINCHAR, V. G. **Ranaviruses**: lethal pathogens of ectothermic vertebrates. New York: Springer Open, 2015. p. 209-240.

CARMONA-GUTIERREZ, D. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. **Cell Death Differ.**, London, v. 17, p. 763-773, 2010.

CARRARO, K. C. Ranicultura: um bom negócio que contribui para a saúde. **Rev. FAE**, Curitiba, v. 11, n. 1, p. 111-118, 2008.

CHANG, H. Y.; YANG, X. Proteases for cell suicide: function and regulation of caspases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v. 64, n. 4, p. 821-846, 2000.

CHEN, Z.; ZHENG, J.; JIANG, Y. A. A new iridovirus isolated from soft-shelled turtle. **Virus Res.**, Amsterdam, v. 63, p. 147-151, 1999.

CHENG, C. W. Iridovirus CARD protein inhibits apoptosis through intrinsic and extrinsic pathways. **Plos One**, San Francisco, v. 10, n. 6, art. e0129071, 2015.

CHENG, K. et al. Differential transcription of fathead minnow immune-related genes following infection with *Frog virus 3*, an emerging pathogen of ectothermic vertebrates. **Virology**, New York, v. 456-457, p. 77-86, 2014.

- CHINCHAR, V. G. et al. Family *Iridoviridae*: poor viral relations no longer. **Cur. Top. Microbiol. Immunol.**, Berlin, v. 328, p. 123-170, 2009.
- CHINCHAR, V. G. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Iridoviridae*. **J. Gen. Virol.**, London, v. 98, n. 5, p. 890-891, 2017.
- CHINCHAR, V. G. et al. Induction of apoptosis in *Frog virus 3*-infected cells. **Virology**, New York, v. 306, p. 303-312, 2003.
- CHINCHAR, V. G. Ranaviruses (family *Iridoviridae*): Emerging cold-blooded killers. **Arch. Virol.**, Austria, v. 147, p. 447-470, 2002.
- CHINCHAR, V. G.; WALTZEK, T. B. Ranaviruses: not just for frogs. **PLOS Pathog.**, San Francisco, v. 10, n. 1, art. e1003850, 2014.
- CHINCHAR, V. G.; WALTZEK, T. B.; SUBRAMANIAM, K. Ranaviruses and other members of the family *Iridoviridae*: Their place in the virosphere. **Virology**, New York, v. 511, p. 259-271, 2017.
- COIRAS, M. et al. Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. **Nat. Rev. Microbiol.**, London, v. 7, p. 798-812, 2009.
- COLLET, B. Innate immune responses of salmonid fish to viral infections. **Dev. Comp. Immunol.**, New York, v. 43, n. 2, p. 160-173, 2014.
- CRANE, M.; HYATT, A. Viruses of fish: an overview of significant pathogens. **Viruses**, Switzerland, v. 3, n. 11, p. 2025-2046, 2011.
- CREPALDI, D.V. et al. A situação da aquacultura e da pesca no Brasil e no mundo. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 30, n. 3/4, p. 81-86, 2006.
- CRIBB, A. Y.; AFONSO, A. M.; FERREIRA, C. M. **Manual técnico de ranicultura**. Brasília, DF: EMBRAPA. 2013.
- CUNNINGHAM, A. A.; TEMS, C. A.; RUSSELL, P. H. Immunohistochemical demonstration of ranavirus antigen in the tissues of infected frogs (*Rana temporaria*) with systemic haemorrhagic or cutaneous ulcerative disease. **J. Comp. Pathol. Ther.**, Edinburgh, v. 138, p. 3-11, 2008.
- DE JESÚS ANDINO, F. et al. Susceptibility of *Xenopus laevis* tadpoles to infection by the ranavirus *Frog-Virus 3* correlates with a reduced and delayed innate immune response in comparison with adult frogs. **Virology**, New York, v. 432, n. 2, p. 435-443, 2012.
- DE VOE, R. et al. Associated morbidity and mortality in a group of captive eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*). **J. Wildl. Dis.**, Ames, v. 35, p. 534-543, 2004.

DEWITTE-ORR, S. J. **A study of innate antiviral mechanisms using fish cell lines**. 2006. 256 f. Tese de Doutorado – Faculdade de Biologia, University of Waterloo, Canadá, 2006.

DUFFUS, A. L. J. et al. Distribution and Host Range of Ranaviruses. In: GRAY, M. J.; CHINCHAR, V. G. **Ranaviruses: lethal pathogens of ectothermic vertebrates**. New York: Springer Open, 2015. p. 9-58.

DUFFUS, A. L. J. et al. *Frog virus 3-like infections in aquatic amphibian communities*. **J. Wildl. Dis.**, Ames, v. 44, n. 1, p. 109-120, 2008.

EATON, H. E. et al. Comparative genomic analysis of the family *Iridoviridae*: Re-annotating and defining the core set of iridovirus genes. **Viol. J.**, London, v. 4, n. 11, 2007.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Exp. Toxicol. Pathol.**, Jena, v. 35 n. 4, p. 495-516, 2007.

ESSBAUER, S.; AHNE, W. The *epizootic haematopoietic necrosis virus (Iridoviridae)* induces apoptosis *in vitro*. **J. Vet. Med. Ser. B.**, Berlin, v. 49, n. 1, p. 25-30, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **The state of world fisheries and aquaculture**: meeting the sustainable development goals. Rome, 2018. 227 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Fishery Statistical Collections**: global aquaculture production 1950-2016. 2016: banco de dados. Disponível em: <http://www.fao.org/figis/servlet/tabselector?tb_ds=aquaculture&tb_mode=table&tb_act=select&tb_grp=species>. Acesso em: 22 Aug. 2018.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome: FAO, 2014.

FERREIRA, C. M.; PIMENTA, A. G. C.; PAIVA NETO, J. S. Introdução à ranicultura. **B. Téc. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 33, p. 1-15, 2002.

FINK S. L.; COOKSON B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infect. Immun.**, Washington, v. 73, p. 1907-1916, 2005.

GALLI, L. et al. Ranavirus detection by PCR in cultured tadpoles (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) from South America. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 257, p. 78-82, 2006.

GALLUZZI, L.; BLOMGREN, K.; KROEMER, L. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. **Nat. Rev. Neurosci.**, London, v. 10, n. 7, p. 481-494, 2009.

GANTRESS, J. et al. Development and characterization of a model system to study amphibian immune responses to iridoviruses. **Virology**, New York, v. 311, p. 254-262, 2003.

GENG, Y. et al. First report of a ranavirus associated with morbidity and mortality in farmed Chinese giant salamanders (*Andrias davidianus*). **J. Comp. Pathol. Ther.**, Edinburgh, v. 145, n. 1, p. 95-102, 2011.

GEORGE, M. R. et al. Isolation and characterization of a ranavirus from koi, *Cyprinus carpio* L., experiencing mass mortalities in India. **J. Fish Dis.**, Oxford, v. 38, n. 4, p. 389-403, 2014.

GONÇALVES, A. A.; OTTA, M. C. M. Aproveitamento da carne da carcaça de rã-touro gigante no desenvolvimento de hambúrguer. **Rev. Bras. Enga. Pesca**, São Luís, v. 3, n. 2, 2008.

GOORHA, R. et al. The role of DNA methylation in virus replicationwi: Inhibition of frog virus 3 replication by 5-azacytidine. **Virology**, New York, v. 138, p. 94-102, 1984.

GOORHA, R. *Frog virus 3* DNA replication occurs in two stages. **J. Virol.**, Washington, v. 43 n. 2 p. 519-528, 1982.

GRAY, M. J.; MILLER, D. L.; HOVERMAN, J. T. Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. **Dis. Aquat. Organ.**, Germany, v. 87, p. 243-266, 2009.

GRAYFER, L. et al. Ranavirus host immunity and immune evasion. In: GRAY M. J.; CHINCHAR, V. G. **Ranaviruses: lethal pathogens of ectothermic vertebrates**. New York: Springer Open, 2015.

GRAYFER, L.; ANDINO, F. J.; ROBERT, J. Prominent amphibian (*xenopus laevis*) tadpole type iii interferon response to the *Frog virus 3* ranavirus. **J. Virol.**, v. 89, n. 9, p. 5072-82, 2015.

GREEN, D. E.; CONVERSE, K. A.; SCHRADER, A. K. Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the USA, 1996–2001. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 969, p. 323-339, 2002.

GRUTTER, M. G. Caspases: key players in programmed cell death. **Curr Opin Struct Biol.**, London, v. 10, n. 6, p. 649-655, 2000.

HÄCKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell Tissue Res.**, Berlin, v. 301, n. 1, p. 5-17, 2000.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, London, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

HIPOLITO, M. Manejo sanitário no cultivo de rã. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. A. P. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004, p. 333-353.

HIPOLITO, M.; BACH, E. E. Patologias em rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) primeira revisão da bibliografia Brasileira. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 69, p.113-115, 2002.

HOLOPAINEN, R. et al. Ranavirus phylogeny and differentiation based on major capsid protein, DNA polymerase and neurofilament triplet H1-like protein genes. **Dis. Aquat. Organ.**, Germany, v. 85, n. 2, p. 81-91, 2009.

HOLOPAINEN, R.; TAPIOVAARA, H.; HONKANEN. Expression analysis of immune response genes in fish epithelial cells following ranavirus infection. **Fish Shellfish Immunol.**, London, v. 32, p. 1095-1105, 2012.

HUANG, S. M. et al. Genetic analysis of fish iridoviruses isolated in Taiwan during 2001–2009. **Arch. Virol.**, Austria, v. 156, n. 9, p. 1505-1515, 2011.

HUANG, Y. et al. Complete sequence determination of a novel reptile iridovirus isolated from soft-shelled turtle and evolutionary analysis of Iridoviridae. **BMC Genomics**, London, v. 10, art. 224, 2009.

HUANG, Y. H. et al. Mitochondrion-mediated apoptosis induced by *Rana grylio* virus infection in fish cells. **Apoptosis**, Netherlands, v. 12, n. 9, p. 1569-1577, 2007.

HYATT, A. D. et al. Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. **Arch. Virol.**, Wien, v. 145, n. 2, p. 301-331, 2000.

HYATT, A. D. et al. First identification of a ranavirus from green pythons (*Chondropython viridis*). **J. Wildl. Dis.**, Ames, v. 38, p. 239-252, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Estatística da pesca 2007 Brasil**: grandes regiões e unidades da federação. Brasília, DF: IBAMA, 2007.

IWANOWICZ, L. et al. Identification of largemouth bass virus in the introduced Northern snakehead inhabiting the Chesapeake Bay Watershed. **J. Aquat. Anim. Health.**, Philadelphia, v. 25, n. 3, p. 191-196, 2013.

JANCOVICH, J. K. et al. Evidence for Multiple Recent Host Species Shifts among the Ranaviruses (Family *Iridoviridae*). **J. Virol.**, Washington, v. 84, n. 6, p. 2636-2647, 2010.

JANCOVICH, J. K. et al. Family *Iridoviridae*. In: KING, A. M. Q et al. **Virus taxonomy**: Ninth report of the international committee on taxonomy of viroses. San Diego, CA: Elsevier, 2012. p. 193-210.

JANCOVICH, J. K. et al. Isolation of lethal virus from the endangered tiger salamander *Ambystoma tigrinum stebbinsi*. **Dis. Aquat. Org.**, Germany, v. 31, n. 3, p. 161-167, 1997.

JANCOVICH, J. K. et al. Ranavirus taxonomy and phylogeny. In: GRAY, M.J.; CHINCHAR, V.G. **Ranavirus: lethal pathogens of ectothermic vertebrates**. New York: Springer Open, 2015. p. 59-70.

JANCOVICH, J. K.; JACOBS, B. L. Innate immune evasion mediated by the *Ambystoma tigrinum* virus eukaryotic translation initiation factor 2 α homologue. **J. Virol.**, Washington, v. 85, n. 10, p. 5061-5069, 2011.

KALYAANAMOORTHY, S. et al. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. **Nat. Methods**, London, v. 14, p. 587-589, 2017.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, Lewis, v. 26, n. 4, p. 239-57, 1972.

LAI, Y. S. Characterization of apoptosis induced by grouper iridovirus in two newly established cell lines from barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch). **J. Fish Dis.**, Oxford, v. 31, p. 825-834, 2008.

LESBARRÉRES, D. et al. Ranavirus: Past, presente and future. **Biol. Lett.**, London, v. 8, n. 4, p. 481-483, 2011.

LIAO, I. C.; CHAO, N. H. Aquaculture and food crisis: opportunities and constraints. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, London, v. 18, n. 4. p. 564-569, 2009.

LIMA, S. L.; AGOSTINHO, C. A. **A criação de rãs**. 3. ed. São Paulo: Globo, 1988.

LIMA, S. L.; TEIXEIRA, R. D.; COSTA, M. Desenvolvimento de pratos prontos a base de carne de Rã (*in sous vide*). In: WORKSHOP GI-PESCADO, 2006, São Paulo. **Anais ...** São Paulo: III Seafood Expo Latin América, 2006.

LIN, H. Y. et al. Development and application of a monoclonal antibody against grouper iridovirus (GIV) major capsid protein. **J. Virol. Methods.**, Amesterdam, v. 205, p. 31-37, 2014.

LIU, Y. et al. Visualization of assembly intermediates and budding vacuoles of singapore grouper iridovirus in grouper embryonic cells. **Sci. Rep.**, London, v. 6, art. 18696, 2016.

LONGO, A. A. **Manual de ranicultura**: uma nova opção de pecuária. Rio de Janeiro: Ediouro do Campo, 1987.

LUNDSTEDT, L. M.; RODRIGUES, A. P. O.; MORO, G. V. Manejo nutricional na piscicultura. In: PALHARES, J. C. P. P. **Produção animal e recursos hídricos**. São Carlos: Cubo, 2016. cap. 10. p. 145-162.

MANIERO, G. D. et al. Generation of a long-lasting, protective, and neutralizing antibody response to the ranavirus FV3 by the frog *Xenopus*. **Dev. Comp. Immunol.**, New York, v. 30, p. 649-657, 2006.

MAO, J.; HEDRICK, R. P.; CHINCHAR, G. Molecular characterization, sequence analysis and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. **Virology**, New York, v. 229, n. 1, p. 212-220, 1997.

MARSCHANG, R. E. et al. Isolation and characterization of an iridovirus from Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*). **Arch. Virol.**, New York, v. 144, p. 1909-1922, 1999.

MARSCHANG, R. E. Viruses infecting reptiles. **Viruses**., Basel, v. 3, n. 11, p. 2087-2126, 2011.

MARSH, I. B. et al. Rapid differentiation of Australian, European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence. **Mol. Cell. Probes**., London, v. 16, n. 2, p. 137-151, 2002.

MAZZONI, R. Doenças na ranicultura: prevenção e uso de vacinas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RANICULTURA, 2003, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Boletim do instituto de Pesca, 2003. p. 41-47.

MAZZONI, R. et al. Mass mortality associated with a *Frog virus 3*-like ranavirus infection in farmed tadpoles *Rana catesbeiana* from Brasil. **Dis. Aquat. Org.**., Germany, v. 86, n. 3, p. 181-191, 2009.

MCDERMOTT, C.; PALMEIRO, V. M. D. Selected emerging infectious diseases of ornamental fish. **Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.**, Philadelphia, v. 16, p. 261-282, 2013.

MESQUITA, A. Q. **Síndrome vestibular em *Lithobates catesbeianus* associada à *Ranavirus***. 2014. 80 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

MILLER, D. L. et al. Comparative Pathology of Ranaviruses and Diagnostic Techniques. In: GRAY, M. J.; CHINCHAR, V. G. **Ranaviruses: lethal pathogens of ectothermic vertebrates**. New York: Springer Open, 2015. p. 171-208.

MILLER, D. L. et al. *Frog virus 3* infection, cultured *American bullfrogs*. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 13, n. 2, p. 342-343, 2007.

MORALES, H. D. et al. Innate immune responses and permissiveness to ranavirus infection of peritoneal leukocytes in the frog *Xenopus laevis*. **J. Virol.**, Baltimore, v. 84, n. 10, p. 4912-4922, 2010.

MORRISON, E. A. et al. Complete genome analysis of a *Frog virus 3* (FV3) isolate and sequence comparison with isolates of differing levels of virulence. **Virology**, New York, v. 11, art. 46, 2014.

MURTI, K. G.; GOORHA, R. Interaction of Frog virus-3 with the cytoskeleton. I. Altered organization of microtubules, intermediate filaments, and microfilaments. **J. Cell. Biol.**, New York, v. 96, n. 5, p. 1248-1257, 1983.

NEVES, N. P. et al. Use of polyclonal antibodies, electron microscopy and histopathology to detect Iridovirus-like particles in bullfrogs. **B. Téc. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 42, p. 523-553, 2016.

NGUYEN, L. T. et al. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. **Mol. Biol. Evol.**, Oxford, v. 32, p. 268-274, 2015.

NIKOLETOPOULOU, V. et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.**, Amsterdam, p. 3448-3459, 2013.

NÓBREGA, I. C. C. et al. Volatile constituents of cooked bullfrog (*Rana catesbeiana*) legs. **Food Chem.**, England, v. 102, n. 1, p. 186-191, 2007.

O'BRIEN, V. Viruses and apoptosis. **J. Gen. Virol.**, London, v. 79, p.1833-1845, 1998.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027**: Special focus: Middle East and North Afric. Paris: OECD, 2018.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Infection with Ranavirus. In: _____. **Aquatic Animal Health Code**. Paris: OIE, 2018. cap. 8.3, p. 1-6, 2018a.

OIE. WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Infection with Ranavirus. In: _____. **Manual of diagnostic tests for aquatic animals**. Paris: OIE, 2018. cap. 2.1.2, p. 1-24, 2018b.

OLIVEIRA, C. R. **Rastreamento e caracterização molecular de ranavírus (FV3) em rês-touro provenientes de cultivos comerciais**. 2017. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesca, São Paulo, 2017.

OU-YANG, Z. et al. Immunogenicity and protective effects of inactivated Singapore grouper iridovirus (SGIV) vaccines in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. **Dev. Comp. Immunol.**, New York, v. 38, p. 254–26, 2012.

PENG, C. et al. Susceptibility of farmed juvenile giant grouper *Epinephelus lanceolatus* to a newly isolated grouper iridovirus (genus *Ranavirus*). **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 177, p. 270-279, 2002.

PHAM, P. H. et al. Differential viral propagation and induction of apoptosis by grouper iridovirus (GIV) in cell lines from three non-host species. **Virus Res.**, Amsterdam, v. 167, p. 16-25, 2012.

PHAM, P. H. et al. Use of cell lines and primary cultures to explore the capacity of rainbow trout to be a host for *Frog virus 3* (FV3). **In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.**, Columbia, v. 51, p. 894-904, 2015.

PINHEIRO, A. Futuro próspero. In: PINHEIRO, A. et al. **1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura**, 2014. p. 11.

- PIRES, C. V. et al. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes protéicas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 179-187, 2006.
- PLUMB, J. A. et al. An iridovirus isolated from wild largemouth bass. **J. Aquat. Anim. Health.**, v. 8, p. 265-270, 1996.
- PRASANKOK, P.; CHUTMONGKONKUL, M.; KANCHANAKHAN, S. Characterization of iridovirus isolated from diseased marbled sleepy goby, *Oxyeleotris marmoratus*. In: WALKER, P. J.; LESTER, R. G.; BONDAD-REANTASO, M. **Diseases in Asian aquaculture**: Asian fisheries society. 2005.
- QIN, Q. W. et al. Characterization of a novel ranavirus isolated from grouper *Epinephelus tauvina*. **Dis. Aquat. Organ.**, Germany, v. 53, n. 1, p. 1-9, 2003.
- RAMBAUT, A. FigTree v1.4 [computer program]. 2012. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>. Acesso em: 10 nov. 2018.
- REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **Am. J. Hyg.**, Baltimore, v. 27, p. 493-497, 1938.
- ROBERT J. et al. Adaptive immunity and histopathology in *Frog virus 3*-infected *Xenopus*. **Virology**, New York, v. 332, p. 667-675, 2005.
- ROBERT, J. et al. Inflammation-induced reactivation of the ranavirus *Frog virus 3* in asymptomatic *Xenopus laevis*. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 11, 2014.
- ROBERT, J. et al. Waterborne infectivity of the Ranavirus *Frog virus 3* in *Xenopus laevis*. **Virology**, New York, v. 417, p. 410-417, 2011.
- SAVITSKAYA, M. A.; ONISHCHENKO, G. E. Mechanisms of Apoptosis. **Biochemistry**, Moscow, v. 80, n. 11, p. 1393-1405, 2015.
- SCHOCK, D. M.; BOLLINGER, T. K.; COLLINS, J. P. Mortality rates differ among amphibian populations exposed to three strains of a lethal ranavirus. **Ecohealth.**, New York, v. 6, n. 3, p. 438-448, 2009.
- SEIXAS FILHO, J. T. S.; PEREIRA, M. M.; MELLO, S. C. R. P. **Manual de ranicultura para o produtor**. Rio de Janeiro: H. P. Comunicação, 2017.
- SHI, C. et al. Production and characterization of mono-clonal antibodies to a grouper iridovirus. **J. Virol. Methods.**, Amsterdam, v. 107, n. 2, p. 147-154, 2003.
- SIVASANKAR, P. et al. Characterization of a virulent ranavirus isolated from marine ornamental fish in India. **Virusdisease.**, New Delhi, v. 28, n. 4, p. 373-382, 2017.
- STARK, T. et al. Death in the clouds: ranavirus associated mortality in assemblage of cloud forest amphibians in Nicaragua. **Acta Herpetol.**, Firenze, v. 9, n. 1, p. 125-127, 2014.

- TAN, W. G. et al. Comparative genomic analyses of *Frog virus 3*, type species of the genus *Ranavirus* (family *Iridoviridae*). **Virology**, New York, v. 323, p. 70-84, 2004.
- TAVARES-DIAS, M.; MARIANO, W.S. **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. São Paulo: Pedro & João Editores, 2015. v. 2.
- TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, London, v. 9, n. 3, p. 231-241, 2008.
- TEODORO, J. G.; BRANTON, P.E. Regulation of apoptosis by viral gene products. **J. Virol.**, Washington, v. 71, n. 3, p.1739-1746, 1997.
- TIDONA, C. A. et al. Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution? **Virus Genes.**, New York, v. 16, n. 1, p. 59-66, 1998.
- ULUKAYA, E.; ACILAN, C.; YILMAZ, Y. Apoptosis: why and how does it occur in biology?. **Cell Biochem. Funct.**, Chichester, v. 29, p. 468-480, 2011.
- WECK, K. E. et al. Macrophages are the major reservoir of latent murine gammaherpesvirus 68 in peritoneal cells. **J. Virol.**, Washington, v. 73, n. 4, p.3273-3283, 1999.
- WEI, Y.; FAN, T.; YU, M. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. **Acta. Biochim. Biophys. Sin.**, Shanghai, v. 40, n. 4, p. 278-288, 2008.
- WEICHERT, M. A.; MELLO, S. R. P.; ESPINDOLA, L. M. O consumo de tilápias e rãs nas cidades do Rio de Janeiro e Niterói. **Panor. Aquic.**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 102, p. 37-41, 2007.
- WEIR, R. P. et al. Isolation and characterisation of a novel Bohle-like virus from two frog species in the Darwin rural area, Australia. **Dis. Aquat. Organ.**, Germany, v. 99, n. 3, p. 169-177, 2012.
- WHITLEY, D. S. et al. *Frog virus 3* ORF 53R, a putative myristoylated membrane protein, is essential for virus replication in vitro. **Virology.**, New York, v. 405, n. 2, p. 448-56, 2010.
- WHITLEY, D.S. et al. Antisense approaches for elucidating ranavirus gene function in an infected fish cell line. **Dev. Comp. Immunol.**, New York, v. 35, p. 937-948, 2011.
- WILLIAMS, T.; BARBOSA-SOLOMIEU, B.; CHINCHAR, V. G. A decade of advances in iridovirus research. **Adv. Virus Res.**, Amsterdam, v. 67, p. 173-248, 2005.
- WINZELER, M. E.; HAMILTON, M. T.; TUBERVILLE, T. D. Stacey L. Lance First case of ranavirus and associated morbidity and mortality in an eastern mud turtle *Kinosternon subrubrum* in South Carolina. **Dis. Aquat. Org.**, Germany, v. 114, p. 77-81, 2015.

ZHANG, Q. Y. et al. Characterization of an iridovirus from the cultured pig frog, *Rana grylio*, with lethal syndrome. **Dis. Aquat. Organ.**, Germany, v. 48, n. 1, p. 27-36, 2001.

ZHAO, Z. et al. Identification and characterization of a novel envelope protein in *Rana grylio* virus. **J. Gen. Virol.**, London, v. 89, p. 1866-1872, 2008.

ZHAO, Z. et al. Characterization of a late gene encoding for MCP in soft-shelled turtle iridovirus (STIV). **Virus Res.**, Amsterdam, v. 129, n. 2, p. 135-44, 2007.

ZHOU, Z. Y. et al. Characterization of a ranavirus isolated from Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*, Blanchard, 1871) in China. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 384, p. 66-73, 2013.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da FZEA/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa da FZEA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Isolamento, caracterização fenotípica e molecular de Frog virus 3-like detectado em *Lithobates catesbeianus* durante surto em ranários comerciais paulistas", protocolada sob o CEUA nº 7819150118, sob a responsabilidade de **Ricardo Luiz Moro de Sousa e equipe; Loiane Sampaio Tavares** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 31/01/2018.

We certify that the proposal "Isolation, phenotypic and molecular characterization of Frog virus 3-like detected in *Lithobates catesbeianus* during outbreak in commercial ranaculture in São Paulo", utilizing 6 Amphibians (males and females), protocol number CEUA 7819150118, under the responsibility of **Ricardo Luiz Moro de Sousa and team; Loiane Sampaio Tavares** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 01/31/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **01/2018** a **06/2018**

Área: **Medicina Veterinária**

Origem: **Amostras biológicas estocadas**

Espécie: **Anfíbios**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **0 a 0 anos**

N: **6**

Linhagem: ***Lithobates catesbeianus***

Peso: **0 a 0 g**

Resumo: Dentre os principais desafios pertinentes à aquicultura, destaca-se a ocorrência de doenças infecciosas virais com seus efeitos devastadores. Durante as duas últimas décadas, os vírus do gênero *Ranavirus* (Família *Iridoviridae*) têm sido associados a eventos de mortalidade em anfíbios, peixes e em répteis, com significativas perdas ecológicas e econômicas. No entanto, informações sobre a circulação destes vírus no Brasil são ainda limitadas. Neste sentido, o presente projeto tem por objetivos realizar o isolamento de FV3 em cultivo celular, com confirmação por técnicas moleculares e proceder com a caracterização fenotípica e genotípica do isolado. Para tanto, amostras de baço, rins e fígado, provenientes de *Lithobates catesbeianus* oriundas de duas raniculturas do estado de São Paulo serão utilizadas. Após confirmação do isolamento, a caracterização viral se dará por microscopia eletrônica, curva de crescimento, ensaio de placa e sequenciamento completo do genoma. Acredita-se que os resultados obtidos nesse estudo poderão contribuir para melhor elucidação da biologia de *ranavirus* circulantes no estado de São Paulo, como agentes etiológicos de ranavirioses.

Local do experimento: Laboratório de Higiene Zootécnica, FZEA/USP

Pirassununga, 03 de novembro de 2018

Prof. Dra. Daniele dos Santos Martins
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Prof. Dra. Cristiane Gonçalves Titto
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP