

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JULIANA DE OLIVEIRA NAVARRO

Construção de clones recombinantes de *Bacillus subtilis* por fusão dos genes *CotC* de endósporo e *MCP (Major Capsid Protein)* de isolado brasileiro de *Ranavirus*

Pirassununga
2023

JULIANA DE OLIVEIRA NAVARRO

Construção de clones recombinantes de *Bacillus subtilis* por fusão dos genes
CotC de endósporo e *MCP* (*Major Capsid Protein*) de isolado brasileiro de
Ranavirus

“Versão Corrigida”

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutora em Ciências do Programa de Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência
Animal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz
Moro de Sousa

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

N322c Navarro, Juliana de Oliveira Construção de clones recombinantes de *Bacillus subtilis* por fusão dos genes *CotC* de endósporo e *MCP (Major Capsid Protein)* de isolado brasileiro de *Ranavirus* / Juliana de Oliveira Navarro ; orientadora Ricardo Luiz Moro de Souza. -- Pirassununga, 2023.
60 f.

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

1. Spore Surface Display. 2. *Ranavirus*. 3. *Bacillus subtilis*. 4. vacinas. I. Souza, Ricardo Luiz Moro de , orient. II. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da imunogenicidade de endósporos de *Bacillus subtilis* recombinantes expressando a proteína MCP (Major Capsid Protein) de ranavírus brasileiro em rãs-touro gigantes (*Lithobates catesbeianus*)", protocolada sob o CEUA nº 5639050221 (ID 001831), sob a responsabilidade de **Ricardo Luiz Moro de Sousa e equipe; Juliana de Oliveira Navarro** - 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 08/03/2022.

We certify that the proposal "Immunogenicity assessment of recombinant *Bacillus subtilis* endospores expressing the MCP (Major Capsid Protein) protein of Brazilian ranavirus in giant bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*)", utilizing 90 Amphibians (males or females), protocol number CEUA 5639050221 (ID 001831), under the responsibility of **Ricardo Luiz Moro de Sousa and team; Juliana de Oliveira Navarro** - 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 03/08/2022.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 11/2021 a 03/2022 Área: Medicina Veterinária

Origem: Animais provenientes de estabelecimentos comerciais

Espécie: Anfíbios sexo: Machos ou Fêmeas Idade: 0 a 12 meses Quantidade: 90

Linhagem: *Lithobates catesbeianus* Peso: 0 a 100 g

Pirassununga, 16 de setembro de 2023

Prof. Dra. Luciane Silva Martello
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Prof. Dra. Fabiana Fernandes Bressan
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP



JULIANA DE OLIVEIRA NAVARRO

Construção de clones recombinantes de *Bacillus subtilis* por fusão dos genes *CotC* de endósporo e *MCP* (*Major Capsid Protein*) de isolado brasileiro de *Ranavirus*

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutora em Ciências do Programa de Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal

Data de aprovação: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora:

Prof(a).Dr(a)._____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof(a).Dr(a)._____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof(a).Dr(a)._____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof(a).Dr(a)._____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof(a).Dr(a)._____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof(a).Dr(a)._____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao meu sobrinho Ygor, que trilha os mesmos caminhos nos estudos e sempre me acompanhou durante o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTO

Primeiramente à Deus, por me dar sabedoria e discernimento para conseguir chegar no final dessa jornada,

A minha mãe Gersumina e ao meu pai Valentim, que mesmo com poucos estudos sempre me incentivaram e mostraram a importância de uma formação, hoje sou a pessoa que me formei e tornei graças a eles,

Aos meus irmãos, Jocelaina e Jefferson, pelo carinho e apoio nas horas difíceis,

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa, pela oportunidade, orientação, paciência, que sempre estava de portas abertas para me ouvir e me acalmar com a sua resiliência. Obrigada por não ter deixado eu desistir.

A Silvia Helena Seraphin de Godoy, além de técnica do laboratório se tornou uma grande amiga.

Aos meus colegas de laboratório, Nathalia, Carla, Waldelucy, Sofia, Ana Castello, Joyce, Nycolas, Samara, Marisa, Talita e Nathalia pelas escutas ativas e risadas, pois até no desespero demos um jeito de sorrir.

Aos meus colegas de trabalho, que me acalmaram muitas vezes e me lembravam o quanto sou forte;

As minhas amigas Carmen e Larissa, que sempre me incentivaram, acalmaram e estiveram presentes nessa minha jornada;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro;

A todos as pessoas que de perto ou longe mandaram pensamentos positivos, meu muito obrigada.

“O Tempo muito me ensinou:

*Ensinou a amar a
vida,*

Não desistir de lutar,

Renascer na derrota,

Renunciar às palavras

e pensamentos negativos,

*Acreditar nos valores
humanos,*

*E a ser
OTIMISTA.*

*Aprendi que mais vale tentar do que
recuar...*

*Antes acreditar do que duvidar
e,*

*Que o que vale na
vida,*

*Não é o ponto de
partida*

*e sim a nossa
caminhada”*

Cora Coralina

RESUMO

NAVARRO, J. O. **Construção de clones recombinantes de *Bacillus subtilis* por fusão dos genes *CotC* de endósporo e *MCP* (*Major Capsid Protein*) de isolado brasileiro de *Ranavirus***. 2023. 60f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga - SP, 2023.

Recombinação genética é um dos principais mecanismos que impulsionam o processo de obtenção de novas proteínas com fins biotecnológicos, podendo-se destacar a utilização de cepas recombinantes de *Bacillus subtilis* para a produção de vacinas baseadas em subunidades proteicas. Em termos de profilaxia, essa estratégia pode ser aplicada à prevenção contra infecções por *Ranavirus*, representando uma abordagem inovadora e versátil. As ranaviroses são doenças causadas por vírus do gênero *Ranavirus*, pertencente à família *Iridoviridae*, que reúne patógenos emergentes capazes de infectar três classes de vertebrados: peixes ósseos, anfíbios e répteis. Surtos de ranavirose associada a estirpes de *Frog virus 3* (FV3) podem apresentar alta mortalidade, causando prejuízos consideráveis na ranicultura. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo a construção de clones recombinantes de *Bacillus subtilis* por meio da fusão gênica dos genes *CotC*, associado à proteína do revestimento externo do endósporo de *B. subtilis*, e *MCP* (*Major Capsid Protein*), que codifica a proteína principal do capsídeo, de estirpe brasileira de *Ranavirus*. Foram desenhados primers específicos para amplificação dos genes *CotC* e *MCP*. A amplificação do gene *CotC* foi obtida de uma cepa parental de *Bacillus subtilis*. A partir de estirpe de FV3, pertencente ao biobanco do Laboratório de Higiene Zootécnica da FZEA-USP, realizou-se a amplificação do gene *MCP*. Utilizou-se o produto dessas amplificações para realizar a PCR de fusão, sendo confirmada por sequenciamento nucleotídico. Os produtos da PCR de fusão foram clonados no plasmídeo pDG1662 e inseridos em cepas competentes de *Bacillus subtilis*, sendo a confirmação dos novos clones, denominados de pDGCMCP, também confirmadas por sequenciamento nucleotídico. A obtenção de cepa recombinante de *B. subtilis* para *MCP* de ranavírus, por meio da técnica de *spore surface display*, utilizada no presente estudo, é etapa essencial no desenvolvimento de vacinas de nova geração contra a ranavirose.

Palavras-chave: *Spore Surface Display, Ranavirus, Bacillus subtilis, vacinas.*

ABSTRACT

NAVARRO, J. O. **Construction of recombinant clones of *Bacillus subtilis* by fusion of the genes *CotC* from endospore and *MCP* (Major Capsid Protein) from Brazilian Ranavirus isolate.** 2023. 60f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2023.

Genetic recombination is one of the key mechanisms driving the process of obtaining new proteins for biotechnological purposes, with the utilization of recombinant strains of *Bacillus subtilis* standing out for the production of subunit-based vaccines. In terms of prophylaxis, this strategy can be applied to prevent infections by *Ranavirus*, representing an innovative and versatile approach. Ranavirus diseases are caused by viruses of the *Ranavirus* genus, belonging to the *Iridoviridae* family, which includes emerging pathogens capable of infecting three classes of vertebrates: bony fishes, amphibians, and reptiles. Outbreaks of ranavirus disease associated with *Frog virus 3* (FV3) strains can lead to high mortality, causing significant losses in frog farming. In this context, the present study aimed to construct recombinant clones of *Bacillus subtilis* by gene fusion of *CotC*, associated with the outer spore coat protein of *B. subtilis*, and *MCP* (*Major Capsid Protein*), which encodes the major capsid protein, from a Brazilian ranavirus strain. Specific primers were designed for the amplification of the *CotC* and *MCP* genes. The *CotC* gene amplification was obtained from a parental strain of *Bacillus subtilis*. The *MCP* gene amplification was performed from an FV3 strain, belonging to the biobank of the Laboratory of Zootechnical Hygiene at FZEA-USP. The products of these amplifications were used to perform fusion PCR, which was confirmed by nucleotide sequencing. The fusion PCR products were cloned into the pDG1662 plasmid and inserted into competent strains of *Bacillus subtilis*, with confirmation of the new clones, referred to as pDGCMCP, also verified by nucleotide sequencing. The generation of a recombinant strain of *B. subtilis* for ranavirus MCP, using the spore surface display technique employed in this study, is an essential step in the development of next-generation vaccines against ranavirus diseases.

Keywords: *Spore Surface Display, Ranavirus, Bacillus subtilis, vaccine.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Panorama de produção de pescado no território brasileiro.....	22
Figura 2.	Rã Touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>)	23
Figura 3.	Panorama Global da Produção Aquícola.....	24
Figura 4.	Ilustração de vírions de <i>Ranavirus</i>	25
Figura 5.	Girinos afetados por ranaviroses.....	27
Figura 6.	<i>Bacillus subtilis</i>	29
Figura 7.	Estágios de endosporogênese em <i>Bacillus</i> spp.....	30
Figura 8.	Fluxograma de trabalho	32
Figura 9.	Fusão dos genes <i>CotC::MCP</i>	36
Figura 10.	Mapa Vetor de Clonagem pDG1662	37
Figura 11.	Células BF – 2 infectadas por FV3.....	40
Figura 12.	Amplificação dos genes <i>CotC</i> e <i>MCP</i>	41
Figura 13.	Amplificação do PCR de fusão <i>CotC::MCP</i>	42
Figura 14.	Ligação e transformação em cepas de <i>Bacillus subtilis</i>	43
Figura 15.	Amplificação dos clones pDGCMCP.....	44
Figura 16.	Representação da Interação Cromossômica.....	45
Figura 17A.	Análise do sequenciamento do clone pDGCMCP.....	46
Figura 17B.	Análise do sequenciamento do clone pDGCMCP.....	47

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Primers utilizados para amplificação dos genes *CotC*, *MCP* e para realização da fusão gênica.....33
- Tabela 2.** Quantificação das cepas de *Bacillus subtilis*.....39

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

ATV - *Ambystoma tigrinum vírus*

B. subtilis - *Bacillus subtilis*

BF-2 - Bluegillfry – linhagem celular

BGCS - *Bacillus* Genetic Stock Center

BHI – Brain Heart Infusion

BIV - *Bohle iridovirus*

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ECV - *European catfish vírus*

EHNV - *Epizootic haemotopoetic necrosis vírus*

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

(Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)

FDA - Food and drug Administration

FV3 – *Frog virus 3*

GRAS - Generally regarded as safe

IgM – Imunoglobulina M

Kpb - kilo pares de base

MCP - *Major capsid protein*

Min. – Minuto

mL – Mililitro

ng – Nanograma

nm – Nanômetro

OIE- Organização Mundial da Saúde Animal

°C - Grau Celsius

P6 – Sexta passagem

pb - Par de bases

PCR - Reação em Cadeia pela Polimerase

SCRV - *Santee-Cooper ranavirus*

TAE - Tris-Acetato/EDTA

TCID - Tissue Culture Infective Dose

µg – Micrograma

µL – Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 AQUICULTURA.....	21
2.2 RANICULTURA.....	25
2.3 <i>Bacillus subtilis</i> E SUAS APLICAÇÕES.....	28
3. OBJETIVOS.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. CEPA BACTERIANA E ESTIRPE VIRAL.....	32
4.2. AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>CotC</i>	33
4.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>MCP</i>	34
4.4 FUSÃO DOS GENES <i>CotC::MCP</i>	35
4.5 CLONAGEM DAS FUSÕES DOS GENES <i>CotC::MCP</i> PARA OBTENÇÃO DA INTERAÇÃO CROMOSSÔMICA <i>CotC::MCP</i>	36
4.5.1 DIGESTÃO, LIGAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO.....	37
4.5.2 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO DE <i>B. subtilis</i>	38
4.6 ANÁLISE DA INTERAÇÃO CROMOSSÔMICA.....	38
4.7 ÉTICA ANIMAL.....	39
5. RESULTADOS.....	39
5.1. EXTRAÇÃO DO DNA BACTERIANO E VIRAL.....	39
5.2. APLICAÇÃO DOS GENES <i>CotC</i> E <i>MCP</i>	40
5.3. FUSÃO DOS GENES <i>CotC::MCP</i>	41

5.4. CLONAGEM DA FUSÃO GÊNICA <i>CotC::MCP</i> EM PDGCMCP.....	42
5.5. CONFIRMAÇÃO DA INTERAÇÃO CROMOSSÔMICA	44
6. DISCUSSÃO.....	48
7.CONCLUSÃO.....	51
8.PERSPECTIVAS FUTURAS.....	51
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
10. ANEXO.....	60

1. INTRODUÇÃO

Aquicultura é uma prática de produção aquícola, fundamentada na produção de anfíbios, plantas aquáticas, peixes, algas, moluscos e crustáceos. É um dos setores que mais cresce atualmente dentro da produção de alimentos de origem animal, ganhando um amplo espaço mundial, estando a China no primeiro lugar e o Brasil na 13ª posição, na produção de peixes em cativeiro, e na 8ª posição, na produção de peixes de água doce (FAO, 2018; BRASIL, 2020). Segundo o relatório do Estado da Pesca e Agricultura (SOFIA), em 2022, a produção global aquícola (incluindo plantas aquáticas) foi de 214 milhões de toneladas, sendo o grupo mais produzido o de peixes, seguido por algas, moluscos, crustáceos e animais semiaquáticos (FAO, 2022). O Brasil é um país com um enorme potencial para o desenvolvimento da aquicultura com crescimento anual progressivo, decorrente da disponibilidade de grandes extensões de terra passíveis de serem destinadas ao cultivo. Graças a esse cenário, o Brasil é o único país da América Latina que propõe apresentar um incremento de 104% na produção aquícola até 2025 (FAO, 2018; OLIVEIRA, 2009).

Nesse contexto, podemos destacar a ranicultura. No Brasil, essa atividade teve início na década de 1930 com o cultivo da espécie *Lithobates catesbeianus* (rã-touro), que até hoje é a espécie mais utilizada para esse tipo de produção, por se adaptar bem ao clima tropical do país (FERREIRA et al., 2002; RODRIGUES et al., 2010). Ao longo desses anos, a ranicultura brasileira passou por diversas fases, com oscilação do número de produtores e incrementos em tecnologias de criação; nesse sentido, graças a adoção de novas tecnologias, aperfeiçoamento de instalações e treinamento de profissionais que atuam na área, a ranicultura brasileira vem crescendo em um ritmo acelerado (FERREIRA et al., 2002; CRIBB et al., 2013).

Com o aumento na produção de rãs, muitos dados relacionados ao manejo zootécnico e à sanidade vêm sendo produzidos e disseminados, resultando no aumento de informações sobre os principais patógenos que acometem as rãs, podendo-se destacar o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* e os vírus pertencentes à família *Iridoviridae*, que inclusive são considerados

crecentes ameaças à biodiversidade global de anfíbios (HIPOLITO et al., 2002; DASZAK et al., 1999; SCHLOEGEL et al., 2009). Segundo a Organização Mundial de Saúde Animal - OIE (2012), atualmente, esses agentes estão associados a doenças emergentes de notificação obrigatória.

A família *Iridoviridae*, subdividida em duas subfamílias (*Alphairidovirinae* e *Betairidovirinae*), compreende seis gêneros: *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Decapodiridovirus*, *Lymphocystivirus*, *Megalocytivirus* e *Ranavirus*, sendo apenas o gênero *Ranavirus* capaz de infectar anfíbios (TEACHER et al., 2010). Ranavírus apresentam genoma viral grande, de DNA dupla fita, com tamanho variável, podendo apresentar de 140 a 303 kb (kilobase), podendo conter ou não um envelope viral (GOORHA; MURTI, 1982; GRAY; CHINCHAR, 2015). O capsídeo viral é constituído principalmente pela proteína MCP (*main capsid protein*), uma proteína estrutural comum e altamente conservada em todos os iridovírus. O *Frog virus 3* (FV3) é a espécie-tipo do gênero *Ranavirus* (CHINCHAR et al., 2009; ICTV, 2011).

Os ranavírus podem ser altamente virulentos, com ocorrência de alta mortalidade em casos de doença ranaviral. Nesse sentido, vários estudos têm sido desenvolvidos para um diagnóstico rápido e de baixo custo, uma vez que o padrão ouro para o diagnóstico atualmente baseia-se em técnicas moleculares e isolamento em cultura celular (GALLI et al., 2006; OIE, 2012).

Nesse contexto, a busca por medidas preventivas para a biossegurança dos plantéis é intensa e uma delas é a formulação de vacinas, podendo-se destacar a construção de clones de *Bacillus subtilis* recombinantes com potencial de aplicação no desenvolvimento de vacinas vetorizadas contra infecções por ranavírus (PACCEZ, 2007).

Bacillus subtilis é uma bactéria Gram-positiva esporulada, amplamente utilizada para produção de enzimas industriais e, mais recentemente, para expressão de proteínas heterólogas e como apresentadora de antígenos (FU et al., 2012). Ivins e Welkos (1986) foram os primeiros pesquisadores a utilizar essa bactéria para a produção e purificação de antígenos, como o antígeno protetor de *Bacillus anthracis*. A utilização do *Bacillus subtilis* como vetor desperta grande interesse na comunidade científica, devido ao seu baixo custo e pelo fato de que

a capacidade de formar endósporos possibilita o armazenamento de vacinas sem a preocupação com o controle de temperatura (FU et al., 2012).

Neste contexto, estudos que envolvam o desenvolvimento de cepa recombinante de *Bacillus subtilis* expressando a proteína MCP de ranavírus, visando a futura obtenção de uma formulação vacinal que promova efetiva proteção para *Lithobates catesbeianus* contra ranavírus, são importantes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aquicultura

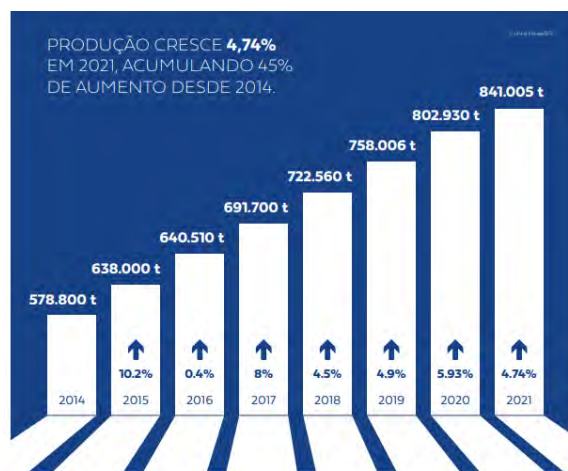
Aquicultura é definida como criação de espécies aquáticas, sendo subdividida em piscicultura (criação de peixes), ranicultura (criação de rãs), carcinicultura (criação de caranguejos, camarões, lagostas), malacocultura (criação de moluscos), algicultura (cultivo de algas) e a criação de répteis (jacaré e quelônios), em qualquer fase do seu desenvolvimento, em ambientes confinados e controlados ou semicontrolados, visando aumentar a produtividade. Essa prática utiliza recursos naturais, tais como água, sol e solo e existem duas possibilidades para a exploração destas fontes: a produção em território continental ou em estuários, costa marítima e plataforma continental. Para a realidade brasileira, mais da metade da produção é proveniente da primeira forma de produção, devido a disponibilidade de grandes extensões de terra passíveis de serem destinadas ao cultivo, a abundância de água doce e a boa adaptabilidade das espécies destinadas à criação. Esses fatores favorecem o crescimento desse setor no Brasil (FAO, 2018; OLIVEIRA, 2009).

A produção de pescado mundial de animais atingiu 214 milhões de toneladas em 2020, tendo um crescimento de 5,3% comparado ao período de 2001 a 2018, sendo que o Brasil contribuiu com 803 mil toneladas. Esse crescimento é notado anualmente, sendo que em 2021 o Brasil produziu 841 mil toneladas, tendo-se um crescimento de 4,7% sobre a produção do ano anterior, como demonstra na figura 1, sendo a tilápia a espécie mais cultivada no Brasil (FAO, 2022; PEIXEBR, 2021). Esse setor foi introduzido no país há mais de um século; entretanto, se compararmos a outras cadeias de produção animal, como bovinocultura, suinocultura e avicultura, que alcançaram altos níveis no comércio

mundial, a aquicultura ainda dá seus primeiros passos no agronegócio nacional. Nesse sentido, para que o país possa alcançar um status comercial mais competitivo é necessário investir ainda mais em conhecimento e pesquisa para que possa deixar de ser um importador e passe a ser um exportador de pescado, tornando-se uma potência aquícola (MUÑOZ et al., 2015).

Nesse cenário, podemos destacar a ranicultura, que teve início no Brasil na década de 1935, quando Tom Cyrril Harrison introduziu 300 espécimes de *Lithobates catesbeianus* (rã-touro) oriundas do Canadá, que deram origem ao primeiro ranário brasileiro (Ranário Aurora); porém, a ranicultura brasileira expandiu-se com maior intensidade a partir do início da década de 1980, devido ao investimento em pesquisa para que novas técnicas fossem desenvolvidas. (FERREIRA, 2002).

Figura 1: Panorama de produção de pescado no território brasileiro.



Legenda: Produção Crescente em toneladas. **Fonte:** PeixeBR, 2022.

A ranicultura compreende a produção de rãs em cativeiro com a finalidade comercial, sendo as duas espécies principais: a rã verde europeia (*Pelophylax ridibundus*) e a rã-touro do leste asiático (*Hoplobatrachus rugulosus*), entre outras. No entanto, a rã-touro norte americana, representada na figura 2 (*Lithobates catesbeianus*), é o anfíbio mais cultivado globalmente, inclusive no Brasil, por se adaptar rapidamente às condições climáticas, apresentando alta eficiência na conversão alimentar e elevado potencial reprodutivo (DIAS et al., 2007; FAO; 2020; RIBEIRO et al., 2022). Ao contrário dos outros países que

praticavam a caça ou o cultivo extensivo de rãs, exaurindo o número de espécimes, o Brasil procurou desenvolver tecnologia de criação em cativeiro, garantindo a produção e a comercialização; no entanto, as pesquisas científicas necessárias ao avanço tecnológico da ranicultura foram impulsionadas a partir de 1978 com o primeiro encontro nacional de ranicultura (ENAR) (CRIBB et al., 2013; LIMA et al., 1992).

Figura 2 – Rã Touro (*Lithobates catesbeianus*)



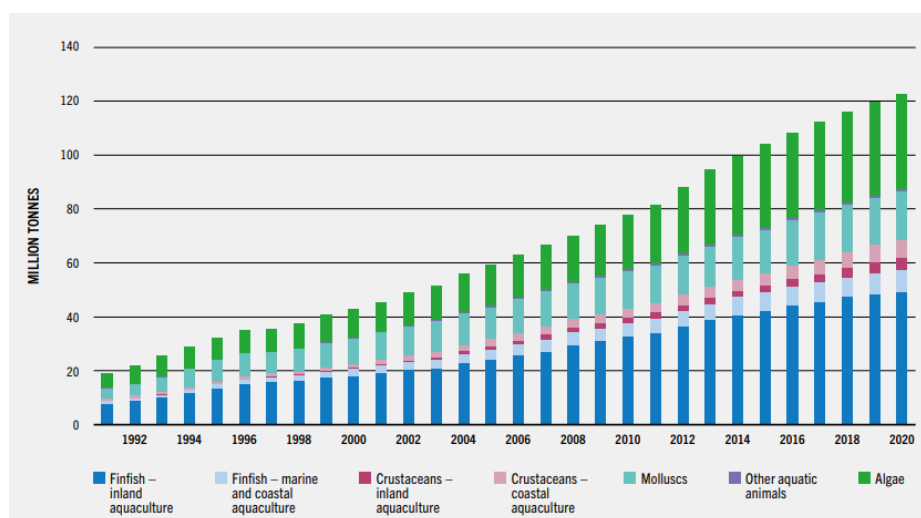
Fonte: FAO, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 13 de dez. 2016

A carne de rã, oriunda da ranicultura, é um produto com mercado potencial tanto no Brasil como no exterior e pode vir a ser um dos produtos capazes de atender a demanda dos produtores rurais por atividades que sejam rentáveis e não exijam elevados investimentos financeiros. O consumo dessa carne, principalmente as pernas de rã, é popular em alguns países, sendo considerada uma iguaria na Europa. Nos últimos anos, tem atraído a atenção de consumidores cada vez mais preocupados com a saúde, por ser considerada uma carne saudável e recomendada por médicos e nutricionistas devido ao seu baixo teor de gordura, alta concentração de proteínas associada à alta digestibilidade e pelo seu sabor semelhante ao de carne de frango. Estas características atraíram a atenção de investidores rurais, elevando o número de ranários no país (CARRARO, 2008; RIBEIRO et al., 2022).

O panorama global de produção aquícola aumentou ou manteve-se estável ao longo dos anos, é possível observar a produção de rã no setor que corresponde outros animais aquáticos, conforme dados apresentados na figura

3. Embora a produção de rã não seja tão representativa quanto às outras espécies, observa-se um aumento de mais de 100% na produção mundial em 2018 em relação a 2010, contribuindo assim com a economia global. A produção média mundial de animais semiaquáticos que incluem a produção de rã foi aproximadamente de 537 mil toneladas, liderada por Taiwan, mas com grandes contribuições da Malásia, Cingapura, Brasil, Equador e México (FAO, 2022; RIBEIRO et al., 2021).

Figura 3: Panorama Global da Produção Aquícola



Fonte: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2022.** Roma, 2022.

Nesse setor, o Brasil é apontado como o país que possui as melhores tecnologias para a criação de rã, inclusive de abate, produzindo-se um produto final de alta qualidade, sem contar as condições climáticas favoráveis e as instituições e recursos humanos competentes e voltados ao desenvolvimento da ranicultura, caracterizando o país como o segundo maior produtor de rã, com uma produção em torno de 400 toneladas por ano, ficando atrás apenas do Taiwan (FURTADO et al.; 2006; FAO, 2006; SNA, 2013).

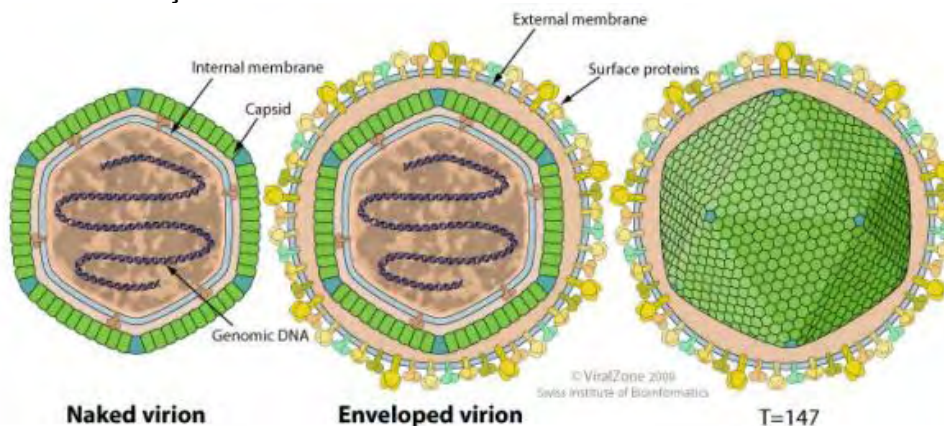
Apesar do Brasil possuir as melhores tecnologias, a ranicultura enfrenta alguns desafios na sua produção, em sistemas intensivos, expondo os animais a agentes patogênicos que podem acarretar surtos com altas mortalidades em girinos e rãs e, conseqüentemente, provocando grandes perdas econômicas. No entanto, os incrementos tecnológicos colaboram para a melhor sistematização

de dados relacionados ao manejo zootécnico e à sanidade, resultando no aumento de informações sobre os principais patógenos que acometem essas espécies, podendo-se destacar o fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* e vírus pertencentes à família *Iridoviridae*, que são considerados agentes de doenças emergentes de notificação obrigatória e ameaças à biodiversidade global de anfíbios (GALLI et al., 2006; HIPOLITO et al., 2002; DASZAK et al., 1999; SCHLOEGEL et al., 2009; OIE, 2012), requerendo-se, notoriamente, a implementação de medidas preventivas para a proteção dos plantéis comerciais.

2.2. *Ranavirus*

O primeiro relato de *Ranavirus* foi através de isolamento em culturas de células renais primárias de rã-leopardo (*Lithobates pipiens*), realizado por Allan Granoff (GRANOFF et al., 1966). O gênero *Ranavirus* pertence à família *Iridoviridae*, apresentando um genoma viral grande (aproximadamente 120 – 200nm de diâmetro), de DNA fita dupla, com tamanho variável, podendo apresentar de 140 a 303 kpb, podendo conter ou não um envelope vira, como ilustrado na figura 4 (GOORHA; MURTI, 1982; GRAY et al., 2015).

Figura 4 – Ilustração de vírions de *Ranavirus*



Fonte: ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses Virus Taxonomy: 2011 Release (current).

O capsídeo viral é constituído principalmente pela proteína MCP (*major capsid protein*), uma proteína estrutural comum e altamente conservada em todos os iridovírus. A família *Iridoviridae*, subdividida em duas subfamílias (*Alphairidovirinae* e *Betairidovirinae*) é atualmente constituída por seis gêneros,

três dos quais infectam invertebrados (*Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Decapodiridovirus*) e três infectam vertebrados ectotérmicos (*Lymphocystivirus*, *Megalocytivirus* e *Ranavirus*). Não foram descritas infecções em pássaros e mamíferos, fator provavelmente relacionado com a temperatura corpórea desses animais, acima da temperatura ótima de replicação viral (22-30°C) e não com falta de receptores celulares, já que os ranavírus podem se replicar em linhagens celulares de mamíferos quando incubados a 30°C (GRAY et al., 2015; JANCOVICH et al., 2015; GRAYFER et al., 2015).

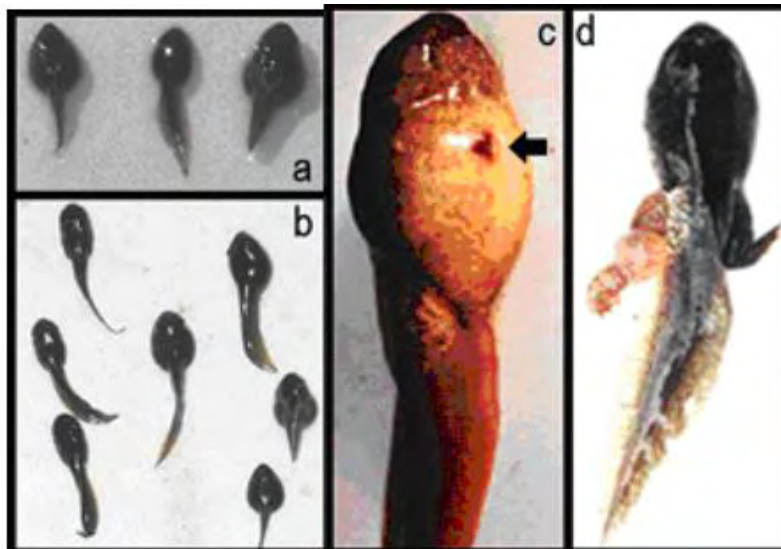
O gênero *Ranavirus* é representado por seis espécies: *Ambystoma tigrinum virus* (ATV), *Bohle iridovirus*, *Epizootic haematopoietic necrosis virus* (EHNV), *European catfish virus* (ECV), *Santee-Cooper ranavirus* (SCRV) e *Frog virus 3* (FV3), todas responsáveis por doenças sistêmicas em peixes, anfíbios e répteis, sendo a última espécie, FV3, a melhor caracterizada entre elas (GRAY et al., 2015; ICTVDS, 2006; WHITTINGTON et al., 2010), sendo utilizada como modelo para estudo envolvendo iridovírus (CHINCHAR et al., 2009).

Ranavirus foi relatado em 72 espécies de anfíbios e identificados em infecções de rãs silvestres e cultivadas, na Ásia, América do Norte, América do Sul e Europa. A transmissão desse vírus ocorre por contato direto com animais infectados, por ingestão de indivíduos infectados, mortos ou moribundos e podem ser encontradas partículas virais em rios e nos recintos aquáticos dos ranários (MILLER et al., 2011; WHITTINGTON et al., 2010; OIE, 2012)

Quando identificado pela primeira vez, pensava-se que ranavírus tinham pouco impacto nas populações de peixes e anfíbios; contudo, essa visão mudou com a evidência de que eles eram responsáveis por epidemias e mortalidade em várias espécies de peixes e, posteriormente, em anfíbios, causando grande perdas econômicas no setor da piscicultura (BRUNNER et al, 2015; CHINCHAR et al., 2009; WILLIAMS et al., 2005). As ranaviroses provocam ulcerações na pele, edemas e hemorragia interna, como demonstra a figura 5. Apresentam início rápido e alta mortalidade, mas podem ocorrer infecções inaparentes em espécies selvagens. No entanto, as epizootias envolvendo ranavírus podem resultar em vários efeitos populacionais para essas espécies, desde infecções

inaparentes ou subclínicas como até mesmo a extinção de espécies locais (ZIEGLER, 2019; BRUNNER et al., 2015).

Figura 5 – Girinos afetados por ranavirose



Legenda: a) no centro girino normal, e a esquerda e direita girinos ascíticos; b) no centro girino jovem normal, à esquerda girinos caquéticos, e à direita girinos ascíticos; c) girino na pré-metamorfose com ascite e úlcera na pele (seta), d) girino na pré-metamorfose com edema na pata. **Fonte:** ROMERO, 2006

O primeiro relato de infecção relacionada a ranavírus ocorreu na década de 80 no Reino Unido, onde foi registrado um declínio significativo em rãs adultas (*Rana temporaria*). No Brasil, o primeiro relato relacionado com mortalidade em massa de girinos por FV3, em ranário comercial, ocorreu em 2006, em Goiás (GALLI et al., 2006). Adicionalmente, Ziegler (2019) relatou a ocorrência de ranavírus na Mata Atlântica e em lagoas de Passo Fundo-RS, onde pesquisadores observaram lagos com muitos girinos e peixes mortos. Esse vírus já foi detectado na natureza em outras partes do mundo e está associado a declínios de populações de anfíbios, ressaltando-se que os anfíbios constituem o grupo de vertebrados mais ameaçado do planeta (KIK et al., 2011; MAZZONI et al., 2009; ZIEGLER 2019). A susceptibilidade dos anfíbios frente aos ranavírus varia de acordo com o estágio de crescimento do animal, sendo os adultos menos susceptíveis provavelmente devido à imunidade adquirida. Porém, as causas dessas variações não são claras. Um fator importante, mas ainda mal compreendido, é que essa variação está relacionada às respostas imunológicas

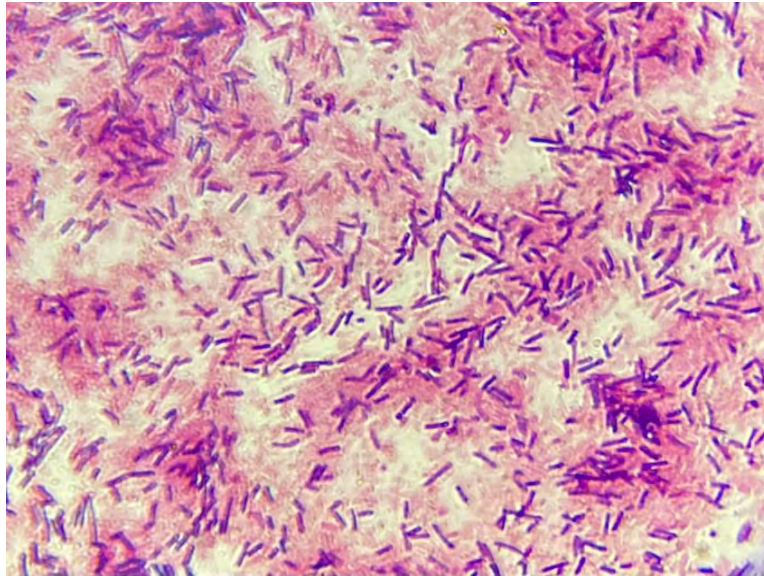
dos anfíbios frente a fatores intrínsecos e extrínsecos (MILLER et al., 2011; MANIERO; CAREY, 1997; CAREY, 2000; DEMAS, 2004; CHINCAR et al., 2009).

Nesse contexto, torna-se evidente a necessidade de pesquisas sobre esse patógeno e estudos voltados para a resposta imunológica dos seus hospedeiros às infecções pelo ranavírus. Esses estudos certamente colaborarão no desenvolvimento de vacinas, medida importante para a profilaxia de enfermidades infecto-contagiosas de maneira geral. Contudo, há esforços ainda incipientes no desenvolvimento de uma vacina contra ranavírus em peixes e anfíbios (LESBARRÈRES, et al., 2012).

2.3. *Bacillus subtilis* e aplicações

Bacillus subtilis é uma bactéria Gram-positiva (figura 6), não patogênica, encontrada principalmente no solo, não colonizadora de tecidos, naturalmente transformável (capacidade de capturar DNA exógeno), formadora de endósporos, multiplicando-se *in vitro* em meios de cultivo simples e de baixo custo, atingindo densidades celulares altas e em curto espaço de tempo. Além disso, é um microrganismo muito bem estudado, tendo suas características genéticas e fisiológicas elucidadas, assim como a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (EARL et al., 2008; FERREIRA et al., 2005; WOOD, 1992). Essas características, entre outras, fizeram com que diferentes espécies de *Bacillus* se tornassem o grupo de maior relevância na área de microbiologia industrial, sendo que a manipulação dessas bactérias data de mais de mil anos, e até hoje é utilizada amplamente na produção de enzimas extracelulares em escala mundial (SCHALLMEY et al., 2004).

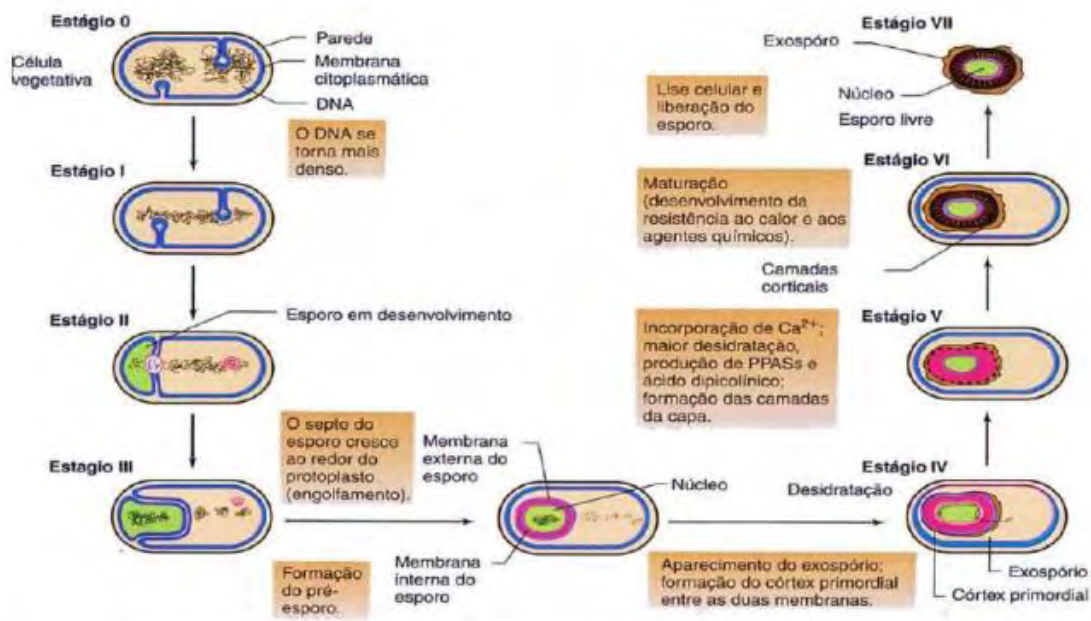
Figura 6 - *Bacillus subtilis*.



Legenda - *Bacillus subtilis* após a coloração de Gram, aumento de 1000x. **Fonte:** própria.

B. subtilis, quando submetido a uma situação de estresse, produz uma célula chamada endósporo, formado no meio intracelular (figura 6). Essa estrutura possui, na sua superfície, a proteína CotC (polipeptídeo constituído por 66 aminoácidos), apresenta grande resistência, pode permanecer em estado de dormência por longos períodos de tempo, sobrevive em extremas temperaturas (altas e baixas). Outrossim, o gênero *Bacillus* é muito utilizado como probiótico para humanos e animais. Uma vez que *B. subtilis* é considerada segura e não patogênica para humanos, é considerado organismo denominado de GRAS (*generally regarded as safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) americano (NICHOLSON et al., 2000; VREELAND et al., 2000; DE SOUZA, 2014).

Figura 7 - Estágios de endosporogênese em *Bacillus* spp.



Fonte: MADIGAN MT, MARTINKO JM, PARKER J. 2004.

Estudos *in vivo*, desenvolvidos para melhor entender o efeito probiótico indicam que endósporos de *B. subtilis* ingeridos por camundongos persistem por um período maior (mais de 24 horas) no trato gastrointestinal do que as células vegetativas (no máximo 12 horas), e que os endósporos possuem a capacidade de germinar no intestino delgado de animais, passando por um processo de multiplicação vegetativa e reesporular novamente dentro do organismo. Pouco se sabe sobre o mecanismo da probiose, mas acredita-se que os endósporos por si só estimulam o sistema imunológico e preparam o organismo contra possíveis infecções por microrganismos patogênicos. Contudo, a teoria mais aceita para explicar a probiose se refere ao mecanismo de competição, no qual o organismo probiótico compete por sítios de ligações com bactérias patogênicas (CASULA et al., 2002; DU et al., 2003; DU et al., 2004; HOA et al., 2000; SPINOSO et al., 2000; HONG et al., 2006).

Os endósporos de *B. subtilis* são capazes de expressar proteínas heterólogas, característica a ser considerada visando a utilização de endósporos recombinantes como vetores vacinais, particularmente por via oral, além de apresentarem estabilidade a condições ambientais (temperatura) e serem imunostimulantes. Essas proteínas são sintetizadas durante a esporulação e

ficam ancoradas na superfície do endósporo, propiciando o contato com as células do sistema imunológico. Também já foi relatada a utilização da proteína CotC como um transportador para exibir antígenos heterólogos nas superfícies de endósporos. Trabalhos que envolvem a produção de vacinas contra *Clostridium tetani*, utilizando essa metodologia, têm se mostrado bastante promissora (ALVES et al., 2018; DU et al., 2003; ISTICATO et al., 2014; NEGRI et al, 2013; NING et al., 2011; MAURIELLO et al., 2004).

Endósporos recombinantes de *B. subtilis* são promissores como apresentadores de antígenos não só para a formulação de vacinas em seres humanos, mas também para imunização de animais, podendo ser amplamente utilizados na pecuária como um método profilático alternativo barato e eficaz (ALVEZ et al., 2018). Como demonstra o estudo de Valdez (2014) que desenvolveu a primeira vacina 100% oral contra o vírus da macha branca que infecta camarões, utilizando endósporos de *B. subtilis* como apresentador de antígenos. Neste contexto, fica claro que esse microrganismo desperta um grande interesse na comunidade científica, devido à sua ampla aplicação tanto na indústria quanto na saúde humana e animal.

3. OBJETIVOS

Os objetivos principais do presente projeto foram relacionados ao desenvolvimento de clones de *Bacillus subtilis* recombinantes por meio da fusão dos genes *CotC* de *B. subtilis* e *MCP* (*Major Capsid Protein*) de isolamento brasileiro de *Ranavirus* FV3, na tentativa de se obter futuramente uma cepa recombinante de *Bacillus subtilis* expressando a proteína MCP.

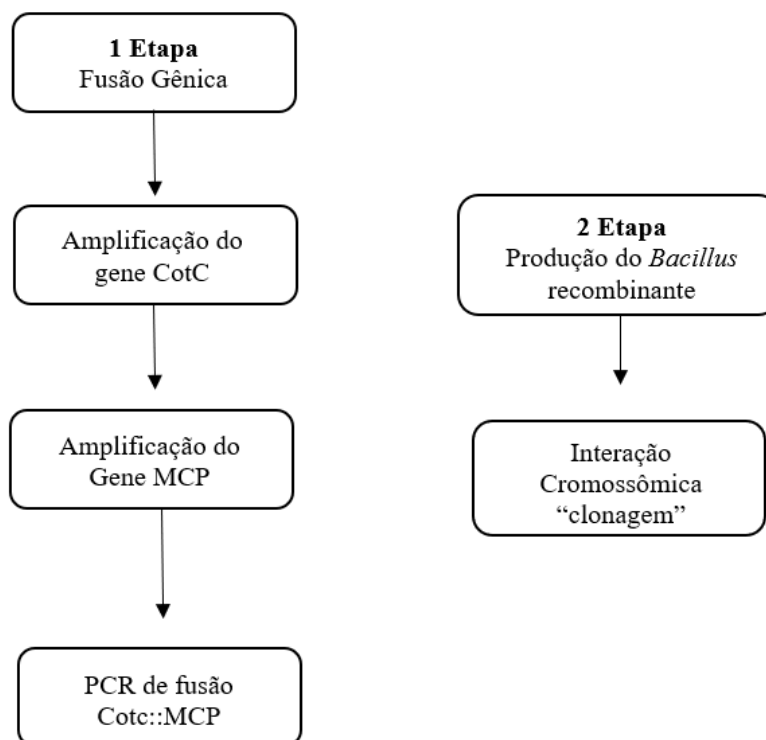
Nesse contexto, destacam-se como objetivos específicos:

- a. amplificação dos genes *CotC* (*B. subtilis*) e *MCP* (FV3) para realização da fusão gênica *CotC::MCP*;
- b. desenvolvimento de cepa recombinante de *B. subtilis* apresentando a fusão gênica *CotC::MCP*;
- c. avaliação da interação cromossômica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia desenvolvida seguiu três etapas principais, destacadas no fluxograma a seguir (figura 8).

Figura 8 – Fluxograma de trabalho.



Fonte: própria.

4.1 Cepa bacteriana e estipe viral

Utilizou-se o *Bacillus subtilis*, cepas BB80, KO7 e KO7A, para produzir uma cepa recombinante isógena. As amostras de *B. subtilis* foram gentilmente cedidas pelo *Bacillus* Genetic Stock Center (BGCS), Ohio, USA.

A estirpe brasileira de ranavírus (FV3) isoladas e pertence ao biobanco do Laboratório de Higiene Zootécnica da FZEA-USP, mantida em células BF-2 (bluegill fry ATCC CCL 91), em meio MEM (minimal essential medium - Gibco®, Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, EUA) (ALENCAR, 2016; CORRÊA, 2019). Essa estirpe foi utilizada para a obtenção do gene *MCP* (*main capsid protein*).

4.2 Amplificação do gene *CotC*

O DNA genômico do *B. subtilis* foi extraído de células vegetativas utilizando extração térmica (SAMBROOK et al., 1989) e os oligonucleotídeos *CotCF/BamHI* (VALDEZ et al., 2014) e *CotCR/MCP* (desenhados para o presente estudo), foram usados para amplificar ambos, o promotor e a sequência codificadora de *CotC* (ID939543). Os nucleotídeos sublinhados no primer senso indicam a localização do sítio *BamHI*, enquanto os nucleotídeos sublinhados no primer antissenso indicam a localização da sequência de fusão *MCP* utilizados (tabela 1).

Tabela 1. Primers utilizados para amplificação dos genes *CotC*, *MCP* e para realização da fusão gênica.

Nome	Sequência (5' - 3')	Sítio de Restrição	Gene Alvo	Produto (pb)
CotCF/BamHI	<u>CGGGATCC</u> CGCGTGCAGCAGGAAAA	BamHI	-	400pb
CotCR/MCP	<u>AGAAGACATTGACCAAGTAGTGTTTTTATgCTTTTTATA</u> CTCTACAAC	-	<i>MCP</i>	
MCPF/CotC	<u>AAAAgCATAAAAAACACTACTCTTCTGTA</u> ACTGGTTC	-	<i>CotC</i>	1.200 pb
M CPR/EcoRI	<u>GAATTCTTACAAGATTGGGAATCC</u>	EcoRI	-	

Legenda: As letras sublinhadas indicam bases de complementaridade com *MCP* e *CotC*, ou uma sequência desemparelhada com um sítio de restrição. (-) Ausência de sítio de restrição ou sequência de hibridação. **Fonte:** Valdez et al., 2014. Modificada.

Para reação da PCR, foi utilizado o kit GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Em síntese, 3 µL do DNA extraído das células vegetativas do *Bacillus subtilis*, foram misturados com 12,5 µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2X, 1,0 µL do primer senso específico (*CotCF/BamHI*) a 10 µM, 1,0 µL do primer antissenso específico (*CotCR/MCP*) a 10 µM e 7,5 µL de água livre de nucleases (GE Healthcare, EUA) totalizando 25 µL. Como controle negativo, foi utilizada alíquota de água livre de nucleases.

O protocolo de termociclagem empregado (Swift™ MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA), visando a amplificação de fragmento genômico de *CotC*, compreendeu: incubação a 95°C por 5 min, seguida de 25 ciclos de 95°C por 1 min, 56°C por 1 min. e 72°C por 1 min, sendo a extensão

final dada a 72°C por 10 minutos (VALDEZ et al., 2014). Como controle negativo, foi utilizada alíquota de água livre de nucleases.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) e verificou-se o tamanho do fragmento (400pb) através da transiluminação do gel em luz ultravioleta, após coloração em solução de Sybr Gold® (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, EUA). Após confirmação do fragmento esperado para o gene (400 pb), os produtos foram purificados com auxílio do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA), conforme especificações do fabricante e enviados para sequenciamento tipo Sanger.

4.3 Amplificação do gene MCP

O gene *MCP* completo (1.200 pb) foi amplificado de acordo com Mazzoni et al. (2009), utilizando-se primers modificados com inserção de sítios de fusão para *MCP* e *CotC* (senso) e de restrição para a endonuclease *EcoRI* (antissenso). As sequências dos primers utilizados, estão descritos na tabela 1.

Para reação da PCR, foi utilizado o kit GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Em síntese, 3 µL do DNA da estirpe de ranavírus (FV3) foram misturados com 12,5 µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2X, 1,0 µL do primer senso específico (CotCF/BamHI) a 10 µM, 1,0 µL do primer antissenso específico (CotCR/MCP) a 10 µM e 7,5 µL de água livre de nucleases (GE Healthcare, EUA) totalizando 25 µL. Como controle negativo, foi utilizada alíquota de água livre de nucleases.

O protocolo de termociclagem empregado (Swift™ MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA), visando à amplificação de fragmento genômico do MCP, compreendeu: incubação a 94°C por 3 min, e, em seguida, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 1 min e 72°C por 1 min, sendo a extensão final dada a 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE e verificou-se o tamanho do fragmento através da transiluminação do gel em luz ultravioleta, após coloração em solução de Sybr Gold® (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, EUA). Após a confirmação do fragmento esperado para o gene

(1.200pb), os produtos foram purificados com auxílio do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA), conforme especificações do fabricante e mandados para sequenciamento do tipo Sanger.

4.4 Fusão dos genes *CotC::MCP*

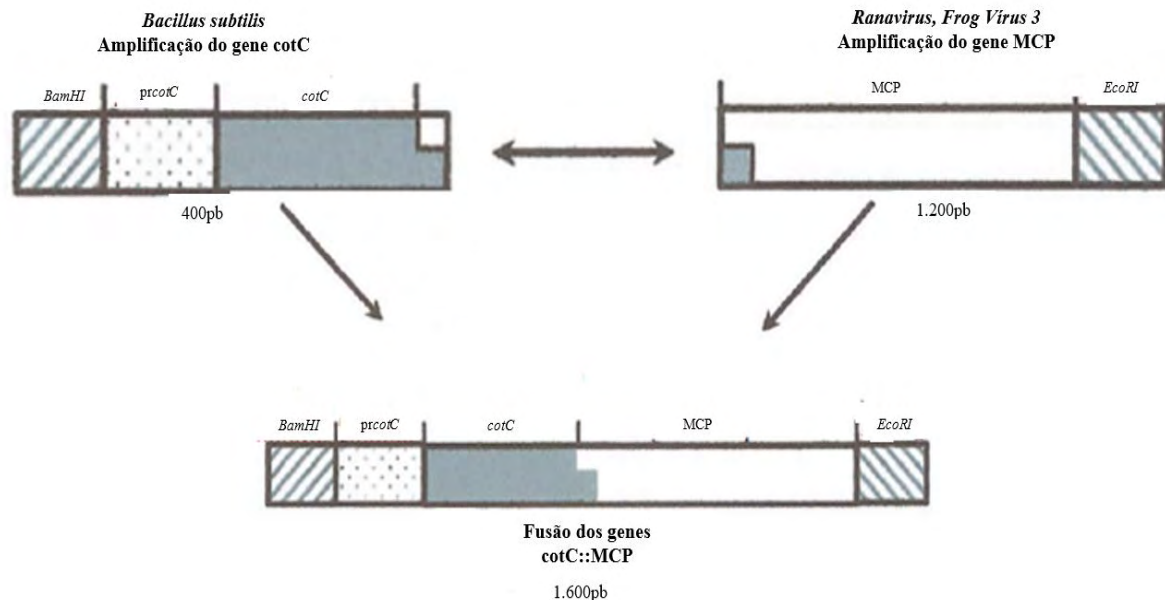
Para a reação de fusão dos genes, demonstrada na figura 9, foi realizada uma primeira PCR (PCR start), utilizando o kit GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, EUA). Em síntese, 3 µL do produto da PCR do gene *CotC* e 4 µL do produto PCR do gene *MCP*, ambas nas concentrações de 10 ng/µL, foram misturados com 12,5 µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2X e 5,5 µL de água livre de nucleases (GE Healthcare, EUA) totalizando 25 µL. Como controle negativo, foi utilizada alíquota de água livre de nucleases. O protocolo de termociclagem empregado (Swift™ MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA), visando a abertura das cadeias de DNA, compreendeu: incubação a 95°C por 5 min., em seguida, 13 ciclos de 95°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 2 minutos.

A PCR de amplificação foi realizada utilizando o kit GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, EUA). Em síntese, 3 µL do produto da PCR start, foram misturados com 12,5 µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2X, 1,0 µL do primer senso específico (*CotCF/BamHI*) a 10 µM, 1,0 µL do primer antissenso específico (*MCPR/EcoRI*) a 10 µM e 7,5 µL de água livre de nucleases (GE Healthcare, EUA) totalizando 25 µL. Como controle negativo, foi utilizada alíquota de água livre de nucleases. O protocolo de termociclagem empregado (Swift™ MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA), visando a fusão dos genes *CotC::MCP*, compreendeu: incubação a 95°C por 5 min, em seguida, 27 ciclos de 95°C por 1 min, 57°C por 1 min e 72°C por 2 min e extensão final de 72°C por 10 minutos.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE e verificou-se o tamanho do fragmento através da transiluminação do gel em luz ultravioleta, após coloração em solução de Sybr Gold® (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, EUA). Após a confirmação do fragmento esperado para o gene (1.600pb), os produtos foram purificados com auxílio do kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA),

conforme especificações do fabricante e enviados para sequenciamento nucleotídico tipo Sanger.

Figura 9 – Fusão dos genes *CotC::MCP*

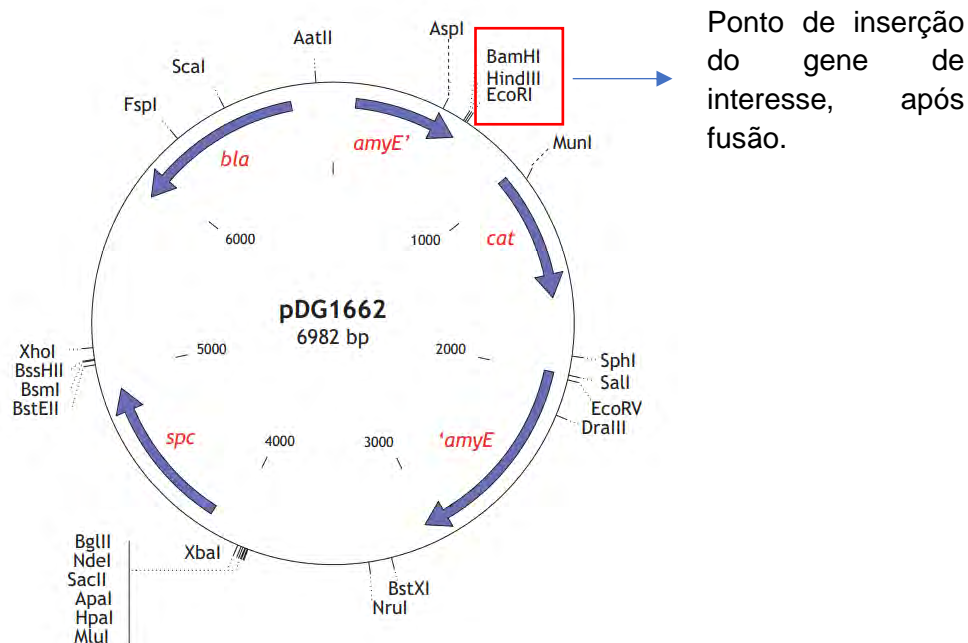


Legenda: Amplificação por PCR de genes individuais *CotC* e *MCP*, bem como as fusões dos genes. Os números indicam o tamanho dos fragmentos dos genes *CotC*, *MCP* e a fusão dos dois genes (*CotC::MCP*). **Fonte:** Valdez et al., 2014. Modificada.

4.5 Clonagem das fusões dos genes *CotC::MCP* para obter a integração cromossômica

A fusão dos genes foi clonada no vector pDG1662 (ECE113) obtida do *Bacillus* Genetic Stock Center, utilizando as enzimas de restrição *BamHI* e *EcoRI*. O plasmídeo recombinante pDGCMCP foi obtido e inserido em células competentes do *B. subtilis*. As células transformadas foram selecionadas utilizando o meio Luria-Bertani (LB) + cloranfenicol à 5µg/mL e verificadas por PCR. A fusão genética foi integrada no cromossomo do *B. subtilis* no locus *amyE* por crossover duplo.

Figura 10 – Mapa do vetor de clonagem pDG1662



Legenda: Características do vetor pDG1662: 6982 pares de bases; promove interação ectópica no locus *amyE* de 1A771, substituindo o cassete de resistência macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina. **Fonte:** Bacillus Genetic Stock Center Catalog Vol. 4.

4.5.1 Digestão, Ligação e Transforma o

A fusão genética (*CotC/MCP*) e o plasmídeo pDG1662 (ECE113) foram digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, EUA), utilizando as seguintes reações: 12 L de água livre de nuclease, 2 L do 2X Buffer Tango, 4 L da enzima *Bam*HI, 2 L da enzima *Eco*RI e 1 L DNA plasmidial na concentração de 1 g/ L; misturou-se delicadamente e incubou-se a 37 C por 4 horas. Para inativação, incubou-se por 20 minutos a 80 C. Para o produto de PCR de fusão foram utilizados: 14 L de água livre de nuclease, 2 L do 2X Buffer Tango, 4 L da enzima *Bam*HI, 2 L da enzima *Eco*RI e 10 L do produto da PCR na concentração de 0,5 g/ L, misturou-se delicadamente e incubou-se a 37 C por 4 horas. Para inativação, incubou-se adicionalmente por 20 minutos a 80 C. A verificação dos fragmentos clivados foi realizada em gel de agarose 1% corado com SYBR®Safe DNA gel stain (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, EUA).

Na etapa de ligação, todos os reagentes foram descongelados em gelo e a reação também foi realizada em gelo. Para a reação de ligação, foram

misturados 5 μ L de 2X Rapid Ligation Buffer, 1 μ L pDG1662 (50 ng), 3 μ L do produto purificado da PCR de Fusão - *CotC/MCP* (42ng/ μ L) e 1 μ L T4 DNA ligase; a reação foi incubada à temperatura ambiente por quatro horas.

4.5.2 Preparação de células competentes e transformação de *Bacillus subtilis*

A transformação foi realizada de acordo com o Catálogo Bacillus Genetic Stock Center. Em síntese, as cepas de *B. subtilis* (BB80, KO7, KO7A) foram subcultivadas em Ágar Base Blood Thymptose e incubadas overnight a 37°C. Logo após o crescimento, algumas colônias foram inoculadas em 15mL do meio A em um Erlenmeyer de 250mL; misturou-se bem e ajustou-se a densidade óptica 650nm (DO650) para 0,1 – 0,2 no espectrofotômetro. Incubou-se a 37°C com aeração vigorosa e a cada 20 minutos, leu-se a DO650 até chegar 0,4 – 0,6 que equivale ao t_0 . Ao se atingir o t_0 , continuou-se a incubação por mais 90 minutos, transferindo-se 50 μ L desta cultura em um tubo de ensaio contendo para 0,45mL do meio B pré-aquecido, incubando-se a 37°C com aeração vigorosa por 90 minutos. Neste ponto, as culturas são altamente competentes, sendo adicionado 1 μ g da ligação, seguida de incubação a 37°C com aeração por 30 minutos. Ao término, realizou-se o plaqueamento em Agar BHI com Clorofenicol 5 μ g/mL e as placas foram incubadas a 37°C, overnight.

4.6 Análise da Interação Cromossômica

Para a confirmação da interação cromossômica, selecionaram-se quatro clones, sendo estes semeados em 5 mL de LB com 5 μ g/mL de clorofenicol a 37°C, overnight, sob agitação a 200 rpm. A *miniprep* para obtenção do DNA plasmidial foi realizada com o kit Omega EZNA Plasmid DNA mini kit (Omega Bio-Tek, EUA), de acordo com recomendações do fabricante. Os plasmídeos pDGMCP foram submetidos à reação de PCR de fusão (conforme descrito no item 4.4) como forma de confirmar a interação cromossômica do gene de fusão (*CotC/MCP*) com o *B. subtilis*. Pesquisa do grau de similaridade entre as sequências nucleotídicas obtidas e aquelas depositadas em banco de dados (GenBank) foi realizada através do aplicativo *on-line* BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (NCBI, 1988).

4.7 Ética Animal

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (USP/FZEA), sob o número CEUA Nº 5339050221.

5. RESULTADOS

5.1 Extração do DNA bacteriano e viral

Após a incubação *overnight* das cepas de *B. subtilis* BB80/KO7/KO7A em caldo BHI, obtiveram-se células vegetativas que foram submetidas à extração térmica. Ao final do respectivo protocolo, realizou-se a quantificação em micrograma/mililitro ($\mu\text{L}/\text{mL}$) do DNA obtido para cada amostra por espectrofotometria (DS-11/DS-11+ Spectrophotometer, DeNovix, EUA), segundo a razão de absorbância A_{260}/A_{280} , com finalidade de se conhecer a quantidade e qualidade do DNA. Observou-se que a extração das células vegetativas apresentou qualidade e quantidade adequada de material genético, como demonstra a tabela 2, e o DNA obtido foi utilizado para amplificação do gene *CotC*.

Tabela 2: Quantificação das cepas de *Bacillus subtilis*.

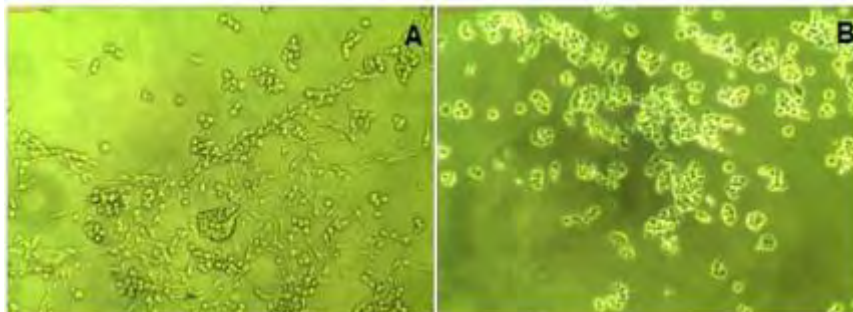
Cepa de <i>B. subtilis</i>	Quantidade de DNA	Pureza da amostra (A_{260}/A_{280})
BB80	125,93 $\mu\text{L}/\text{mL}$	1,84
KO7	135,39 $\mu\text{L}/\text{mL}$	1,77
KO7A	106,77 $\mu\text{L}/\text{mL}$	1,84

Legenda: Cepas de *Bacillus subtilis* e concentrações e a pureza de cada amostra, respectivamente. **Fonte:** própria.

O DNA da cepa de ranavírus, pertencente ao biobanco do Laboratório de Higiene Zootécnica da FZEA-USP, foi extraído por Corrêa (2019) de alíquotas de suspensões de células BF-2 (bluegill fry ATCC CCL 91) infectadas por FV3, sexta passagem (P6), com título de $10^{6.8}$ TCID/mL. Após 24 e 48 horas, efeitos citopáticos e morte celular foram verificados (figura 11). O DNA extraído foi armazenado a -80°C ; e as alíquotas de DNA que apresentaram maiores

concentrações e grau de pureza foram escolhidas para realizar a amplificação do gene MCP.

Figura 11– Célula BF-2 infectadas por FV3.



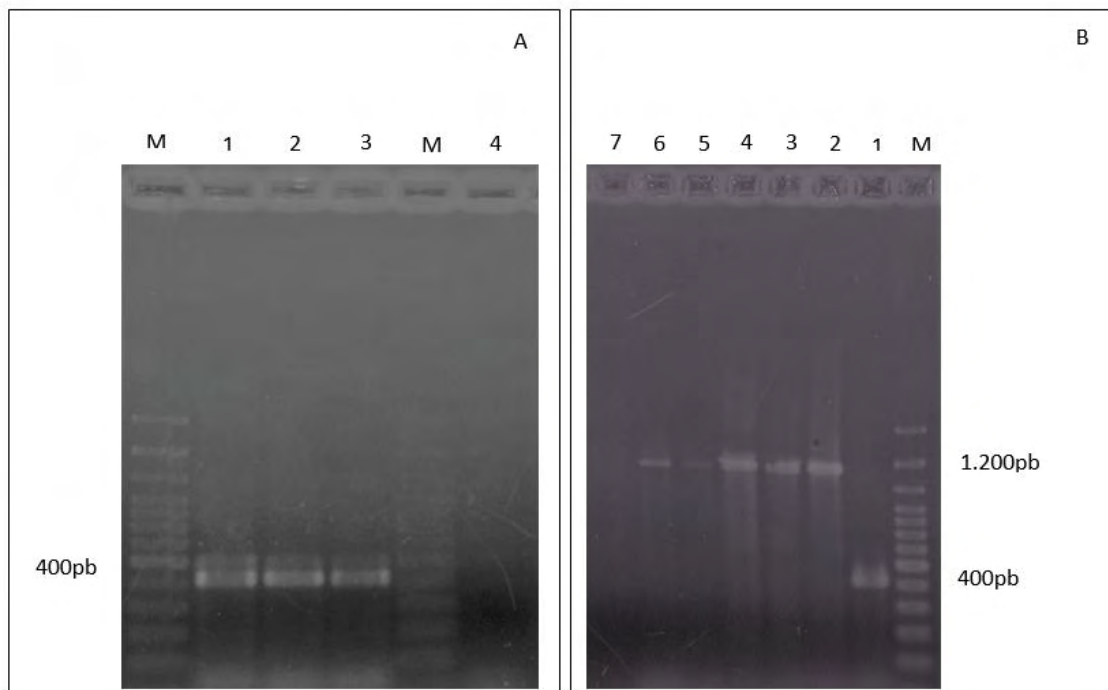
Legenda: Efeito citopático, após 24 h da infecção; B: Células BF-2 mortas, após 48 horas da infecção. Aumento de 100x. **Fonte:** Corrêa, 2019.

5.2 Amplificação dos genes *CotC* e *MCP*

As modificações dos oligonucleotídeos CotCF/BamHI (inserção de um sítio de restrição para *Bam*HI), CotCR/MCP (inserção de um sítio de fusão para o gene *MCP*), MCPF/CotC (inserção de um sítio fusão para o gene *CotC*) e MCPR/EcoRI (inserção de um sítio de restrição para EcoRI) foram necessários para futuramente se realizar a fusão gênica e a interação cromossômica utilizando-se o vetor pDG1662 (ECE113). Essas modificações foram realizadas a partir de Valdez et al. (2014) e Mazzoni et al. (2009). Os oligonucleotídeos foram testados anteriormente, a fim de se verificar a nova combinação de oligonucleotídeos e as condições das PCRs.

As amostras de DNA bacteriano e viral foram submetidas a reação de PCR para obter a amplificação dos genes *CotC* e *MCP*. Foram obtidos *amplicons* de tamanho esperado, para os genes *CotC* (400 pb) e *MCP* (1.200 pb) (figura 12-A e 12-B). As amostras foram submetidas ao sequenciamento nucleotídico tipo Sanger, confirmando o sucesso das amplificações.

Figura 12 – Amplificações dos genes *CotC* extraído das células vegetativas e do gene *MCP* de isolado FV3 e controles das reações.

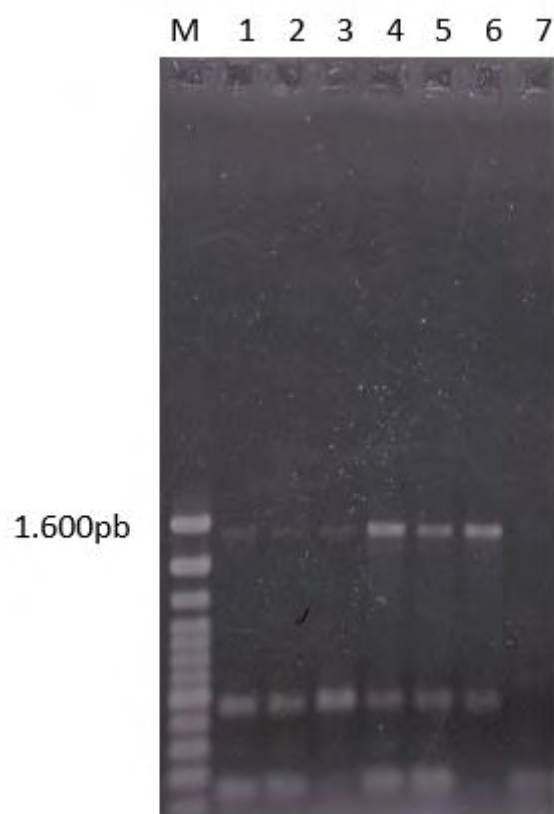


Legenda: Gel de agarose 1,5%. **A** – M: marcador de massa molecular (*ladder* de 100pb, Promega); 1, 2 e 3: amplicons do gene *CotC*, a partir das cepas BB80, KO7 e KO7A, respectivamente, fragmento com o tamanho esperado 400pb, 4: H₂O - controle negativo da reação. **B** – M: marcador de massa molecular (*ladder* de 100pb, Promega); 1: amplicon do gene *CotC*, a partir da cepa BB80, 2 à 6: amplicons do gene *MCP*, do DNA viral de FV3, fragmento com tamanho esperado de 1.200pb, 7: H₂O - controle negativo da reação. **Fonte:** Própria.

5.3 Fusão dos genes *CotC*::*MCP*

Os produtos das PCRs dos genes *CotC* e *MCP* foram submetidos à reação de PCR start para abrir a fita de DNA. Ao término, realizou-se a PCR de fusão com os oligonucleotídeos CotCF/BamHI e MCPR/EcoRI com extremidades referentes às enzimas escolhidas, para obter a fusão gênica *CotC*::*MCP*. Foi obtido o produto de tamanho esperado de 1.600pb (figura 13). Em seguida, foi realizada a purificação e os produtos enviados para o sequenciamento nucleotídico tipo Sanger onde se confirmou a fusão dos genes obtendo 98% de similaridade pelo BLAST.

Figura 13: Amplicons da PCR de fusão dos genes *CotC::MCP*.



Legenda: Gel de agarose 1,5%. M: marcador de massa molecular (*ladder* de 100pb, Promega); 1: *amplicon* da fusão do gene *CotC* de BB80 com o gene *MCP*, com baixa concentração; 2: *amplicon* da fusão do gene do gene *CotC* de KO7 com o gene *MCP*, com baixa concentração; 3: *amplicon* da fusão do gene *CotC* de KO7A com o gene *MCP*, com baixa concentração; 4: *amplicon* da fusão do gene *CotC* de BB80 com o gene *MCP*, com alta concentração; 5: *amplicon* da fusão do gene *CotC* de KO7 com o gene *MCP*, com alta concentração; 6: *amplicon* da fusão do gene *CotC* de KO7A com o gene *MCP*, 7: H₂O - controle negativo da reação. **Fonte:** Própria.

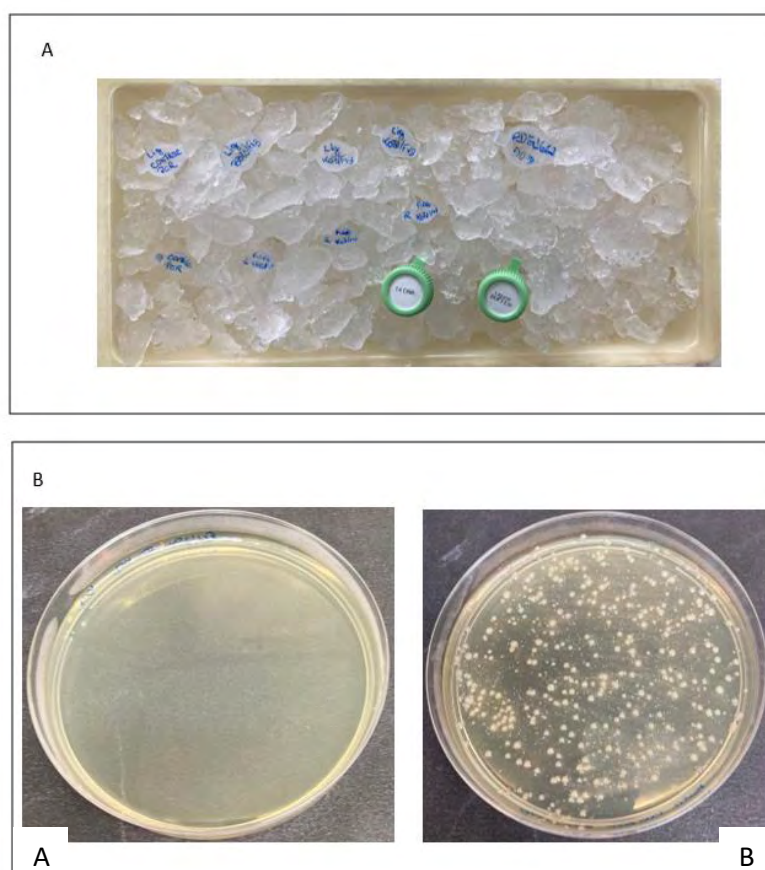
5.4 Clonagem das fusões gênicas *CotC::MCP* em pDG1662

5.4.1 Ligação e transformação em cepas de *Bacillus subtilis*

Para uma ligação mais eficiente, foi utilizada a razão 1/1 de vetor pDG1662 (ECE113) e inserto, sendo os microtubos denominados: lig BB80/FV3 - ligação da PCR de fusão (BB80/FV3), lig KO7/FV3 - ligação da PCR de fusão (KO7/FV3), lig KO7A/FV3 - ligação da PCR de fusão (KO7A/FV3) e lig controle PCR – ligação do Controle da PCR. No dia seguinte, após 18 horas de incubação os vetores recombinantes (BB80/FV3, KO7/FV3 e KO7A/FV3) e Controle da PCR foram inseridos nas cepas de *Bacillus subtilis* (BB80, KO7 e KO7A) conforme descrito no item 4.5.2 (Figuras 14 – A)

Estas células transformadas foram plaqueadas em duplicatas e incubadas overnight. O vetor pDG1662 não provoca crescimento diferencial de coloração como alguns vetores convencionais, sendo o método de seleção dado por meio da adição de 5µg/mL de Cloranfenicol e 100µg/mL de Espectinomicina, onde as células transformadas são resistentes ao Cloranfenicol e sensíveis a Espectinomicina; portanto, todas as colônias desejadas tiveram crescimento somente no meio com adição de Cloranfenicol e são brancas. Esse crescimento foi visível na cepa de *Bacillus subtilis* KO7A com a inserção do vetor recombinante pDGBB80/FV3 (figura 14 - B).

Figura 14 - Ligação e transformação em cepas de *Bacillus subtilis*.



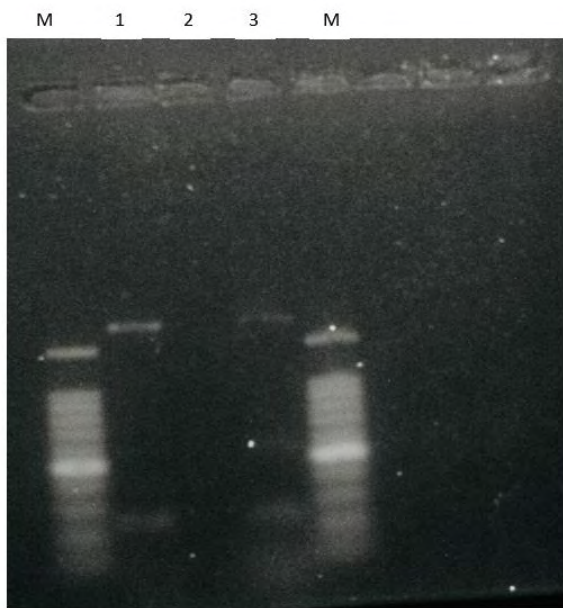
Legenda: A: incubação em gelo de tubos de 0,2mL contendo as reações de ligações (ligBB80/FV3, ligKO7/FV3, ligKO7A/FV3), os tubos da PCR de fusão (BB80/FV3, KO7/FV3, KO7/FV3 e Controle PCR), o tubo contendo o plasmídeo pDG1662. B: Placa com colônias transformadas em pDGCMPC. A placa A com meio LB + adição de Espectinomicina (100µL/mL), onde não teve crescimento de nenhuma colônia. A placa B com meio LB + adição Cloranfenicol (5µL/mL), onde cresceram as colônias transformadas de KO7A. **Fonte:** Própria.

5.5 Confirmação da Interação Cromossômica

Um total de 10 colônias isoladas das placas KO7A-pDGBB80/FV3 foram submetidas ao *miniprep* de apenas 3 clones pDGBB80/FV3. As demais colônias subcultivadas foram armazenadas com a adição de glicerol em -20°C .

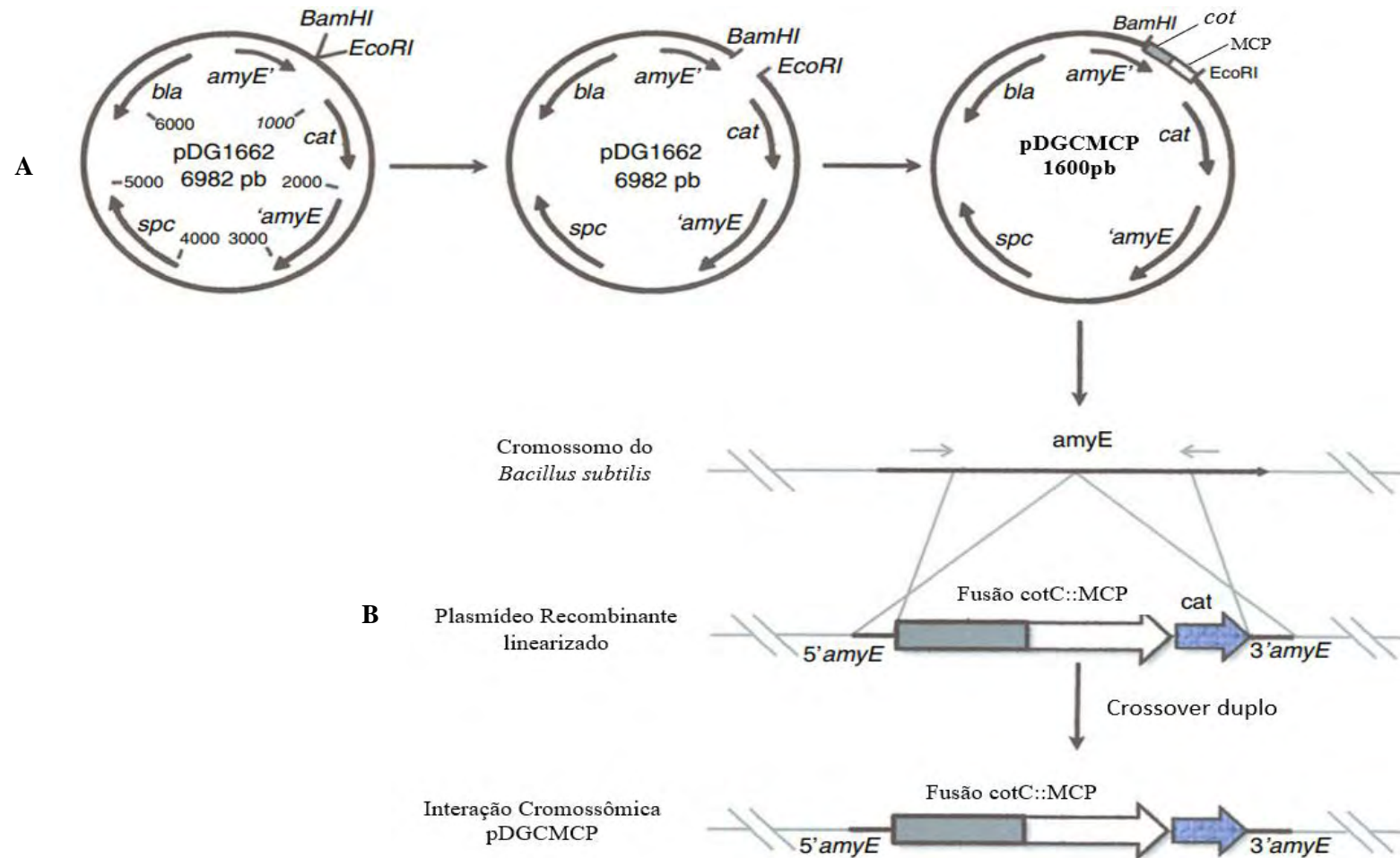
Para confirmação da Interação Cromossômica, foi realizada a amplificação pela PCR de fusão do gene *CotC::MCP* e analisadas em gel de agarose. Dos 3 clones recombinantes analisados apenas dois (2/3) apresentou o fragmento esperado de 1.600pb referente ao gene de fusão *CotC::MCP* (figura 15). A Interação Cromossômica está representada na figura 16. Realizou-se a purificação do fragmento e enviando-se o material para o sequenciamento tipo Sanger onde se confirmou a interação cromossômica entre a cepa de *Bacillus subtilis* e a fusão gênica *CotC::MCP*, ou seja, que o gene de fusão está inserido no plasmídeo pDG1662 (figura 17A e 17B), através da obtenção do grau de similaridade no BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (NCBI, 1988).

Figura 15– Amplificação dos clones pDGCMCP.



Legenda: Gel de agarose 1,5% contendo a PCR de fusão dos três clones. M: marcador de massa molecular (ladder de 100pb, Promega), 1 e 3 *amplicons* de 1.600pb dos clones pDGCMCP. **Fonte:** própria.

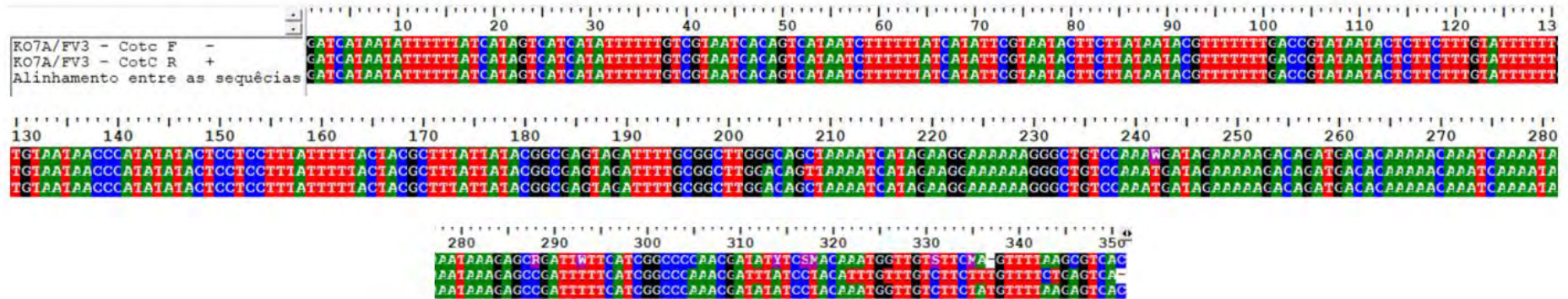
Figura 16 – Representação da Interação Cromossômica



Legenda: (A) Fusões dos genes *CotC::MCP* no plasmídeo pDG1662. (B) Integração cromossômica no *Bacillus subtilis* por evento de recombinação crossover duplo na sequência codificadora do gene *amyE*. **Fonte:** Valdez et al., 2014. Modificada.

Figura 17A – Análise do sequenciamento do clone pDGCMCP.

Alinhamento das Amostras KO7A/FV3 - CotC

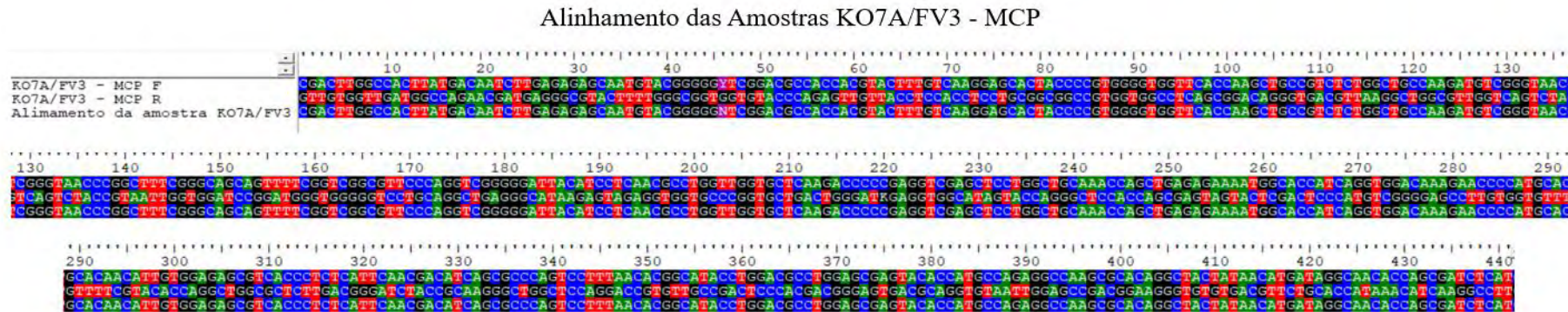


Blast das Sequências Alinhadas

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168 chromosome, complete genome	Bacillus subtilis ...	789	789	100%	0.0	98.02%	4316079	CP053102.1
<input checked="" type="checkbox"/> Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168 chromosome, complete genome	Bacillus subtilis ...	789	789	100%	0.0	98.02%	4398844	CP052842.1

Legenda: Alinhamento das seqüências nucleotídicas do fragmento referente a interação cromossômica pDGCMCP, apresentando identidade de 98% para cepa de *Bacillus subtilis*, confirmando a interação cromossômica. **Fonte:** Própria.

Figura 17B – Análise do sequenciamento do clone pDGCMCP.



Blast das Sequências Alinhadas

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Frog_virus_3_strain_Rana-Bra-01	Frog_virus_3	813	813	100%	0.0	99.77%	105080	MH351268.1
<input checked="" type="checkbox"/> Frog_virus_3_isolate_RVSP-154/BR-USP_major_capsid_protein_gene_complete_cds	Frog_virus_3	813	813	100%	0.0	99.77%	1392	MH016573.1
<input checked="" type="checkbox"/> Frog_virus_3_major_capsid_protein_(MCP)_gene_complete_cds	Frog_virus_3	813	813	100%	0.0	99.77%	1465	DQ897669.1

Legenda: Alinhamento das sequências nucleotídicas do fragmento referente à interação cromossômica pDGCMCP, apresentando identidade de 99% para o gene *MCP* do *Ranavirus*. **Fonte:** Própria.

6. DISCUSSÃO

Com o crescimento da ranicultura, a intensificação do manejo zootécnico tem propiciado desafios sanitários que podem se tornar fatores limitantes na produção, destacando-se os iridovírus, agentes etiológicos de notificação obrigatória (HIPOLITO et al., 2002; DASZAK et al., 1999; SCHLOEGEL et al., 2009; OIE, 2019), necessitando-se investir ainda mais na pesquisa para o desenvolvimento de medidas profiláticas. Na perspectiva de infecção de rãs por ranavírus e eventuais falhas para prevenção da ranavirose, o presente trabalho pode colaborar para o desenvolvimento de estratégias profiláticas.

Os endósporos de *B. subtilis* vem sendo usados em vários estudos para expressão heteróloga superficial de diferentes proteínas alvo, sendo utilizados vários sistemas de ancoragem, como exemplo a proteína CotC que é encontrada na superfície do endósporo do *B. subtilis*, consistindo em um polipeptídeo de 66 aminoácidos. A estratégia de fusão gênica que foi desenvolvida por pesquisadores ingleses e italianos é amplamente estudada e usada para expressão de proteínas alvo, apresentadas na superfície de endósporos de *B. subtilis* (MAURIELLO et al. 2004; NING et al. 2011; KIM; SCHUMANN, 2009).

O primeiro estudo que avaliou a capacidade de endósporos de *B. subtilis* recombinantes expressarem fragmentos antigênicos para toxina tetânica foi de Du et al. (2003), com a administração oral de endósporos em modelos murinos, sendo que os animais foram capazes de produzir uma resposta imunológica específica para toxina tetânica e, diferentemente, foram minimamente estimulados a responder contra as proteínas do revestimento dos endósporos. Mauriello et al. (2004) também utilizaram antígeno da toxina tetânica, expresso em endósporo de *B. subtilis*, pela fusão com a proteína de membrana CotC. O estudo relata que os camundongos que receberam oralmente os endósporos recombinantes desenvolveram uma resposta imunológica maior do que o grupo controle.

Os endósporos de *B. subtilis* recombinantes apresentam aplicações promissoras, não só como apresentadores de antígenos para seres humanos, mas também para animais, podendo ser utilizados na produção animal conforme observado por Mou et al. (2016). Estes autores ao administrarem endósporos de *B. subtilis* recombinantes expressando uma proteína do vírus da gastroenterite transmissível, que causa diarreia severa em leitões, relataram que a cepa

recombinante utilizada induz a resposta imune desses animais. No estudo de Valdez et al. (2014), *pellets* de ração com endósporos de *B. subtilis* recombinantes foram utilizados na dieta de camarões. A construção dessas cepas recombinantes ocorreu através da fusão da proteína de membrana CotC, que serviu para ancorar uma proteína estrutural do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), assim carreando antígenos heterólogos em sua superfície, onde se obteve uma proteção de 100% desses camarões contra WSSV.

Os estudos descritos acima ressaltam a importância dos dados obtidos no processo biotecnológico desenvolvido nesse projeto, indicando a potencialidade de uma cepa recombinante de *B. subtilis* como vetor vacinal para *Ranavirus*. Visto que não há tratamento para as ranaviroses, a melhor estratégia de controle de infecções por ranavírus é a adoção de medidas preventivas, como o manejo sanitário e o vacinal, sendo que vacinas comerciais contra ranavírus não estão disponíveis e, então, o presente trabalho pode corroborar para o desenvolvimento de uma futura vacina de nova geração, usando cepa recombinante de *B. subtilis*. Pode-se destacar ainda que esse trabalho é o pioneiro na utilização de um isolado brasileiro de *Ranavirus* na construção do fusionado gênico.

Para a construção de cepas recombinantes, utilizando-se dois genes, são utilizadas técnicas de clonagem que, apesar de eficientes, são trabalhosas. Visando a otimização de tempo, utilizou-se a combinação dos genes *MCP* e *CotC* via PCR de fusão. O método escolhido tem o desafio de concatenar vários fragmentos de DNA em reações consecutivas de PCR, podendo acarretar um risco inerente aos erros induzidos pela PCR (GEU-FLORES et al., 2007).

A técnica de *spore surface display* mostra-se uma excelente ferramenta biotecnológica, por ser uma técnica eficiente e versátil. Mesmo tendo essas características e tomando todo o cuidado para desenhar os primers e otimizar a PCR, encontraram-se algumas dificuldades, principalmente na otimização do fragmento de DNA a ser montado. Por ser um fragmento de 1600pb, utilizaram-se primers longos, induzindo o aparecimento de bandas inespecíficas. Apesar de toda a dificuldade, obteve-se sucesso no processo, conseguindo realizar a fusão dos genes *CotC::MCP* que foram comprovadas via eletroforese e sequenciamento.

Outros estudos também utilizaram essa técnica para construção de cepas recombinantes e tiveram bons resultados. Spiliotis (2012) comprova que a PCR de fusão é um método de clonagem rápido, que requer baixas quantidades de material inicial, poucas etapas experimentais e resulta em alto rendimento de colônias positivas. Nos estudos realizados por Cha-aim et al. (2012), a PCR de fusão pôde ser usada para a construção de cepas recombinantes.

No processo de clonagem do gene recombinante no plasmídeo pDG1662, transformado nas cepas de *Bacillus subtilis* BB80, KO7 e K07A, cedidos pelo *Bacillus* Genetic Stock Center (BGCS), obteve-se a interação cromossômica somente na cepa transformada de K07A, confirmando as informações cedidas pelo BGCS, descrevendo que o plasmídeo pDG1662 é compatível com a cepa K07A. Obteve-se, portanto, um possível vetor de expressão de proteína heterólogo pDGCMCP, podendo ser futuramente utilizado para produção de vacina oral contra ranavírus, empregando como sistema de transporte de antígenos heterólogos na superfície de endósporos de *B. subtilis*.

Diversos estudos já descreveram que endósporos recombinantes de *B. subtilis* têm sido empregados como veículo vacinal oral. Wang et.al. (2023) construíram, com sucesso, endósporos recombinantes de *B. subtilis* (CotC – LMBV). Demonstrando uma resposta imunológica protetora e eficaz contra o vírus *Largementh bass*, ao realizar um desafio com robalos vacinados oralmente com os endósporos recombinantes, obtiveram uma taxa de sobrevivência e de produção de IgM específico significativamente maiores do que aquelas observadas no grupo controle. Liang et.al (2023) também utilizaram os endósporos de *B. subtilis* como veículo vacinal para a exibição da proteína VP19 de iridovírus, após o desafio com garoupas vacinadas oralmente com os endósporos recombinantes CotC-19, observando-se uma sobrevivência relativamente maior comparada com o grupo controle, além das garoupas vacinadas apresentarem uma carga viral significativamente menor.

Espera-se que a cepa recombinante desenvolvida nesse projeto possa subsidiar outros estudos como análise de expressão de proteínas heterólogas expressas na superfície de endósporos de *B. subtilis*, contribuindo para o desenvolvimento de imunógenos vacinais contra *Ranavirus* para a proteção de

anfíbios, bem como peixes, contribuindo, desta forma, com o necessário aprimoramento dos programas sanitários na aquicultura brasileira.

7. CONCLUSÃO

A construção da cepa recombinante pDGCMCP do isolado brasileiro de *Ranavirus* FV3 foi realizada de forma inédita no Brasil, através de *B. subtilis* transformados pelo plasmídeo pDG1662. Apesar das dificuldades encontradas na técnica de PCR de fusão, obteve-se sucesso ao fusionar os dois genes (*CotC* e *MCP*) e, a partir dessa fusão, realizou-se a interação cromossômica pelo método de clonagem.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Não obstante, a partir dos resultados da interação cromossômica realizada, estudos da expressão de proteínas heterólogas são necessários para comprovar que a cepa recombinante de *B. subtilis* obtida pode ser utilizada futuramente como um candidato à vacina vetorizada contra infecções por ranavírus.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, A. L. F. **Isolamento e caracterização de estirpe de Fog Virus 3 – símile detectada em rãs -touros gigantes (*Lithobates catesbeianus*) no Estado de São Paulo**. 2016. 60f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

ALVES, K. C. S.; ALMEIDA, M. E. M.; CLÓRIA, J. C.; SANTOS, F. A.; PEREIRA, K. D.; CASTRO, D. P.; MARIÚBA, L. A. M. *Bacillus subtilis*: uma versátil ferramenta biotecnológica. **Scientia Amazonia**, v.7; n. 2, p.15-23, 2018.

ANUÁRIO PEIXEBR DA PISCICULTURA. 2022. Disponível em: < <https://www.peixebr.com.br/anuario2022/> >. Acesso em: 25/04/2023.

ANUÁRIO PEIXEBR DA PISCICULTURA. 2021. Disponível em: < <https://www.peixebr.com.br/anuario2022/>>. Acesso em: 25/04/2023.

BARNES, A. G; CEROVIC, V.; HOBSON, P. S.; KLAVINSKIS, L. S. *Bacillus subtilis* spores: a novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. **European Journal Immunology**, v. 37, n. 6, p. 1538–1547, 2007.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Acesso em: 27/09/2023.

BRASIL, EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA), 29 de junho 2020. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/53738345/artigo---o-protagonismo-do-brasil-na-producao-mundial-de-pescado> >. Acesso em: 26/04/2023.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 13 de dezem. 2016. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/18797150/aquicultura-brasileira-cresce-123-em-dez-anos> >. Acessado em setembro 2018.

BRUNNER, J. L.; STORFER, A.; GRAY, M. J.; HOVERMAN, J. T. *Ranavirus ecology and evolution: from epidemiology to extinction*. In: Gray, M. J.; Chinchar, V. G. (Ed.) **Ranaviruses: lethal pathogens of ectothermic vertebrates**. Springer, New York, 2015.

CAREY, C. Infectious disease and worldwide declines of amphibian populations, with comments on emerging diseases in coral reef organisms and in humans. **Environmental Health Perspectives**, n. 108, p. 143, 2000.

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

CASULA, G.; CUTTING, S. M. Bacillus probiotic: spore germination in the gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2344-2352, 2002.

CHA-AIM, K.; HOSHIDA, H.; FUKUNAGA, T.; AKADA, R. Fusion PCR via Novel Overlap Sequences. **Gene Synthesis**, p.97 – 110, 2012.

CHINVHAR, V. G. et al. Family *Iridoviridae*: poor viral relations no longer. Current topics in **Microbiology and Immunology**, New York, v. 328, p. 123 – 170, 2009.

CRIBB, A. Y., AFONSO, A. M., MOSTÉRIO, C. M. F. Manual técnico de ranicultura. Brasília/DF: **Embrapa**, v. 27, p. 13, 2013.

CORRÊA, T. C. **Imunobiológicos para o diagnóstico laboratorial de ranivirose: clonagem e expressão do gene MCP de isolado brasileiro de *Ranavirus* e produção de anticorpos policlonais anti-proteína MCP recombinante**. 2019. 131f. Tese (Doutor em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

DASZAK P.; BERGER L.; CUNNINGHAM A.A.; HYATT A.D.; GREEN D.E.; SPEARE R. Emerging infectious diseases and amphibian population declines. **Emerging Infections Diseases**, Atlanta, 5: 735–748, 1999.

DE SOUZA, R.D.; BATISTA, M.T.; LUIZ, W.; CAVALCANTE, R.C.; AMORIM, J.H.; BIZERRA, R.S.; MARTINS, E.G.; FERREIRA, L.C. *Bacillus subtilis* spores as vaccine adjuvants: further insights into the mechanisms of action. **PLoS One**, v. 9; 2014.

DEMAS, G. The energetics of immunity: a neuroendocrine link between energy balance and immune function. **Hormones and Behavior**, v. 45, p. 173–180, 2004.

DIAS, D. C.; FURLANETO, F. P. B.; AYROZA, L. M. S.; FRANÇA, F. M.; FERREIRA, C. M.; STÉFANI, M. V. Estudo da viabilidade econômica do uso de probiótico na alimentação da rã-touro, *Rana catesbeiana*. **Informações Econômicas**, SP, v.37, n.3, 2007.

DU, C. C., MASHOOF, S. M., CRISCITIELLO, M. F. Oral immunization of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) upregulates the mucosal immunoglobulin IgX. **Veterinary Immunologic and Immunopathologic**, v. 145, n. 1-2, p. 493-498, 2012.

DU, L. H.; HONG, H. A.; CUTTING, S. M. Germination of the spore in the gastrointestinal tract provide a novel route for heterologous antigen delivery. **Vaccine**, v.21, p. 4215-4224, 2003.

DU, L. H.; HONG, H. A.; UYEN, N. Q.; CUTTING, S. M. Intracellular fate and immunogenicity of *B. subtilis* spore. **Vaccine**, v.22, p. 1873-1885, 2004.

EARL, A. M.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 269-275, 2008.

FAO, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 13 de dezem. 2016. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/18797150/aquicultura-brasileira-cresce-123-em-dez-anos> >. Acessado em setembro 2018.

FERREIRA, C.M; PIMENTA, A.G.C.; PAIVA-NETO, J.S. **Introdução à Ranicultura. Boletim Técnico do Instituto de Pesca**. São Paulo, 33: 1-15, 2002.

FERREIRA, L.C.; FERREIRA, R.C.; SCHUMANN, W. *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 113-124, 2005.

FILHO, M. X. P.; FLORES, R. M. V.; ROCHA, H. J. T.; SONODA, D. Y.; CARVALHO, V. B.; OLIVEIRA, L.; RODRIGUES, F. L. M. Boletim de pesquisa e desenvolvimento - O mercado de peixes da piscicultura no Brasil: estudo do segmento de supermercados. **Embrapa Pesca e Aquicultura**, 2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2022**. Roma, 2022.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2022**. Roma, 2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS-FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2006**. Rome: FAO, 2018.

FU, X.; LI, N.; LAI, Y.; LIU, L., LIN, Q.; SHI, C.; HUANG, Z.; WU, S. Protective immunity against iridovirus disease in mandarin fish, induced by recombinant major capsid protein of infectious spleen and kidney necrosis virus. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 33, p. 880-885, 2012.

FURTADO, A. A. L.; MODESTA, R. C. D.; SIQUEIRA, R. S.; FREITAS, S. C. Comunicado Técnico – Processamento de Patê de Carne de Rã. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2006.

GALLI, L.; PEREIRA, A.; MARQUEZ, A.; MAZZONI, R. Ranavirus detection by PCR in cultured tadpoles (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802) from South America. **Aquaculture**, Amsterdam, 257(1-4): 78-82, 2006.

GEU-FLORES, F.; NOUR-ELDIN, H.; NIELSEN, M. USER fusion: A rapid and efficient method for simultaneous fusion and cloning of multiple PCR products. **Nucleic Acids Research**, 2007.

GOORHA, R., MURTI, K. G. The genome of frog virus – 3, an animal and DNA virus, is circularly permuted and terminally redundant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, p. 248-252, 1982.

GRANOFF, A.; CAME, P. E.; BREEZE, D. C. Viruses and renal carcinoma of *Rana pipiens* I. The isolation and properties of virus from normal and tumor tissue. **Virology**, n. 29, p. 133–148, 1966.

GRAY, M. J. & CHINCHAR, V. G. *Ranaviruses – Lethal Pathogens of Ectothermic Vertebrates*. **Springer Open**, 2015.

GRAYFER, L.; EDHOLM, E. S.; JESÚS, A. F.; CHINCHAR, V. G.; ROBERT, J. *Ranavirus host immunity and immune evasion*. In: Gray, M. J.; CHINCHAR, V.G. (Ed.). **Ranaviruses: lethal pathogens of ectothermic vertebrates**. Springer, New York, 2015.

WOOD, C. R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. **Trends in Biotechnology**, v. 10, p. 247-256, 1992.

HIPOLITO, M.; BACH, E.E. Patologias em rã touro (*Rana catesbeiana* Shaw 1802). Primeira revisão da bibliografia brasileira. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**. São Paulo, v. 69, n. 2, p. 113-120, 2002.

HOA, T. T.; DUC, L. H.; ISTICATO, R.; BACCIGALUP, L.; RICCA, E.; VAN, P. H.; CUTTING, A. S. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5241-5247, 2000.

HONG, H. A.; DUC, L. H.; CUTTING, S. M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, 2006.

ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses *Virus Taxonomy: 2011 Release (current)*. Disponível em: < <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> > Acesso em outubro de 2018.

ICTVDS Management 00.036. Iridoviridae. In: BÜCHEN-OSMOND, C. (Ed.). **ICTVdB – The universal virus database, version**. New York: Columbia University, 2006.

ISTICATO, R.; RICCA, E. Spore Surface Display. **Microbiology Spectrum**, v. 2, 2014.

IVIS, B. E.; WELKOS, S.L.; Cloning and expression of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene in *Bacillus subtilis*. **Infect. Immun.**, v. 54, p. 537 – 542, 1986.

JANCOVICH, J. K.; STECKLER, N.; WALTZEK, T. B. *Ranavirus taxonomy and phylogeny*. In: Gray, M. J.; Chinchar, V. G. (Ed.). **Ranaviruses: lethal pathogens of ectothermic vertebrates**. Springer, New York, 2015.

JOMAR CARVALHO FILHO. Ranavírus: Uma ameaça para os ranários comerciais. **Panorama da Aqüicultura**, v. 13, n. 77, p.57-58, 2003.

LIANG, X.; JUNJIA LIANG, J.; CAO, J.; LIU, S.; WANG, Q.; NING, Y.; LIANG, Z.; ZHENG, J.; ZHANG, Z.; LUO, J.; CHEN, Y.; HUANG, X.; HUANG, Y.; QIN, Q.; ZHOU, S. Oral immunizations with *Bacillus subtilis* spores displaying VP19 protein provide protection against Singapore grouper iridovirus (SGIV) infection in grouper. **Fish and Shellfish Immunology**, v.138, 2023.

KIK, M.; MARTEL, A.; SLUIJS, A. S.; PASMANS, F.; WOHLSEINS, P.; GRÖNE, A.; RIJKS, J. M. Ranavirus – associated mass mortality in wild amphibians, The Netherlands, 2010: A first report. **The Veterinary Journal**, n. 190, p. 284-286, 2011.

KIM, J.; SCHUMANN, W. Display of proteins on *Bacillus subtilis* endospores. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 19, p. 3127-36, 2009.

LESBARRÈRES, D.; BALSEIRO, A.; BRUNNER, J.; CHINCHAR, V. G.; DUFFS, A.; KERBY, J.; MILLER, D. L.; ROBERT, J.; SCHOCK, D. M.; WALRZEK, T.; GRAY, M. J. Ranavirus: past, present and future. **Biology letters**, n. 8, p.481-483, 2012.

LIMA, S. L.; AGOSTINHO, C. A. Capacidade de adaptação dos sistemas de manufatura em função do mercado consumidor. Chapecó (SC): INOTEC, 1992.

IICHAR, V.G.; HYATT A.; MIYAZAKI, T.; WILLIANS, T. Family *Iridoviridae*: Poor viral relations no longer. **Current Topics in Microbiology & Immunology**, Berlin, 328: 123-170, 2009.

MADIGAN MT, MARTINKO JM, PARKER J. 2004. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. São Paulo: Prentice Hall, 1993.

MANIERO, G. & CAREY, C. Changes in selected aspects of immune function in the leopard frog, *Rana pipiens*, associated with exposure to cold. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, n. 167, p. 256–263, 1997.

MAURIELLO, E. M. F.; DUC, L. H.; ISTICATO, R.; CANGIANO, G.; HONG, H. A.; DE FELICE, M.; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using *CotC* as a fusion partner. **Vaccine**, v. 22, p. 1177–1187, 2004.

MAZZONI, R. et al. Mass mortality associated with a frog virus 3-like Ranavirus infection in farmed tadpoles *Rana catesbeiana* from Brazil. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 86, n. 3, p. 181-191, 2009.

MIILLER, D.; GRAY, M.; STORFER, A. Ecopathology of Ranaviruses Infecting Amphibians. **Viruses Basel**, v.3, n.11, p.2351-2373, 2011.

MOU, C.; ZHU, L.; LIN, J.; YANG, Q. Immune responses induced by recombinant *Bacillus subtilis* expressing the spike protein of transmissible gastroenteritis virus in pigs. **Antitiral Research**, n. 131, p. 74-84, 2016.

MUÑOZ, A. E. P.; FLORES, R. V.; RODRIGUES, A. P. O.; MATAVELI, M. Ativos Aquicultura. **Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil**, v. 1, p. 1 – 4, 2015.

NEGRI, A.; POTOKI, W.; IWANICKI, A.; OBUCHOWSKI, M.; HINC, K. Expression and display of Clostridium difficile protein FliD on the surface of Bacillus subtilis spores. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 1379-1385, 2013.

NICHOLSON, W. L.; MUNAKATA, N.; HORNECK, G.; MELOSH, H. J.; SETLOW, P. Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 548-572, 2000.

NING, D.; LENG, X.; LI, Q.; XU, W. Surface – displayed VP28 on Bacillus subtilis spores induce protection against white spot syndrome virus in crayfish by oral administration. *Journal of Applied Microbiology*, v. 11, p. 1327-1336, 2011.

OIE – Listed diseases, infections and infestations in force in 2019. Disponível em: < [Animal health in the World: OIE - World Organisation for Animal Health](#)>. Acesso em: 20 jan. 2021.

OIE. OFFICIAL INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Infection with Ranavirus. In “Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals” Office International des Epizooties, Paris, France, p. 1- 21, 2012.

OLIVEIRA, R. C. O panorama da aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, vol.2, nº1, 2009.

PACCEZ, J. D. **Aplicação de linhagens geneticamente modificadas de Bacillus subtilis no desenvolvimento de vacinas de mucosa contra patógenos entéricos**. Tese (Doutorado em Ciências) Instituto de ciências biomédicas, Universidade de São Paulo (ICB). São Paulo, 2007.

RIBEIRO, L. P.; TOLEDO, L. F. An overview of the Brazilian frog farming. **R**, vol.548, 2022.

RODRIGUES, C. A. G. et al. Áreas potenciais para criação de rã-touro gigante Lithobates catesbianus (Shaw, 1802) na região Sudeste do Brasil. Campinas: Embrapa Monitoramento por satélite, 2010, 37 p. (Embrapa Monitoramento por Satélite . Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 12).

ROMERO, R. A. M. **Infecções por *Ranavirus* e cocos gram-positivos em girinos e rãs de criação (*Rana catesbeiana shaw, 1802*) do estado de Goiás.** 2006. 153f. Tese (Doutor em Ciência Animal) – Universidade de Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

SAMBROOK, K.T., FRISCH, E.F. AND MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O.P. Developments in the use of Bacillus species for industrial production. *Can J Microbiol.* v. 50 (1), p.1-17, 2004.

SCHLOEGEL, L.M.; FERREIRA, C.M.; JAMES, T.; HIPOLITO, M.; LONGCORE, J.; HYATT, A.; YABSLEY; MARTINS, A.M.C.R.; MAZZONI, R.; DAVIES, A.J.; DASZAK, P. The North American Bullfrog (*Rana catesbeiana*) as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil. **Animal Conservation**, London, 2009,

SOCIEDADE BRASILEIRA DE AGRICULTURA -SNA. Brasil é o segundo na produção mundial de rãs, 2013. Disponível em: < [Brasil é segundo na produção mundial de rãs - Sociedade Nacional de Agricultura \(sna.agr.br\)](http://brasil.e.segundo.na.producao.mundial.de.ras - Sociedade Nacional de Agricultura (sna.agr.br)>)>. Acesso em: 07/01/2021.

SPINOSO, M. R.; BRACCINI, T.; RICCA, E.; DE FELICE, M.; MORELLI, L.; POZZI, G.; OGGIONI, M. R. On the fate of ingested Bacillus spores. **Research in Microbiology**, v. 151, p. 361-368, 2000.

SPILOTIS, M. Inverse Fusion PCR Cloning. **PLoS ONE**, v.7, 2012.

TEACHER, A. G. F.; CUNNINGHAM, A. A.; GARNER, T. W. J. Assessing the long-term impact of Ranavirus infection in wild common frog populations. **Animal Conservation**, v.13, p.514 – 522, 2010.

WANG, Q.; LIANG, X.; NING, Y.; LIU, S.; LIANG, Z.; ZHANG, Z.; CHENG, Y.; CAO, J.; WANG, F.; LAN, L.; CHENG, G.; HUANG, Y.; HUANG, Y.; QUIN, Q.; ZHOU, S. Surface display of major capsid protein on Bacillus subtilis spores against largemouth bass virus (LMBV) for oral administration. **Fish and Shellfish Immunology**, v.135, 2023.

VALDEZ, A.; YESPIZ-PLASCENCIA, G.; RICCA, E.; OLMOS, J. First Litopenaeus vannamei WSSV 100% oral vaccination protection using CotC::Vp26 fusion protein displayed on Bacillus subtilis spores surface. **Journal Applied Microbiology**, v. 117, p. 347- 357, 2014.

VREELAND, R. H.; ROSENZWEIG, W. D.; POWERS, D. W. Isolation of a 250-million-year- old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. **Nature**, v. 407, p. 897-900, 2000.

WHITTINGTON, R. J.; BECKER, J. A.; DENNIS, M. M. Iridovirus infections in finfish – critical review with emphasis on ranaviruses. **Journal of Fish Diseases**, n. 33, p. 95-122, 2010.

WILLIAMS, T.; BARBOSA-SOLOMIEU, V.; CHINCHAR, V. G. A decade of advances in iridovirus research. **Advances in Virus Research**, n.65, p.173–248, 2005.

ZIEGLER, M. F. Anfíbios infectados por ranavírus são detectados na Mata Atlântica. *Jornal da Unicamp*, 2019. Disponível em: <<https://www.unicamp.br/unicamp/index.php/ju/noticias/2019/05/28/anfibios-infectados-por-ranavirus-sao-detectados-na-mata-atlantica>>. Acessado em: 12/01/2021.

10. ANEXO

10.1 Meios utilizados para a transformação celular

10.1.2 Base Meio A 10X

10g Extrato de levedura

2g Casaminoácidos

900mL Água destilada autoclave

Adicione 100mL de solução á 50% de glicose esterilizada por filtro

10.1.3 Sais de *Bacillus* 10X

Sais de *Bacillus* 10X

20g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

183g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

60g KH_2PO_4

10g Na^+ citrato

2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1000 ml de Água para 1000 mL

10.1.3 Meio A

81mL de água estéril

10mL de Base Meio A 10X

9mL Sais de *Bacillus* 10X

10.1.4 Meio B

10mL Médio A 10

0,1mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50nM

0,1 mL $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 250nM