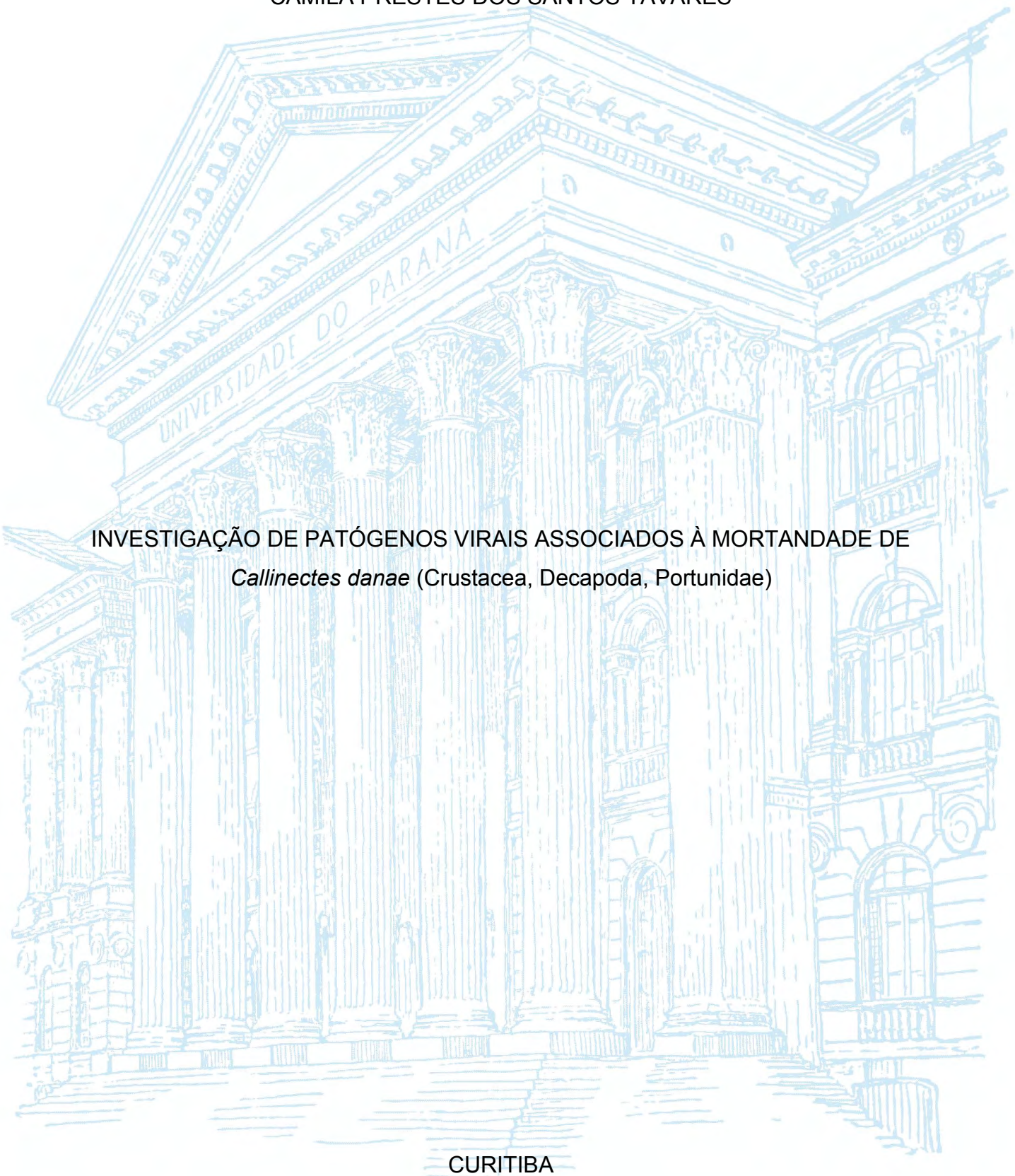
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA PRESTES DOS SANTOS TAVARES



INVESTIGAÇÃO DE PATÓGENOS VIRAIS ASSOCIADOS À MORTANDADE DE *Callinectes danae* (Crustacea, Decapoda, Portunidae)

CURITIBA

2021

CAMILA PRESTES DOS SANTOS TAVARES

INVESTIGAÇÃO DE PATÓGENOS VIRAIS ASSOCIADOS À MORTANDADE DE *Callinectes danae* (Crustacea, Decapoda, Portunidae)

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Zoologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Ostrensky

Coorientador: Ubiratã de Assis Teixeira da Silva

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Tavares, Camila Prestes dos Santos.
Investigação de patógenos virais associados à mortandade de *Callinectes danae* (Crustacea, Decapoda, Portunidae). / Camila Prestes dos Santos Tavares. – Curitiba, 2021.
239 f. : il.

Orientador: Antonio Ostrensky.
Coorientador: Ubiratã de Assis Teixeira da Silva.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

1. Siri. 2. Glicogênio. 3. Crustaceo. 4. Callinectes danae. 5. Patogene. 6. Aquicultura. I. Título. II. Ostrensky, Antonio. III. Silva, Ubiratã de Assis Teixeira da. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

CDD (20.ed.) 594.58

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CAMILA PRESTES DOS SANTOS TAVARES** intitulada: **Investigação de patógenos virais associados à mortandade de Callinectes danae (Crustacea, Decapoda, Portunidae)**, sob orientação do Prof. Dr. ANTONIO OSTRENSKY NETO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Julho de 2021.

Assinatura Eletrônica
25/08/2021 10:16:22.0
ANTONIO OSTRENSKY NETO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
25/08/2021 11:40:06.0
RODRIGO MAGGIONI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ)

Assinatura Eletrônica
24/08/2021 21:08:19.0
MARIO ANTONIO NAVARRO DA SILVA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
25/08/2021 15:03:15.0
LUCIENE CORREA LIMA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 108515
Para autenticar este documento/assinatura, acesse https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp e insira o codigo 108515

Dedico este trabalho à minha família, amigos e a todos aqueles que, de alguma forma, fazem do mar sua fonte de sustento e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Antonio Ostrensky, pela orientação, ensinamentos e discussões que contribuíram para o meu amadurecimento profissional e pessoal. Espero poder passar um pouco do seu legado de excelência profissional, generosidade e paixão por novos desafios.

Ao meu coorientador e amigo, Dr. Ubiratã de Assis Teixeira da Silva pela coorientação, incentivo e ensinamentos tão necessários durante a construção dessa tese.

Ao GIA por ceder toda a sua estrutura para a realização do trabalho. E a todos os alunos e estagiários que durante o período de realização deste trabalho passaram pelos laboratórios do GIA e pelo CAMAR. Tenho um enorme orgulho de poder fazer parte da história do GIA.

A todos os pesquisadores que me ajudaram na construção dessa tese, Dra. Mingli Zhao, Dra. Ana Paula Sommer Vinagre, Dr. Samuel Paulo Cibulski, Dra. Gisele Castilho-Westphal e Dr. Giorgi Dal Pont. Essa tese não seria possível sem a ajuda e conhecimento de vocês!

Ao Dr. Eric James Schott por abrir as portas do seu laboratório para que eu pudesse fazer o doutorado sanduíche, por me ensinar tanto e permitir que essa tese atingisse um nível não imaginado antes.

Ao meu comitê de acompanhamento, Dra. Setuko Masunari e Dr. Eduardo Ballester, pelas orientações, críticas e paciência em ler e discutir minha pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Rodrigo Maggioni, Dr. Mário Antônio Navarro da Silva e Dra. Luciene Corrêa Lima pelas valiosas contribuições à versão final do trabalho.

Aos pescadores da Vila São Miguel pela coleta dos siris e, principalmente, pela inspiração para realizar o presente estudo.

À Pós-Graduação em Zoologia pela oportunidade de ser aluna do programa.

À Capes pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche no exterior que permitiu que eu vivesse uma das minhas melhores experiências profissionais.

Ao CNPq pelo provimento da bolsa de estudos que permitiu minha dedicação exclusiva a este trabalho durante os últimos quatro anos.

À minha família, mãe e pai, por sempre me motivarem e me ajudarem nos momentos mais difíceis, sempre dando uma palavra de amor e conforto.

Ao meu esposo e melhor amigo, Henrique, que sempre me incentivou e torceu pelas minhas vitórias.

A Deus, pela vida, saúde e por colocar todas essas pessoas no meu caminho.

"Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos".

— Isaac Newton

RESUMO

Os crustáceos portunídeos, popularmente conhecidos como siris, são distribuídos globalmente e conhecidos por seu grande potencial econômico para a aquicultura. O cultivo de siri-mole desperta o interesse de investidores no Brasil e no mundo por gerar um produto de alto valor de mercado, bastante demandado e desejado pelos consumidores. Não raramente, porém, as infecções virais limitam a sobrevivência dos siris em cativeiro e, consequentemente, o sucesso dos cultivos em escala comercial. No Brasil, embora sejam registradas altas taxas de mortandade de siris em cultivo, nenhum estudo havia sido realizado até então para avaliar a presença de quaisquer vírus. O objetivo desse trabalho foi analisar a presença de vírus de RNA e os efeitos da infecção em *Callinectes danae*, uma espécie de siri-azul explorada pela indústria brasileira de produção de siri-mole, em condições de laboratório. Por meio de levantamento bibliográfico sistemático (utilizando a metodologia PRISMA - preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses) foi possível descrever os patógenos virais que afetam técnica e economicamente a aquicultura de crustáceos braquiúros, bem como os métodos de diagnóstico e controle das doenças causadas por vírus. Essa análise mostrou que os patógenos virais mais estudados em crustáceos braquiuros foram relacionados à família *Reoviridae* (36%), com destaque para o *Callinectes sapidus* Reo-like Vírus 1 (20%), uma das espécies associadas a episódios de elevada e rápida mortalidade de *C. sapidus* em sistemas de produção de siri-mole nos EUA. Na etapa seguinte, um estudo foi projetado para investigar se o CsRV1 contribui para a mortandade de *C. danae* em cativeiro no Brasil. Após 14 dias de experimento, todos os siris analisados (n=178) testaram negativo para CsRV1 após ensaios RT-qPCR. No entanto, a análise eletroforética do RNA extraído de alguns siris mostrou um padrão de 12 bandas de dsRNA, indicando uma infecção por um novo reovírus putativo, denominado CsRV2. A infecção por CsRV2 não foi associada a mortandade dos siris, mas causou alterações metabólicas e comportamentais significativas, como redução na concentração de glicogênio no hepatopâncreas e uma diminuição dos reflexos motores dos siris. Em seguida, a sequência do genoma de CsRV2 (20.909 nt) foi descrita e, com base no nível de identidade do gene RdRp com outros reovírus, foi constatado que CsRV2 pertence ao gênero *Cardoreovirus*. Os dados do sequenciamento de nova geração também permitiram a descoberta de um genoma tripartido (11.430 nt), semelhante à bunyavírus, relacionado a família *Cruliviridae*, aqui nominado como *C. danae* Portunibunyavirus. Análises histopatológicas e de microscopia eletrônica também foram conduzidas e revelaram que ambos os vírus infectam os tecidos derivados da ectoderme e mesoderme, podendo ser capazes de causar alterações histopatológicas com potencial associação com a mortalidade dos animais infectados. O passo seguinte foi analisar a patogenicidade de CsRV2 em *C. danae* (n=25) mantidos em condições de laboratório. Após 14 dias de infecção experimental, foi registrada maior taxa de mortalidade nos siris coinfectados com CsRV2 e CdPBV1 (70%), em comparação com os siris infectados somente com CsRV2 (9%). Nenhuma morte foi registrada no grupo controle negativo. Ainda, foi observado que a coinfecção por CsRV2 e CdPBV1 exacerba as alterações metabólicas (aumento do consumo de oxigênio), comportamentais (redução dos reflexos motores) e imunológicas (redução do número de granulócitos circulantes). Por fim, entendendo a importância da divulgação científica, os resultados gerados nesta tese foram compilados em texto de linguagem simples e de fácil compreensão que será utilizado para divulgação da tese e de seus resultados. Ficou evidenciado que a infecção por patógenos virais será possivelmente o principal desafio para o sucesso da indústria de siri-mole no Brasil, fazendo-se necessário o desenvolvimento de medidas de controle e mitigação para que essa cadeia produtiva possa se consolidar e crescer no Brasil.

Palavras-chave: Siri-mole; CsRV2; CdPBV1; Glicogênio; RAMP; $\dot{M}O_2$.

ABSTRACT

Portunid crabs are globally distributed and known for their great economic potential for aquaculture. The soft-shell crab aquaculture awakens the interest of investors in Brazil and the world for generating a product with a high market value, which is highly demanded and desired by consumers. Not rarely, however, viral infections limit the crab's survival in captivity and, consequently, the aquaculture's success on a commercial scale. In Brazil, although high mortality rates of crabs in captivity are recorded, no study has been carried out to assess the presence of any viruses. The objective of this study was to analyze the presence of RNA viruses and the effects of the infection in *Callinectes danae*, a blue crab species explored by the Brazilian soft-shell crab production industry, under laboratory conditions. Through a systematic literature review (PRISMA methodology - preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses) it was possible to describe the viral pathogens that technically and economically affect the aquaculture of brachyuran crustaceans, as well as the methods of diagnosis and control of diseases caused by the virus. This analysis showed that the most studied viral pathogens in crabs were related to the *Reoviridae* family (36%), with emphasis on *Callinectes sapidus* Reo-like Virus 1 (20%), as it is one of the species associated with high and rapid episodes of mortality of *C. sapidus* in soft-shell crab production systems in the USA. In the next step, a study was designed to investigate whether CsRV1 contributes to the mortality of *C. danae* in captivity in Brazil. After 14 days of the experiment, all crabs analyzed (n=178) tested negative for CsRV1 through RT-qPCR assays. However, electrophoretic analysis of RNA extracted from some crabs showed a pattern of 12 dsRNA bands that indicated infection by putative new reovirus called CsRV2. CsRV2 infection was not associated with crab mortality, but it caused significant metabolic and behavioral changes, such as a reduction in the concentration of hepatopancreas glycogen and a decrease in crab motor reflexes. Then, the CsRV2 genome sequence (20,909 nt) was described and, based on the level of identity of the RdRp gene with other reoviruses, it was found that CsRV2 belongs to the genus *Cardoreovirus*. The next-generation sequencing data also allowed for the discovery of a tripartite bunyavirus-like genome (11,430 nt), related to the *Cruliviridae* family, here called *C. danae* Portunibunyavirus 1. Histopathological and electron microscopy analyzes were also conducted and revealed that both the viruses infect tissues derived from the ectoderm and mesoderm, and may be capable of causing histopathological changes with a potential association with the mortality of infected crabs. Then, was analyzed the CsRV2 pathogenicity in *C. danae* (n=25) kept under laboratory conditions. After 14 days of experimental infection, a higher mortality rate was recorded in crabs co-infected with CsRV2 and CdPBV1 (70%) compared to crabs infected only with CsRV2 (9%). No deaths were recorded in the negative control group. Furthermore, it was observed that the co-infection by CsRV2 and CdPBV1 exacerbates metabolic (increased oxygen consumption), behavioral (reduction in motor reflexes), and immunological (reduction in the number of circulating granulocytes) alterations. Finally, understanding the importance of scientific dissemination, the results generated in this thesis were compiled in a journal with simple and easy-to-understand language. The results of this thesis show that infection by viral pathogens is also the main challenge for the success of the soft-shell crab industry in Brazil, making it necessary to develop control and mitigation measures for this production chain to develop on a large scale in Brazil.

Keywords: Soft-shell crabs; CsRV2; CdPBV1; Glycogen; RAMP; $\dot{M}O_2$.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma das etapas de elaboração da tese, incluindo as perguntas que foram respondidas em cada capítulo.....23

Figura 2. Fluxograma do protocolo para a busca e obtenção das referências bibliográficas analisadas na revisão sistemática, com base nas diretrizes PRISMA, aplicado para a compilação dos dados sobre os patógenos virais que afetam o cultivo de crustáceos braquiúros, bem como os métodos de diagnóstico e controle das doenças causadas por esses patógenos. 31

Figura 3. Principais termos usados (≥ 0,05%) e correlação Phi (Φ ≥ 0,7) entre eles, nos 73 principais documentos científicos sobre patógenos virais em crustáceos braquiúros publicados entre 1977 e junho de 2020. Note que os vírus mais citados nos documentos analisados são o vírus da mancha branca “WSSV” e o reovírus de *Callinectes sapidus* “CsRV”. Este último está correlacionado a termos que estão relacionados ao hospedeiro, locais onde este vírus foi detectado e os principais autores que publicaram as informações sobre o reovírus. 44

Figura 4. Fluxograma desenvolvido no presente estudo para auxiliar na detecção dos patógenos virais que causam mortalidade de *Callinectes sapidus* em cultivo, com base nos aspectos clínicos, histológicos e de microscopia eletrônica reportados nos estudos publicados entre 1977 e junho de 2020. 64

Figura 5. Técnicas utilizadas para o diagnóstico de patógenos virais em crustáceos braquiúros nas publicações entre 1977 a junho de 2020. 69

Figura 6. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier de espécimes de *Callinectes danae* mantidos em condições experimentais por 14 dias: (A) curva de sobrevivência do conjunto total de siris testados; (B) curvas de sobrevivência dos siris intactos, sem qualquer lesão visível e dos animais que apresentavam alguma lesão ou ausência de pereiópodos. Não foram encontradas diferenças significativas entre animais intactos e lesionados de acordo com o teste de Mantel-Cox, Breslow e Tarone-Ware. 102

Figura 7. Eletroforese de um dsRNA de um isolado norte-americano CsRV1 de *Callinectes sapidus* e um dsRNA de CsRV2 de *Callinectes danae* mantidos em um sistema de recirculação. Os tamanhos das bandas de dsRNA foram determinados por comparação com marcador de peso molecular 1 kb mostrado na primeira linha (Cat.No.: SM1331, Thermo Fisher Scientific, USA). 104

Figura 8. Prevalência de CsRV2 (A) e intensidade relativa das bandas de dsRNA (B) do RNA extraído da hemolinfa (barra cinza) e músculo (barra preta) de *Callinectes danae* ao longo de 14 dias de cativeiro. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p<0,05$) de acordo com o teste de qui-quadrado de Pearson (X^2) para dados de prevalência (%) e ANOVA One-way, seguido do teste post hoc de Tukey para densidade relativa das bandas de dsRNA (Média ± DP). Letras minúsculas indicam diferenças entre a prevalência de CsRV2 identificada na hemolinfa dos siris ao longo do período experimental. Letras maiúsculas indicam diferenças na prevalência entre as amostras de hemolinfa e músculo no último dia de experimento. 105

Figura 9. (A) Porcentagem de indivíduos *Callinectes danae* com reflexos comprometidos durante o experimento; (B) Porcentagem de siris infectados e não infectados por CsRV2 que tinham reflexo de chute comprometido. Letras minúsculas representam diferenças significativas no reflexo ($p<0,05$; teste de Friedman ANOVA seguido por Wilcoxon). Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre animais infectados e não infectados ao longo do experimento (teste U de Mann Whitney). 111

Figura 10. A) Eletroforese em gel de agarose de CsRV2 (dsRNA) extraído de um espécime de *Callinectes danae* coletado na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. Os tamanhos das bandas de dsRNA foram determinados por comparação com o marcador de peso molecular de 1 kb mostrado na primeira coluna (Cat.Nº. N32325, New England Biolabs, EUA). B) Ilustração da organização do genoma dos 12 segmentos de dsRNA do CsRV2, os ORFs são representados pelas barras cinza e as sequências não codificantes pelas linhas pretas.....144

Figura 11. Árvore filogenética de máxima verossimilhança de reovírus de crustáceos e outros reovírus com base nas sequências de aminoácidos codificadas de RdRp, VP2, VP3 e VP4. A árvore foi construída usando PhyML (GUINDON; DUFAYARD; LEFORT; ANISIMOVA et al., 2010) com modelos de substituição de melhor ajuste (GTR_G + I) determinados por Smart Model Selection (LEFORT; LONGUEVILLE; GASCUEL, 2017). As análises de significância estatística das topologias das árvores foram realizadas com o teste de suporte de ramos de verossimilhança aproximada (aLRT) (GUINDON; GASCUEL, 2003). O gênero Cardoreovirus de crustáceos braquiúros da família *Reoviridae* é mostrado em vermelho. 146

Figura 12. A) Alinhamento de sequências de nucleotídeos do gene RdRp de *Cardorevirus* (EsRV905 - AY542965, CsRV2 de *Callinectes sapidus* - MW2208677 e CsRV2 isolado de *Callinectes danae* do presente estudo). Os aminoácidos conservados foram destacados em preto, as lacunas foram indicadas como linhas no software Geneious (versão R9). B) Alinhamento da sequência de aminoácidos traduzida (RdRp) de CsRV2 isolado de *C. danae* e CsRV2 de *C. sapidus* - QPK66770.1, as incompatibilidades de aminoácidos foram destacadas em amarelo. As substituições de aminoácidos do mesmo grupo físico-químico e função são representadas por "+". 148

Figura 13. Representação gráfica dos três segmentos genômicos (-ssRNA) de CdPBV1 com anotação para ORFs associados ao bunyavírus. ORFs são representados pelas barras cinzas e sequências não codificantes pelas linhas pretas. 151

Figura 14. Uma árvore filogenética desenvolvida a partir das proteínas do gene RdRp previstas de 24 bunyavírus. Os dados da sequência da proteína foram alinhados no Geneious usando o protocolo padrão MAFFT. A árvore foi desenvolvida usando Figtree (versão 1.4.4). Os bunyavírus que infectam crustáceos são destacados em vermelho na árvore. 152

Figura 15. Microfotografias eletrônicas de diferentes tecidos de *Callinectes danae*. Presença de partículas virais (59,0 ± 8,5 nm de diâmetro) previstas como CsRV2 no citoplasma da célula do tecido muscular A) e hemócito das brânquias (B). A imagem (D) mostra com ampliação menor o arranjo paracristalino no hemócito das brânquias, que inclui partículas de CsRV2 em diferentes fases de desenvolvimento. (C) Partículas previstas como CdPBV1 (126,3 ± 45,4 nm de diâmetro) presentes na célula do tecido conjuntivo frouxo entre os túbulos do hepatopâncreas. (E) As partículas de CdPBV1 de membrana única saem/entram na célula por meio da citose da membrana celular (seta preta) e entram na célula com uma membrana dupla (seta branca). (F) presença de partículas de CsRV2 e CdPBV1 no epitélio das brânquias, com presença de vesículas preenchidas de CsRV2. V: Vesículas; N: núcleo; C: cutícula; H: espaço da hemolinfa.....154

Figura 16. Histopatologia das brânquias de *Callinectes danae* infectadas com CsRV2. A) Granuloma nas lamelas branquiais é destacado em aumento de 400X, seta branca indica a ocorrência de outro granuloma e seta preta infiltrado de hemócitos. B) Sincícios em ampliação de 1000X (seta branca). C) Inclusões intracitoplasmáticas em hemócitos, os corpos de inclusão são destacados por setas pretas (aumento de

1000X). D) Parasitas presentes nas lamelas das brânquias (aumento 100X). E) Descolamento da cutícula da lamela (setas pretas) e granuloma (seta branca) em aumento de 100X. F) A fusão da lamela é destacada com aumento de 400x. G) Aumento de volume e divisão mitótica celular semelhante à neoplasia nas lamelas branquiais, as neoplasias são destacadas em aumento de 1000x. 156

Figura 17. Histopatologia do hepatopâncreas de *Callinectes danae* infectado com CsRV2. A) O granuloma é destacado em aumento de 400X. B) Sincícios no tecido conjuntivo frouxo entre os túbulos do hepatopâncreas em aumento de 400X (setas brancas). C) Inclusões intracitoplasmáticas nos hemócitos do hepatopâncreas, os corpos de inclusão são destacados por uma seta branca (aumento 1000X). D) Infiltração de hemócitos entre os túbulos do hepatopâncreas em aumento de 400X. E) Células com núcleos picnóticos nos túbulos (aumento 400X). F) Hemócitos de diferentes tamanhos com núcleos de diferentes formas e cores semelhantes à neoplasia são destacados em aumento de 1000X. 157

Figura 18. Fluxograma esquemático das etapas do experimento de infecção experimental de CsRV2 em *Callinectes danae* em condições de laboratório. As setas tracejadas indicam o grupo experimental adicional, os siris que receberam injeção de solução salina, mas que se infectaram com CsRV2 durante o período experimental. 189

Figura 19. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de espécimes de *Callinectes danae* desafiados com injeção intramuscular de CsRV2 (linha tracejada), grupo controle positivo para CsRV2 (linha contínua preta) e grupo controle negativo (linha contínua cinza) em condições experimentais por 14 dias. As diferentes letras representam diferença estatística ($p<0,05$) entre o grupo controle e desafiados, usando o teste de Mantel-Cox, Breslow e Tarone-Ware. 193

Figura 20. Carga viral de CsRV2 (Média ± DP) em *Callinectes danae* que morreram (A) ou sobreviveram (B) durante o período experimental em condições de laboratório. As barras pretas representam a carga viral nos siris que receberam injeção intramuscular de CsRV2 e as barras cinzas os siris do grupo controle que se contaminaram com CsRV2 durante o experimento. 193

Figura 21. Gel de agarose corado com GelRed™ (Biotium, CA, USA) representando o ensaio de RT-PCR a partir de RNA total extraído de *Callinectes danae* após 14 dias de experimento em laboratório. (A) Produtos de RT-PCR usando primers específicos para amplificar uma região de 97 bp de CsRV2. Linha 1: marcador de peso molecular de 100 bp; Linha 2: RNA extraído de um exemplar do grupo controle que se contaminou com CsRV2 durante o experimento (ID: 5); Linha 3 e 4: Um exemplar do experimento infectado por CsRV2 via injeção intramuscular (ID: 20 e 21); Linha 5: Inóculo usado na injeção de CsRV2; Linha 6: Controle negativo (água ultrapura). (B) Produtos de RT-PCR usando primers específicos para amplificar uma região de 127 bp de CdPBV1. Linha 7: Um exemplar do grupo controle que se contaminou com CsRV2 durante o experimento (ID: 5); Linha 8: Um exemplar do experimento infectado por CsRV2 via injeção intramuscular (ID: 20); Linha 9: Inóculo usado na injeção de CsRV2; Linha 10: Um exemplar positivo para CdPBV1 (ID: BR37); Linha 11: Controle negativo (água ultrapura). (C) Produtos de RT-PCR usando primers específicos para CdPBV1 a partir do RNA total extraído de todos os siris do grupo controle negativo (linhas 2-5), grupo controle positivo para CsRV2 (linhas 6-16) e do grupo infectado por CsRV2 via injeção intramuscular (linhas 17-26). 195

Figura 22. (A) Valores médios ± erro padrão das taxas de fluxo de amônia total (AT) e (B) consumo de oxigênio de exemplares de *Callinectes danae* infectados por CsRV2 e CdPBV1 via injeção intramuscular (barra preta), por CsRV2 após contaminação durante o experimento (barra cinza) e do grupo controle negativo, que receberam

injeção de solução salina (barra branca). As letras indicam diferenças entre o grupo controle e o tratamento (One-way ANOVA, teste de Tukey, p<0,05). 197

Figura 23. Avaliação da ação reflexa de *Callinectes danae* durante 14 dias de experimento em condições de laboratório. (A) Proporção do comprometimento reflexo (média ± DP) de C. danae infectados por CsRV2 e CdPBV1 via injeção intramuscular (barra preta), controle positivo para CsRV2 (barra cinza) e controle negativo para CsRV2 e CdPBV1 (barra branca). (B) Porcentagem de perda de cada um dos seis reflexos dos exemplares de C. danae do grupo controle positivo para CsRV2 e (C) dos exemplares infectados por CsRV2 e CdPBV1 via injeção intramuscular. Não foram detectadas diferenças estatísticas (p>0,05) na proporção do comprometimento reflexo e porcentagem da perda dos reflexos entre os grupos para cada dia analisado, usando o teste U de Mann Whitney. 199

Figura 24. (A) Análise de citometria de fluxo dos hemócitos obtidos de exemplares de *Callinectes danae* que receberam injeção de solução salina e que testaram negativo para CsRV2 e CdPBV1; (B) que receberam injeção de solução salina, mas se contaminaram com CsRV2 durante o experimento; e (C) exemplares que foram injetados propositalmente com CsRV2 e incidentalmente com CdPBV1 e mantidos em condições de laboratório durante 14 dias. As letras maiúsculas indicam a porcentagem dos granulócitos (G), células hialinas (H) e semigranulócitos (S), estimados pela dispersão direta (FSC) e dispersão lateral (SSC). O gráfico D apresenta a proporção média de hemócitos (média ± DP) para todos os siris analisados de cada grupo experimental. 200

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Termos utilizados para a busca das referências bibliográficas relacionadas a patógenos virais em crustáceos braquiúros cultiváveis. O grupo I foi utilizado para determinar os termos mais apropriados baseados nos gêneros de crustáceos braquiúros cultivados. O grupo II inclui os termos escolhidos para a pesquisa e seleção da bibliografia. 30

Tabela 2. Síntese conceitual do algoritmo utilizado para analisar a correlação entre palavras nos textos analisados. 34

Tabela 3. Vírus que infectam crustáceos braquiúros de importância para a aquicultura mundial. 36

Tabela 4. Reflexos avaliados durante o teste RAMP (STONER, 2012). 99

Tabela 5. Média ± desvio padrão das variáveis de qualidade da água do sistema experimental e valores recomendados para os caranguejos de aquicultura propostos por MALONE e BURDEN (1988) e HOCHHEIMER (1988). 101

Tabela 6. Prevalência de CsRV2 e densidade relativa de bandas de dsRNA de siris, *Callinectes danae*, que sobreviveram ou morreram durante o período experimental. 105

Tabela 7. Prevalência de CsRV2 em *Callinectes danae* de diferentes estágios de muda após 0 e 14 dias em condições de laboratório. 106

Tabela 8. Relação da infecção por CsRV2 e as concentrações de glicose, triglicerídeos e proteínas totais na hemolinfa de fêmeas e machos de *Callinectes danae* mantidos em condições de laboratório. Os valores são expressos como mediana (min-máx) em mg dL^{-1}. 108

Tabela 9. Relação da infecção por CsRV2 e as concentrações de glicogênio no hepatopâncreas e triglicerídeos no hepatopâncreas e gônadas de siris machos e fêmeas (*Callinectes danae*) mantidos em condições de laboratório. Os valores são expressos como mediana (min-max) em mg g^{-1}. 109

Tabela 10. Relação do efeito da infecção pelo CsRV2 com o comprometimento dos reflexos motores (RAMP) de *Callinectes danae* mantida em condições de laboratório. 111

Tabela 11. Anotação da sequência do genoma CsRV2 em comparação com outras sequências de proteínas usando o banco de dados NCBI. S: segmentos de CsRV2; TM: tamanho do segmento; P: nome da proteína. 145

Tabela 12. Anotação do genoma -ssRNA da sequência CdPBV1 em comparação com outras sequências de proteínas usando o banco de dados NCBI. 151

Tabela 13. Carga viral de CsRV2 em *Callinectes danae* após período experimental em condições laboratoriais. Não foram detectadas diferenças estatísticas na carga viral média de CsRV2 entre os grupos experimentais (Mann Whitney, p>0,05). 191

Tabela 14. Média ± desvio padrão das variáveis físicas e químicas monitoradas na água de cada grupo experimental, bem como os valores recomendados para os caranguejos e siris propostos por MALONE e BURDEN (1988) e por HOCHHEIMER (1988). ...194

Tabela 15. Taxa de ingestão de alimento de *Callinectes danae* após infecção por CsRV2 e coinfecção por CsRV2 e CdPBV1 via injeção intramuscular em condições de laboratório. Não foram detectadas diferenças na taxa de ingestão (%) entre os grupos experimentais (Mann Whitney, p>0,05). 197

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO GERAL 19

REFERÊNCIAS 24

Quais patógenos virais afetam o cultivo de crustáceos braquiúros e quais são os métodos de diagnóstico e controle? 26

CAPÍTULO I - DOENÇAS VIRAIS EM CRUSTÁCEOS BRAQUIÚROS CULTIVADOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA[1] 27

RESUMO 27

1. INTRODUÇÃO 27

2. MATERIAL E MÉTODOS 29

2.1. SELEÇÃO DOS TERMOS PARA A BUSCA DOS ESTUDOS 30

2.2. SELEÇÃO E IMPORTAÇÃO DOS DOCUMENTOS 32

2.3. FLUXOGRAMA 33

2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA 33

3. RESULTADOS 34

3.1. PRINCIPAIS PATÓGENOS DE CRUSTÁCEOS BRAQUIÚROS 34

3.2. VÍRUS DE RNA 40

3.2.1. Vírus relacionados à família *Reoviridae* 40

3.2.2. Vírus relacionados à família *Rhabdoviridae* 48

3.2.3. Vírus relacionados à família *Bunyaviridae* 50

3.2.4. Vírus relacionados à família *Dicistroviridae* 51

3.2.5. Vírus relacionados à família *Picornaviridae* 52

3.2.6. Vírus relacionados à família *Roniviridae* 53

3.2.7. Vírus relacionados à família *Tombusviridae* 54

3.3. VÍRUS DE DNA 54

3.3.1. Vírus relacionados à família *Baculoviridae* 54

3.3.2. Vírus relacionados à família *Herpesviridae* 57

3.3.3. Vírus relacionados à família *Parvoviridae* 58

3.3.4. Vírus relacionados à família *Nimaviridae* 58

3.4. TÉCNICAS UTILIZADAS NA DETECÇÃO DE PATÓGENOS VIRAIS EM CRUSTÁCEOS BRAQUIÚROS....62
3.5. CONTROLE DE PATÓGENOS VIRAIS EM CRUSTÁCEOS BRAQUIÚROS EM CULTIVO....69
4. CONCLUSÃO....72
5. AGRADECIMENTOS....73
6. REFERÊNCIAS....74
CsRV1 infecta e causa mortalidade em *Callinectes danae* mantidos em cativeiro no Brasil?....88
CAPÍTULO II - DETECÇÃO DE UM SUPOSTO NOVO REOVÍRUS EM *Callinectes danae*, COM IMPACTOS POTENCIAIS NA PRODUÇÃO DE SIRI-MOLE NO BRASIL[1] 89
RESUMO....89
1. INTRODUÇÃO....90
2. MATERIAL E MÉTODOS....94
2.1. COLETA DOS SIRIS....94
2.2. SISTEMA EXPERIMENTAL....94
2.3. COLETA DE HEMOLINFA E DISSECÇÃO DOS SIRIS....95
2.4. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DA HEMOLINFA....96
2.5. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DO MÚSCULO DOS PEREIÓPODOS....96
2.6. QUANTIFICAÇÃO DE CsRV1 POR RT-qPCR (REVERSE TRANSCRIPTION-QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION)....97
2.7. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO dsRNA DE CsRV2....98
2.8. AVALIAÇÃO DE ASPECTOS COMPORTAMENTAIS....99
2.9. ANÁLISES BIOQUÍMICAS....100
2.10. ANÁLISE DE DADOS....100
3. RESULTADOS....101
3.1. QUALIDADE DA ÁGUA....101
3.2. MORTALIDADE....102

3.3. PREVALÊNCIA DE CsRV1 USANDO RT-qPCR E DESCOBERTA DE CsRV2 PELA VISUALIZAÇÃO DO GENOMA PUTATIVO DO REOVÍRUS 103
3.4. AVALIAÇÃO METABÓLICA 106
3.5. AVALIAÇÃO DE ASPECTOS COMPORTAMENTAIS 110
4. DISCUSSÃO 111
4.1. MORTALIDADE 112
4.2. PREVALÊNCIA DE REOVÍRUS 116
4.3. ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS NA HEMOLINFA E NO HEPATOPÂNCREAS 117
4.4. ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS 120
5. CONCLUSÃO 122
6. AGRADECIMENTOS 123
7. REFERÊNCIAS 123
Como CsRV2 é estruturado geneticamente e morfologicamente? 133
CAPÍTULO III - INFECÇÕES VIRAIS EM *Callinectes danae* (CRUSTACEA, PORTUNIDAE): CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA E GENÉTICA DE CsRV2 E A DESCOBERTA DE UM NOVO BUNYAVIRUS[1] 134
RESUMO 134
1. INTRODUÇÃO 135
2. MATERIAL E MÉTODOS 137
2.1. COLETA E MANUTENÇÃO DOS SIRIS 137
2.2. HISTOLOGIA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA 138
2.3. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO RNA VIRAL 139
2.4. SEQUENCIAMENTO DO GENOMA 140
2.5. ANÁLISE FILOGENÉTICA 141
3. RESULTADOS 141
3.1. SEQUENCIAMENTO, MONTAGEM E ANOTAÇÃO DO GENOMA DE *Callinectes sapidus* REOVIRUS 2 EM *C. danae* 141
3.2. FILOGENIA DE *Callinectes sapidus* REOVIRUS 2 EM *C. danae* 143
3.3. VARIAÇÃO DO GENOMA DE CsRV2 147

3.4. SEQUENCIAMENTO, MONTAGEM E ANOTAÇÃO DO GENOMA DE *Callinectes danae* PORTUNIBUNYAVIRUS 1 EM *C. danae* 149
3.5. FILOGENIA DE *Callinectes danae* PORTUNIBUNYAVIRUS 1 EM *C. danae* 150
3.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA 153
3.7. HISTOPATOLOGIA 155
4. DISCUSSÃO 158
4.1. *Callinectes sapidus* REOVIRUS 2 EM *C. danae* 158
4.2. *Callinectes danae* PORTUNIBUNYAVIRUS 1 EM *C. danae* 160
4.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA E HISTOPATOLOGIA 161
4.4. POTENCIAIS IMPACTOS DA INFECÇÃO POR CsRV2 E CdPBV1 EM *C. danae* 165
5. CONCLUSÃO 166
6. AGRADECIMENTOS 167
7. REFERÊNCIAS 167
Infecções experimentais de CsRV2 causam mortalidade em *Callinectes danae* em laboratório? 175
CAPÍTULO IV - PATOGENICIDADE DE CsRV2 E CdPBV1 EM *Callinectes danae*: UMA PREOCUPAÇÃO IMINENTE PARA A PRODUÇÃO DE SIRI-MOLE NO BRASIL[1] 176
RESUMO 176
1. INTRODUÇÃO 177
2. MATERIAL E MÉTODOS 180
2.1. COLETA, TRANSPORTE E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS 180
2.2. PREPARAÇÃO DO INÓCULO DE CSRV2 181
2.3. TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS 182
2.4. EXTRAÇÃO DE RNA 183
2.5. DESENHO DE PRIMERS E ENSAIO RT-qPCR PARA CsRV2 184
2.6. RT-PCR END-POINT PARA DETECÇÃO DE CdPBV1 185
2.7. FLUXO DE AMÔNIA TOTAL 186
2.8. TAXA DE CONSUMO DE OXIGÊNIO ($\dot{M}O_2$) 186

2.9. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL 187
2.10. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HEMÓCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO 188
2.11. ANÁLISE DE DADOS 188
3. RESULTADOS 190
3.1. QUANTIFICAÇÃO DE CsRV2 POR RT-qPCR 190
3.2. MORTALIDADE 191
3.3. PRESENÇA DE CdPBV1 POR RT-PCR 194
3.4. AVALIAÇÃO METABÓLICA 196
3.5. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL 198
3.6. AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA 199
4. DISCUSSÃO 201
5. CONCLUSÃO 208
6. AGRADECIMENTOS 209
7. REFERÊNCIAS 209
Como divulgar para a comunidade não-científica os resultados obtidos durante os estudos? 218
CONSIDERAÇÕES FINAIS 230
ANEXOS 232

APRESENTAÇÃO GERAL

O presente trabalho está inserido em uma linha de pesquisa do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais, GIA, que visa a geração de dados e informações voltados ao desenvolvimento de tecnologias para a produção de siri-mole em larga escala no Brasil. O estudo foi motivado principalmente pelo potencial da produção do siri-mole destinado à alimentação, mas principalmente como uma atividade econômica que poderá beneficiar diretamente a população de pescadores do litoral paranaense.

O termo siri-mole se refere ao siri recém-mudado e ainda coberto por um tegumento flexível e macio, uma característica que permite que seja consumido praticamente inteiro, sendo considerada uma iguaria gastronômica de alto valor econômico. A produção de siri-mole desperta o interesse de investidores brasileiros e internacionais justamente por gerar um produto de alto valor de mercado, bastante demandado e apreciado pelos consumidores em todo o mundo (HUNGRIA; TAVARES; PEREIRA; SILVA *et al.*, 2017).

Por essas razões, a produção de siri-mole tornou-se, ao longo do tempo, uma atividade multimilionária, praticada principalmente nos Estados Unidos e em vários países asiáticos, caracterizando-se como uma das formas mais lucrativas de agregar valor à pesca do siri, além de ser uma importante fonte de emprego e renda em diversos países (TAVARES; SILVA; PEREIRA; OSTRENSKY, 2018). No entanto, apesar de ser uma atividade altamente lucrativa, existem alguns gargalos na produção que precisam ser superados. O principal deles é a alta taxa de mortalidade - que pode afetar até 50% dos animais mantidos em cultivo –, que resulta em perda de tempo e esforço para os pescadores e produtores e, principalmente, perda de recursos pesqueiros (SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.*, 2019).

Várias são as causas já relatadas de mortandade de siris durante o processo produtivo de siris-moles, incluindo a baixa qualidade da água nos sistemas de produção (HOCHHEIMER, 1988; LAKSHMI; TRIGG; PERRY; VENKATARAMIAH, 1984); o estresse

causado pela coleta e transporte dos animais (CHAVES; EGGLESTON, 2003); e o estresse fisiológico associado ao processo de muda (DEFUR; NUSBAUMER; LEWIS, 1988). Mas, nos últimos anos, os episódios de elevada e rápida mortalidade de siris em cativeiro têm sido atribuídos à infecção por organismos patogênicos, especialmente vírus (BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010; ROGERS; TAYLOR; HAWKE; ANDERSON LIVELY, 2015; SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.*, 2019).

No Brasil, são raras as informações sobre patógenos virais em siris. Os únicos vírus já registrados em siris são o *Callinectes sapidus* Reo-like Vírus 1 (CsRV1) e, mais recentemente, o *Callinectes sapidus* Reo-like Vírus 2 (CsRV2), ambos vírus de RNA pertencentes à família *Reoviridae* e que foram detectados em *C. sapidus* coletados no Rio Grande do Sul (FLOWERS; BACHVAROFF; WARG; NEILL *et al.*, 2016; ZHAO; FLOWERS; SCHOTT, 2021). Embora o CsRV1 seja um reovírus bem conhecido pelos pesquisadores e aquicultores norte-americanos, pois tem sido associado a episódios agudos de mortandade de siris nos Estados Unidos (BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010; SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.*, 2019; ZHAO; TAVARES; SCHOTT, 2021), nenhum estudo havia sido realizado até aqui para avaliar a presença de quaisquer vírus ou seus potenciais efeitos na sobrevivência de siris mantidos em cativeiro no Brasil.

Neste contexto, ao longo dos seis anos de pesquisas desenvolvidas pelo Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), ficou evidente que, para que a indústria de produção de siri-mole atinja uma escala comercial significativa no Paraná ou mesmo no Brasil, será necessário primeiramente compreender adequadamente as reais causas da perda de animais em cultivo. Somente tal conhecimento permitirá que sejam desenvolvidas estratégias assertivas para superar esse gargalo e promover a otimização e o uso mais eficiente de todo e qualquer recurso empregado no processo produtivo de siris-moles no país.

O principal objetivo desta tese foi analisar a presença de vírus de RNA e os efeitos da infecção em *C. danae*, uma espécie de siri-azul explorada pela nascente indústria brasileira de produção de siri-mole, em condições de laboratório. A Figura 1 apresenta as etapas de trabalho envolvidas nos cinco capítulos que compõem a tese, bem como as perguntas que foram respondidas em cada capítulo.

No Capítulo 1 foi realizada uma revisão sistemática dos dados sobre os patógenos virais que afetam técnica e economicamente a aquicultura dos crustáceos braquiúros no mundo, bem como os métodos de diagnóstico e controle das doenças causadas por esses patógenos. Além disso, foi elaborado um fluxograma para auxiliar, em estudos sequentes, o diagnóstico dos principais vírus que afetam o cultivo de siris.

No Capítulo 2 foi investigado se o CsRV1, um reovírus fatal para *C. sapidus* em cultivo, ou qualquer outro vírus estaria associado à mortandade de *C. danae* mantidos em um sistema local de recirculação. Além disso, foi avaliado se os siris infectados por vírus exibem alterações metabólicas ou comportamentais que poderiam ser usadas para identificar a infecção. Neste capítulo, o CsRV2 foi registrado pela primeira vez em *C. danae* por meio da visualização das bandas de dsRNA por meio de eletroforese.

No Capítulo 3, por meio do sequenciamento de nova geração, é descrita a sequência do genoma de CsRV2 e relatada a descoberta de um novo bunyavírus putativo infectando *C. danae* coletados na baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. Também, é apresentada a filogenia e similaridade de genes em relação a outros reovírus e bunyavírus que infectam crustáceos. O estudo ainda apresenta os resultados das abordagens diagnósticas tradicionais – através de histopatologia e microscopia eletrônica de transmissão - para ambos os vírus.

O objetivo do capítulo 4 foi o de avaliar, *in vivo*, a patogenicidade de CsRV2 em *C. danae*, bem como os efeitos da infecção sobre indicadores de atividade metabólica, imunológicos e comportamentais no hospedeiro após infecção experimental via injeção

intramuscular. No decorrer do estudo foi detectada a presença de CdPBV1 nos animais que foram desafiados com CsRV2, o que proporcionou uma compreensão mais abrangente dos efeitos da coinfecção por CsRV2 e CdPBV1.

Por fim, no Capítulo 5 foi elaborado um texto de divulgação científica contendo os principais resultados obtidos na presente tese. O objetivo será utilizar esse texto para divulgar o conhecimento científico gerado para a comunidade não acadêmica, usando para isso uma linguagem simples, direta e de fácil compreensão.

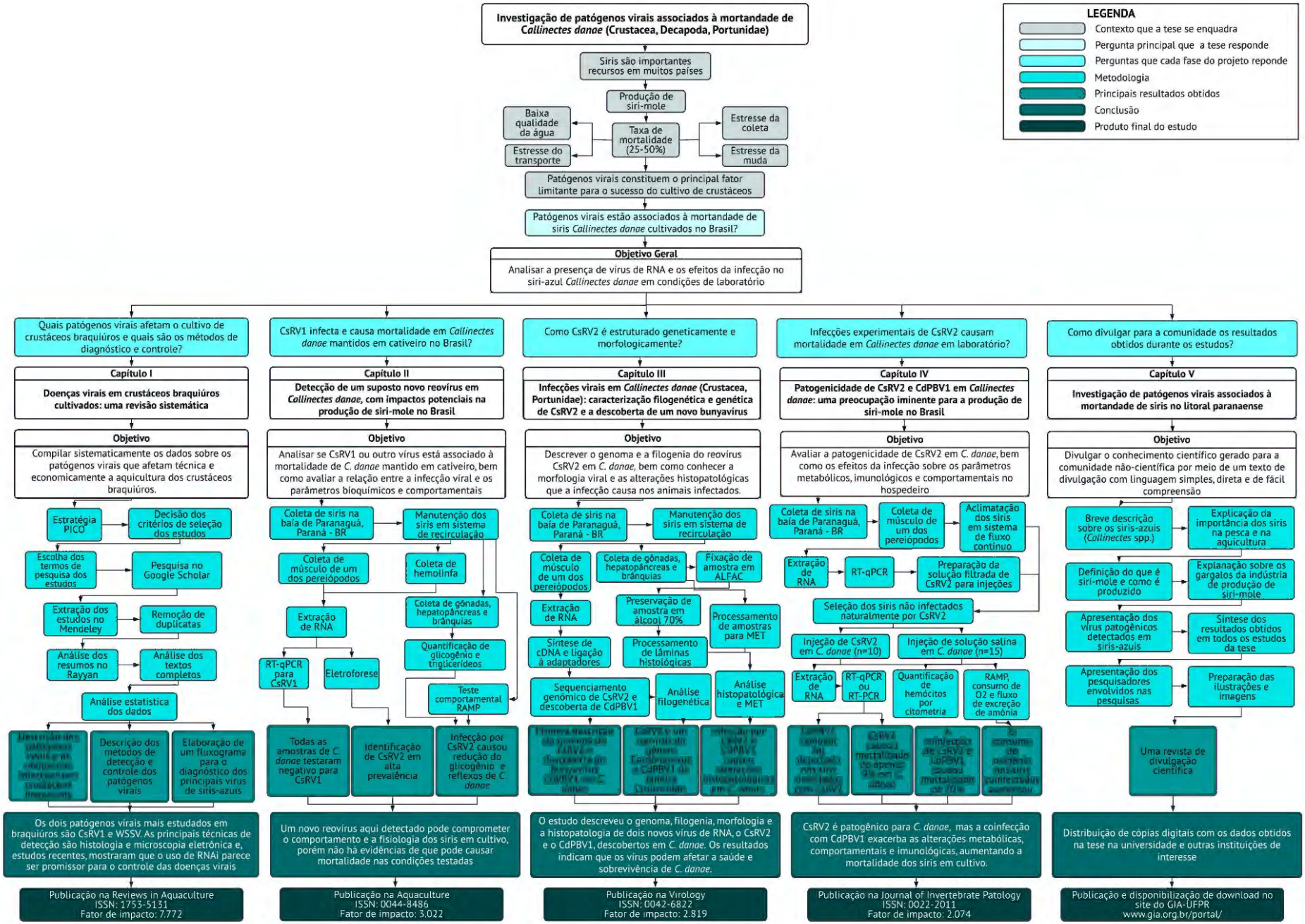


Figura 1. Fluxograma das etapas de elaboração da tese, incluindo as perguntas que foram respondidas em cada capítulo.

REFERÊNCIAS

BOWERS, H. A.; MESSICK, G. A.; HANIF, A.; JAGUS, R.; CARRION, L.; ZMORA, O.; SCHOTT, E. J. Physicochemical properties of double-stranded RNA used to discover a reo-like virus from blue crab *Callinectes sapidus*. **Diseases of Aquatic Organisms**, 93, n. 1, p. 17-29, 2010. 10.3354/dao02280

CHAVES, J. C.; EGGLESTON, D. B. Blue crab mortality in the North Carolina soft-shell industry: Biological and operational effects. **Journal of Shellfish Research**, 22, p. 241-250, 2003.

DEFUR, P. L.; NUSBAUMER, D.; LEWIS, R. J. Physiological aspects of molting in blue crabs from the tidal fresh-water Potomac River, Virginia. **Journal of Crustacean Biology**, 8, n. 1, p. 12-19, 1988. https://doi.org/10.1163/193724088X00026

FLOWERS, E. M.; BACHVAROFF, T. R.; WARG, J. V.; NEILL, J. D.; KILLIAN, M. L.; VINAGRE, A. S.; BROWN, S.; ALMEIDA, A. S.; SCHOTT, E. J. Genome sequence analysis of csrv1: a pathogenic reovirus that infects the blue crab *Callinectes sapidus* across its trans-hemispheric range. **Frontiers in Microbiology**, 7, n. e82202, 2016. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00126

HOCHHEIMER, J. **Water quality in soft crab shedding**. College Park, MD, USA.: University of Maryland, Sea Grant Extension Program, 1988. 6 p.

HUNGRIA, D. B.; TAVARES, C. P. S.; PEREIRA, L. Â.; SILVA, U. A. T.; OSTRENSKY, A. Global status of production and commercialization of soft-shell crabs. **Aquaculture International** 25, n. 6, p. 2213-2226, 2017. 10.1007/s10499-017-0183-5

LAKSHMI, G. J.; TRIGG, C. M.; PERRY, H. M.; VENKATARAMIAH, A. **The Effect of ammonia accumulation on blue crab shedding success: final report, March, 1983 through December, 1983**. Ocean Springs, Miss.: Gulf Coast Research Laboratory, 1984.

ROGERS, H. A.; TAYLOR, S. S.; HAWKE, J. P.; ANDERSON LIVELY, J. A. Variations in prevalence of viral, bacterial, and rhizocephalan diseases and parasites of the blue crab (*Callinectes sapidus*). **Journal of Invertebrate Pathology**, 127, p. 54-62, 2015. https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.03.002

SPITZNAGEL, M. I.; SMALL, H. J.; LIVELY, J. A.; SHIELDS, J. D.; SCHOTT, E. J. Investigating risk factors for mortality and reovirus infection in aquaculture production of soft-shell blue crabs (*Callinectes sapidus*). **Aquaculture**, 502, p. 289-295, 2019. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.051

TAVARES, C. P. S.; SILVA, U. A. T.; PEREIRA, L. A.; OSTRENSKY, A. Systems and techniques used in the culture of soft-shell swimming crabs. **Reviews in Aquaculture**, 10, n. 4, p. 913-923, 2018. https://doi.org/10.1111/raq.12207

ZHAO, M.; FLOWERS, E. M.; SCHOTT, E. J. Near-complete sequence of a highly divergent reovirus genome recovered from *Callinectes sapidus*. **Microbiology Resource Announcements**, 10, n. 1, p. e01278-01220, 2021. 10.1128/mra.01278-20

ZHAO, M.; TAVARES, C. P. d. S.; SCHOTT, E. J. Diversity and classification of reoviruses in crustaceans: A proposal. **Journal of Invertebrate Pathology**, p. 107568, 2021/03/10/ 2021. https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107568

Pergunta 1

Quais patógenos virais afetam o cultivo de crustáceos braquiúros e quais são os métodos de diagnóstico e controle?

CAPÍTULO I - DOENÇAS VIRAIS EM CRUSTÁCEOS BRAQUIÚROS CULTIVADOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA[1]

Camila Prestes dos Santos Tavares[1,2], Ubiratan de Assis Teixeira da Silva[2] e Antonio Ostrensky[2]

[1]Programa de Pós-graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Departamento de Zoologia, Curitiba, Paraná, Brasil. CEP: 80035-050. Telefone: +55 41 33505634. E-mail: camilatavares@ufpr.br

[2]Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), Universidade Federal do Paraná, Departamento de Zootecnia, Curitiba, Paraná, Brasil. CEP: 80035-050.

RESUMO

Os crustáceos braquiúros são distribuídos globalmente e são muito valorizados na aquicultura mundial. Infecções virais são limitantes para a sobrevivência destes animais e, consequentemente, para o sucesso dos cultivos em escala comercial. No presente estudo realizamos uma revisão sistemática de dados relacionados aos patógenos virais, particularmente aqueles que afetam técnica e economicamente a aquicultura de crustáceos braquiúros, bem como dos métodos de diagnóstico e controle das doenças causadas por esses patógenos. Nos estudos publicados (n=73) entre 1977 e junho de 2020, foram registradas 32 espécies de vírus, das quais os mais estudados foram relacionados à família *Reoviridae* (36%) e *Nimaviridae* (33%), com destaque para o CsRV1 (20%) e WSSV (48%). As maiores taxas de mortalidade em eventos agudos foram reportadas em ensaios experimentais com o siri-azul *Callinectes sapidus* infectado por CsRV1 ou WSSV e com o siri-da-lama *Scylla* spp. infectado por MCRV, MCDV, MCTV ou WSSV. As técnicas mais utilizadas no diagnóstico da presença de patógenos virais são a microscopia eletrônica de transmissão (38,4%) e a histopatologia (34,2%). No entanto, o uso de ferramentas moleculares, como a PCR e suas variações, tem aumentado nos últimos anos para facilitar o diagnóstico em crustáceos braquiúros. Por fim, as melhorias no manejo de cultivo e o uso de terapia de RNAi e de substâncias extraídas de plantas têm sido estudados e fornecem valiosas informações para nortear futuras estratégias de mitigação e controle de infecções virais na aquicultura de crustáceos braquiúros.

Palavras-chave: *Reoviridae*, *Nimaviridae*, Crustáceos, Mortalidade, Aquicultura

1. INTRODUÇÃO

Segundo estimativas da Organização das Nações Unidas (ONU, 2019), a população mundial chegará a 9,7 bilhões de pessoas em 2050, o que representa 25% de aumento em comparação com 2020. Alimentar essa população é um contínuo desafio. De acordo com os dados da FAO (FAO, 2020), entre 1986 e 2018 a produção aquícola mundial teve um

[1]Artigo elaborado para submissão ao Reviews in Aquaculture - ISSN:1753-5131

crescimento médio anual de 7,22%, enquanto o crescimento da produção pesqueira foi de apenas 1,32%. A aquicultura continua sendo a atividade com maior taxa de crescimento na produção mundial de alimentos de origem animal mas, além de aumentar a produtividade dos cultivos, garantir a sustentabilidade das atividades aquícolas é crucial para atender da demanda futura por alimento (SHIELDS, 2003).

Os crustáceos braquiúros são distribuídos globalmente e são importantes recursos pesqueiros em muitos países, com capturas anuais de cerca de 2 milhões de toneladas em todo o mundo entre 2010 e 2018 (FAO, 2020). Diversos siris e caranguejos também são altamente valorizados como espécies para a aquicultura. Cerca de 1,2 milhões de toneladas desses organismos foram produzidas no mundo, com um aumento na produção de cerca de 34% nos últimos 10 anos e gerando um valor global de produção estimado, em 2019, em 12 milhões de dólares (FAO, 2020). Além do cultivo de crustáceos braquiúros de casca-dura, existe uma indústria significativa e crescente de produção de siris-moles, que são animais recém-mudados e ainda cobertos por um tegumento mole, uma característica que permite que sejam consumidos inteiros, tornando-se uma iguaria gastronômica de alto valor (HUNGRIA; TAVARES; PEREIRA; SILVA *et al.*, 2017; TAVARES; SILVA; PEREIRA; OSTRENSKY, 2018).

Um dos grandes desafios para a sustentabilidade dos cultivos de crustáceos braquiúros é de ordem sanitária, uma vez que os organismos podem ser infectados e mortos por um amplo espectro de microrganismos patogênicos, incluindo protozoários (SHIELDS, 2000; STENTIFORD; SHIELDS, 2005), bactérias (THIBODEAUX; BURNETT; BURNETT, 2009) e fungos (SHIELDS; OVERSTREET, 2003). Porém, são os patógenos virais o principal grupo de agentes infeciosos limitantes para a sobrevivência de siris e caranguejos e para o sucesso de seu cultivo em escala comercial (KENNEDY; CRONIN, 2007; PERAZZOLO; ROSA; BARRACCO, 2012; SHIELDS; OVERSTREET, 2007). Dados gerados em diferentes estados norte-americanos sugerem que a mortalidade de siris,

causadas por um único agente viral em instalações de produção de siri-mole, pode causar perdas econômicas de mais de 2 milhões de dólares (SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.*, 2019).

Assim, o conhecimento detalhado sobre os patógenos virais que infectam os crustáceos braquiúros é fundamental para o planejamento dos investimentos e desenvolvimento de estratégias de mitigação dos impactos das infecções virais na aquicultura (SHIELDS, 2003; SHIELDS; OVERSTREET, 2003). O objetivo do presente artigo de revisão foi compilar sistematicamente os dados sobre patógenos virais que afetam técnica e economicamente a aquicultura dos crustáceos braquiúros, bem como os métodos de diagnóstico e controle das doenças causadas por esses patógenos. Além disso, elaborar um fluxograma para auxiliar no diagnóstico de possíveis manifestações virais em crustáceos braquiúros em cultivo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A revisão teve início com a elaboração de duas perguntas, baseadas na estratégia PICO (Population, Intervention, Comparison and Outcome): “Quais são os patógenos virais e seus efeitos em crustáceos braquiúros cultivados?” e “Como identificar e controlar os patógenos virais em crustáceos braquiúros cultivados?”. O acrônimo PICO utilizado para elaboração das perguntas que serviram de base para a pesquisa foi baseado no modelo utilizado na Prática Baseada em Evidências (PBE) e recomendado para revisões sistemáticas (SANTOS; PIMENTA; NOBRE, 2007). A revisão sistemática da literatura foi conduzida de acordo com as diretrizes PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-analysis) (MOHER; SHAMSEER; CLARKE; GHERSI *et al.*, 2015), tendo o Google Scholar como plataforma de pesquisa. O protocolo para obtenção das referências bibliográficas foi aplicado em quatro fases: 1) Escolha dos termos de busca; 2) Pré-identificação; 3) Seleção; e 4) Elegibilidade (Figura 2).

2.1. SELEÇÃO DOS TERMOS PARA A BUSCA DOS ESTUDOS

Para a escolha dos termos apropriados para a busca na plataforma de pesquisa, foi realizada uma busca inicial para identificar os principais gêneros de crustáceos braquiúros que são cultivados na aquicultura mundial, a partir dos termos listados no grupo I da Tabela 1. A biblioteca gerada na pesquisa, foi analisada utilizando o programa R Studio e o pacote de código aberto Bibliometrix R (Aria and Cuccurullo, 2017), que fornecem um conjunto de ferramentas para pesquisa quantitativa bibliométrica (R CoreTEAM, 2020). A nuvem contendo as 100 palavras mais citadas nas referências bibliográficas destacou cinco gêneros de crustáceos braquiúros: *Eriocheir*, *Scylla*, *Callinectes*, *Portunus* e *Carcinus*. A confiabilidade da informação foi confirmada utilizando o banco de dados da FAO Fisheries and Aquaculture Department, que contém estatísticas sobre a produção global da aquicultura entre 1950 e 2018 (FAO, 2020).

Tabela 1. Termos utilizados para a busca das referências bibliográficas relacionadas a patógenos virais em crustáceos braquiúros cultiváveis. O grupo I foi utilizado para determinar os termos mais apropriados baseados nos gêneros de crustáceos braquiúros cultivados. O grupo II inclui os termos escolhidos para a pesquisa e seleção da bibliografia.

Grupo	Combinações de termos	Número de resultados no Google scholar
I	crab AND aquaculture	80.000
II	callinectes OR scylla OR portunus OR carcinus OR eriocheir AND aquaculture AND virus	8.190

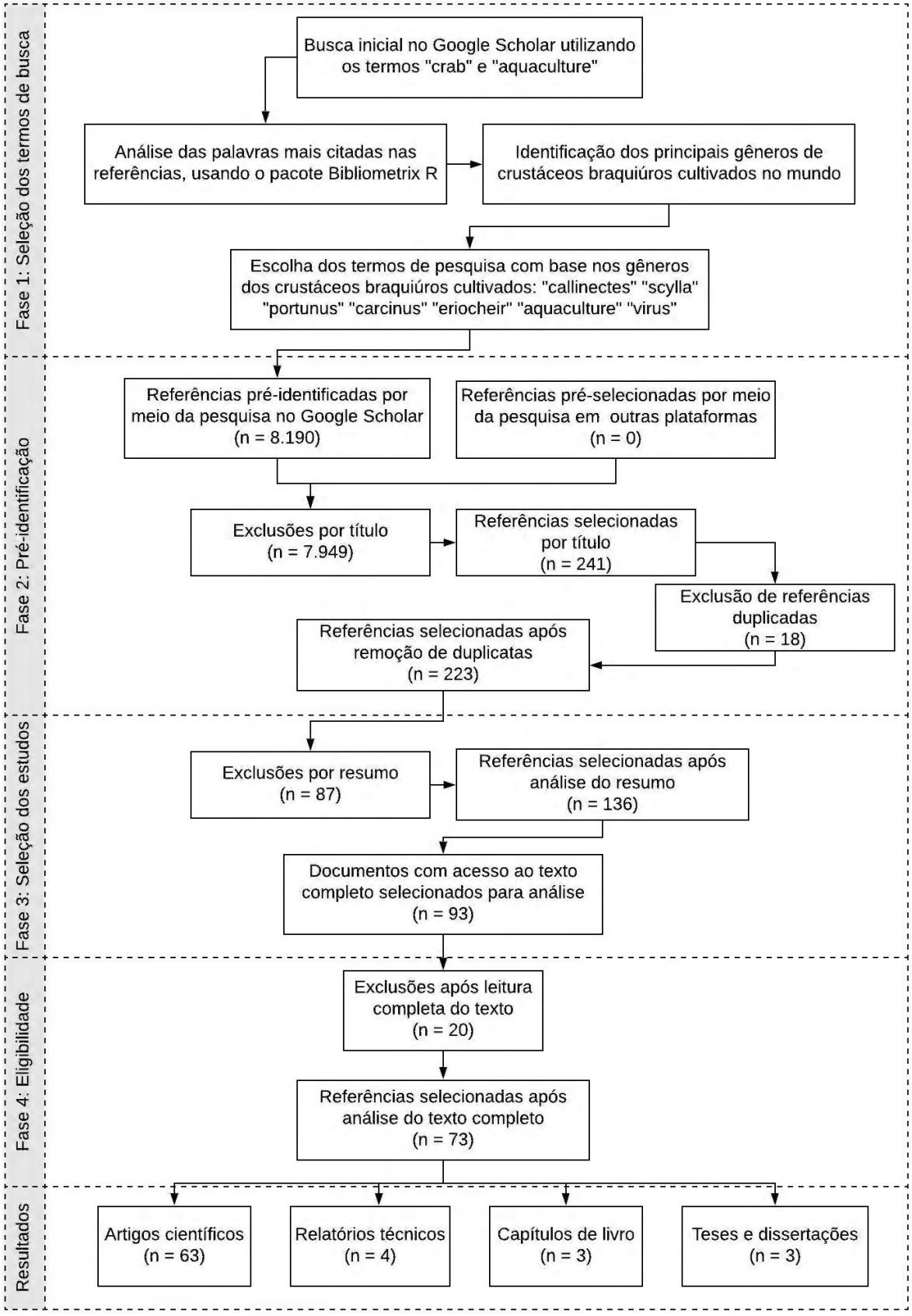


Figura 2. Fluxograma do protocolo para a busca e obtenção das referências bibliográficas analisadas na revisão sistemática, com base nas diretrizes PRISMA, aplicado para a compilação dos dados sobre os patógenos virais que afetam o cultivo de crustáceos braquiúros, bem como dos métodos de diagnóstico e controle das doenças causadas por esses patógenos.

2.2. SELEÇÃO E IMPORTAÇÃO DOS DOCUMENTOS

Após determinar os termos apropriados para a pesquisa bibliográfica, a segunda fase do protocolo consistiu na busca pelos artigos científicos, livros, capítulos de livros, teses e relatórios publicados até junho de 2020, que apresentavam em seu título, resumo e palavras-chave os termos listados no grupo II da Tabela 1. A pesquisa, usando a combinação dos termos, identificou o total de 8.190 documentos. O título dos documentos obtidos na busca foi avaliado de acordo com (1) a abordagem de patógenos virais nos crustáceos braquiúros cultivados; (2) a detecção dos patógenos virais em crustáceos braquiúros cultivados; (3) as informações sobre os métodos de controle dos efeitos dos patógenos virais em crustáceos braquiúros. Não houve restrição de idioma na seleção dos estudos.

Entre os documentos obtidos na pesquisa, 241 documentos foram pré-selecionados pelo título, com base nos critérios de inclusão e exclusão. Após a seleção das referências pelo título, todas as referências bibliográficas e os documentos em formato Portable Document Format (PDF) foram importados por meio do gerenciador automático de referências Mendeley 1.19.2 (Elsevier, Holanda). As referências importadas foram checadas e as duplicadas removidas.

Na terceira fase, o resumo de cada referência bibliográfica foi cuidadosamente analisado com auxílio do aplicativo Rayyan QCRI (MOURAD; HOSSAM; ZBYS; AHMED, 2016). A elegibilidade dos trabalhos foram determinados independentemente por dois coautores desse levantamento bibliográfico, que resolveram entre si as dissonâncias. Os critérios de inclusão envolveram: (1) a população do estudo: crustáceos braquiúros cultivados (incluindo estágios larvais e juvenil); (2) desenho do estudo: estudos coorte prospectivos ou retrospectivos, estudos de caso-controle, ensaios clínicos randomizados e estudos descritivos. Os critérios de exclusão foram: (1) estudos sobre outros grupos de crustáceo, como camarões e lagostas; (2) estudos sobre crustáceos braquiúros não

cultivados; (3) estudos que não relataram infecções virais em crustáceos braquiúros cultivados, e (4) artigos de revisão e meta-análises.

Após leitura dos resumos, o número de documentos de interesse foi reduzido para 136. No caso de livros e capítulos de livros, que não possuíam um resumo estruturado, foi avaliada a relevância dos temas abordados pelos autores. A quarta fase do protocolo, consistiu na leitura integral dos estudos com acesso ao documento completo. Após a leitura completa dos textos, de acordo com a abordagem e o desenho do estudo, 73 documentos (incluindo artigos científicos, capítulos de livro, relatórios técnicos, teses e dissertações) foram selecionados por atenderem aos objetivos desta revisão.

2.3. FLUXOGRAMA

Com base nas publicações selecionadas na revisão sistemática, um banco de dados foi criado e organizado usando o Excel®, contendo informações sobre os sinais clínicos e as alterações causadas pelos principais agentes virais que afetam *Callinectes sapidus*. A partir disso, um fluxograma para o diagnóstico das principais doenças virais foi construído com auxílio do aplicativo de diagramação Lucidchart (LUCIDCHART, 2020). O fluxograma contemplou apenas os principais vírus que acometem *C. sapidus*, dada sua ampla distribuição geográfica em relação a outros braquiúros (MELO, 1996; WILLIAMS, 1974) e, principalmente, por ser a principal espécie explorada no cultivo de siri-mole nas Américas (HUNGRIA; DOS SANTOS TAVARES; PEREIRA; DE ASSIS TEIXEIRA SILVA *et al.*, 2017; TAVARES; SILVA; PEREIRA; OSTRENSKY, 2018).

2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os documentos em formato PDF, selecionados ao final do protocolo, foram analisados através do programa R Studio e o pacote de código aberto Bibliometrix R (Aria and Cuccurullo, 2017), para observação das palavras mais utilizadas pelos respectivos autores nos textos selecionados. Foi realizada uma análise de correlação envolvendo todas as principais palavras utilizadas pelos autores em cada documento, a partir de algoritmos

específicos. Para isso, foram selecionadas as palavras com frequência de ocorrência ≥ 0,03% do número total de palavras em cada texto. Em seguida, cada palavra foi correlacionada a todas as outras palavras pelo coeficiente Phi (ϕ), que corresponde ao coeficiente de correlação de Pearson para variáveis dicotômicas, calculado a partir da seguinte fórmula:

$$\phi = \frac{n_{11}n_{00} - n_{10}n_{01}}{\sqrt{n_{1\cdot}n_{0\cdot}n_{\cdot 0}n_{\cdot 1}}}$$

Onde: n_{11} indica o número de documentos nos quais duas palavras (x e y) apareceram juntas; n_{00} o número de documentos em que nenhuma das duas palavras foi citada; n_{10} e n_{01} o número de documentos em que apenas uma das palavras foi citada (Tabela 2). Somente as palavras que apresentaram Φ ≥ 0,7 foram consideradas.

Tabela 2. Síntese conceitual do algoritmo utilizado para analisar a correlação entre palavras nos textos analisados.

	Contém a palavra 'Y'	**Não contém a palavra 'Y'**
Contém a palavra 'X'	n_{11}	n_{10}
Não contém a palavra 'X'	n_{01}	n_{00}

3. RESULTADOS

3.1. PRINCIPAIS PATÓGENOS DE CRUSTÁCEOS BRAQUIÚROS

A Tabela 3 mostra todas as espécies de vírus identificadas em crustáceos braquiúros de interesse comercial na aquicultura entre 1977 e 2020. Foram registradas 32 espécies de vírus, das quais nove foram relacionadas à família *Reoviridae*, sete à família *Baculoviridae*, cinco à *Rhabdoviridae*, duas à *Bunyaviridae*, *Dicistroviridae* e *Parvoviridae* e um único membro foi relacionado às famílias *Herpesviridae*, *Nimaviridae*, *Roniviridae*, *Tombusviridae* e *Picornaviridae*.

Entre os 73 estudos analisados, as famílias virais mais estudadas foram *Reoviridae* (36%) e *Nimaviridae* (33%), com destaque para o *Callinectes sapidus* reovirus 1 (CsRV1) e o vírus da síndrome da mancha branca (White Spot Syndrome Vírus - WSSV), representados por cerca de 20 e 48% dos estudos, respectivamente. Já, os membros da família *Baculoviridae*, *Bunyaviridae*, *Dicistroviridae*, *Parvorividae*, *Roniviridae* e *Tombusviridae* foram registrados uma única vez e não foram mais estudados.

As espécies de crustáceos braquiúros mais estudadas foram o siri-azul *Callinectes sapidus* (59%) e o siri-da-lama *Scylla serrata* (33%), ambas espécies de grande importância para aquicultura norte-americana e asiática. Além disso, a maioria dos estudos sobre patógenos virais em crustáceos braquiúros foram realizados nos Estados Unidos (30%), China (33%), Índia (10%) e Austrália (5%). Embora os crustáceos braquiúros sejam considerados um importante recurso pesqueiro e aquícola em países da América do Sul, ainda pouco se sabe sobre patógenos virais que infectam esses organismos no continente.

Tabela 3. Vírus que infectam crustáceos braquiúros de importância para a aquicultura mundial.

Família	Espécie	Abreviação	Genoma	Hospedeiro	Referência
Reoviridae	*Callinectes sapidus* Reovirus virus 1	CsRV1	dsRNA	*Callinectes sapidus*	(BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010; CHUNG, J. SOOK; PITULA, J. S.; SCHOTT, E.; ALVAREZ, J. V. *et al.*, 2015; FLOWERS; BACHVAROFF; WARG; NEILL *et al.*, 2016; FLOWERS; JOHNSON; AGUILAR; SCHOTT, 2018; JOHNSON, 1977; JOHNSON, 1983; MESSICK, 1998; MESSICK; SINDERMANN, 1992; ROGERS; TAYLOR; HAWKE; ANDERSON LIVELY, 2015; ROGERS; TAYLOR; HAWKE; SCHOTT *et al.*, 2015; SHIELDS, 2003; SHIELDS; OVERSTREET, 2003; SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.*, 2019; TANG; MESSICK; PANTOJA; REDMAN *et al.*, 2011)
	Eriocheir sinensis reovirus 905	EsRV 905		*Eriocheir sinensis*	(ZHANG; ZHANG; HUANG; BONAMI *et al.*, 2002)
	Eriocheir sinensis reovirus 816	EsRV 816		*Eriocheir sinensis*	(ZHANG; ZHANG; HUANG; BONAMI *et al.*, 2002)
	Eriocheir sinensis reovirus WX-2012	EsRV WX-2012		*Eriocheir sinensis*	(MA; DAI; SERWADDA; SHEN, 2016; SHEN; MA; HU, 2015)
	Gill Virus de *Carcinus mediterraneus*			*Carcinus mediterraneus*	(JOHNSON, 1983)
	Mud crab Reovirus ou *Scylla serrata* reovirus	MCRV ou SsRV		*Scylla serrata* e *Portunus trituberculatus*	(DENG; XU; HU; LI *et al.*, 2019; FAN; LIU; XU; YUAN *et al.*, 2017; FANG; LI; XU; ZHANG *et al.*, 2015; HUANG; DENG; LI; SU *et al.*, 2012; JITHENDRAN; POORNIMA; BALASUBRAMANIAN;

					KULASEKARAPANDIAN, 2009; WENG; GUO; SUN; CHAN *et al.*, 2007)
	Reo-like virus de *Carcinus mediterraneus*	RC84		*Carcinus mediterraneus*	(MARI; BONAMI, 1987)
	Swimming Crab Reovirus	SCRV		*Portunus trituberculatus*	(ZHANG; LI; LIU; ZHANG, 2015)
	W2 Virus	W2		*Carcinus mediterraneus*	(MARI; BONAMI, 1988b)
Rhabdoviridae	Y-Organ Virus de *Carcinus maenas*		ssRNA	*Carcinus maenas*	(JOHNSON, 1983)
	Rhabdo-like virus A	RhVA		*Callinectes sapidus*	(JOHNSON, 1983; SHIELDS, 2003; SHIELDS; OVERSTREET, 2003; YUDIN; CLARK, 1979)
	Rhabdo-like Virus B	RhVB		*Callinectes sapidus*	(JOHNSON, 1983; MESSICK; SINDERMANN, 1992; SHIELDS; OVERSTREET, 2003)
	Y-Organ Virus de *Carcinus mediterraneus*			*Carcinus mediterraneus*	(JOHNSON, 1983)
	Enveloped Helical Virus	EHV		*Callinectes sapidus*	(JOHNSON, 1983; MESSICK; SINDERMANN, 1992; SHIELDS; OVERSTREET, 2003)
Bunyaviridae	Crab Hemocytopenic Virus	CHV	ssRNA	*Carcinus maenas*	(JOHNSON, 1983)
	Carcinus maenas Portunusbunyavirus 1	CmPBV1		*Carcinus maenas*	(BOJKO; SUBRAMANIAM; WALTZEK; STENTIFORD *et al.*, 2019)
Dicistroviridae	Mud crab Dicistrovirus	MCDV	ssRNA	*Scylla paramamosain*	(GAO; LIU; HUANG; WANG *et al.*, 2019)
	Taura syndrome virus	TSV		*Scylla serrata*	(KIATPATHOMCHAI; JAROENRAM; ARUNRUT; GANGNONNGIW *et al.*, 2008)
Picornaviridae	Chesapeake Bay Virus	CBV	ssRNA	*Callinectes sapidus*	(JOHNSON, 1983; MESSICK; SINDERMANN, 1992; SHIELDS, 2003; SHIELDS; OVERSTREET, 2003)
Roniviridae	*Eriocheir sinensis* Ronivirus	EsRNV	ssRNA	*Eriocheir sinensis*	(ZHANG; BONAMI, 2007)
Tombusviridae	Mud Crab Tombus-like virus	MCTV	ssRNA	*Scylla paramamosain*	(GAO; LIU; HUANG; WANG *et al.*, 2019)

Herpesviridae	Bi-facies Virus	BFV	dsDNA	*Callinectes sapidus*	(JOHNSON, 1983; MESSICK; SINDERMANN, 1992; SHIELDS, 2003; SHIELDS; OVERSTREET, 2003)
Parvoviridae	Parvo-like Virus de *Carcinus mediterraneus*	PC84	dsDNA	*Carcinus mediterraneus*	(MARI; BONAMI, 1988a)
	Penaeus merguiensis Densovirus	PmergDNV		*Scylla serrata*	(OWENS; LIESSMANN; LA FAUCE; NYGUYEN *et al.*, 2010)
Baculoviridae	Baculovirus de *Carcinus maenas*		dsDNA	*Carcinus maenas*	(JOHNSON, 1983)
	Baculovirus A	Baculo-A		*Callinectes sapidus*	(JOHNSON, 1983; 1988; MESSICK; SINDERMANN, 1992; SHIELDS; OVERSTREET, 2003)
	Baculovirus B	Baculo-B		*Callinectes sapidus*	(JOHNSON, 1983; 1988; MESSICK; SINDERMANN, 1992; SHIELDS; OVERSTREET, 2003)
	Baculovirus do Hepatopancreas de *Carcinus mediterraneus*			*Carcinus mediterraneus*	(JOHNSON, 1983)
	Scylla Bacilliform Virus	SBV		*Scylla serrata*	(ANDERSON; PRIOR, 1992; LIESSMANN; OWENS; ZENG, 2005; OWENS; LIESSMANN; LA FAUCE; NYGUYEN *et al.*, 2010)
	Penaeid Rod-shaped DNA Virus	PRDV		*Portunus trituberculatus*	(MOMOYAMA; HIRAOKA; VENEGAS, 1999)
	Tau virus			*Carcinus mediterraneus*	(PAPPALARDO; MARI; BONAMI, 1986)
Nimaviridae	White Spot Syndrome Virus	WSSV	dsDNA	*Scylla tranquebarica*, *Scylla serrata*, *Scylla olivacea*, *Scylla paramamosain*, *Callinectes sapidus*, *Callinectes arcuatus*, *Callinectes danae, Cancer paguros*, *Carcinus maenas*,	(BATEMAN; TEW; FRENCH; HICKS *et al.*, 2012; CHANG; CHEN; WANG, 1998; COSTA; FRAGA; ZAMPARETTI; MARQUES *et al.*, 2012; DING; WANG; ZHU; PAN *et al.*, 2017; DING; YAO; ZHANG; WAN *et al.*, 2015; DING; CAO; ZHU; XU *et al.*, 2017; GALAVÍZ-SILVA; MOLINA-GARZA; ALCOCER-GONZÁLEZ; ROSALES-ENCINAS *et al.*, 2004; GUNASEKARAN; GOPALAKRISHNAN; DEIVASIGAMANI;

	Portunus pelagicus, *Portunus trituberculatus*, *Portunus sanguinolentus* e *Eriocheir sinensis*	SERALATHAN *et al.*, 2018; HARI, 2003; HUANG; HAN; WANG; REN, 2017; HUANG; WANG; XU; PAN *et al.*, 2018; IKA MAHARANI, 2005; JITHENDRAN; POORNIMA; BALASUBRAMANIAN; KULASEKARAPANDIAN, 2009; KONG; LIN; GONG; TRAN *et al.*, 2020; KOU; PENG; CHIU; LO, 1998; LAVILLA-PITOGO; DE LA PEÑA, 2004; LIN; HE; GONG; ZHANG *et al.*, 2020; LIU, W.; QIAN, D.; YAN, X. J., 2011; LO; HO; PENG; CHEN *et al.*, 1996; MA; TANG; LIN; GONG *et al.*, 2019; MENG; JANG; SEO; CHO, 2009; NORIZAN; HARRISON; HASSAN; MUSA *et al.*, 2019; POWELL; BROWDY; BURGE, 2015; RAJA; JITHENDRAN; RAJAN, 2019; RAJENDRAN; VIJAYAN; SANTIAGO; KROL, 1999; REN; LIN; KONG; GONG *et al.*, 2020; SHIELDS; OVERSTREET, 2003; SOMBOONNA; MANGKALANAN; UDOMPETCHARAPORN; KRITTANAI *et al.*, 2010; SUPAMATTAYA; HOFFMANN; BOONYARATPALIN; KANCHANAPHUM, 1998; VASEEHARAN; JAYAKUMAR; RAMASAMY, 2003; WAIKHOM; JOHN; GEORGE; JEYASEELAN, 2006; WANG; HONG; ZHU, 2020; WANG; LO; CHANG; KOU, 1998; WANG; SUN; ZHU, 2017; WANG; SUN; ZHU, 2018)

3.2. VÍRUS DE RNA

3.2.1. Vírus relacionados à família *Reoviridae*

Reoviridae é a maior e mais bem estudada família entre todas as famílias de vírus de RNA de fita dupla (dsRNA) (MERTENS, 2004). Partículas virais de reovírus têm simetria icosaédrica, com diâmetros de 60 a 85 nm e podem ser subdivididas em duas subfamílias, os vírus “turreted” e “non-turreted”, dependendo da existência ou não de projeções nos 12 vértices (ATTOUI; MERTENS; BECNEL; BELAGANAHALLI *et al.*, 2012). O genoma de dsRNA dos reovírus é segmentado e o número varia de 9 a 12 segmentos (ATTOUI; MERTENS; BECNEL; BELAGANAHALLI *et al.*, 2012). Além da classificação estrutural, o nível de divergência de sequência, principalmente nos segmentos de genoma e proteínas mais conservados são critérios importantes para a classificação de gêneros e espécies (FLOWERS; BACHVAROFF; WARG; NEILL *et al.*, 2016; ZHAO; TAVARES; SCHOTT, 2021).

Entre os 15 gêneros de reovírus, o único gênero que infecta crustáceos reconhecido pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) é o *Cardoreovirus,* com 12 segmentos de genoma e que infecta o caranguejo chinês *Eriocheir sinensis* (ATTOUI; MERTENS; BECNEL; BELAGANAHALLI *et al.*, 2012; WALKER; SIDDELL; LEFKOWITZ; MUSHEGIAN *et al.*, 2019; ZHANG; SHI; ZHANG; BONAMI, 2004). No entanto, desde a primeira descoberta de um reovírus no caranguejo marinho *Macropipus depurator,* em 1966 (VAGO, 1966), nove vírus semelhantes à reovírus foram relatados em cinco espécies de caranguejos e siris de importância para a aquicultura, entre eles oito reovírus impactam negativamente o cultivo dos animais: o W2, CsRV1, EsRV 905, EsRV 816, MCRV ou SsRV, SCRV, e o Vírus de brânquia de *Carcinus mediterraneus*.

3.2.1.1. W2

Cerca de 20 anos após a primeira descoberta de um reovírus em um invertebrado marinho, o reovírus W2 foi registrado em *C. mediterraneus* coletados na Lagoa Prevost e

ao longo da costa do Mediterrâneo, próximo a Montpellier, na França (MARI; BONAMI, 1987; 1988b). O vírus W2 possui forma paraesférica e não possui envelope, mede de 65 a 70 nm de diâmetro e forma estruturas virais incomuns (rosetas) no tecido conjuntivo do hepatopâncreas, trato digestivo, brânquias e hemócitos (MARI; BONAMI, 1988b). W2 é vírus de dsRNA de 12 segmentos com padrão eletroforético de 1/5/6 (MARI; BONAMI, 1988b). Durante os experimentos de MARI e BONAMI (1987) e MARI e BONAMI (1988b), os caranguejos infectados por W2 apresentaram sinais clínicos de doença, como letargia, perda de apetite, fraqueza e morreram após 20 dias de cultivo em um sistema de recirculação.

3.2.1.2. CsRV1

Ao mesmo tempo em que os primeiros reovírus foram descritos no Mediterrâneo, o reovírus patogênico RLV (Reo-like virus) foi identificado em *C. sapidus* coletados no Oceano Atlântico, ao longo da baía de Chesapeake em Maryland e da baía Chincoteague em Virginia, EUA (JOHNSON, 1977). Entre 2005 e 2007, o reovírus foi registrado novamente em *C. sapidus* capturados nos estuários da costa atlântica dos EUA e foi nomeado como *C. sapidus* reovirus (CsRV) (BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010; TANG; MESSICK; PANTOJA; REDMAN *et al.*, 2011). Mais recentemente, o CsRV foi renomeado como CsRV1 quando um segundo reovírus foi descoberto em *C. sapidus* coletado no sul do Brasil, provisoriamente denominado CsRV2 (FLOWERS; BACHVAROFF; WARG; NEILL *et al.*, 2016; ZHAO; FLOWERS; SCHOTT, 2021).

Nos últimos anos, o CsRV1 se tornou um dos principais problemas para a aquicultura de siris nos Estados Unidos, pois é uma das espécies associadas a episódios de elevada e rápida mortalidade de *C. sapidus* em sistemas de produção de siri-mole (SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.*, 2019). A Figura 3 mostra o resultado da análise de correlação realizada com base nos termos mais frequentes utilizados pelos autores e avaliados nos documentos selecionados por meio da aplicação da metodologia PRISMA.

Observou-se que os artigos selecionados enfocam principalmente os aspectos associados à presença do reovírus CsRV1 em *C. sapidus* em instalações de produção de siri-mole, principalmente nos estados de Maryland, Virgínia e Flórida. O reovírus foi registrado em mais de 50% dos siris mortos ou moribundos em sistemas de produção de siri-mole, porém estava presente em menos de 5% dos siris saudáveis e 7% dos siris-moles que realizaram a muda com sucesso (BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010; SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.*, 2019). Além disso, infecções experimentais de CsRV1 usando injeção intramuscular em *C. sapidus*, causaram 100% de mortalidade após 10 a 13 dias e resultaram no aparecimento de inclusões virais nos hemócitos (BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010; JOHNSON, 1977).

CsRV1 é um vírus não envelopado com cápside icosaédrica, mede aproximadamente 55 nm de diâmetro e os vírions são frequentemente associados a microtúbulos e estruturas microfilamentares, formando um arranjo paracristalino (BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010; JOHNSON, 1983; ZHAO; TAVARES; SCHOTT, 2021). O genoma de CsRV1 possui 12 segmentos de dsRNA, variando de 4,3 a 1,1 kb, com um padrão eletroforético de 1/5/6 (BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010). FLOWERS; BACHVAROFF; WARG; NEILL *et al.* (2016) sugerem que o CsRV1 pertence a um novo gênero da família *Reoviridae*, denominado *Crabreovirus*, que ainda não foi reconhecido pelo ICTV como gênero.

CsRV1 infecta tecidos de origem mesodérmica e ectodérmica, tais como os hemócitos, a epiderme, o sistema nervoso, o trato digestivo, as brânquias, o músculo e o hepatopâncreas, produzindo inclusões citoplasmáticas basofílicas, aumentando o volume celular (BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010; CHUNG, J. SOOK; PITULA, J. S.; SCHOTT, E.; ALVAREZ, J. V. *et al.*, 2015). Os hemócitos infectados invadem as células gliais dos gânglios cerebral e torácico, que se tornam necróticos (JOHNSON, 1977;

JOHNSON, 1984). Devido à necrose neuronal, os siris tornam-se lentos, exibem tremores e, eventualmente paralisia total (SHIELDS; OVERSTREET, 2007).

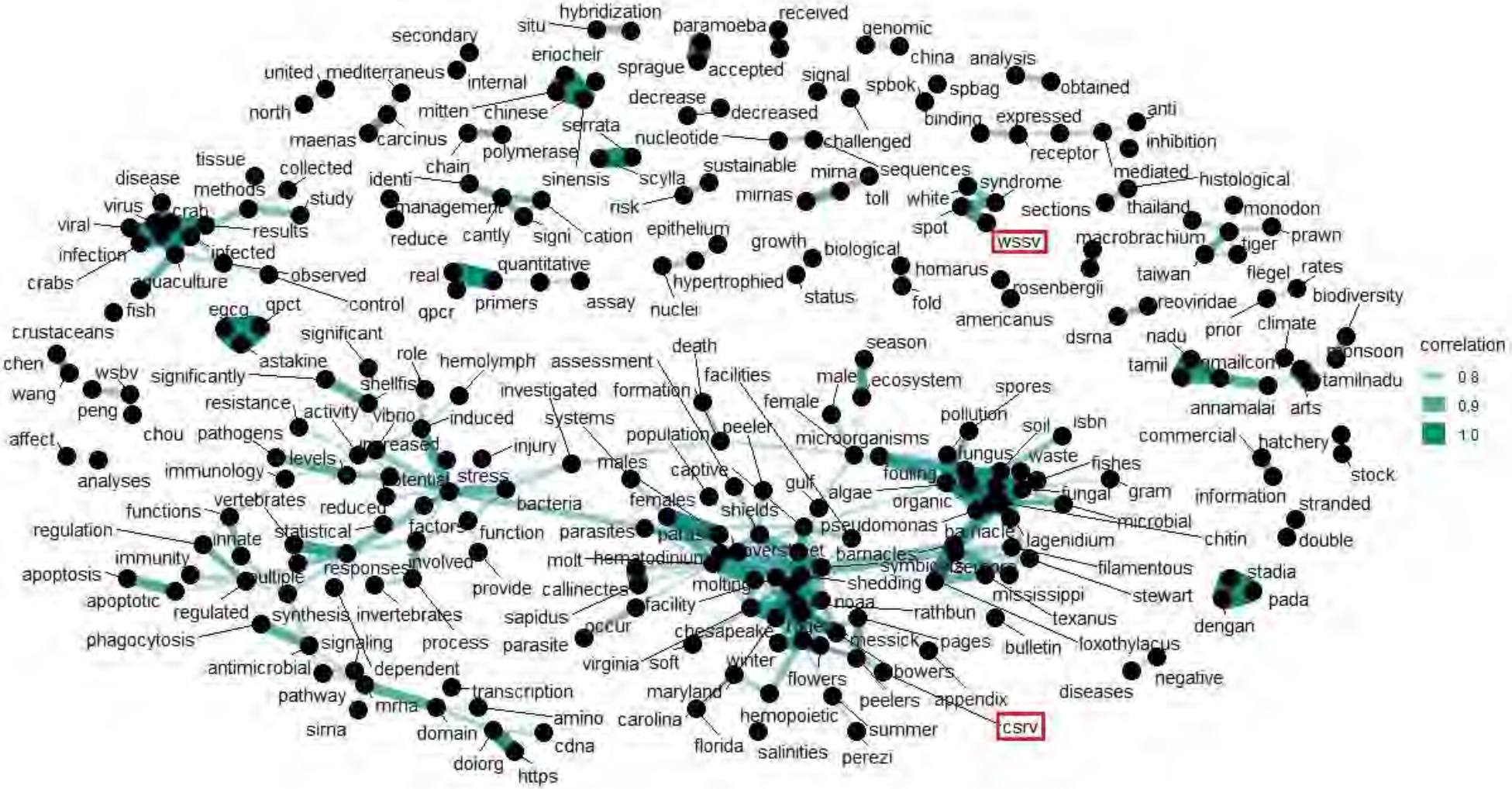


Figura 3. Principais termos usados (≥ 0,05%) e correlação Phi (Φ ≥ 0,7) entre eles, nos 73 principais documentos científicos sobre patógenos virais em crustáceos braquiúros publicados entre 1977 e junho de 2020. Note que os vírus mais citados nos documentos analisados são o vírus da mancha branca “WSSV” e o reovírus de *Callinectes sapidus* “CsRV”, ambos estão destacados em linhas vermelhas. Este último está correlacionado a termos que estão relacionados ao hospedeiro, locais onde este vírus foi detectado e os principais autores que publicaram as informações sobre o reovírus.

3.2.1.3. MCRV ou SsRV

Segundo ZHAO; TAVARES e SCHOTT (2021), metade dos reovírus que infectam crustáceos braquiúros foram identificados infectando siris de sistemas de cultivo na China, incluindo o Mud Crab Reovírus (MCRV), também chamado de *S. serrata* Reovírus (SsRV), que infecta o siri-da-lama *S. serrata* (DENG; LU; OU; SU *et al.*, 2012; HUANG; DENG; LI; SU *et al.*, 2012; WENG; GUO; SUN; CHAN *et al.*, 2007). A partícula viral de MCRV e SsRV é icosaédrica sem envelope, mede 70 nm de diâmetro e forma arranjos paracristalinos no citoplasma das células (CHEN; XIONG; YANG; MAO *et al.*, 2011; WENG; GUO; SUN; CHAN *et al.*, 2007). O genoma de MCRV possui 12 segmentos de dsRNA, variando de 4,6 a 1,1 kb com um padrão eletroforético de 1/5/6 (WENG; GUO; SUN; CHAN *et al.*, 2007). Este vírus citoplasmático infecta células do tecido conjuntivo do hepatopâncreas, brânquias e intestino do siri-da-lama (JITHENDRAN; POORNIMA; BALASUBRAMANIAN; KULASEKARAPANDIAN, 2009). DENG; LU; OU; SU *et al.* (2012) sugerem que o MCRV pertence ao gênero *Crabreovirus*, juntamente com CsRV1.

Segundo WENG; GUO; SUN; CHAN *et al.* (2007), o vírus MCRV causa alta mortalidade e grandes perdas econômicas nos cultivos de siri-da-lama na província de Guangdong, na China. Os autores demonstraram, por meio de análise histopatológica e ensaios de injeções intramuscular, inoculação oral, imersão e coabitação que MCRV é o agente etiológico da doença do sono (sleeping disease – SD) de *S. serrata*. Os principais sinais clínicos da doença são lentidão, perda de apetite e uma ligeira coloração acinzentada do corpo (WENG; GUO; SUN; CHAN *et al.*, 2007). Além disso, os autores também observaram que os animais infectados naturalmente por MCRV apresentavam hepatopâncreas atrofiado, intestino vazio e brânquias amareladas. O reovírus é altamente patogênico para o siri-da-lama e a transmissão parece ocorrer por meio de rotas entéricas e de superfície corporal, pois a infecção experimental causou 100% de mortalidade após 10 dias em *S. serrata* por injeção intramuscular, exposição por imersão ou inoculação oral,

e 80% de mortalidade por coabitação após 20 dias (WENG; GUO; SUN; CHAN *et al.*, 2007). Os sinais característicos da infecção pelo reovírus foram observados a partir do quarto dia após a infecção experimental (WENG; GUO; SUN; CHAN *et al.*, 2007).

3.2.1.4. EsRV

Desde o primeiro relato, em 1994, na província de Jiangsu, na China, a doença do tremor (TD) é considerada uma das doenças mais graves que afetam *E. sinensis*, pois tem causado graves perdas econômicas para os empreendimentos de cultivo do caranguejo associadas à alta taxa de mortalidade provocada pela doença (ZHANG; ZHANG; HUANG; BONAMI *et al.*, 2002). Os caranguejos com TD apresentam tremores nas pernas, lentidão e perda de apetite. A mortalidade pode chegar a 70%, mas até hoje o agente etiológico da TD é desconhecido (CHEN; JIANG; QIAN; CHEN *et al.*, 2011). Durante investigações para identificar o agente causador da TD, ZHANG; SHI; ZHANG e BONAMI (2004) caracterizaram o primeiro reovírus de *E. sinensis*, nomeado de *E. sinensis* reovirus 905 (EsRV905). EsRV905 se desenvolve no citoplasma das células do tecido conjuntivo do hepatopâncreas e brânquias, formando inclusões virais intracitoplasmáticas e lesões necróticas (ZHANG; SHI; ZHANG; BONAMI, 2004). Em infecções experimentais, o EsRV905 purificado causou cerca de 30% de mortalidade nos caranguejos, mas nenhum sinal típico de tremor foi identificado em *E. sinensis*, sugerindo que o EsRV905 pode infectar e se replicar em *E. sinensis*, mas pode não ser a causa da TD neste caranguejo (ZHANG; SHI; ZHANG; BONAMI, 2004).

Mais tarde, ZHANG e BONAMI (2012) detectaram um segundo tipo de reovírus isolado de *E. sinensis* na China, nomeado de *E. sinensis* reovirus 816 (EsRV816). Semelhante ao EsRV905, EsRV816 se desenvolve no citoplasma das células do tecido conjuntivo de todos os órgãos, principalmente hepatopâncreas, brânquias, coração e intestino, formando corpúsculos de inclusão eosinofílicos (ZHANG; BONAMI, 2012). Após a infecção experimental por injeção de vírus purificado, não foram observados sinais de

doença, como tremores nas pernas, porém 28% dos caranguejos morreram 20 dias após a infecção (ZHANG; BONAMI, 2012).

Um terceiro vírus, EsRVWX-2012, também foi identificado em caranguejos *E. sinensis* que apresentavam sinais de TD, porém nenhuma infecção experimental foi conduzida (SHEN; MA; HU, 2015). Ambos os reovírus EsRV905, EsRV816 e EsRVWX-2012 possuem partículas virais icosaédricas não envelopadas e infectam o tecido conjuntivo de *E. sinensis*. Porém, EsRV905 e EsRV816 apresentam tamanho de partícula de 55 e 60 nm de diâmetro, respectivamente (ZHANG; BONAMI, 2012; ZHANG; SHI; ZHANG; BONAMI, 2004), já o EsRVWX-2012 é maior, apresentando 60-70 nm de diâmetro (SHEN; MA; HU, 2015). Além das diferenças no tamanho, também apresentam diferenças no padrão de eletroforese. O EsRV905 é de 3/4/5 e o EsRVWX-2012 é de 1/5/6 com 12 segmentos, enquanto EsRV816 exibiu 10 segmentos com um padrão de eletroforese de 5/3/2 (ZHANG; BONAMI, 2012; ZHAO; TAVARES; SCHOTT, 2021).

Com base na ultraestrutura, propriedades físico-químicas e relações filogenéticas, o EsRV905 foi classificado no novo gênero *Cardoreovirus* estabelecido pelo ICTV (ATTOUI; MERTENS; BECNEL; BELAGANAHALLI *et al.*, 2012). Curiosamente, EsRV816 mostrou homologia muito baixa com as sequências de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) putativo de EsRV905. Com base nas relações filogenéticas da polimerase viral, EsRV816 foi classificado como um novo gênero diferente de *Cardoreovirus*, o *Crustareovírus* (ZHANG; BONAMI, 2012; ZHANG; SHI; ZHANG; BONAMI, 2004; ZHAO; TAVARES; SCHOTT, 2021). Já, EsRVWX-2012 foi classificado como um membro do gênero *Crabreovirus* (SHEN; MA; HU, 2015; ZHAO; TAVARES; SCHOTT, 2021).

3.2.1.5. SCRV

A aquicultura do siri-nadador *P. trituberculatus* sofreu perdas econômicas substanciais na China devido a uma epidemia que tem provocado alta mortalidade nos últimos anos (ZHANG; LI; LIU; ZHANG, 2015). Investigações epidemiológicas moleculares

convencionais e testes de infecção artificial mostraram que o agente patogênico da doença é o reovírus do siri nadador (SCRV) (LI, 2012; LI; PENG; LIU; ZHOU *et al.*, 2012). A partícula SCRV é icosaédrica, não envelopada e mede 30 ± 10 nm, considerado menor do que a maioria dos reovírus (ZHANG; LI; LIU; ZHANG, 2015). Embora o acrônimo do vírus possa ser confundo com os vírus que infectam *S. serrata*, não há evidências de que SCRV possa infectar o siri-da-lama. O SCRV pode provocar hemorragia severa em *P. trituberculatus* e causar mortalidades de até 100% em apenas 10 dias (FANG; LI; XU; ZHANG *et al.*, 2015; LI, 2012; LI; PENG; LIU; ZHOU *et al.*, 2012). Nenhuma infecção experimental foi conduzida para SCRV e mais detalhes sobre a estrutura do genoma também não está disponível na literatura.

3.2.1.6. Vírus de brânquias de Carcinus mediterraneus

Segundo JOHNSON (1983), o Vírus de Brânquias de *C. mediterraneus* é paraesférico, não envelopado, com 55 nm de diâmetro. O vírus foi relacionado à família *Reoviridae*. Porém, detalhes sobre a estrutura do genoma ainda são raros na literatura (BONAMI, 1976; JOHNSON, 1983). O vírus infecta e destrói as células epiteliais, principalmente as das brânquias. A inoculação do vírus purificado por injeção intramuscular em *C. mediterraneus* saudáveis causou mortalidade em apenas 8 dias (JOHNSON, 1983). Os caranguejos também são fatalmente infectados com o reovírus quando a partir da presença de tecidos de animais doentes infectados presentes nos tanques de cultivo (BONAMI, 1976).

3.2.2. Vírus relacionados à família *Rhabdoviridae*

A família *Rhabdoviridae* inclui 30 gêneros de vírus envelopados, tipicamente baciliformes, com genomas de RNA de fita simples de sentido negativo (WALKER; BLASDELL; CALISHER; DIETZGEN *et al.*, 2018). Além de plantas e vertebrados, os membros da família *Rhabdoviridae* também são encontrados em invertebrados, incluindo crustáceos (JOHNSON, 1984). Quatro vírus relacionados à família *Rhabdoviridae* foram

detectados em crustáceos braquiúros, o RhVA, RhVB, Y-Organ Virus de *Carcinus mediterraneus* e EHV. Entre os rhabdovírus conhecidos, apenas RhVA causa efeitos deletérios para a aquicultura.

3.2.2.1. Rhabdo-like virus A

Em suas investigações sobre as junções neuromusculares dos músculos gástricos do siri-azul, *C. sapidus*, JAHROMI (1977) identificou pela primeira vez um vírus semelhante à *Rhabdoviridae*, presente principalmente nas células gliais. Mais tarde, YUDIN e CLARK (1979) registraram o mesmo vírus nas células da glândula mandibular (glândula ecdisial) de *C. sapidus* e nomeando-o inicialmente de EGV-2, devido à associação com a glândula ecdisial (JAHROMI, 1977; YUDIN; CLARK, 1979). Anos depois, o reovírus foi renomeado para Rhabdo-like virus A (RhVA) (JOHNSON, 1978; 1983; SHIELDS; OVERSTREET, 2003). O RhVA é um vírus baciliforme muito menor do que as outras espécies pertencentes à família *Rhabdoviridae*. Apresenta diâmetro de 25 a 30 nm e comprimento de 100 a 150 nm, formando arranjo paracristalino no citoplasma das células (JOHNSON, 1983; SHIELDS; OVERSTREET, 2003). Segundo JOHNSON (1978), RhVA se desenvolve no retículo endoplasmático e infecta as células do tecido hematopoiético, hemócitos, células do tecido conjuntivo, células de reserva associadas ao tecido conjuntivo, epiderme, tecido epicárdico e células gliais de gânglios e nervos.

A manifestação da infecção por RhVA está associada ao estresse do hospedeiro, principalmente devido ao estresse do transporte e manutenção em sistemas de cultivo (JAHROMI, 1977), estresse fisiológico consequente da ablação do pedúnculo ocular (YUDIN; CLARK, 1979) e por coinfecções com outros vírus, como CsRV1, Baculo-B, CBV e EHV (JOHNSON, 1983; JOHNSON, 1984). A infecção experimental por meio de injeção de RhVA e CsRV1 causou a mortalidade de *C. sapidus* após apenas três dias em condição de laboratório (JOHNSON, 1983; SHIELDS; OVERSTREET, 2003). Geralmente, a infecção

por RhVA não produz sinais clínicos em *C. sapidus*, no entanto, JOHNSON (1983) observou que os animais infectados simultaneamente por RhVA e CsRV1 apresentaram paralisia.

3.2.3. Vírus relacionados à família *Bunyaviridae*

A ordem *Bunyavirales* foi estabelecida recentemente para agrupar vírus de genoma de RNA de fita simples de sentido negativo (-ssRNA), compostos de 2 a 4 segmentos (MAES; ADKINS; ALKHOVSKY; AVSIC-ZUPANC *et al.*, 2019). A ordem contém 10 famílias. Porém, até o momento, é reconhecida uma única família viral de bunyavírus que infecta crustáceos (*Cruliviridae*) e que contém um único membro reconhecido oficialmente pelo ICTV, o Wenling Lincruvirus (MAES; ADKINS; ALKHOVSKY; AVSIC-ZUPANC *et al.*, 2019). Embora vários vírus semelhantes à bunyavírus tenham sido propostos provisoriamente infectando crustáceos braquiúros, incluindo o Crab Haemocytic Virus (CHV) (JOHNSON, 1983) e o *Carcinus maenas* Portunibunyavirus 1 (CmPBV1) (BOJKO; SUBRAMANIAM; WALTZEK; STENTIFORD *et al.*, 2019).

3.2.3.1. CHV

O CHV é um vírus esférico de 55 a 80 nm de diâmetro, que ocorre na membrana intracitoplasmática dos hemócitos e, às vezes, associado ao complexo de Golgi do caranguejo europeu *C. maenas* (JOHNSON, 1983). A infecção por CHV causa problemas na coagulação, redução do número de hemócitos circulantes e pode levar *C. maenas* a morte (BANG, 1971; HOOVER, 1977). O principal sinal clínico da infecção é visualizado quando a hemolinfa do caranguejo é retirada e não há formação de coágulos (BANG, 1971; HOOVER, 1977). Embora, cause efeitos deletérios e até a morte de *C. maenas*, detalhes sobre o genoma de CHV e seus efeitos na sobrevivência da espécie ainda são desconhecidos.

3.2.3.2. CmPBV1

O CmPBV1 é o vírus mais recentemente detectado em um crustáceo braquiúro de importância para a aquicultura, *C. maenas*. CmPBV1 foi detectado e sequenciado por

BOJKO; SUBRAMANIAM; WALTZEK; STENTIFORD *et al.* (2019), a partir de amostras de *C. maenas* coletados em nas Ilhas Faroe, na Dinamarca. As partículas virais de CmPBV1 são esféricas, medem 96,6 ± 12,2 nm de diâmetro e o seu genoma consiste em três segmentos de RNA de fita simples de sentido negativo (BOJKO; STEBBING; DUNN; BATEMAN *et al.*, 2018; BOJKO; SUBRAMANIAM; WALTZEK; STENTIFORD *et al.*, 2019). Em estudos prévios, BOJKO; STEBBING; DUNN; BATEMAN *et al.* (2018) observaram que CmPBV1 estava presente com uma prevalência de 1,1% em *C. maenas* coletados na costa de Nesvík, Ilhas Faroé. A infecção resultou em inclusões eosinofílicas no epitélio branquial, tecidos conjuntivos, amebócitos e hemócitos, causadas pelo desenvolvimento de arranjos paracristalinos. Embora, os efeitos da infecção pelos bunyavírus CHV e CmPBV1 na sobrevivência dos caranguejos não tenham sido descritos, ZHANG; SHI; ZHANG e BONAMI (2004), em um estudo sobre o reovírus EsRV905, observaram que a coinfecção de EsRV905 e um vírus semelhante a bunyavírus aumentou em até 30% a taxa de mortalidade de *E. sinensis*.

3.2.4. Vírus relacionados à família *Dicistroviridae*

3.2.4.1. MCDV

Durante investigações para descobrir o agente causador de mortalidade de *S. paramamosain*, GUO; HE; XU e WENG (2013) detectaram o reovírus MCRV e descobriram um vírus adicional com um diâmetro de cerca de 30 nm infectando simultaneamente o siri-da-lama. O vírus é icosaédrico, sem envelope, apresenta diâmetro de 30 nm e genoma de RNA de fita simples de sentido positivo (ssRNA) (GAO; LIU; HUANG; WANG *et al.*, 2019; ZHANG; HE; SU; DONG *et al.*, 2011) e foi nomeado de dicistrovírus do siri-da-lama (MCDV). Os resultados da análise filogenética de GUO; HE; XU e WENG (2013) sugerem que o MCDV tem uma relação genética próxima com o vírus da síndrome de Taura (TSV) do que outros dicistrovírus e que o MCDV é um novo membro da família *Dicistroviridae*, classificado no gênero *Aparavirus* (GUO; HE; XU; WENG, 2013).

Infecção experimental realizado por GUO; HE; XU e WENG (2013), por meio de injeção intramuscular de MCDV em *S. paramamosain*, causou 100% de mortalidade em apenas 7 dias, sendo que nenhum siri morreu no grupo controle. MCDV foi detectado em vários órgãos, como brânquias, intestinos, estômago, coração, hepatopâncreas, gônadas, músculos, hemolinfa e órgãos ganglionares torácicos de *S. paramamosain* (GUO; HE; XU; WENG, 2013). Além disso, os siris apresentaram sinais clínicos da infecção, como falta de apetite e mudanças comportamentais, como nenhuma resposta ao toque e permanência na superfície da areia durante o dia.

3.2.5. Vírus relacionados à família *Picornaviridae*

3.2.5.1. CBV

O vírus da Baía de Chesapeake (CBV) foi detectado pela primeira vez em juvenis de *C. sapidus* coletados durante o verão em Tangier Sound, baía de Chesapeake (JOHNSON, 1978; 1983). CBV é um vírus de RNA de fita simples, icosaédrico, sem envelope com cerca de 30 nm de diâmetro, que ocorre no citoplasma das células derivadas ectodermicamente, às vezes, formando arranjos paracristalinos (JOHNSON, 1983). CBV infecta células neurossecretoras, células nervosas, epiderme, epitélios das brânquias e epitélio do intestino anterior e posterior (SHIELDS, 2003; SHIELDS; OVERSTREET, 2003). Segundo JOHNSON (1983), o CBV pode causar destruição do sistema nervoso central, epitélio branquial e células neurossecretoras, que pode levar o siri-azul ter dificuldades nas trocas gasosas, controle osmótico e vários processos vitais e até causar morte.

Além disso, os omatídios costumam ser gravemente danificados, levando o siri-azul à cegueira e gerando alterações comportamentais no hospedeiro, como natação de forma desorientada e permanência na posição com a cabeça direcionada para a região ventral. Estas mudanças comportamentais permitem que siris infectados sejam predados facilmente, aumentando o canibalismo (JOHNSON, 1983; SHIELDS; OVERSTREET, 2003). O CBV é um vírus patogênico para juvenis e adultos de *C. sapidus*, podendo levar

o hospedeiro à morte entre duas semanas até dois meses em condições laboratoriais (JOHNSON, 1983; MESSICK; SINDERMANN, 1992). Além disso, há evidências de que CBV pode apresentar ação sinérgica com outros vírus, como CsRV1, RhVA ou EHV (JOHNSON, 1983).

3.2.6. Vírus relacionados à família *Roniviridae*

A doença dos suspiros (SD) é frequentemente reportada em cultivos de *E. sinensis*, nas províncias de Jiangsu, Zhejiang, Anhui e Xangai, na China (ZHANG; BONAMI, 2007). A doença é caracterizada pelos sons que lembram suspiros, que podem ser ouvidos claramente dos caranguejos afetados devido à lenta formação de bolhas durante a respiração. Durante as investigações sobre o agente causador da SD, ZHANG e BONAMI (2007) encontraram um vírus semelhante a *Roniviridae* desenvolvendo-se em células do tecido conjuntivo e o nomearam de EsRNV para *E. sinensis* ronivirus.

O EsRNV é um vírus baciliforme, envelopado, que mede 24 a 42 nm de diâmetro e 60 a 170 nm de comprimento, que apresenta nucleocapsídeos medindo 16 a 18 nm de diâmetro e 150 a 250 nm de comprimento, formando arranjos paralelos (ZHANG; BONAMI, 2007). Os corpos de inclusão observados por microscopia de luz no citoplasma têm de 200 a 800 nm. No estudo de ZHANG e BONAMI (2007), o EsRNV foi detectado nos órgãos linfóides, tecidos conjuntivos das brânquias, hepatopâncreas, coração e intestino. A análise em microscopia de luz mostrou corpos de inclusão basofílicos no citoplasma das células do órgão linfoide e intestino e apoptose nesses órgãos. Focos eosinofílicos de células conectivas necróticas também descritos (ZHANG; BONAMI, 2007). Essas características podem ser consideradas comuns aos membros da família *Roniviridae*. O ronivírus foi inoculado experimentalmente por injeção intramuscular em *E. sinensis* e causou 100% de mortalidade após 17 dias, com início das mortes a partir do décimo terceiro dia (ZHANG; BONAMI, 2007). Os sinais de SD foram observados em cerca de 30% dos animais

infectados por EsRNV, confirmando que o ronivírus é o agente etiológico da SD. Além disso os caranguejos apresentaram lentidão e anorexia.

3.2.7. Vírus relacionados à família *Tombusviridae*

Os membros da família *Tombusviridae* não possuem envelope e apresentam genomas de RNA de fita simples de sentido positivo (ssRNA) (HYODO; KAIDO, 2021). Além de detectarem o dicistrovírus MCDV, GAO; LIU; HUANG; WANG *et al.* (2019), estudando indivíduos de *S. paramamosain,* também identificaram a presença de um vírus icosaédrico de 72 nm diâmetro, não detectado anteriormente por métodos de biologia molecular, o mud crab tombus-like virus (MCTV). Por meio da infecção experimental de MCTV em *S. paramamosain* provenientes de uma fazenda de cultivo da Província de Guangdong, China, GAO; LIU; HUANG; WANG *et al.* (2019) observaram que a carga viral de MCTV no hepatopâncreas e hemócitos dos siris aumentaram significativamente durante o curso da infecção, porém sinais clínicos da infecção não foram reportados. Além disso, após 96 horas de infecção por MCTV, 60% dos siris morreram, confirmando a patogenicidade deste vírus eminente em *S. paramamosain* (GAO; LIU; HUANG; WANG *et al.*, 2019).

3.3. VÍRUS DE DNA

3.3.1. Vírus relacionados à família *Baculoviridae*

Os membros da família *Baculoviridae* são vírus de DNA de fita dupla, envelopados, podendo ser ocluído ou não, que infectam o núcleo das células do hospedeiro (ANDERSON; PRIOR, 1992). Os baculovírus são o maior grupo de vírus conhecidos em crustáceos decápodes (ANDERSON; PRIOR, 1992; JOHNSON, 1988; SHIELDS; OVERSTREET, 2003). Oito baculovírus foram relatados em cinco espécies de caranguejos e siris de importância para a aquicultura, entre eles os vírus Baculo-B, Baculovirus do Hepatopancreas de *C. mediterraneus*, Penaeid Rod-shaped DNA Virus e Tau vírus causam efeitos negativos para o cultivo de crustáceos braquiúros.

3.3.1.1. Baculo-B

O Baculovírus-B é um vírus envelopado, não ocluído, que compartilha muitas semelhanças com o Baculo-A, exceto por infectar hemócitos e células hematopoéticas, frequentemente produzindo áreas hipercromáticas no centro do núcleo das células e núcleos hipertrofiados homogêneos ou contornados na cromatina (JOHNSON, 1983). As partículas virais de Baculo-B são ovóides, medindo cerca de 100 nm de diâmetro e 335 nm de comprimento, apresentando extremidades cônicas e arredondadas (SHIELDS; OVERSTREET, 2003). Os vírions tendem a formar matrizes ordenadas no nucleoplasma e seu desenvolvimento está associado a vesículas intranucleares (JOHNSON, 1983). O Baculo-B já foi registrado em *C. sapidus* nas baías de Chesapeake e Chincoteague, Maryland e Virgínia, respectivamente (JOHNSON, 1983; MESSICK, 1998). Os siris infectados experimentalmente apresentaram sinais de doença, porém somente a coinfecção de Baculo-B com os vírus CsRV1 e RhVA causou mortalidade (JOHNSON, 1983; MESSICK, 1998).

3.3.1.2. Baculovirus do hepatopancreas de C. mediterraneus

Um baculovírus foi detectado no núcleo das células do epitélio do hepatopancreas e do intestino médio de *C. mediterraneus* coletados na costa da França (PAPPALARDO; BONAMI, 1979). As partículas virais do baculovírus são baciliformes, envelopados e medem de 80 a 90 nm de diâmetro e 340 a 380 nm de comprimento. Diferente de outros baculovírus, o baculovírus de *C. mediterraneus* é flexionado quando está dentro do envelope, mas quando o envelope é rompido por choque osmótico, o vírion fica reto. A infecção pelo baculovírus em *C. mediterraneus* causa hipertrofia no núcleo das células epiteliais, podendo ser fatal para os animais infectados (JOHNSON, 1983). Em condições laboratoriais, este vírus foi transmitido oralmente para *C. mediterraneus*, a partir da alimentação com tecidos infectados e por injeção intramuscular.

3.3.1.3. Penaeid Rod-shaped DNA Virus

O Penaeid Rod-shaped DNA Virus é um vírus envelopado, não ocluído, com formato ovóide, medindo cerca de 84 nm de diâmetro e 226 nm de comprimento (INOUYE; YAMANO; IKEDA; KIMURA *et al.*, 1996). Este vírus é o agente causador da viremia aguda do peneídeo (PAV), doença conhecida por causar mortalidade massiva de *Penaeus japonicus* em cultivo. No estudo de MOMOYAMA; HIRAOKA e VENEGAS (1999), a patogenicidade do PRDV foi examinada por ensaios de infecção usando métodos de inoculação intramuscular e oral em juvenis de seis espécies de crustáceos, incluindo camarões *Penaeus* spp. e o siri *P. trituberculatus*. Todos os juvenis de camarões *Penaeus* spp. testados morreram de 2 a 7 dias após a inoculação, resultando em mortalidades de até 100%. Por outro lado, os siris *P. trituberculatus* foram significativamente menos suscetíveis ao vírus em comparação com as outras espécies testadas. Mortalidades de 10% foram registradas dois dias após injeção intramuscular e de apenas 4% 30 dias após a inoculação oral. Os siris infectados por PRDV apresentaram hipertrofia dos núcleos das células epidérmicas cuticulares do estômago. Porém, nenhum sinal clínico evidente foi registrado nos animais.

3.3.1.4. Tau virus

O vírus T, designado pela letra grega tau, foi observado pela primeira vez na lagoa de Thau, na França, a partir de amostras de caranguejos *C. mediterraneus* (PAPPALARDO; MARI; BONAMI, 1986). O vírus T compartilha as características gerais com os baculovírus não ocluídos, exceto pelas partículas em forma de arco ao invés de bastonete, típico de baculovírus. O tamanho médio das partículas é de 80 nm de diâmetro e 350 nm de comprimento, formando arranjos paralelos no nucleoplasma. A transmissão experimental do vírus T causou lesões nas células (E, R, F e B) do epitélio do hepatopâncreas e intestino médio em *C. mediterraneus*. O primeiro sinal de infecção foi hipertrofia nuclear associada ao desaparecimento de nucléolos e marginação da cromatina (PAPPALARDO; MARI;

BONAMI, 1986). Os caranguejos infectados exibiram uma diminuição da agressividade, seguida de aumento da letargia e perda de apetite, levando à imobilidade e, alguns dias depois, à morte. A taxa de mortalidade dos animais infectados foi de 100% após 25 dias, contra 20% no grupo de controle (PAPPALARDO; MARI; BONAMI, 1986).

3.3.2. Vírus relacionados à família *Herpesviridae*

3.3.2.1. Bi-facies Virus

O vírus bi-facies, anteriormente referido como vírus herpes-like (HLV), é um vírus icosaédrico, envelopado e constituído de genoma de DNA de fita dupla, que infecta o núcleo ou o citoplasma de hemócitos e células hemopoiéticas de *C. sapidus* (JOHNSON, 1977; SHIELDS; OVERSTREET, 2003). O vírus BFV também pode infectar tecido conjuntivo e células epiteliais das brânquias, mas não foi observado no músculo, coração, epitélio intestinal, gônadas ou tecidos nervosos (JOHNSON, 1983). O desenvolvimento completo do vírus Bi-facies ocorre no núcleo, onde este vírus tem dois tipos de desenvolvimento levando a duas formas finais. As partículas envelopadas do Tipo A, com dois envelopes medindo de 197 a 233 nm de diâmetro e as partículas do Tipo B, com apenas um envelope de 174 a 191 nm de diâmetro (JOHNSON, 1988).

Os ensaios de infecção experimental realizadas por JOHNSON (1978), por meio de injeção intramuscular de hemolinfa de um siri moribundo e por via oral usando tecido infectado como alimento, resultou em mortes após 30 a 40 dias. Os siris infectados só apresentaram sinais clínicos da infecção pouco antes de morrerem, quando se tornaram inativos e pararam de se alimentar. O vírus Bi-facies também já foi detectado com prevalência de 13% em populações selvagens de *C. sapidus* nas baías de Assawoman, Delaware e Chincoteague, na costa leste dos EUA (JOHNSON, 1983). No entanto, os siris naturalmente infectados podem sobreviver por pelo menos 60 dias (JOHNSON, 1983).

3.3.3. Vírus relacionados à família *Parvoviridae*

3.3.3.1. Parvo-like Virus de C. mediterraneus

MARI e BONAMI (1988a) registraram um pequeno agente viral no caranguejo *C. mediterraneus.* O vírus apresenta algumas afinidades com os membros da família *Parvoviridae* por suas características e propriedades físico-químicas. Os autores o nomearam de PC84, um vírus icosaédrico, sem envelope, que mede cerca de 23 a 27 nm de diâmetro (MARI; BONAMI, 1988a). Este parvovírus infecta o núcleo e o citoplasma das células fibroblásticas e mioepiteliais do tecido conjuntivo do hepatopancreas, intestino médio e brânquias de *C. mediterraneus*, causando necrose em algumas áreas e reações de defesa caracterizadas pelo acúmulo de células degenerativas, como nódulos. MARI e BONAMI (1988a) também visualizaram que o núcleo das células infectadas apresentava um material amorfo e denso de elétrons contendo partículas virais em áreas mais claras, ao invés de cromatina. Infecção experimental por meio de injeção intramuscular de PC84 em *C. mediterraneus* causou sinais de fraqueza, falta de apetite e induziu a morte dos animais 10 a 25 dias após a inoculação (MARI; BONAMI, 1988a).

3.3.4. Vírus relacionados à família *Nimaviridae*

3.3.4.1. WSSV

Existem muitos vírus que têm uma ampla gama de hospedeiros, um deles é o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), que antes era conhecido como baculovírus, mas que mais tarde foi considerado pelo ICVT como uma espécie do gênero *Whispovirus*, pertencente à família *Nimaviridae* (VLAK; BONAMI; FLEGEL; KOU *et al.*, 2005; WANG; HIRONO; MANINGAS; SOMBOONWIWAT *et al.*, 2019). O WSSV é conhecido pelos pesquisadores e carcinicultores de camarões peneídeos há mais de três décadas, e ainda é considerado o patógeno que mais impacta a sustentabilidade e o crescimento da indústria global de camarões cultivados. Esse vírus é o agente causador da doença da mancha branca (WSD), que causa mortalidades massivas de camarões e prejuízos à carcinicultura

em todo o mundo (BATEMAN; TEW; FRENCH; HICKS *et al.*, 2012; LIGHTNER, 2011; STENTIFORD; BONAMI; ALDAY-SANZ, 2009; STENTIFORD; OIDTMANN; SCOTT; PEELER, 2010).

O WSSV é um vírus envelopado, não ocluído, em forma de bastonete, que mede de 70 a 150 nm de diâmetro e 275 a 380 nm de comprimento e possui uma projeção semelhante a uma cauda e um nucleocapsídeo estriado (DURAND; LIGHTHER; REDMAN; BONAMI, 1997; VLAK; BONAMI; FLEGEL; KOU *et al.*, 2005). A infecção por WSSV ocorre em todos os tecidos de origem mesodérmica e ectodérmica, como brânquias, órgão linfóide, epitélio cuticular e tecido conjuntivo subcuticular (LIGHTNER, 1996). Os núcleos das células infectadas tornam-se hipertrofiados com a cromatina marginalizada e contêm corpos de inclusão que se coram intensamente eosinofílicos na infecção em estágio inicial e basofílicos na infecção mais avançada (LIGHTNER, 1996). Embora, mais comumente associado a camarões peneídeos cultivados em regiões tropicais, o vírus também é capaz de infectar, causar doenças e matar uma ampla gama de outros crustáceos decápodes, incluindo caranguejos e siris de importância para a aquicultura, como *C. maenas*, *E. sinensis*, *S. serrata*, *S. olivacea*, *S. paramamosain*, *S. tranquebarica*, *P. pelagicus*, *P. sanguinolentus*, *P. trituberculatus*, *C. sapidus*, *C. arcuatus* e *C. danae.*

Testes de exposição baseados em vias naturais (alimentos) e artificiais (injeção intramuscular) de exposição ao WSSV em *Cancer pagurus*, *C. maenas* e *E. sinensis* mostraram que as espécies testadas foram consideradas suscetíveis à infecção com WSSV e que o vírus foi capaz de se replicar e permanecer virulento, exceto para *C. maenas* (BATEMAN; TEW; FRENCH; HICKS *et al.*, 2012). No caso de *C. maenas*, os caranguejos não sofreram mortalidade significativa quando exposto ao WSSV e a presença de corpos de inclusão intranuclear característicos só foi observada por meio de injeção intramuscular, mas com uma gravidade muito menor que a observada nas outras espécies. Em contraste, *E. sinensis* sofreu alta mortalidade, seja de animais infectados por meio da alimentação ou

por injeção intramuscular, e apresentou patologia clássica da WSD, exceto as manchas brancas na cutícula e coloração avermelhada do corpo. Estudos subsequentes também confirmaram a patogenicidade e virulência de WSSV em *E. sinensis* (DING; WANG; ZHU; PAN *et al.*, 2017; DING; YAO; ZHANG; WAN *et al.*, 2015). Segundo DING; YAO; ZHANG; WAN *et al.* (2015), a injeção de WSSV causou mortalidade de 100% em apenas 10 dias em *E. sinensis* cultivados em tanques no leste da China.

Estudos de infecção experimental de WSSV também confirmaram a patogenicidade e virulência em outra espécie importante na aquicultura asiática, o siri-da-lama, *S. serrata* (IKA MAHARANI, 2005; LIU, W.; QIAN, D.; YAN, X., 2011; RAJA; JITHENDRAN; RAJAN, 2019; RAJENDRAN; VIJAYAN; SANTIAGO; KROL, 1999; SUPAMATTAYA; HOFFMANN; BOONYARATPALIN; KANCHANAPHUM, 1998). Nas investigações de LIU, W.; QIAN, D. e YAN, X. (2011), o siri-da-lama foi submetido a injeção por via intramuscular com diluições em série de 10 vezes de um inóculo de WSSV. Após 10 dias, as taxas de mortalidade variaram de 38,9% a 100% nas doses mais diluídas a concentradas, respectivamente. As células epiteliais da brânquia dos siris infectados apresentaram núcleos hipertrofiados com inclusões basofílicas e os animais infectados apresentaram sinais de fraqueza, letargia, consumo de ração reduzido, desprendimento dos apêndices, atraso na coagulação da hemolinfa, e hemolinfa amarelada. No estudo de RAJA; JITHENDRAN e RAJAN (2019), além de registrarem alta taxa de mortalidade em siris-da-lama infectados por WSSV, também identificaram redução de 60% na contagem total de hemócitos (THC) de siris infectados em comparação com os animais saudáveis. Testes de exposição baseados em via oral e na água realizados por IKA MAHARANI (2005) também mostraram que além de causar mortalidade dos juvenis de *S. serrata* (72%), o WSSV também pode afetar os siris em estágio de zoea 1 (80%) e zoea 3 (40%), comprometendo o sucesso da larvicultura.

O WSSV também foi detectado em outras espécies do gênero *Scylla*, como *S. olivacea* (NORIZAN; HARRISON; HASSAN; MUSA *et al.*, 2019), *S. paramamosain* (KONG;

LIN; GONG; TRAN *et al.*, 2020; LIN; HE; GONG; ZHANG *et al.*, 2020; NORIZAN; HARRISON; HASSAN; MUSA *et al.*, 2019; REN; LIN; KONG; GONG *et al.*, 2020; SOMBOONNA; MANGKALANAN; UDOMPETCHARAPORN; KRITTANAI *et al.*, 2010; WANG; SUN; ZHU, 2017; WANG; SUN; ZHU, 2018) e *S. tranquebarica* (JITHENDRAN; POORNIMA; BALASUBRAMANIAN; KULASEKARAPANDIAN, 2009; NORIZAN; HARRISON; HASSAN; MUSA *et al.*, 2019; RAJENDRAN; VIJAYAN; SANTIAGO; KROL, 1999). Entre estas espécies, *S. olivacea* parece ser mais suscetível ao WSSV que *S. paramamosain*. Segundo SOMBOONNA; MANGKALANAN; UDOMPETCHARAPORN; KRITTANAI *et al.* (2010), desafios utilizando injeções de WSSV ($1x10^6$ cópias virais/g) causaram 100% de mortalidade em *S. olivacea* após 7 dias. Já os siris *S. paramamosain* sobreviveram por duas semanas após a injeção. Para SOMBOONNA; MANGKALANAN; UDOMPETCHARAPORN; KRITTANAI *et al.* (2010), esses resultados sugerem que a suscetibilidade à doença da mancha branca no gênero *Scylla* é dependente da espécie e também pode ser dependente da dose. Para criadores de siris-da-lama os resultados sugerem que, para evitar perdas durante surtos sazonais de WSSV, o cultivo de *S. paramamosain* pode ser uma melhor opção do que *S. olivacea*.

O WSSV também já foi detectado em *P. pelagicus* (KOU; PENG; CHIU; LO, 1998; LO; HO; PENG; CHEN *et al.*, 1996; SUPAMATTAYA; HOFFMANN; BOONYARATPALIN; KANCHANAPHUM, 1998; WAIKHOM; JOHN; GEORGE; JEYASEELAN, 2006), *P. sanguinolentus* (CHANG; CHEN; WANG, 1998; LO; HO; PENG; CHEN *et al.*, 1996; WAIKHOM; JOHN; GEORGE; JEYASEELAN, 2006; WANG; LO; CHANG; KOU, 1998) e *P. trituberculatus* (KOU; PENG; CHIU; LO, 1998; MENG; JANG; SEO; CHO, 2009). Em ensaios de infecção experimental por meio de injeção intramuscular e ingestão de tecido contaminado, o vírus causou mortalidade de 100% em *P. pelagicus* em apenas nove dias, sendo que os animais infectados estavam aparentemente saudáveis e se alimentavam até o momento da morte (SUPAMATTAYA; HOFFMANN; BOONYARATPALIN;

KANCHANAPHUM, 1998). Os siris *P. sanguinolentus* e *P. pelagicus* também mostraram suscetibilidade diferencial a WSSV dependendo do isolado. A taxa mortalidade variou de 50% a 100% após a alimentação com os tecidos de camarões infectados com diferentes isolados sul da Índia (G9 e A117), enquanto aqueles alimentados com o isolado G27 não mostraram mortalidade (WAIKHOM; JOHN; GEORGE; JEYASEELAN, 2006).

Outros estudos também demonstraram o potencial do WSSV para infectar e causar efeitos deletérios nos estoques selvagens ou cultivados de *C. sapidus* (COSTA; FRAGA; ZAMPARETTI; MARQUES *et al.*, 2012; KROL, 2002; POWELL; BROWDY; BURGE, 2015; SHIELDS; OVERSTREET, 2003), *C. arcuatus* (GALAVÍZ-SILVA; MOLINA-GARZA; ALCOCER-GONZÁLEZ; ROSALES-ENCINAS *et al.*, 2004) e *C. danae* (COSTA; FRAGA; ZAMPARETTI; MARQUES *et al.*, 2012). Na maioria estudos, foi confirmado que os siris *Callinectes* spp. podem servir como um reservatório biológico de WSSV. Por outro lado, testes de exposição ao WSSV baseados em vias naturais, por ingestão de tecidos infectados, causaram mortalidade de 66% em *C. sapidus* (KROL, 2002), enquanto a injeção intramuscular gerou taxa de mortalidade de até 100% (BLAYLOCK; CURRAN; LOTZ, 2019). Além disso, os animais injetados carregavam uma carga viral maior do que os animais alimentados com tecidos infectados (BLAYLOCK; CURRAN; LOTZ, 2019).

3.4. TÉCNICAS UTILIZADAS NA DETECÇÃO DE PATÓGENOS VIRAIS EM CRUSTÁCEOS BRAQUIÚROS

Os sinais clínicos mais frequentes causados por infecções virais em crustáceos braquiúros são fraqueza, letargia e redução da alimentação (BONAMI; ZHANG, 2011; JOHNSON, 1977; VAGO, 1966). Alguns vírus podem provocar outros sinais clínicos específicos que podem auxiliar no diagnóstico, como tremores e paralisia, como acontece nas fases tardias da infecção por CsRV1 em *C. sapidus* (SHIELDS; OVERSTREET, 2007); hemolinfa amarelada e desprendimento de apêndices, em infecção por WSSV (LIU, W.;

QIAN, D.; YAN, X., 2011); e alterações na natação e posição corporal, em infecção por CBV (JOHNSON, 1983; SHIELDS; OVERSTREET, 2003).

No entanto, os sinais clínicos isoladamente não são ferramentas determinantes para o diagnóstico de infecções por patógenos virais em siris e caranguejos. Alguns vírus podem não causar sinais clínicos aparentes ou estes podem ser manifestados somente em infecções mais graves. Outro problema é que os sinais não são específicos podendo ser provocados por outros agentes infecciosos não virais, fazendo-se necessário a utilização de técnicas confiáveis e validadas para o diagnóstico. A Figura 4 mostra, na forma de um fluxograma, como a combinação entre sinais clínicos, análises histopatológicas e análises por microscopia eletrônica podem auxiliar na detecção de patógenos virais específicos que afetam técnica e economicamente o cultivo de *C. sapidus*.

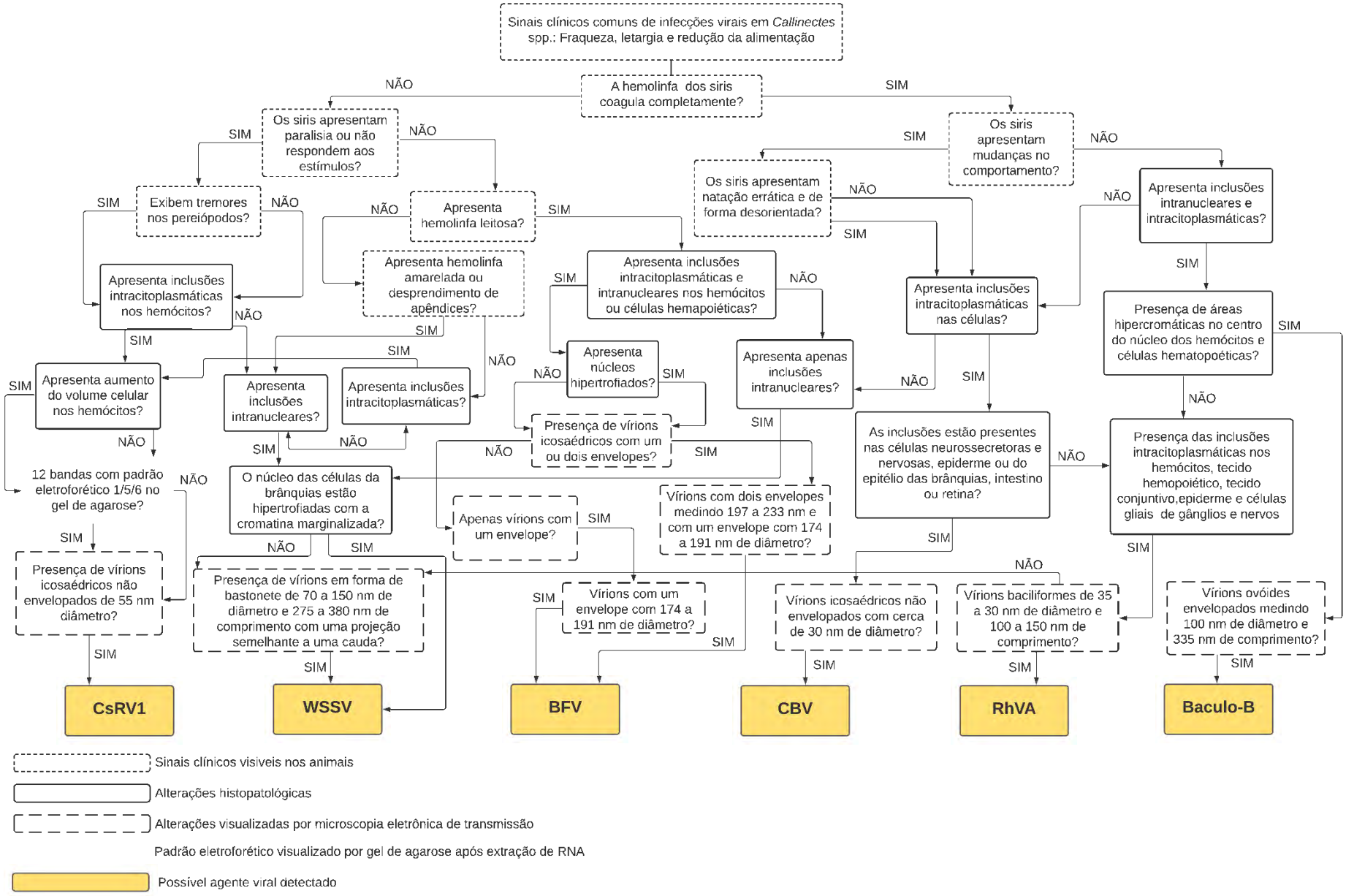


Figura 4. Fluxograma desenvolvido no presente estudo para auxiliar na detecção dos patógenos virais que causam mortalidade de *Callinectes sapidus* em cultivo, com base nos aspectos clínicos, histológicos e de microscopia eletrônica reportados nos estudos publicados entre 1977 e junho de 2020.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a histopatologia estão entre as técnicas mais frequentemente utilizadas, desde os primeiros estudos até os dias atuais, em pesquisas sobre patógenos virais em crustáceos braquiúros. Entre os documentos analisados nesta revisão, 38,4% utilizaram a MET para detectar os agentes viras e 34,2% utilizaram a histopatologia. Ambas as técnicas são confiáveis para a detecção de vírus em crustáceos e são essenciais para se descobrir e caracterizar a biologia de novos vírus, por isso são consideradas ferramentas padrão para o diagnóstico da infecção por WSSV, de acordo com a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE, 2018). No entanto, segundo PAPPALARDO; MARI e BONAMI (1986) a MET mostrou limitações na detecção das partículas do vírus Tau em *C. mediterraneus*. No estudo, o vírus foi detectado em apenas 55% dos animais infectados experimentalmente, apesar de todos os caranguejos terem morrido com sinais típicos da doença.

Após o desenvolvimento da técnica molecular baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR), ainda na década de 80 (MULLIS; FALOONA; SCHARF; SAIKI *et al.*, 1986), os estudos sobre patógenos virais também passaram a utilizá-la (26%) (Figura 5). Além do método molecular por PCR, uma ampla gama de técnicas foi aplicada nos estudos publicados entre 1977 e 2020 visando auxiliar no diagnóstico da presença de vírus patogênicos em crustáceos braquiúros, como a hibridização in situ (6,8%), sequenciamento genômico (11%), a RT-qPCR ou qPCR (32,9%), RT-LAMP (1,4%), bem como o teste de imunoensaio (5,5%).

A hibridização in situ é uma técnica de citogenética baseada na detecção de regiões específicas do DNA ou RNA em amostras teciduais a partir de sondas específicas. As sequências de nucleotídeos complementares são marcadas com fluorocromos e são visualizadas por meio de fluorescência em microscópio de luz ou epifluorescência (CHANG; CHEN; WANG, 1998). Segundo CHANG; CHEN e WANG (1998), esta técnica já é bem estabelecida para detectar o WSSV em camarões, caranguejos e lagostas, incluindo *P.*

sanguinolentus, e permite identificar os órgãos e tecidos alvo do vírus nos animais. LIESSMANN; OWENS e ZENG (2005), MOMOYAMA; HIRAOKA e VENEGAS (1999) e TANG; MESSICK; PANTOJA; REDMAN *et al.* (2011) também utilizaram a hibridização in situ para determinar a presença dos baculovírus SBV e PRDV e do reovírus CsRV1 em *S. serrata, P. trituberculatus* e *C. sapidus*, respectivamente. A hibridização in situ fornece uma alta especificidade em que a reação positiva ocorre apenas com o vírus alvo e, portanto, pode distinguir entre os vírus que são morfologicamente semelhantes (TANG; MESSICK; PANTOJA; REDMAN *et al.*, 2011). Porém, essa técnica requer que a região infectada pelo vírus seja identificada por visualização das áreas coradas, sendo menos sensível do que ensaios baseados em PCR.

Com o desenvolvimento de PCR e o Sequenciamento de Nova Geração (NGS) de alto rendimento, vários genomas virais foram detectados em crustáceos braquiúros, como o WSSV (BATEMAN; TEW; FRENCH; HICKS *et al.*, 2012; DING; YAO; ZHANG; WAN *et al.*, 2015; GALAVÍZ-SILVA; MOLINA-GARZA; ALCOCER-GONZÁLEZ; ROSALES-ENCINAS *et al.*, 2004; GUNASEKARAN; GOPALAKRISHNAN; DEIVASIGAMANI; SERALATHAN *et al.*, 2018), CsRV1 (BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010; ROGERS; TAYLOR; HAWKE; ANDERSON LIVELY, 2015), PRDV (MOMOYAMA; HIRAOKA; VENEGAS, 1999) e SBV (LIESSMANN; OWENS; ZENG, 2005). Embora a PCR tenha sido amplamente utilizada nos estudos, a técnica por si só não é adequada para quantificar a carga viral presente no hospedeiro, uma vez que simplesmente detecta a presença ou indica a ausência do genoma viral por meio da amplificação dos fragmentos de DNA específicos e visualização por eletroforese (BATEMAN; TEW; FRENCH; HICKS *et al.*, 2012). Para os reovírus, o padrão (número e tamanho) dos segmentos do genoma também é um critério para a identificação de diferentes espécies em uma amostra, podendo ser analisado por eletroforese em gel de agarose após a extração de RNA, sem a

necessidade de amplificação dos fragmentos do genoma (BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010).

Em contraste, a PCR em Tempo Real (qPCR) é uma variação da técnica de PCR, a qual permite que a amplificação e detecção ocorram simultaneamente, com capacidade de gerar resultados quantitativos com maior precisão, inclusive identificando a carga viral de WSSV (DING; WANG; ZHU; PAN *et al.*, 2017; HUANG; WANG; XU; PAN *et al.*, 2018; KONG; LIN; GONG; TRAN *et al.*, 2020; LIU, W.; QIAN, D.; YAN, X. J., 2011; MA; TANG; LIN; GONG *et al.*, 2019; MENG; JANG; SEO; CHO, 2009; POWELL; BROWDY; BURGE, 2015), CsRV1 (CHUNG, J. S.; PITULA, J. S.; SCHOTT, E.; ALVAREZ, J. V. *et al.*, 2015; FLOWERS; BACHVAROFF; WARG; NEILL *et al.*, 2016; FLOWERS; JOHNSON; AGUILAR; SCHOTT, 2018; ROGERS; TAYLOR; HAWKE; SCHOTT *et al.*, 2015; SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.*, 2019), MCRV (DENG; XU; HU; LI *et al.*, 2019; JITHENDRAN; POORNIMA; BALASUBRAMANIAN; KULASEKARAPANDIAN, 2009), MCTV (GAO; LIU; HUANG; WANG *et al.*, 2019), EsRV WX-2012 (MA; DAI; SERWADDA; SHEN, 2016), SBV (OWENS; LIESSMANN; LA FAUCE; NYGUYEN *et al.*, 2010) e SCRV (ZHANG; LI; LIU; ZHANG, 2015). A qPCR também pode incluir uma etapa de transcrição reversa (RT-qPCR), usada quando o vírus é de RNA, como os reovírus (BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010; FLOWERS; BACHVAROFF; WARG; NEILL *et al.*, 2016).

Embora sejam amplamente utilizadas, as técnicas de PCR, qPCR e RT-qPCR exigem a utilização de equipamentos caros e sensíveis para sua execução, e a preparação da amostra é trabalhosa e demorada. Porém, essas técnicas foram modernizadas, MA; DAI; SERWADDA e SHEN (2016) desenvolveram um ensaio de amplificação isotérmica, mediado por loop de transcrição reversa (RT-LAMP) com alta especificidade, sensibilidade e rapidez, para detectar EsRV WX-2012 em *E. sinensis* e que pode ser usado para diagnosticar o vírus nos caranguejos de fazendas de aquicultura, onde os equipamentos de

diagnóstico não são geralmente disponíveis. A RT-LAMP dispensa a necessidade da etapa de extração de DNA e o uso de termociclador. Além disso, o método apresentou limite de detecção de 15 pg e sensibilidade 100 vezes maior que o RT-PCR convencional (MA; DAI; SERWADDA; SHEN, 2016). Outra vantagem é que o resultado pode ser visualizado a olho nu, sem a adição de reagentes extras ou etapas de eletroforese.

Para facilitar ainda mais no diagnóstico de patógenos virais em fazendas de cultivo, ZHANG; LI; LIU e ZHANG (2015) e FAN; LIU; XU; YUAN *et al.* (2017) desenvolveram um teste rápido imunocromatográfico em tiras para a detecção diferencial e qualitativa do vírus SCRV em *P. trituberculatus* e SsRV em *S. serrata*, respectivamente. Ambos os testes, utilizam uma membrana de nitrocelulose impregnada com anticorpos específicos que reagem com o antígeno viral presente na amostra de hemolinfa de um animal infectado. A interação antígeno-anticorpo da amostra positiva para o vírus é revelada pelo corante vermelho (ouro coloidal) na linha de teste da fita. O teste desenvolvido por ZHANG; LI; LIU e ZHANG (2015), utilizam anticorpos imunoglobulina Y (IgY) específicos contra as proteínas de SCRV, isolados após inoculação do vírus em ovos de galinha. Já o teste de FAN; LIU; XU; YUAN *et al.* (2017), utilizam anticorpos policlonais (pAb) e monoclonais (mAb) específicos contra a proteína do capsídeo de SsRV (p29), isolados de coelhos infectados pelo vírus. O teste em tiras para detecção de SsRV apresentou sensibilidade geral de 71% em comparação com a RT-PCR na detecção no siri-da-lama, já o teste para SCRV detectou o reovírus com sucesso em todas as amostras de *P. trituberculatus* infectados artificialmente.

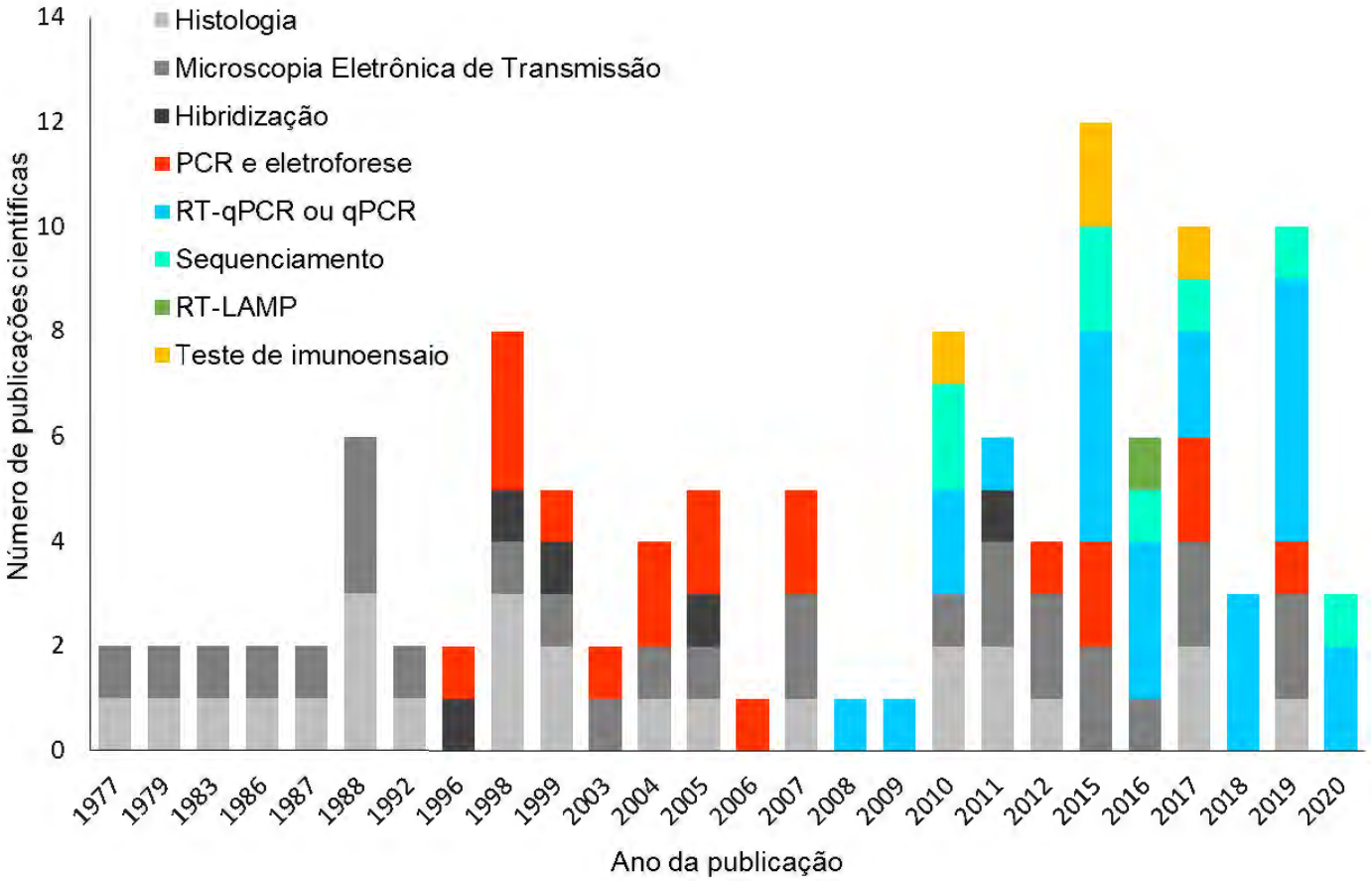


Figura 5. Técnicas utilizadas para o diagnóstico de patógenos virais em crustáceos braquiúros nas publicações entre 1977 a junho de 2020.

3.5. CONTROLE DE PATÓGENOS VIRAIS EM CRUSTÁCEOS BRAQUIÚROS EM CULTIVO

Embora as infecções virais representam, na atualidade em nível mundial, a maior ameaça para o sucesso e a sustentabilidade da aquicultura de crustáceos (PERAZZOLO; ROSA; BARRACCO, 2012), a profilaxia e o controle das infecções virais nos cultivos de crustáceos braquiúros restringem-se ainda basicamente à adoção de práticas adequadas de manejo e à redução das condições de estresse. Na prática, os fatores que determinam o estado de saúde de crustáceos braquiúros são ainda pouco conhecidos (PERAZZOLO; ROSA; BARRACCO, 2012; SHIELDS; OVERSTREET, 2003) e a ciência apenas dá seus primeiros passos efetivos para elucidação e controle desse tema.

Entre as práticas de manejo adotadas, o controle da temperatura da água de cultivo é a mais efetiva, pois a temperatura exerce grande influência, tanto para o hospedeiro

quanto o patógeno e sua variação costuma criar condições favoráveis à replicação viral (CHUNG, J. S.; PITULA, J. S.; SCHOTT, E.; ALVAREZ, J. V. *et al.*, 2015; LAVILLA-PITOGO; DE LA PEÑA; CATEDRAL, 2007) e para o aumento da infectividade e patogenicidade do vírus (ZHANG; BONAMI, 2012). Investigações realizadas por CHUNG, J. S.; PITULA, J. S.; SCHOTT, E.; ALVAREZ, J. V. *et al.* (2015), mostraram que quando *C. sapidus* infectados com CsRV1 foram expostos ao aumento de temperatura de 10 para 23°C, a replicação viral nos hemócitos e em vários tecidos aumentou significativamente. Resultados semelhantes também foram observados por ZHANG e BONAMI (2012) em *E. sinensis* infectados por EsRV816, no estudo, 28,5% dos caranguejos morreram após 20 dias mantidos a 28°C. Já no grupo mantido a 20ºC, nenhum caranguejo morreu, indicando um efeito da temperatura na infectividade e patogenicidade do vírus. No experimento realizado por LAVILLA-PITOGO; DE LA PEÑA e CATEDRAL (2007), resultados positivos para WSSV em *S. serrata* expostos a temperatura de 19 a 21ºC e gerados através de PCR, foram identificados após 15 dias de cultivo. Já nas temperaturas de 27 a 29ºC o WSSV foi detectado somente após 25 dias, indicando que, neste caso, a exposição temperaturas mais baixa pode aumentar a infecção.

Nos crustáceos, por não apresentarem uma memória imunológica eficiente e específica, carecendo de células linfocíticas, anticorpos e células de memória como as dos vertebrados, a vacinação costuma ser pouco prática ou mesmo inefetiva atualmente (ROWLEY; POPE, 2012), tornando essencial a busca por estratégias para controlar as infecções virais e minimizar as grandes perdas sofridas pela indústria (SHIELDS; OVERSTREET, 2003). Neste contexto, houve na última década, um importante avanço na compreensão de uma série de mecanismos antivirais, como o silenciamento da infecção viral pelo sistema de RNA de interferência (RNAi) e o uso de substâncias terapêuticas ou preventivas (DENG; XU; HU; LI *et al.*, 2019; DENG; ZHANG; LI; LI *et al.*, 2019; FANG; LI; XU; ZHANG *et al.*, 2015; HUANG; HAN; WANG; REN, 2017; HUANG; WANG; XU; PAN *et*

al., 2018; KONG; LIN; GONG; TRAN *et al.*, 2020; LIN; HE; GONG; ZHANG *et al.*, 2020; MA; TANG; LIN; GONG *et al.*, 2019; REN; LIN; KONG; GONG *et al.*, 2020; WANG; HONG; ZHU, 2020; WANG; SUN; ZHU, 2017).

O sistema de RNAi para suprimir infecções virais é uma abordagem promissora para o controle de doenças virais em crustáceos. A RNAi é um mecanismo celular responsável pelo silenciamento gênico pós-transcricional que atua sobre o RNA mensageiro (mRNA). Neste mecanismo, uma fita dupla de RNA (dsRNA) de 21-25 nucleotídeos que, ao ser incorporada a um complexo intracitoplasmático, liga-se a uma sequência de nucleotídeos complementar localizada no mRNA-alvo, ocasionando assim o silenciamento viral, por inibição da tradução e/ou degradação do mRNA (PERAZZOLO; ROSA; BARRACCO, 2012). Experimentos em laboratório mostraram que caranguejos submetidos a injeção com oligonucleotídeo anti-miRNA específicos têm redução da replicação viral após o desafio com WSSV (HUANG; HAN; WANG; REN, 2017; HUANG; WANG; XU; PAN *et al.*, 2018). No estudo de HUANG; WANG; XU; PAN *et al.* (2018), os resultados mostraram que o WSSV utilizou o microRNA-7 (miR-7) para aumentar a replicação do vírus durante a infecção em *E. sinensis*. No entanto, a replicação foi inibida pela regulação negativa de miR-7 após injeções de um oligonucleotídeo anti-miRNA (AMO-miR-7: 5′-TAGGCAGATTAGTGATTTCTT-3′) 24 a 48 horas após a infecção. Contudo, embora a tecnologia de RNAi continue a ser explorada, ainda não há dados de ensaios a campo para a abordagem de RNAi (OIE, 2018).

A epigalocatequina-3-galato (EGCG), que é o polifenol mais abundante extraído do chá verde, uma bebida popular em todo o mundo, exibe atividades antibacterianas e anticancerígenas em potencial (JANKUN; SELMAN; SWIERCZ; SKRZYPCZAK-JANKUN, 1997). Segundo WANG; SUN e ZHU (2017), o EGCG também pode induzir a imunidade inata e aumentar a sobrevivência de *S. paramamosain* desafiado contra a WSSV, além de inibir a replicação de WSSV, representando uma nova possível abordagem terapêutica ou

preventiva em potencial para controlar o WSSV. Nas investigações de WANG; SUN e ZHU (2017), o tratamento com injeções de EGCG (1 mg/kg) aumentou significativamente a taxa de sobrevivência dos siris e reduziu o número de cópias virais de WSSV em 24, 48 e 72 h pós-desafio, em comparação com o observado em animais do grupo controle. Segundo os autores, o tratamento com EGCG pode induzir certas vias imunológicas, como as da fenoloxidase e JAK-STAT, e pode aumentar a atividade da profenoloxidase. Os resultados deste estudo poderão ser usados para futuras pesquisas antivirais com o objetivo de proteger os crustáceos braquiúros cultivados da infecção por WSSV e outros vírus.

4. CONCLUSÃO

Numerosos patógenos virais estão fortemente associados a mortalidade significativa nos crustáceos braquiúros de interesse para a aquicultura, incluindo vírus que já são causa de impactos negativos na indústria aquícola de camarões peneídeos há décadas, como o WSSV. Entre as espécies de vírus registradas em diferentes hospedeiros de crustáceos braquiúros descritos nesta revisão, a maioria afeta de forma sistêmica os animais, infectando os tecidos de origem mesodérmica e ectodérmica, característica que provavelmente contribui para a patogenia dessas infecções. Além disso, ensaios experimentais de exposição dos animais aos diferentes patógenos virais, mostraram que a taxa de mortalidade foi alta após a inoculação do vírus via injeção intramuscular, mas também por vias de fácil transmissão, como por via oral pelo consumo de tecido infectado ou pela água, condições que são comuns em ambiente de cultivo.

Desde que os primeiros vírus de crustáceos braquiúros foram descritos no final da década de 70, a descoberta de novos vírus foi acelerada com o desenvolvimento de novas técnicas moleculares de detecção, mas as técnicas tradicionais não foram substituídas e ainda são consideradas ferramentas úteis na identificação de doenças virais. O fluxograma fornecido neste estudo, com base nas técnicas tradicionais de diagnóstico, pode nortear o diagnóstico de doenças virais em siris de cultivo. Ainda, é provável, que o aumento dos

estudos que utilizam as técnicas tradicionais de detecção combinado com as técnicas moleculares, principalmente aquelas com abordagens metagenômicas, terão um efeito crescente na identificação e caracterização de novos vírus, o que certamente expandirá a diversidade de vírus apresentadas aqui em uma gama mais ampla de crustáceos. Esse cenário pode ser desanimador para a indústria aquícola de crustáceos braquiúros, pois as medidas preventivas padrão, como a vacinação, por sua vez, não são viáveis ou efetivas. No entanto, na busca por solução para este problema, novas abordagens para aumentar a sobrevivência dos animais em cultivo foram estudadas, incluindo a melhoria das práticas de manejo de cultivo e as pesquisas sobre o uso de terapia de RNAi e de substâncias extraídas de plantas, que devem ser temas das pesquisas futuras.

Neste contexto, os tópicos discutidos nesta revisão fornecem informações claras de que, apesar da recente expansão da produção global da aquicultura de crustáceos braquiúros, o conhecimento científico sobre os patógenos virais, os avanços nas técnicas de diagnóstico e a busca urgente por estratégias de mitigação são indispensáveis para que esse setor produtivo atinja um patamar sustentável a longo prazo. Por fim, os gargalos da indústria aquícola de crustáceos braquiúros no mundo só serão tratados na prática, quando houver sinergia entre os profissionais do cultivo de crustáceos braquiúros e os especialistas em patologia, epidemiologia, especialistas em terapêutica e os formuladores de políticas públicas no campo da segurança alimentar.

5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Produtividade em Pesquisa concedida ao Dr. Antonio Ostrensky (processo Nº 304633/2017-8, pelo financiamento do projeto (processo Nº 381091/2014-7) e pela concessão de bolsa de doutorado à Camila P. S. Tavares (processo Nº 141022/2017-5). À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche no exterior (processo nº 88881.190487/2018-01).

6. REFERÊNCIAS

ANDERSON, I. G.; PRIOR, H. C. Baculovirus infections in the mud crab, *Scylla serrata*, and a freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*, from Australia. **Journal of Invertebrate Pathology**, 60, n. 3, p. 265-273, 1992.

ARIA, M.; CUCCURULLO, C. Bibliometrix: An R-tool for comprehensive science mapping analysis. **Journal of Informetrics**, 11, p. 959-975, 2017.

ATTOUI, H.; MERTENS, P. P. C.; BECNEL, J.; BELAGANAHALLI, S.; BERGOIN, M.; BRUSSAARD, C. P.; CHAPPELL, J. D.; CIARLET, M.; DEL VAS, M.; DERMODY, T. S.; DORMITZER, P. R.; DUNCAN, R.; FANG, Q.; GRAHAM, R.; GUGLIELMI, K. M.; HARDING, R. M.; HILLMAN, B.; MAKKAY, A.; MARZACHÌ, C.; MATTHIJNSSENS, J.; MILNE, R. G.; MOHD JAAFAR, F.; MORI, H.; NOORDELOOS, A. A.; OMURA, T.; PATTON, J. T.; RAO, S.; MAAN, M.; STOLTZ, D.; SUZUKI, N.; UPADHYAYA, N. M.; WEI, C.; ZHOU, H. Family Reoviridae. *In*: LEFKOWITZ, E. J., Dempsey, D.M., Hendrickson, R.C., Orton, R.J., Siddell, S.G., Smith, D.B., (Eds.) (Ed.). **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. New York: Elsevier Academic press, 2012. p. 541-637.

BANG, F. B. Transmissible Disease, Probably Viral in Origin, Affecting the Amebocytes of the European Shore Crab, *Carcinus maenas*. **Infection and immunity**, 3, n. 4, p. 617-623, 1971.

BATEMAN, K. S.; TEW, I.; FRENCH, C.; HICKS, R. J.; MARTIN, P.; MUNRO, J.; STENTIFORD, G. D. Susceptibility to infection and pathogenicity of White Spot Disease (WSD) in non-model crustacean host taxa from temperate regions. **Journal of Invertebrate Pathology**, 110, n. 3, p. 340-351, 2012. 10.1016/j.jip.2012.03.022

BLAYLOCK, R. B.; CURRAN, S. S.; LOTZ, J. M. White spot syndrome virus (WSSV) in cultured juvenile blue crabs *Callinectes sapidus*: Oral versus injection exposure, and feeding frequency effects. **Diseases of Aquatic Organisms**, 133, n. 2, p. 147-156, 2019. 10.3354/dao03334

BOJKO, J.; STEBBING, P. D.; DUNN, A. M.; BATEMAN, K. S.; CLARK, F.; KERR, R. C.; STEWART-CLARK, S.; JOHANNESEN, Á.; STENTIFORD, G. D. Green crab *Carcinus maenas* symbiont profiles along a North Atlantic invasion route. **Diseases of Aquatic Organisms**, 128, n. 2, p. 147-168, 2018. 10.3354/dao03216

BOJKO, J.; SUBRAMANIAM, K.; WALTZEK, T. B.; STENTIFORD, G. D.; BEHRINGER, D. C. Genomic and developmental characterisation of a novel bunyavirus infecting the crustacean *Carcinus maenas*. **Scientific Reports**, 9, n. 1, p. 1-10, 2019. s41598-019-49260-4

BONAMI, J. R., 1976, Kingston, Ontario. **Viruses from crustaceans and annelids: our state of knowledge**. 20-23.

BONAMI, J. R.; ZHANG, S. Viral diseases in commercially exploited crabs: A review. **Journal of Invertebrate Pathology**, 106, n. 1, p. 6-17, 2011. 10.1016/j.jip.2010.09.009

BOWERS, H. A.; MESSICK, G. A.; HANIF, A.; JAGUS, R.; CARRION, L.; ZMORA, O.; SCHOTT, E. J. Physicochemical properties of double-stranded RNA used to discover a reo-like virus from blue crab *Callinectes sapidus*. **Diseases of aquatic organisms**, 93, n. 1, p. 17-29, 2010. 10.3354/dao02280

CHANG, P. S.; CHEN, H. C.; WANG, Y. C. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization. **Aquaculture**, 164, n. 1-4, p. 233-242, 1998.

CHEN, A.; JIANG, Y.; QIAN, D.; CHEN, C.; LI, A.; HUANG, J.; YANG, B. Trembling disease of Chinese mitten crab. **China Fish**, 11, p. 57, 2011.

CHEN, J.; XIONG, J.; YANG, J.; MAO, Z.; CHEN, X. Nucleotide sequences of four RNA segments of a reovirus isolated from the mud crab *Scylla serrata* provide evidence that this virus belongs to a new genus in the family Reoviridae. **Archives of Virology**, 156, n. 3, p. 523-528, 2011. 10.1007/s00705-010-0852-4

CHUNG, J. S.; PITULA, J. S.; SCHOTT, E.; ALVAREZ, J. V.; MAURER, L.; LYCETT, K. A. Elevated water temperature increases the levels of reo-like virus and selected innate immunity genes in hemocytes and hepatopancreas of adult female blue crab, *Callinectes sapidus*. **Fish and Shellfish Immunology**, 47, n. 1, p. 511-520, 2015. 10.1016/j.fsi.2015.09.027

COSTA, S. W.; FRAGA, A. P. M.; ZAMPARETTI, A. S.; MARQUES, M. R. F.; ANDREATTA, E. R. Presence of the white spot syndrome virus (WSSV) in wild decapods crustaceans in coastal lagoons in southern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, 64, n. 1, p. 209-216, 2012. 10.1590/S0102-09352012000100030

DENG, H.; XU, X.; HU, L.; LI, J.; ZHOU, D.; LIU, S.; LUO, P.; HE, J.; WENG, S. A janus kinase from *Scylla paramamosain* activates JAK/STAT signaling pathway to restrain mud crab reovirus. **Fish and Shellfish Immunology**, 90, p. 275-287, 2019. 10.1016/j.fsi.2019.03.056

DENG, H.; ZHANG, W.; LI, J.; LI, J.; HU, L.; YAN, W.; LIU, S.; HE, J.; WENG, S. A signal transducers and activators of transcription (STAT) gene from *Scylla paramamosain* is involved in resistance against mud crab reovirus. **Fish and Shellfish Immunology**, 94, p. 580-591, 2019. 10.1016/j.fsi.2019.09.045

DENG, X. X.; LU, L.; OU, Y. J.; SU, H. J.; LI, G.; GUO, Z. X.; ZHANG, R.; ZHENG, P. R.; HE, J. G.; WENG, S. P.; CHEN, Y. G. Sequence analysis of 12 genome segments of mud crab reovirus (MCRV). **Virology**, 422, n. 2, p. 185-194, 2012. 10.1016/j.virol.2011.09.029

DING, Z.; WANG, S.; ZHU, X.; PAN, J.; XUE, H. Temporal and spatial dynamics of white spot syndrome virus in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. **Aquaculture Research**, 48, n. 5, p. 2528-2537, 2017. 10.1111/are.13089

DING, Z.; YAO, Y.; ZHANG, F.; WAN, J.; SUN, M.; LIU, H.; ZHOU, G.; TANG, J.; PAN, J.; XUE, H.; ZHAO, Z. The first detection of white spot syndrome virus in naturally infected cultured Chinese mitten crabs, *Eriocheir sinensis* in China. **Journal of Virological Methods**, 220, p. 49-54, 2015. 10.1016/j.jviromet.2015.04.011

DING, Z. F.; CAO, M. J.; ZHU, X. S.; XU, G. H.; WANG, R. L. Changes in the gut microbiome of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) in response to White spot syndrome virus (WSSV) infection. **Journal of Fish Diseases**, 40, n. 11, p. 1561-1571, 2017. 10.1111/jfd.12624

DURAND, S.; LIGHTHER, D. V.; REDMAN, R. M.; BONAMI, J. R. Ultrastructure and morphogenesis of White Spot Syndrome Baculovirus (WSSV). **Diseases of Aquatic Organisms**, 29, n. 3, p. 205-211, 1997.

FAN, D.; LIU, J.; XU, M.; YUAN, Y.; YANG, J.; CHEN, J.; SPRINGERLINK. A convenient immunochromatographic test strip for rapid detection of *Scylla serrata* reovirus. 2017.

FANG, J.; LI, D.; XU, R.; ZHANG, L.; LIU, L.; GUO, A. Tubulin mediates *Portunus trituberculatus* reovirus infection. **Aquaculture**, 448, p. 196-202, 2015. 10.1016/j.aquaculture.2015.06.001

FAO. **Global Capture and Aquaculture Production (FishStat)**. Rome, Italy, 2020. Disponível em: http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hqp_5215617422254205836.xml&outtype=html. Acesso em: 27/06/2020.

FLOWERS, E. M.; BACHVAROFF, T. R.; WARG, J. V.; NEILL, J. D.; KILLIAN, M. L.; VINAGRE, A. S.; BROWN, S.; ALMEIDA, A. S.; SCHOTT, E. J. Genome sequence analysis of csrv1: a pathogenic reovirus that infects the blue crab *Callinectes sapidus* across its trans-hemispheric range. **Frontiers in Microbiology**, 7, n. e82202, 2016. 10.3389/fmicb.2016.00126

FLOWERS, E. M.; JOHNSON, A. F.; AGUILAR, R.; SCHOTT, E. J. Prevalence of the pathogenic crustacean virus *Callinectes sapidus* reovirus 1 near flow-through blue crab aquaculture in Chesapeake Bay, USA. **Diseases of Aquatic Organisms**, 129, n. 2, p. 135-144, 2018. 10.3354/dao03232

GALAVÍZ-SILVA, L.; MOLINA-GARZA, Z. J.; ALCOCER-GONZÁLEZ, J. M.; ROSALES-ENCINAS, J. L.; IBARRA-GÁMEZ, C. White spot syndrome virus genetic variants detected

in Mexico by a new multiplex PCR method. **Aquaculture**, 242, n. 1-4, p. 53-68, 2004. 10.1016/j.aquaculture.2004.09.006

GAO, Y.; LIU, S.; HUANG, J.; WANG, Q.; LI, K.; HE, J.; HE, J.; WENG, S.; ZHANG, Q. Cryo-electron microscopy structures of novel viruses from mud crab *Scylla paramamosain* with multiple infections. **Journal of Virology**, 93, n. 7, 2019. 10.1128/jvi.02255-18

GUNASEKARAN, T.; GOPALAKRISHNAN, A.; DEIVASIGAMANI, B.; SERALATHAN, M. V.; KATHIRKAMAN, P. Spontaneous white spot syndrome virus (WSSV) infection in mud crab (*Scylla serrata* Forskal 1775) fattening pens farm of south east coast of India. **Comparative Clinical Pathology**, 27, n. 2, p. 413-419, 2018. 10.1007/s00580-017-2607-z

GUO, Z. X.; HE, J. G.; XU, H. D.; WENG, S. P. Pathogenicity and complete genome sequence analysis of the mud crab dicistrovirus-1. **Virus Research**, 171, n. 1, p. 8-14, 2013. 10.1016/j.virusres.2012.10.002

HARI, S. The evidence of virus-like particles in crabs (*Scylla* sp.) isolated from insideand outside pond shrimp infected with white spot disease. **Indonesian Journal of Veterinary Science**, 21, n. 1, 2003. https://doi.org/10.22146/jsv.485

HOOVER, K. L. **The effect of a virus infection on the hemocyte population in *Carcinus maenas***. Tese de doutorado, Johns Hopkins University, pp. 1–158, 1977.

HUANG, Y.; HAN, K.; WANG, W.; REN, Q. Host MicroRNA-217 promotes white spot syndrome virus infection by targeting tube in the chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 7, n., 2017. 10.3389/fcimb.2017.00164

HUANG, Y.; WANG, W.; XU, Z.; PAN, J.; ZHAO, Z.; REN, Q. *Eriocheir sinensis* microRNA-7 targets crab Myd88 to enhance white spot syndrome virus replication. **Fish and Shellfish Immunology**, 79, p. 274-283, 2018. 10.1016/j.fsi.2018.05.028

HUANG, Z.; DENG, X.; LI, Y.; SU, H.; LI, K.; GUO, Z.; ZHENG, P.; XU, H.; HE, J.; ZHANG, Q.; WENG, S. Structural insights into the classification of mud crab reovirus. **Virus Research**, 166, n. 1-2, p. 116-120, 2012. 10.1016/j.virusres.2012.02.025

HUNGRIA, D. B.; TAVARES, C. P. S.; PEREIRA, L. Â.; SILVA, U.A.T.; OSTRENSKY, A. Global status of production and commercialization of soft-shell crabs. **Aquaculture International**, 25, n. 6, p. 2213-2226, 2017. 10.1007/s10499-017-0183-5

HYODO, K.; KAIDO, M. Dianthovirus (Tombusviridae). *In*: BAMFORD, D. H. e ZUCKERMAN, M. (Ed.). **Encyclopedia of Virology (Fourth Edition)**. Oxford: Academic Press, 2021. p. 383-387.

IKA MAHARANI, R. Sensitivitas Berbagai Stadia Kepiting Bakau (*Scylla paramamosain* Estampador) terhadap White Spot Syndrome Virus. **Bioteknologi**, 2, n. 1, 2005. 10.13057/biotek/c020105

INOUYE, K.; YAMANO, K.; IKEDA, N.; KIMURA, T.; NAKANO, H.; MOMOYAMA, K.; KOBAYASHI, J.; MIYAJIMA, S. The Penaeid Rod-shaped DNA Virus (PRDV), which Causes Penaeid Acute Viremia (PAV). **Fish Pathology**, 31, n. 1, p. 39-45, 1996. 10.3147/jsfp.31.39

JAHROMI, S. S. Occurrence of Rhabdovirus-like particles in the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Journal of General Virology**, 36, n. 3, p. 485-493, 1977. 10.1099/0022-1317-36-3-485

JANKUN, J.; SELMAN, S. H.; SWIERCZ, R.; SKRZYPCZAK-JANKUN, E. Why drinking green tea could prevent cancer. **Nature**, 387, n. 6633, p. 561-561, 1997. 10.1038/42381

JITHENDRAN, K. P.; POORNIMA, M.; BALASUBRAMANIAN, C. P.; KULASEKARAPANDIAN, S. **Diseases of Mud Crabs In India**. Bull. Cent. Inst. Brackishwat. Aquaculture, n. 20, p. 28, 2009.

JOHNSON, P. T. A viral disease of the blue crab, *Callinectes sapidus*: Histopathology and differential diagnosis. **Journal of Invertebrate Pathology**, 29, n. 2, p. 201-209, 1977.

JOHNSON, P. T. Viral diseases of the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Marine Fisheries Review**, 40, p. 13-15, 1978.

JOHNSON, P. T. Diseases Caused by Viruses, Rickettsiae, Bacteria, and Fungi. *In*, Provenzano Jr., A.J. (Ed.), p. 1-78, 1983.

JOHNSON, P. T. Viral diseases of marine invertebrates. **Helgoländer Meeresuntersuchungen**, 37, n. 1-4, p. 65-98, 1984. 10.1007/BF01989296

JOHNSON, P. T. Rod-shaped nuclear viruses of crustaceans: hemocyte-inf ecting species **Diseases of Aquatic Organisms**, 5, p. 111-122, 1988.

KENNEDY, V. S.; CRONIN, L. E. **The Blue Crab: *Callinectes Sapidus***. College Park, Md, USA: Maryland Sea Grant College, University of Maryland, 2007.

KIATPATHOMCHAI, W.; JAROENRAM, W.; ARUNRUT, N.; GANGNONNGIW, W.; BOONYAWIWAT, V.; SITHIGORNGUL, P. Experimental infections reveal that common Thai crustaceans are potential carriers for spread of exotic Taura syndrome virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, 79, n. 3, p. 183-190, 2008. 10.3354/dao01903

KONG, T.; LIN, S.; GONG, Y.; TRAN, N. T.; ZHANG, Y.; ZHENG, H.; MA, H.; LI, S. Sp-CBL inhibits white spot syndrome virus replication by enhancing apoptosis in mud crab (*Scylla paramamosain*). **Developmental and Comparative Immunology**, 105, 2020. 10.1016/j.dci.2019.103580

KOU, G.-H.; PENG, S.-E.; CHIU, Y.-L.; LO, C.-F. Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. *In*: FLEGEL, T. W. (Ed.). **Advances in Shrimp Biotechnology**. Bangkok: National Centre for Genetic Engineering and Biotechnology Thailand, 1998.

KROL, R. M. **Pathobiology of White Spot Virus (WSV) in Diverse Crustaceans from the United States**. University of Southern Mississippi, 2002.

LAVILLA-PITOGO, C. R.; DE LA PEÑA, L. D. **Diseases in farmed mud crabs *Scylla* spp. : diagnosis, prevention, and control**. Tigbauau, Iloilo, Philippines: Aquaculture Dept., Southeast Asian Fisheries Development Center, 2004. 9718511717 9789718511718.

LAVILLA-PITOGO, C. R.; DE LA PEÑA, L. D.; CATEDRAL, D. D. Enhancement of white spot syndrome virus load in hatchery-reared mud crab *Scylla serrat*a (Forsskål, 1775) juveniles at a low temperature. **Aquaculture Research**, 38, n. 14, p. 1600-1603, 2007 2007. 10.1111/j.1365-2109.2007.01770.x

LI, D. F. Purification of *Portunnus trituberculatus* reovirus. China. Chinese patent no. 201210576754.2 2012.https://patents.google.com/patent/CN103013932B/en

LI, D. F.; PENG, J.; LIU, L. G.; ZHOU, Y. Q.; CHEN, J. Chicken embryo culture method of *Portunnus trituberculatus* reovirus. China. Chinese patent no. 201210019133.4 2012.https://patents.google.com/patent/CN103013932B/en

LIESSMANN, L.; OWENS, A. L.; ZENG, C. **Investigation into the mortalities of larval mud crabs, *Scylla serrata* and methods of control**. Dissertação de mestrado, James. Cook University, Austrália. 2005.

LIGHTNER, D. V. **A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp**. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 1996. 304 p.

LIGHTNER, D. V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. **Journal Invertebrate of Pathology**, 106, n. 1, p. 110-130, 2011. 10.1016/j.jip.2010.09.012

LIN, S.; HE, Y.; GONG, Y.; ZHANG, Y.; MA, H.; ZHENG, H.; LI, S. SpBOK inhibits WSSV infection by regulating the apoptotic pathway in mud crab (*Scylla paramamosain*). **Developmental and Comparative Immunology**, 106, 2020. 10.1016/j.dci.2019.103603

LIU, W.; QIAN, D.; YAN, X. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in hemolymph of *Scylla serrata* response to white spot syndrome virus infection. **Aquaculture**, 314, n. 1-4, p. 53-57, 2011. 10.1016/j.aquaculture.2011.02.021

LIU, W.; QIAN, D.; YAN, X. J. Studies on pathogenicity and prevalence of white spot syndrome virus in mud crab, *Scylla serrata* (Forskal), in Zhejiang Province, China. **Journal of Fish Diseases**, 34, n. 2, p. 131-138, 2011. 10.1111/j.1365-2761.2010.01221.x

LO, C. F.; HO, C. H.; PENG, S. E.; CHEN, C. H.; HSU, H. C.; CHIU, Y. L.; CHANG, C. F.; LIU, K. F.; SU, M. S.; WANG, C. H.; KOU, G. H. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. **Disease of Aquatic Organisms**, 27, n. 3, p. 215-225, 1996. 10.3354/dao027215

LUCIDCHART. **Ferramenta de criação de fluxogramas**. 2020. Disponível em: https://lucid.app/lucidchart/invitations/accept/fe72eacc-7b23-443a-8096-5d65d7f01522. Acesso em: 20 nov. 2020.

MA, X.; TANG, X.; LIN, S.; GONG, Y.; TRAN, N. T.; ZHENG, H.; MA, H.; AWEYA, J. J.; ZHANG, Y.; LI, S. SpBAG1 promotes the WSSV infection by inhibiting apoptosis in mud crab (*Scylla paramamosain*). **Fish and Shellfish Immunology**, 94, p. 852-860, 2019. 10.1016/j.fsi.2019.10.013

MA, Y.; DAI, T.; SERWADDA, A.; SHEN, H. Detecting a novel *Eriocheir sinensis* reovirus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. **Letters in Applied Microbiology**, 63, n. 5, p. 363-368, 2016. 10.1111/lam.12630

MAES, P.; ADKINS, S.; ALKHOVSKY, S. V.; AVSIC-ZUPANC, T.; BALLINGER, M. J.; BENTE, D. A.; BEER, M.; BERGERON, É.; BLAIR, C. D.; BRIESE, T.; BUCHMEIER, M. J.; BURT, F. J.; CALISHER, C. H.; CHARREL, R. N.; CHOI, I. R.; CLEGG, J. C. S.; TORRE, J. C. d. l.; LAMBALLERIE, X. d.; DERISI, J. L.; DIGIARO, M.; DREBOT, M.; EBIHARA, H.; ELBEAINO, T.; ERGÜNAY, K.; FULHORST, C. F.; GARRISON, A. R.; GAO, G. F.; GONZALEZ, J.-P. J.; GROSCHUP, M. H.; GÜNTHER, S.; HAENNI, A.-L.; HALL, R. A.; HEWSON, R.; HUGHES, H. R.; JAIN, R. K.; JONSON, M. G.; JUNGLEN, S.; KLEMPA, B.; KLINGSTRÖM, J.; KORMELINK, R.; LAMBERT, A. J.; LANGEVIN, S. A.; LUKASHEVICH, I. S.; MARKLEWITZ, M.; MARTELLI, G. P.; MIELKE-EHRET, N.; MIRAZIMI, A.; MÜHLBACH, H.-P.; NAIDU, R.; NUNES, M. R. T.; PALACIOS, G.; PAPA, A.; PAWESKA, J. T.; PETERS, C. J.; PLYUSNIN, A.; RADOSHITZKY, S. R.; RESENDE, R. O.; ROMANOWSKI, V.; SALL, A. A.; SALVATO, M. S.; SASAYA, T.; SCHMALJOHN, C.; SHÍ, X.; SHIRAKO, Y.; SIMMONDS, P.; SIRONI, M.; SONG, J.-W.; SPENGLER, J. R.; STENGLEIN, M. D.; TESH, R. B.; TURINA, M.; WÈI, T.; WHITFIELD, A. E.; YEH, S.-D.; ZERBINI, F. M.; ZHANG, Y.-Z.; ZHOU, X.; KUHN, J. H.; SPRINGERLINK. Taxonomy of the order *Bunyavirales*: second update 2018. **Archives of Virology**, 164, n. 3, p. 927-941, 2019. 10.1007/s00705-018-04127-3

MARI, J.; BONAMI, J. R. A reolike virus of the Mediterranean shore crab *Carcinus mediterraneus*. **Diseases of Aquatic Organisms**, 3, p. 107-112, 1987.

MARI, J.; BONAMI, J. R. PC 84, a parvo-like virus from the crab *Carcinus mediterraneus:* pathological aspects, ultrastructure of the agent, and first biochemical characterization. **Journal of Invertebrate Pathology**, 51, n. 2, p. 145-156, 1988a.

MARI, J.; BONAMI, J. R. W2 virus infection of the crustacean *Carcinus mediterraneus*: a reovirus disease. **The Journal of General Virology**, 69, p. 561-571, 1988b.

MELO, G. A. S. **Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro**. São Paulo, SP, Brazil: Pleiade, FAPESP, 1996.

MENG, X. H.; JANG, I. K.; SEO, H. C.; CHO, Y. R. White spot syndrome virus quantification in blue crab *Portunus trituberculatus* hatchery-produced larvae and wild populations by TaqMan real-time PCR, with an emphasis on the relationship between viral infection and crab health. **Aquaculture**, 291, n. 1-2, p. 18-22, 2009. 10.1016/j.aquaculture.2009.02.003

MERTENS, P. The dsRNA viruses. **Virus Research**, 101, n. 1, p. 3-13, 2004. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.12.002

MESSICK, G. A. Diseases, Parasites, and Symbionts of Blue Crabs (*Callinectes sapidus*) Dredged from Chesapeake Bay. **Journal of Crustacean Biology**, 18, n. 3, p. 533-533, 1998.https://doi.org/10.1163/193724098X00368

MESSICK, G. A.; SINDERMANN, C. J. **Synopsis of Principal Diseases of the Blue Crab, *Callinectes sapidus***. p. 32-32. 1992.

MOHER, D.; SHAMSEER, L.; CLARKE, M.; GHERSI, D.; LIBERATI, A.; PETTICREW, M.; SHEKELLE, P.; STEWART, L. A.; GROUP, P.-P. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. **Systematic reviews**, 4, 2015. 10.1186/2046-4053-4-1

MOMOYAMA, K.; HIRAOKA, M.; VENEGAS, C. A. Pathogenicity of Penaeid Rod-shaped DNA Virus (PRDV) to juveniles of six crustacean species. **Fish Pathology**, 34, n. 4, p. 183-188, 1999. 10.3147/jsfp.34.183

MOURAD, O.; HOSSAM, H.; ZBYS, F.; AHMED, E. Rayyana web and mobile app for systematic reviews. **Systematic Reviews**, 5, p. 210, 2016.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H., 1986, **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 263-273.

NORIZAN, N.; HARRISON, F. S.; HASSAN, M.; MUSA, N.; MUSA, N.; WAHID, M. E. A.; ZAINATHAN, S. C. First detection of white spot syndrome virus (Wssv) in wild mud crab

Scylla spp. (de haan, 1883) from Setiu wetlands, Malaysia. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, 41, n. 1, p. 45-52, 2019. 10.14456/sjst-psu.2019.6

OIE. **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Chapter 2.2.8. Infection with white spot syndrome vírus**. 2018. Disponível em: http://www.oie.int/index.php?id=2439&L=0&htmfile=sommaire.htm. Acesso em: 07/06/2020.

ONU. **World Population Prospects Highlights**. Department of Economic and Social Affairs, Population Division, 2019.

OWENS, L.; LIESSMANN, L.; LA FAUCE, K.; NYGUYEN, T.; ZENG, C. Intranuclear bacilliform virus and hepatopancreatic parvovirus (PmergDNV) in the mud crab *Scylla serrata* (Forskal) of Australia. **Aquaculture**, 310, n. 1-2, p. 47-51, 2010. 10.1016/j.aquaculture.2010.10.028

PAPPALARDO, R.; BONAMI, J. R. Infection des Crustaces marines due a un virus de type nouveau apparente aux Baculovirus. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, 288, n. 10, p. 535-538, 1979.

PAPPALARDO, R.; MARI, J.; BONAMI, J. R. τ (tau) virus infection of *Carcinus mediterraneus*: Histology, cytopathology, and experimental transmission of the disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, 47, n. 3, p. 361-368, 1986. 10.1016/0022-2011(86)90107-2

PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D.; BARRACCO, M. A. Defesas Antivirais em Crustáceos: Estado da Arte. *In*: MARINGÁ (Ed.). **Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos**. Maringá - PR: Massoni, 2012. v. 1, cap. 14, p. 315-354.

POWELL, J. W. B.; BROWDY, C. L.; BURGE, E. J. Blue crabs *Callinectes sapidus* as potential biological reservoirs for white spot syndrome virus (WSSV). **Diseases of Aquatic Organisms**, 113, n. 2, p. 163-167, 2015. 10.3354/dao02829

RAJA, R. A.; JITHENDRAN, K. P.; RAJAN, J. J. S. Mortality among farmed mud crab, *Scylla serrata* due to white spot syndrome virus (WSSV) in Andhra Pradesh, India. 2019.

RAJENDRAN, K. V.; VIJAYAN, K. K.; SANTIAGO, T. C.; KROL, R. M. Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crabs and lobsters from India. **Journal of Fish Diseases**, 22, n. 3, p. 183-191, 1999. 10.1046/j.1365-2761.1999.00162.x

REN, X.; LIN, S.; KONG, T.; GONG, Y.; MA, H.; ZHENG, H.; ZHANG, Y.; LI, S. The miRNAs profiling revealed by high-throughput sequencing upon WSSV infection in mud crab *Scylla paramamosain*. **Fish and Shellfish Immunology**, 100, p. 427-435, 2020. 10.1016/j.fsi.2020.03.002

ROGERS, H. A.; TAYLOR, S. S.; HAWKE, J. P.; ANDERSON LIVELY, J. A. Variations in prevalence of viral, bacterial, and rhizocephalan diseases and parasites of the blue crab (*Callinectes sapidus*). **Journal of Invertebrate Pathology**, 127, p. 54-62, 2015. https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.03.002

ROGERS, H. A.; TAYLOR, S. S.; HAWKE, J. P.; SCHOTT, E. J.; ANDERSON LIVELY, J. A. Disease, parasite, and commensal prevalences for blue crab *Callinectes sapidus* at shedding facilities in Louisiana, USA. **Diseases of Aquatic Organisms**, 112, n. 3, p. 207-217, 2015.

ROWLEY, A. F.; POPE, E. C. Vaccines and crustacean aquaculture—A mechanistic exploration. **Aquaculture**, 334, p. 1-11, 2012. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.12.011

SANTOS, C. M. d. C.; PIMENTA, C. A. d. M.; NOBRE, M. R. C. The PICO strategy for the research question construction and evidence search. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, 15, p. 508-511, 2007.

SHEN, H.; MA, Y.; HU, Y. Near-Full-Length genome sequence of a novel reovirus from the chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. **Genome Announcements**, 3, n. 3, May 21 2015. 10.1128/genomeA.00447-15

SHIELDS, J. D. Infection and mortality studies with *Hematodinium perezi* in blue crab. *In*: GUILLORY, H. V., Perry, H.,Vanderkooy, S. (Ed.). **Proceeding: Blue crab Mortality Symposium** Ocean Springs, Mississippi: Gulf States Marine Fisheries Commission, 2000. v. 90, p. 50-60.

SHIELDS, J. D. Research priorities for diseases of the blue crab *Callinectes sapidus*. **Bulletin of Marine Science**, 72, p. 505-518, 2003. https://scholarworks.wm.edu/vimsarticles/1514

SHIELDS, J. D.; OVERSTREET, R. M. The Blue Crab: Diseases, Parasites, and Other Symbionts. **The Blue Crab: Diseases, Parasites and Other Symbionts**, p. 119-119, 2003.

SHIELDS, J. D.; OVERSTREET, R. M. Diseases, Parasites and Other Symbionts. *In*: KENNEDY, V. S., L.E. Cronin (eds.) (Ed.). **The blue crab *Callinectes sapidus***. Maryland Sea Grant College, College Park, Maryland, 2007. cap. 8, p. 299-417.

SOMBOONNA, N.; MANGKALANAN, S.; UDOMPETCHARAPORN, A.; KRITTANAI, C.; SRITUNYALUCKSANA, K.; FLEGEL, T. W. Mud crab susceptibility to disease from white spot syndrome virus is species-dependent. **BMC Research Notes**, 3, 315, 2010. 10.1186/1756-0500-3-315

SPITZNAGEL, M. I.; SMALL, H. J.; LIVELY, J. A.; SHIELDS, J. D.; SCHOTT, E. J. Investigating risk factors for mortality and reovirus infection in aquaculture production of soft-shell blue crabs (*Callinectes sapidus*). **Aquaculture**, 502, p. 289-295, 2019. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.051

STENTIFORD, G. D.; BONAMI, J. R.; ALDAY-SANZ, V. A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura syndrome, Yellowhead disease and White Spot Disease and implications of inclusion of these diseases in European legislation. **Aquaculture**, 291**:** 1-17 p. 2009. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.042

STENTIFORD, G. D.; OIDTMANN, B.; SCOTT, A.; PEELER, E. J. Crustacean diseases in European legislation: Implications for importing and exporting nations. **Aquaculture**, 306**:** 27-34 p. 2010.https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.06.004

STENTIFORD, G. D.; SHIELDS, J. D. A review of the parasitic dinoflagellates *Hematodinium* species and *Hematodinium*-like infections in marine crustaceans. **Diseases of Aquatic Organisms**, 66, n. 1, p. 47-70, 2005. 10.3354/dao066047

SUPAMATTAYA, K.; HOFFMANN, R. W.; BOONYARATPALIN, S.; KANCHANAPHUM, P. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla setrata* and krill *Acetes* sp. **Diseases of Aquatic Organisms**, 32, n. 2, p. 79-85, 1998. 10.3354/dao032079

TANG, K. F. J.; MESSICK, G. A.; PANTOJA, C. R.; REDMAN, R. M.; LIGHTNER, D. V. Histopathological characterization and in situ detection of *Callinectes sapidus* reovirus. **Journal of Invertebrate Pathology**, 108, n. 3, p. 226-228, 2011. https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.08.010

TAVARES, C. P. S.; SILVA, U. A. T.; PEREIRA, L. A.; OSTRENSKY, A. Systems and techniques used in the culture of soft-shell swimming crabs. **Reviews in Aquaculture**, 10, n. 4, p. 913-923, 2018. https://doi.org/10.1111/raq.12207

TEAM, R. C. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: 2020.

THIBODEAUX, L. K.; BURNETT, K. G.; BURNETT, L. E. Energy metabolism and metabolic depression during exercise in *Callinectes sapidus*, the Atlantic blue crab: effects of the bacterial pathogen *Vibrio campbellii*. **The Journal of experimental biology**, 212, p. 3428-3439, 2009. 10.1242/jeb.033431

VAGO, C. A Virus Disease in Crustacea. **Nature**, 209, n. 5030, p. 1290-1290, 1966. 10.1038/2091290a0

VASEEHARAN, B.; JAYAKUMAR, R.; RAMASAMY, P. PCR-based detection of white spot syndrome virus in cultured and captured crustaceans in India. **Letters in Applied Microbiology**, 37, n. 6, p. 443-447, 2003. 10.1046/j.1472-765X.2003.01428.x

VLAK, J.; BONAMI, J.; FLEGEL, T.; KOU, G.; LIGHTNER, D.; LO, C.; LOH, P.; WALKER, P. Nimaviridae. *In*: FAUQUET, C. M.;MAYO, J.;MANILOFF, J.;DESSELBERGER, U. e BALL, L. A. (Ed.). **Virus Taxonomy. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**: Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2005. p. 187–192.

WAIKHOM, G.; JOHN, K. R.; GEORGE, M. R.; JEYASEELAN, M. J. P. Differential host passaging alters pathogenicity and induces genomic variation in white spot syndrome virus. **Aquaculture**, 261, n. 1, p. 54-63, 2006. 10.1016/j.aquaculture.2006.07.031

WALKER, P. J.; BLASDELL, K. R.; CALISHER, C. H.; DIETZGEN, R. G.; KONDO, H.; KURATH, G.; LONGDON, B.; STONE, D. M.; TESH, R. B.; TORDO, N.; VASILAKIS, N.; WHITFIELD, A. E.; ICTV REPORT, C. ICTV Virus Taxonomy Profile: Rhabdoviridae. **The Journal of general virology**, 99, n. 4, p. 447-448, 2018.

WALKER, P. J.; SIDDELL, S. G.; LEFKOWITZ, E. J.; MUSHEGIAN, A. R.; DEMPSEY, D. M.; DUTILH, B. E.; HARRACH, B.; HARRISON, R. L.; HENDRICKSON, R. C.; JUNGLEN, S.; KNOWLES, N. J.; KROPINSKI, A. M.; KRUPOVIC, M.; KUHN, J. H.; NIBERT, M.; RUBINO, L.; SABANADZOVIC, S.; SIMMONDS, P.; VARSANI, A.; ZERBINI, F. M.; DAVISON, A. J.; SPRINGERLINK. Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). **Archives of Virology**, 164, n. 9, p. 2417-2429, 2019. 10.1007/s00705-019-04306-w.2019.

WANG, H.-C.; HIRONO, I.; MANINGAS, M. B. B.; SOMBOONWIWAT, K.; STENTIFORD, G.; CONSORTIUM, I. R. ICTV Virus Taxonomy Profile: Nimaviridae. **Journal of General Virology**, 100, n. 7, p. 1053-1054, 2019. https://doi.org/10.1099/jgv.0.001248

WANG, J.; HONG, W.; ZHU, F. The role of Astakine in *Scylla paramamosain* against Vibrio alginolyticus and white spot syndrome virus infection. **Fish and Shellfish Immunology**, 98, p. 236-244, 2020. 10.1016/j.fsi.2020.01.024

WANG, Y.-C.; LO, C.-F.; CHANG, P.-S.; KOU, G.-H. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. **Aquaculture**, 164, n. 1, p. 221-231, 1998/05/01/ 1998. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00188-4

WANG, Z.; SUN, B.; ZHU, F. Epigallocatechin-3-gallate inhibit replication of white spot syndrome virus in *Scylla paramamosain*. **Fish and Shellfish Immunology**, 67, p. 612-619, 2017. 10.1016/j.fsi.2017.06.050

WANG, Z.; SUN, B.; ZHU, F. Molecular characterization of glutaminyl-peptide cyclotransferase(QPCT)in *Scylla paramamosain* and its role in *Vibrio alginolyticus* and white

spot syndrome virus (WSSV) infection. **Fish and Shellfish Immunology**, 78, p. 299-309, 2018. 10.1016/j.fsi.2018.04.059

WENG, S. P.; GUO, Z. X.; SUN, J. J.; CHAN, S. M.; HE, J. G. A reovirus disease in cultured mud crab, *Scylla serrata*, in southern China. **Journal of Fish Diseases**, 30, n. 3, p. 133-139, 2007. 10.1111/j.1365-2761.2007.00794.x

WILLIAMS, A. B. The swimming crabs of the genus *Callinectes* (Decapoda: Portunidae). **Fishery Bulletin**, 72, n. 3, 1974.

YUDIN, A. I.; CLARK, W. H. A description of rhabdovirus-like particles in the mandibular gland of the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 33, n. 2, p. 133-147, 1979. 10.1016/0022-2011(79)90146-0

ZHANG, L. P.; LI, D. F.; LIU, L. G.; ZHANG, G. Rapid immunochromatographic test strip to detect swimming crab *Portunus trituberculatus* reovirus. **Diseases of Aquatic Organisms**, 117, n. 1, p. 21-29, 2015. 10.3354/dao02921

ZHANG, R.; HE, J.; SU, H.; DONG, C.; GUO, Z.; OU, Y.; DENG, X.; WENG, S. Identification of the structural proteins of VP1 and VP2 of a novel mud crab dicistrovirus. **Journal of Virological Methods**, 171, n. 2, p. 323-328, 2011. 10.1016/j.jviromet.2010.09.010

ZHANG, S.; BONAMI, J. R. A roni-like virus associated with mortalities of the freshwater crab, *Eriocheir sinensis* Milne Edwards, cultured in China, exhibiting 'sighs disease' and black gill syndrome. **Journal of Fish Diseases**, 30, n. 3, p. 181-186, 2007. 10.1111/j.1365-2761.2007.00796.x

ZHANG, S.; BONAMI, J. R. Isolation and partial characterization of a new reovirus in the chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* H Milne Edwards. **Journal of Fish Diseases**, 35, n. 10, p. 733-739, 2012. 10.1111/j.1365-2761.2012.01398.x

ZHANG, S.; SHI, Z.; ZHANG, J.; BONAMI, J. R. Purification and characterization of a new reovirus from the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. **Journal of Fish Diseases**, 27, n. 12, p. 687-692, 2004. 10.1111/j.1365-2761.2004.00587.x

ZHANG, S.; ZHANG, J. H.; HUANG, C. H.; BONAMI, J. R.; SHI, Z. L. Preliminary studies on two strains of reovirus from crab *Eriocheir sinensis*. **Virologica Sinica**, 17, p. 263-265, 2002.

ZHAO, M.; FLOWERS, E. M.; SCHOTT, E. J. Near-complete sequence of a highly divergent reovirus genome recovered from *Callinectes sapidus*. **Microbiology Resource Announcements**, 10, n. 1, p. e01278-01220, 2021. 10.1128/mra.01278-20

ZHAO, M.; TAVARES, C. P. d. S.; SCHOTT, E. J. Diversity and classification of reoviruses in crustaceans: A proposal. **Journal of Invertebrate Pathology**, p. 107568, 2021/03/10/ 2021. https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107568

Pergunta 2

CsRV1 infecta e causa mortalidade em *Callinectes danae* mantidos em cativeiro no Brasil?

CAPÍTULO II - DETECÇÃO DE UM SUPOSTO NOVO REOVÍRUS EM *Callinectes danae*, COM IMPACTOS POTENCIAIS NA PRODUÇÃO DE SIRI-MOLE NO BRASIL[1]

Camila Prestes dos Santos Tavares[1,2], Mingli Zhao[4,] Éverton Lopes Vogt[3]; Jorge Felipe Argenta Model[3], Anapaula Sommer Vinagre[3], Ubiratan de Assis Teixeira da Silva[2,] Antonio Ostrensky[2] e Eric J Schott[4]

[1]Programa de Pós-graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Departamento de Zoologia, Curitiba, Paraná, Brasil. CEP: 80035-050. Telefone: +55 41 33505634. E-mail: camilatavares@ufpr.br

[2]Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), Universidade Federal do Paraná, Departamento de Zootecnia, Curitiba, Paraná, Brasil. CEP: 80035-050.

[3]Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. CEP: 90050-170.

[4]Institute of Marine and Environmental Technology, University of Maryland Center for Environmental Science, Baltimore, MD 21202, USA.

RESUMO

Os crustáceos portunídeos, popularmente conhecidos como siris, podem ser infectados por uma variedade de microrganismos patogênicos, mas os mais prejudiciais são os vírus. Acredita-se que *Callinectes sapidus* reovirus 1 (CsRV1) de ocorrência natural contribua para a mortalidade de *Callinectes sapidus* em sistemas de cultivo de siri-mole nos EUA. No Brasil, os siris-moles são frequentemente produzidos com *Callinectes danae*, que sofre uma taxa de mortalidade em cultivo semelhante à de *C. sapidus*. Uma ferramenta para triagem de siris infectados por vírus pode ajudar a indústria a rastrear os siris infectados antes de serem colocados nas instalações de cultivo. Este estudo investigou se o CsRV1 poderia ser detectado em *Callinectes danae* mantidos em cativeiro. O estudo também avaliou a relação entre a infecção viral e os parâmetros bioquímicos e comportamentais. Para isso, os exemplares de *C. danae* (n=178) foram coletados na baía de Paranaguá, mantidos em sistema de recirculação por 14 dias e submetidos semanalmente a análises bioquímicas e teste preditor de mortalidade por ação reflexa (RAMP). Os ensaios RT-qPCR para CsRV1 foram negativos para todas as amostras. No entanto, a análise eletroforética do RNA extraído de alguns siris mostrou um padrão de 12 bandas de dsRNA que indicava infecção intensa por um reovírus com uma organização genômica diferente de CsRV1. O padrão de bandas foi indistinguível de um novo reovírus putativo detectado em *C. sapidus* no Rio Grande do Sul, Brasil, provisoriamente denominado de CsRV2. A prevalência do dsRNA de CsRV2 aumentou significativamente nos siris ao longo do período experimental, mas não

[1]Artigo submetido à Aquaculture - ISSN:0044-8486

houve diferença significativa na prevalência do CsRV2 entre os siris que morreram e sobreviveram. A presença do dsRNA de CsRV2 foi correlacionada com uma redução significativa na concentração de glicogênio no hepatopâncreas e uma diminuição da ação reflexa de RAMP, especialmente do reflexo de chute. Os resultados obtidos neste estudo são um primeiro vislumbre da ocorrência de reovírus que infectam *C. danae* e seus potenciais efeitos sobre os siris em sistemas de produção de siri-mole no Sul do Brasil.

Palavras-chave: Reovirus; CsRV2; siri-azul; Glicogênio; Proteínas totais; RAMP.

1. INTRODUÇÃO

Os crustáceos portunídeos (Decapoda, Crustacea), comumente conhecidos como siris, são distribuídos globalmente e considerados importantes recursos pesqueiros em muitos países, tendo gerado cerca de 2 milhões de toneladas capturadas em todo o mundo (FAO, 2020). Além disso, várias espécies de siris são altamente valorizadas na aquicultura, com um valor global de produção estimado em 2,2 milhões de dólares em 2018 (FAO, 2020; TOBIAS-QUINITIO; LIBUNAO; PARADO-ESTEPA; CALPE, 2015). Além do cultivo de siris de casca dura, existe uma indústria economicamente significativa e crescente de siris-mole, que são siris recém-mudados ainda cobertos por um tegumento flexível e macio, uma característica que permite que sejam consumidos inteiros (CHANG; MYKLES, 2011; FREEMAN; KILGUS; LAURENDEAU; PERRY, 1987; TAGATZ, 1968). Os siris-moles são considerados uma iguaria gastronômica de alto valor, apreciada em todo o mundo (HUNGRIA; TAVARES; PEREIRA; SILVA *et al.*, 2017).

A produção de siri-mole, que é praticada há mais de 100 anos nos EUA e em vários países da Ásia, tornou-se ao longo do tempo uma atividade multimilionária, caracterizando-se como uma das formas mais lucrativas de agregar valor à pesca do siri, além de ser uma importante fonte de emprego e renda em diversos países (FERDOUSHI; XIANG; HASAN, 2010; KENNEDY; CRONIN, 2007; TAVARES; SILVA; PEREIRA; OSTRENSKY, 2018). Não raro, porém, são registradas taxas de mortalidades nas instalações de produção de siri-mole, que podem afetar 25% ou mais dos animais mantidos em cativeiro, representando significativa perda de recursos pesqueiros, tempo e atividade laboral, o que pode

comprometer até mesmo a própria viabilidade financeira dos empreendimentos (CHAVES; EGGLESTON, 2003; SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.*, 2019).

Nos Estados Unidos, *Callinectes sapidus* é a espécie mais cultivada na produção de siri-mole, devido à abundância de animais provenientes da pesca e à simplicidade das técnicas de cultivo (TAVARES; SILVA; PEREIRA; OSTRENSKY, 2018). No Brasil, o cultivo de siri-mole é realizado com *C. sapidus*, bem como com *C. danae* e *C. exasperatus*, que também são comumente pescados ao longo da costa brasileira. Pesquisas em laboratórios brasileiros indicam que as taxas de mortalidade de *C. danae* e *C. exasperatus* também são de aproximadamente 25%, conforme observado para *C. sapidus* nos EUA (OSTRENSKY; VENTURA; CORRÊA; SANTOS *et al.*, 2015).

As causas da mortalidade de siris durante o processo produtivo de siris-moles incluem a baixa qualidade da água nos sistemas de cultivo (HOCHHEIMER, 1988; LAKSHMI; TRIGG; PERRY; VENKATARAMIAH, 1984); o estresse causado pela coleta e transporte dos animais (CHAVES; EGGLESTON, 2003); e o estresse fisiológico associado ao processo de muda (DEFUR; NUSBAUMER; LEWIS, 1988). Sabe-se também que o estresse pode tornar os siris mais suscetíveis à infecção por patógenos ou exacerbar a patogenicidade das infecções (KENNEDY; CRONIN, 2007; PERAZZOLO; ROSA; BARRACCO, 2012; SHIELDS; OVERSTREET, 2007), especialmente vírus (DEFUR; NUSBAUMER; LEWIS, 1988; JOHNSON, 1977; LE MOULLAC; HAFFNER, 2000; PERAZZOLO; ROSA; BARRACCO, 2012; SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.*, 2019).

A resposta ao estresse em invertebrados infectados por patógenos virais ainda é relativamente pouco compreendida (FABBRI; MOON, 2016; GALLO; ACCORDI; CHIMENTI; CIVININI *et al.*, 2016). O estresse estimula a secreção de catecolaminas e hormônio hiperglicêmico de crustáceos (CHH) pelo principal centro neuroendócrino, o órgão X (APARICIO-SIMÓN; PIÑÓN; RACOTTA; RACOTTA, 2010; CHUNG, 2010;

MODEL; DOS SANTOS; DA SILVA; VINAGRE, 2019). Essa resposta neuroendócrina primária ao estresse é seguida por alterações nos metabólitos da hemolinfa e dos tecidos, como glicose e lactato, que são considerados a resposta secundária ao estresse (APARICIO-SIMÓN; PIÑÓN; RACOTTA; RACOTTA, 2010; LORENZON; GIULIANINI; MARTINIS; FERRERO, 2007; MERCIER; PALACIOS; CAMPA-CÓRDOVA; TOVAR-RAMÍREZ *et al.*, 2006; VINAGRE; TRAPP; KUCHARSKI; SILVA, 2020). Por exemplo, a hiperglicemia e hiperlactatemia são induzidas pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) em *Cherax quadricarinatus* e *Litopenaeus vannamei* (FAN; YE; CHEN; SHAO *et al.*, 2016; HERNÁNDEZ-PALOMARES; GODOY-LUGO; GÓMEZ-JIMÉNEZ; GÁMEZ-ALEJO *et al.*, 2018). A hiperglicemia e diminuição do glicogênio também foram observadas na lagosta espinhosa do Caribe *Panulirus argus* infectado com *Panulirus argus* virus 1 (PaV1) (HERRERA-SALVATIERRA; PASCUAL-JIMÉNEZ; HUCHIN-MIAN; LOZANO-ÁLVAREZ *et al.*, 2019; ZAMORA-BRISEÑO; RUIZ-MAY; ELIZALDE-CONTRERAS; HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ *et al.*, 2020). PaV1 também pode alterar as vias bioquímicas de síntese de neurotransmissores e o comportamento do hospedeiro (ZAMORA-BRISEÑO; RUIZ-MAY; ELIZALDE-CONTRERAS; HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ *et al.*, 2020).

Já foram registradas cerca de oito espécies de virus em *Callinectes* spp., quatro são letais e dois são encontrados simultaneamente com outros virus, com evidências de efeito patogênico sinérgico entre elas (KENNEDY; CRONIN, 2007; ROGERS; TAYLOR; HAWKE; SCHOTT *et al.*, 2015). *Callinectes sapidus* Reo-like Virus 1 (também chamado RLV para Reo-Like Virus, ou CsRV1 (JOHNSON, 1977; TANG; MESSICK; PANTOJA; REDMAN *et al.*, 2011)), está intimamente associado à episódios de elevada e rápida mortalidade de *C. sapidus* em instalações de cultivo de siri-mole na América do Norte (BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010; FLOWERS; JOHNSON; AGUILAR; SCHOTT, 2018; SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.*, 2019). O CsRV1 é um reovírus com um genoma de RNA de fita dupla (dsRNA), que infecta tecidos de origem mesodérmica e

ectodérmica, especialmente hemócitos, que invadem os gânglios cerebrais e torácicos, e que causa tremores e paralisia nos animais infectados (BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010; JOHNSON, 1977; KENNEDY; CRONIN, 2007). O genoma de um segundo reovírus putativo de *C. sapidus*, provisoriamente denominado CsRV2, foi recentemente detectado e sequenciado de um siri capturado no Rio Grande do Sul, Brasil (ZHAO; FLOWERS; SCHOTT, 2021). No entanto, os vírions do vírus putativo não foram visualizados ou caracterizados nos tecidos dos siris e as manifestações histopatológicas ou consequências de possíveis infecções não são conhecidas. Também não há estudos sobre sua prevalência ou patogenicidade em qualquer espécie de *Callinectes*.

Existem registros de alta prevalência de CsRV1 em *C. sapidus* selvagem em estuários da costa atlântica dos EUA e do Rio Grande do Sul, Brasil (FLOWERS; BACHVAROFF; WARG; NEILL *et al.*, 2016; SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.*, 2019; ZHAO; BEHRINGER; BOJKO; KOUGH *et al.*, 2020). A identificação do CsRV1 depende da detecção do genoma do vírus usando ensaios de RT-qPCR, que é caro, demorado e requer instalações especializadas. Apesar da utilidade potencial, não há relatos de métodos de triagem visual, bioquímica ou comportamental bem-sucedidos para identificar siris infectados por vírus. Dada a associação do CsRV1 com a mortalidade de *C. sapidus* na produção de siri-mole e a presença do vírus em *C. sapidus* no Brasil, é importante investigar se o CsRV1 contribui para a mortalidade de *C. danae* na produção brasileira de siri-mole. Este estudo foi projetado para investigar se o CsRV1 ou qualquer outro vírus está associado à mortalidade de *C. danae* mantido em um sistema de recirculação, bem como avaliar se os siris infectados por vírus exibem alterações metabólicas ou comportamentais que podem ser usadas para identificar os siris infectados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. COLETA DOS SIRIS

Espécimes de *C. danae* foram obtidos por pescadores artesanais na Vila de São Miguel, Paranaguá, Paraná, Brasil (25°25'48" S/48°27'12" W). Os siris foram capturados usando armadilhas cobertas por malha de abertura de 20 mm e utilizando-se peixe como isca. Imediatamente após a captura, os animais foram transferidos para caixas de polietileno (70 litros) contendo água do mar do local da captura e mantidos sob aeração constante. Em cada caixa, os siris foram individualmente protegidos por telas plásticas flexíveis para minimizar lesões e mortalidade durante o transporte até o Centro de Aquicultura Marinha e Repovoamento, pertencente ao Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), da Universidade Federal do Paraná (25°41'29.94"S, 48°27'57.09"W).

No laboratório, os animais foram identificados até o nível de espécie com base no manual de identificação desenvolvido por MELO (1996). O sexo, estágio de muda e eventuais lesões na carapaça ou nos apêndices foram registrados a partir do exame visual, conforme recomendado por autores como BAPTISTA; PINHEIRO; BLANKENSTEYN e BORZONE (2003), FREEMAN; KILGUS; LAURENDEAU e PERRY (1987), OSTRENSKY; VENTURA; CORRÊA; SANTOS *et al.* (2015). A largura da carapaça (medida entre a base dos espinhos laterais) e o peso vivo de cada indivíduo foram aferidos, respectivamente, com o auxílio de um paquímetro manual e de uma balança digital de precisão (Marte AL 500 c – 0.001 g, Brazil).

2.2. SISTEMA EXPERIMENTAL

Os exemplares de *C. danae* (n=178), sem distinção de sexo, foram colocados em caixas de polietileno de 70 L (n=6 siris por caixa), divididas por barreiras de PVC perfuradas, para evitar canibalismo. As caixas (n=31) foram interconectadas a um sistema de recirculação, composto por filtros mecânicos e biológicos e submetidas à aeração artificial.

O fotoperíodo foi ajustado para 12:12 horas (claro: escuro), controlado por um temporizador analógico. A temperatura foi mantida em 25 ± 2°C e a salinidade em 25 ups. Os animais foram monitorados diariamente para identificar a ocorrência de mortes e muda. Todos os siris foram alimentados diariamente com peixe até a saciedade. Uma hora após a oferta de alimento, os resíduos e fezes foram coletados e descartados para evitar a deterioração da qualidade da água.

As seguintes variáveis físicas e químicas da água foram analisadas diariamente como rotina durante o experimento: salinidade, medida por meio de refratômetro óptico (Instrutemp, Brasil); pH, através de peagâmetro digital (AZ-86505, Taiwan); temperatura (°C), oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) e percentagem de saturação de oxigênio (%), por meio de oxímetro digital (YSI, 550A, USA); concentração de nitrogênio na forma de amônia total (mg L^{-1} de N-AT), obtida pelo método do indofenol (APHA, 2005) e nitrito (mg L^{-1} de $N\text{-}NO_2^-$) (APHA, 1995) mediante leitura das amostras por espectrometria (Spectronic 20 Genesys, USA).

2.3. COLETA DE HEMOLINFA E DISSECÇÃO DOS SIRIS

A coleta de hemolinfa foi realizada em três momentos, na chegada dos siris ao laboratório, após a primeira semana e ao final do período experimental (14 dias). A hemolinfa (~1 mL) foi coletada de indivíduos (n=111) escolhidos ao acaso, a partir da membrana artrodial localizada na base do quinto pereiópodo, utilizando seringas do tipo insulina contendo citrato de sódio a 10% como anticoagulante (INOHARA; PINTO; MODEL; TRAPP *et al.*, 2015). Após o período experimental, os siris sobreviventes foram crioanestesiados por 15 min. para a última coleta de hemolinfa e dissecados. Os animais que morreram durante o período experimental também foram dissecados logo após a sua morte. Durante a dissecção foram coletadas amostras de hepatopâncreas, gônadas e a musculatura de um dos pereiópodos. Todas as amostras de hemolinfa e tecidos foram

imediatamente transferidas para tubos de microcentrífuga de 2 mL e armazenadas a -20°C para posterior análise.

2.4. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DA HEMOLINFA

Após a coleta, as amostras de hemolinfa foram transportadas em uma caixa de isopor com gelo seco até o Laboratório de Genética do GIA, em Curitiba, Paraná, para a extração de RNA. As amostras de hemolinfa (~100 µL) foram homogeneizadas em 1 mL de solução ácida contendo tiocianato de guanidínio, acetato de sódio, fenol e clorofórmio, elaborada conforme o protocolo de preparação da solução adaptado por RODRIGUEZ-EZPELETA; TEIJEIRO; FORGET; BURGER *et al.* (2009). A extração do RNA foi realizada seguindo o protocolo proposto por SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.* (2019). Os fragmentos de RNA resultantes foram então dissolvidos em EDTA 1 mM para diminuir a degradação do RNA e armazenadas a -20°C. As amostras de controle negativo (água destilada) foram extraídas antes e depois dos conjuntos de amostras dos siris testados para monitorar a contaminação cruzada entre cada amostra. A pureza e concentração do RNA foram avaliadas por fluorimetria Qubit® 4.0 (Thermo Fisher Scientific, USA), realizada de acordo com recomendações do fabricante.

2.5. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DO MÚSCULO DOS PEREIÓPODOS

As amostras de músculo dos pereiópodos de cada siri foram preservadas em etanol 95% e transportadas até o Institute of Marine and Environmental Technology (IMET), pertencente a University of Maryland Center for Environmental Science, Maryland, EUA, para extração de RNA total e posterior determinação da carga viral de CsRV1. Os pereiópodos foram dissecados com lâminas de barbear estéreis, e todas as superfícies de manuseio foram limpas com solução de hipoclorito de sódio a 10% para evitar possíveis contaminações. Fragmentos de 25-100 mg de músculo foram excisados de um pereiópodo e homogeneizados em 1 mL de solução ácida de extração, conforme descrito acima. Porém, nesta etapa a mistura foi homogeneizada utilizando beads de cerâmina em um

homogeneizador FastPrep24 (MP Biomedicals, USA) na velocidade de 4,5 metros/segundo (m/s) por 30 segundos. Todo processo de extração foi realizado conforme o protocolo descrito anteriormente. As amostras de controle negativo (músculo de peixe congelado) foram extraídas antes e depois dos conjuntos de amostras dos siris testados para monitorar a contaminação cruzada entre cada amostra. Após a extração, a pureza e concentração do RNA foram avaliadas por espectrofotometria NanoDrop 2000™ (Thermo Fisher Scientific, USA), realizada de acordo com recomendações do fabricante.

2.6. QUANTIFICAÇÃO DE CsRV1 POR RT-qPCR (REVERSE TRANSCRIPTION-QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION)

A infecção por CsRV1 foi avaliada medindo o número de cópias do genoma de CsRV1 presente no músculo dos siris, usando os métodos RT-qPCR adaptados de FLOWERS; BACHVAROFF; WARG; NEILL *et al.* (2016), usando um par de primers projetado para detectar uma região de 158 pb do nono segmento genômico de CsRV1 (GenBank entry KU311716): 5′-TGCGTTGGATGCGAAGTGACAAAG-3′ (RLVset1F) and 5′-GCGCCATACCGAGCAAGTTCAAAT-3′ (RLVset1R). As curvas de calibração do genoma de CsRV1 para RT-qPCR foram produzidas por dsRNA viral purificado e isolado (preparado de acordo com os métodos de BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.* (2010)) de siris coletados nos Estados Unidos e que apresentavam infecções intensas por CsRV1, com mais de 10^8 cópias por mg de músculo. O dsRNA genômico viral foi quantificado, e então os padrões foram preparados a partir de diluições em série calculadas para 10 a 10^7 cópias por microlitro.

A reação de RT-PCR foi desenvolvida com o qScript™ One-Step SYBR® Green qRT-PCR Kit, Low ROX™ (Quanta Bio - Cat.No.:95089-050) em reações de 10 µL contendo 0,5 µM de cada primer específico para CsRV1. Os primers foram dissolvidos em 1mM de EDTA. Para emparelhar os primers de PCR no dsRNA, os primers e o RNA extraído foram combinados, aquecidos a 95°C por 5 min. e depois resfriados a 4°C, antes de serem

adicionados à mistura de reação da transcriptase reversa e da Taq polimerase. A transcrição reversa e a reação de amplificação foram conduzidas em um termociclador (Applied Biosystems Fast 7500), utilizando temperatura inicial de 50°C por 5 min. (transcrição reversa), seguido de 5 min. a 95°C (inativação da transcriptase reversa e desnaturação do template). A amplificação foi alcançada por meio de 40 ciclos de 5 segundos a 95°C (fusão) e 30 segundos a 61°C (anelamento e extensão), seguido por uma análise da curva de fusão monitorando a fluorescência SybrGreen durante a variação gradual da temperatura de 61°C a 95°C para verificar a amplificação do produto esperado (FLOWERS; BACHVAROFF; WARG; NEILL *et al.*, 2016).

2.7. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO dsRNA DE CsRV2

Um total de 5 µL do RNA total de cada amostra de *C. danae* foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1% (solução tampão TBE 0,5X) e visualizado por coloração com brometo de etídio ou, quando disponível, o corante alternativo GelRed™ (Biotium, CA, USA), e detecção fluorométrica. Para cada amostra aplicada, utilizou-se 1 µL de corante Gel Loading Dye Purple (6X) (Cat.No.:B70255, New England Biolabs, USA). No caso do ladder, utilizou-se 1 µL do corante e 1 µL de marcador de peso molecular 1 kb (Cat.No.:N32325, New England Biolabs, USA). As condições da eletroforese (voltagens, amperagem e tempo) foram padronizadas para permitir a comparação de bandas em diferentes géis.

Para elaborar um método semiquantitativo da intensidade da banda de dsRNA, os géis de agarose foram digitalizados sob luz ultravioleta (UV) e documentadas (no formato tiff.) usando um sistema de documentação de gel ChemiDoc™ (Bio-rad, Austrália). Todos os parâmetros e condições experimentais utilizados foram mantidos constantes ao longo do estudo. A intensidade das bandas do dsRNA viral foi processada por densitometria digitalizada das fotografias, usando o programa Image J versão 1.8.0 de domínio público, e numericamente expressado como densidade relativa (ABRÀMOFF; MAGALHÃES; RAM,

2004). Por conveniência pragmática, apesar das incertezas sobre a caracterização do segundo reovírus putativo e seus efeitos potenciais no hospedeiro, este estudo se refere a esse reovírus putativo como CsRV2 sem qualificação, e aos siris cujos RNAs extraídos mostraram o padrão eletroforético característico de ZHAO; FLOWERS e SCHOTT (2021), como infectado com CsRV2.

2.8. AVALIAÇÃO DE ASPECTOS COMPORTAMENTAIS

As respostas comportamentais dos siris (n=100) foram analisadas usando o teste RAMP (preditor de mortalidade por ação reflexa) para avaliar se a infecção viral por CsRV2 estava associada a mudanças comportamentais em *C. danae* antes de cada coleta de hemolinfa (dias 0, 7 e 14). Este teste foi composto pela análise dos seis reflexos (Tabela 4) descritos por STONER (2012). A partir dos resultados obtidos, foi criado um índice com pontuação variando de 0 (nenhum reflexo perdido) a 6 (todos os reflexos ausentes). A proporção de comprometimento reflexo foi calculada por meio da soma da pontuação dos reflexos para cada animal e divisão pelo total de reflexos observados. Os valores obtidos foram utilizados para a análise estatística e foram correlacionados com a presença do vírus.

Tabela 4. Reflexos avaliados durante o teste RAMP (STONER, 2012).

Ordem de observação	Reflexo observado	Descrição da análise
1	Extensão dos quelípodos	O animal foi levantado com a carapaça para cima e foi observado a extensão dos quelípodos em um plano horizontal. Em animais saudáveis, foi esperada a retração dos quelípodos na direção posterior.
2	Retração dos quelípodos	Os quelípodos foram empurrados na direção anterior. Em animais normais, foi esperada uma forte retração dos apêndices na direção oposta.
3	Fechamento da quela	As quelas foram tocadas com um objeto. Em animais saudáveis, foi esperada uma forte resposta de fechamento.
4	Retração do olho	O pedúnculo ocular foi cuidadosamente tocado com um objeto pontiagudo. A retração lateral do pedúnculo ocular em direção à carapaça foi esperada.
5	Fechamento da boca	O terceiro maxilípede foi cuidadosamente empurrado com um objeto pontiagudo. A resposta reflexa esperada em um indivíduo normal foi a retração.
6	"Chute"	Um objeto pontiagudo foi usado para levantar seus apêndices abdominais. O reflexo esperado foi uma agitação forte e imediata dos pereiópodos

2.9. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As amostras de hemolinfa (~0.9 mL), hepatopâncreas, músculo e gônadas foram enviadas, em caixa de isopor com gelo seco, ao Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LAMEC), Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre, Brasil, para análise bioquímica das alterações metabólicas resultantes da resposta secundária ao estresse causada pela infecção viral. As concentrações de glicose, triglicerídeos e proteínas totais nas amostras de hemolinfa foram determinadas usando kits comerciais Labtest e analisadas em um espectrofotômetro, como rotineiramente usado na bioquímica clínica, e os resultados foram expressos em mg dL^{-1} (ANTUNES; DO AMARAL; RIBARCKI; WIILLAND *et al.*, 2010).

A extração e determinação da concentração de glicogênio nas amostras foram realizadas utilizando a metodologia descrita por INOHARA; PINTO; MODEL; TRAPP *et al.* (2015). Para a determinação das concentrações de triglicerídeos, as amostras de hepatopâncreas foram homogeneizadas em solução salina 0.9% na proporção 1:10 (peso/volume) e a concentração de triglicerídeos foi determinada usando o mesmo kit comercial LABTEST já descrito para a determinação dos triglicerídeos hemolinfáticos (MODEL; DOS SANTOS; DA SILVA; VINAGRE, 2019). Os resultados foram expressos em mg g^{-1} de tecido.

2.10. ANÁLISE DE DADOS

Um banco de dados foi criado e organizado usando o Excel®. A qualidade da água nas unidades experimentais e os dados biométricos dos animais mantidos em cativeiro foram analisados pelos testes de normalidade Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnoff, seguido pelo teste de homogeneidade das variâncias de Chochan C., Hartley & Bartlett e pelo teste de homocedasticidade. A sobrevivência dos siris durante o experimento foi analisada através das curvas de Kaplan-Meier e comparadas através dos métodos Mantel-Cox, Breslow e Tarone-Ware (software IBM SPSS® Statistical Package for Social Sciences,

versão 22). Os dados dicotômicos sobre a prevalência do vírus foram analisados pelo teste de qui-quadrado (X^2) de Pearson para tabela de contingência 2x2. Os dados fisiológicos, comportamentais e densitométricos foram agrupados em dois tratamentos (infectados e não-infectados ou mortos e sobreviventes) e os resultados, quando paramétricos, analisados através de ANOVA One way, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Dados não paramétricos foram analisados através dos testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Em todas as análises, realizadas utilizando-se o software Statsoft Statistica®, versão 10, foi considerando um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. QUALIDADE DA ÁGUA

As características físicas e químicas da água do sistema de cultivo permaneceram relativamente estáveis e dentro dos limites recomendados para caranguejos cultivados durante todo o período experimental, com exceção da concentração de nitrito e oxigênio dissolvido (Tabela 5).

Tabela 5. Média ± desvio padrão das variáveis de qualidade da água do sistema experimental e valores recomendados para os caranguejos de aquicultura propostos por MALONE e BURDEN (1988) e HOCHHEIMER (1988).

Variáveis físicas e químicas	**Média ± desvio padrão**	**Valores recomendados por MALONE e BURDEN (1988) e HOCHHEIMER (1988)**
Temperatura (ºC)	25 ± 0,20	22-28
Oxigênio dissolvido (mg L^{-1})	5,76 ± 0,63	>7,0
Oxigênio dissolvido (%)	78,0 ± 5,71	Nd*
pH	8,0 ± 0,10	6,5-8,5
Salinidade	25,3 ± 0,46	± 5 ups do local de coleta
Amônia total (mg L^{-1})	0,07 ± 0,05	<1,0
Nitrito (mg L^{-1})	0,93 ± 0,21	<0,5

* Não disponível

3.2. MORTALIDADE

No total, 48,9% (n=91) dos siris morreram durante o experimento. A análise da curva de sobrevivência de Kaplan-Meier revelou que o que as mortes ocorreram de forma relativamente uniforme desde o primeiro até o decimo quarto dia de experimento (Figura 6). Quando os siris chegaram ao laboratório, foi observado que 35,4% apresentaram lesões, como a ausência de um ou dois quelípodos e de até quatro pereiópodos. Um total de 58,7% dos siris com alguma lesão morreu durante o período experimental. Usando os métodos Mantel-Cox, Breslow e Tarone-Ware, a mortalidade de siris com lesões e intactos não foi significativamente diferente (p>0,05). Além disso, não houve diferença estatística (p>0,05) na sobrevivência entre siris de diferentes sexos (fêmea: 44%, macho: 53,2%) ou estágios de muda (pré-muda: 47,3%, intermuda: 51,5%).

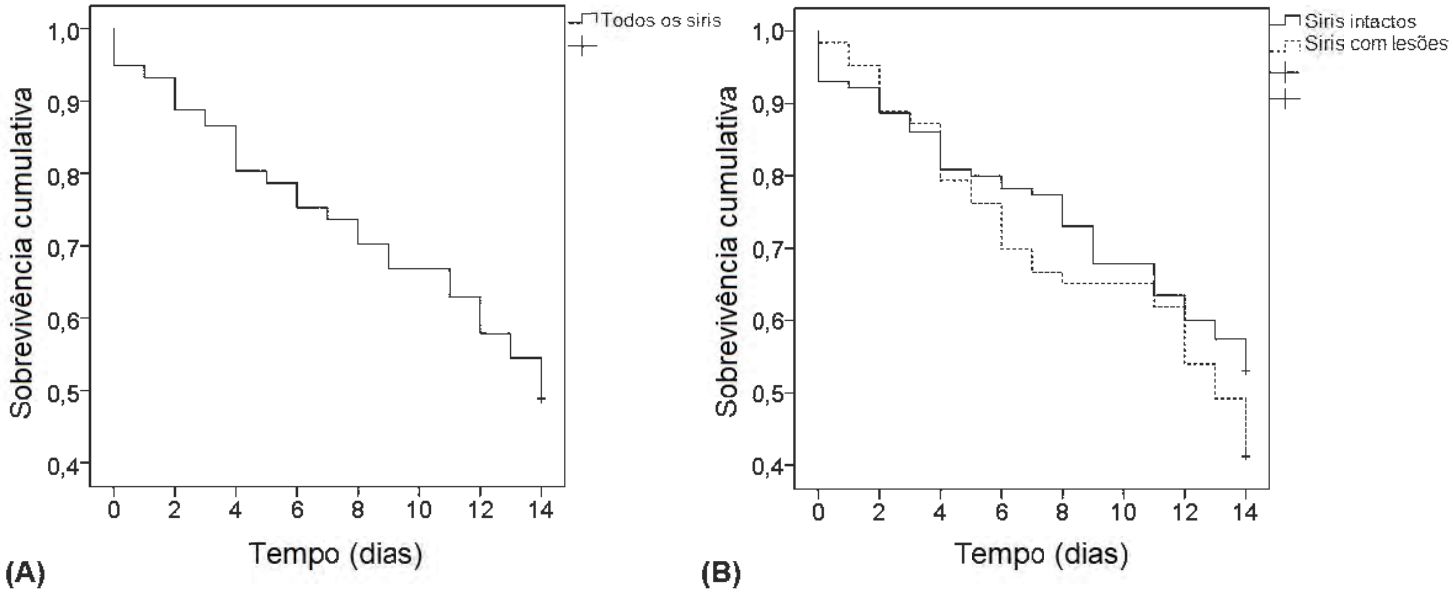


Figura 6. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier de espécimes de *Callinectes danae* mantidos em condições experimentais por 14 dias: (A) curva de sobrevivência do conjunto total de siris testados; (B) curvas de sobrevivência dos siris intactos, sem qualquer lesão visível e dos animais que apresentavam alguma lesão ou ausência de pereiópodos. Não foram encontradas diferenças significativas entre animais intactos e lesionados de acordo com o teste de Mantel-Cox, Breslow e Tarone-Ware.

3.3. PREVALÊNCIA DE CsRV1 USANDO RT-qPCR E DESCOBERTA DE CsRV2 PELA VISUALIZAÇÃO DO GENOMA PUTATIVO DO REOVÍRUS

O RNA total do músculo de *C. danae* foi analisado usando o ensaio RT-qPCR para CsRV1. As curvas de calibração usualmente apresentavam uma inclinação próxima a -3,493 e coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,996 entre a cópia do genoma e o ciclo do limiar. Entretanto, todas as amostras de RNA total dos siris analisados (n=178) foram negativas para CsRV1. Portanto, na busca por evidências de possível presença de outros vírus, o RNA total de todos os siris foi analisado por eletroforese em gel de agarose. A análise mostrou que 12 bandas de dsRNA aparente eram evidentes em muitas das amostras teciduais dos siris. Observou-se, entretanto, que a migração das bandas de dsRNA foi diferente das bandas produzidas pelo genoma CsRV1 (Figura 7). Os tamanhos dos 12 fragmentos foram estimados entre 3,6 e 0,7 kb, com base na comparação com um marcador de peso molecular de 1 kb. O vírus putativo foi aqui provisoriamente identificado como "*Callinectes sapidus* Reo-like Virus 2", ou CsRV2, com base na semelhança com o padrão de dsRNA descrito por ZHAO; FLOWERS e SCHOTT (2021).

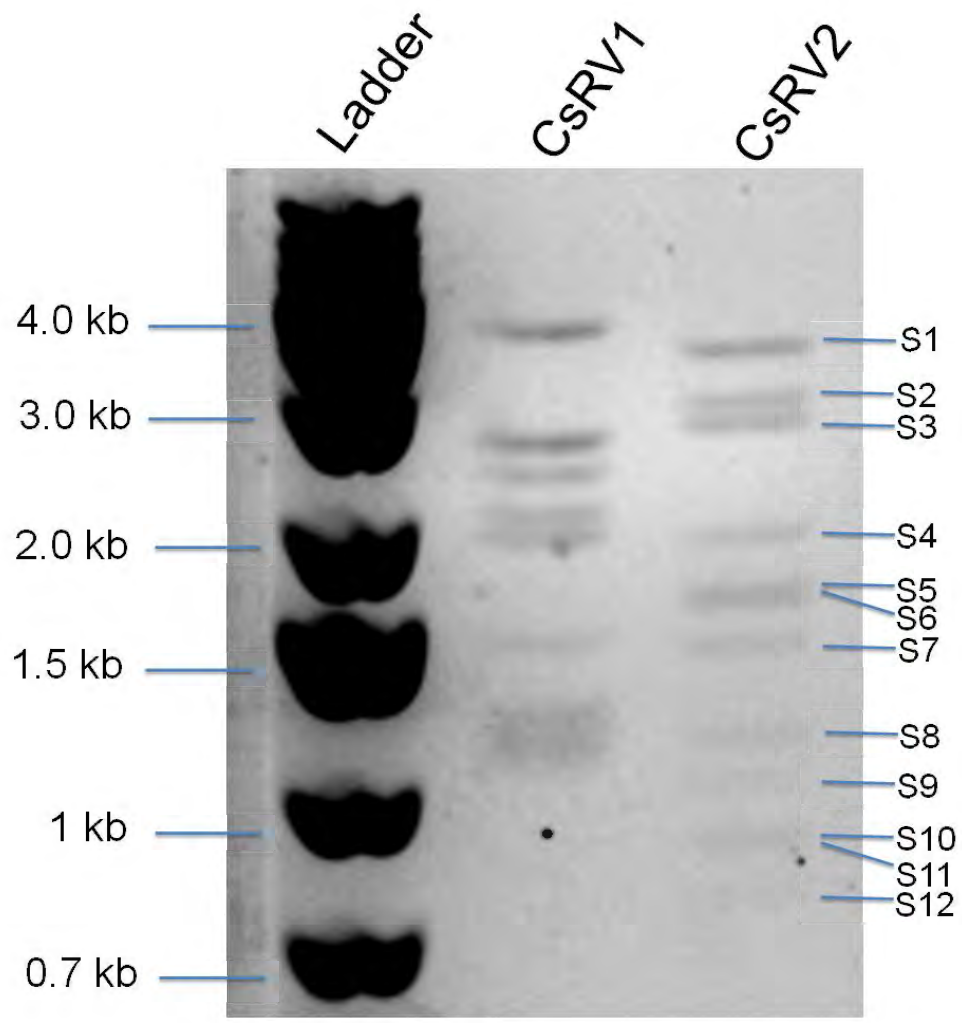


Figura 7. Eletroforese de um dsRNA de um isolado norte-americano CsRV1 de *Callinectes sapidus* e um dsRNA de CsRV2 de *Callinectes danae* mantidos em um sistema de recirculação. Os tamanhos das bandas de dsRNA foram determinados por comparação com marcador de peso molecular 1 kb mostrado na primeira linha (Cat.No.: SM1331, Thermo Fisher Scientific, USA).

O dsRNA do genoma putativo de CsRV2 foi identificado no RNA extraído do músculo de 78% (n=139) dos siris analisados após todo o período o experimental. Além disso, também foi possível observar o dsRNA de CsRV2 no RNA extraído da hemolinfa de *C. danae*, com prevalência de 42% no início do experimento e 88,5% após 14 dias de experimento. Não houve diferença estatística na prevalência de CsRV2 entre as amostras de hemolinfa e de músculo, segundo o teste de qui-quadrado de Pearson (Figura 8A). A análise por densitometria mostrou padrões semelhantes, com aumento da densidade relativa das bandas do genoma putativo de CsRV2 ao longo do período experimental (Figura 8B). Apesar da alta prevalência de CsRV2 observada em *C. danae*, não houve

diferença significativa na presença do genoma de CsRV2 na hemolinfa dos siris que morreram ou sobreviveram durante o experimento. Porém, analisando as amostras de músculo, foi observada maior prevalência e densidade das bandas de dsRNA viral nos animais que sobreviveram até o último dia de experimento (Tabela 6).

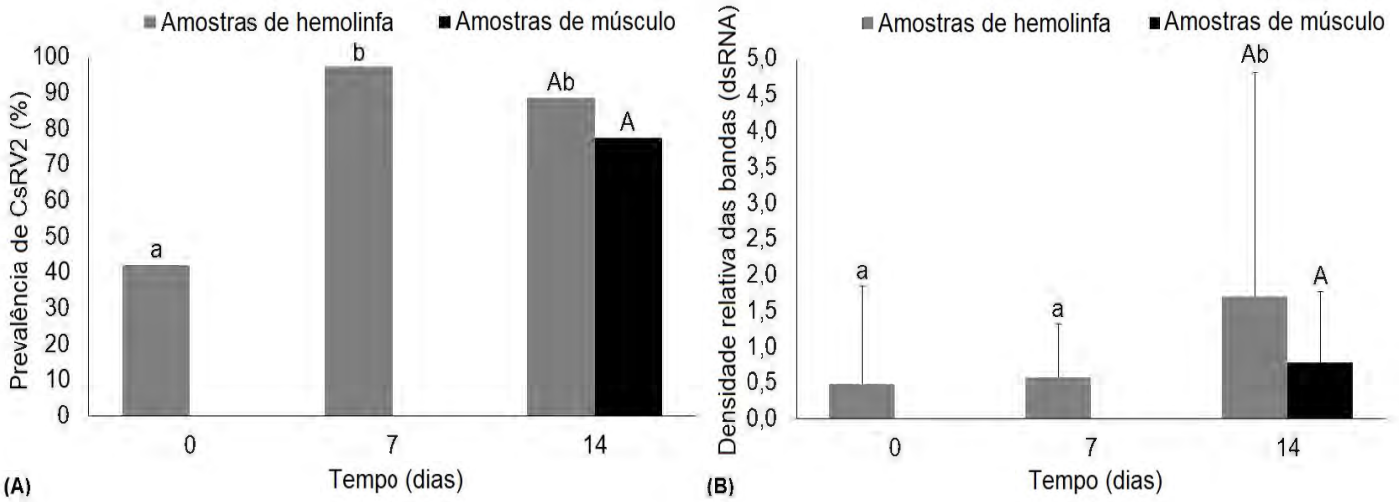


Figura 8. Prevalência de CsRV2 (A) e intensidade relativa das bandas de dsRNA (B) do RNA extraído da hemolinfa (barra cinza) e músculo (barra preta) de *Callinectes danae* ao longo de 14 dias de cativeiro. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p<0,05$) de acordo com o teste de qui-quadrado de Pearson (X^2) para dados de prevalência (%) e ANOVA One-way, seguido do teste post hoc de Tukey para densidade relativa das bandas de dsRNA (Média ± DP). Letras minúsculas indicam diferenças entre a prevalência de CsRV2 identificada na hemolinfa dos siris ao longo do período experimental. Letras maiúsculas indicam diferenças na prevalência entre as amostras de hemolinfa e músculo no último dia de experimento.

Tabela 6. Prevalência de CsRV2 e densidade relativa de bandas de dsRNA de siris, *Callinectes danae*, que sobreviveram ou morreram durante o período experimental.

		Siris vivos			**Siris mortos**		
Origem da amostra	Tempo (dias)	Prevalência de CsRV2 (%)	*n*	Densidade relativa das bandas de dsRNA (média ± DP)	Prevalência de CsRV2 (%)	*n*	Densidade relativa das bandas de dsRNA (média ± DP)
Hemolinfa	0	$12,5^{a}$	8	$0,7 \pm 0^{a}$	50^{a}	45	$0,5 \pm 1,4^{a}$
	7	100^{b}	10	$0,5 \pm 0,4^{a}$	$96,4^{b}$	29	$0,6 \pm 0,7^{b}$
	14	$86,6^{b}$	30	$1,8 \pm 3,3^{b}$	100^{b}	5	$1,1 \pm 3,1^{b}$
Músculo	14	$87,3^{A}$	87	$1,0 \pm 1,2^{A}$	$68,1^{B}$	91	$0,5 \pm 0,5^{B}$

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p<0,05$) de acordo com o teste Qui-quadrado de Pearson para dados de prevalência e ANOVA One-way e o teste de Tukey para comparar conjuntos de dados de densidade relativa. As letras minúsculas indicam diferenças entre os dias de experimento (direção vertical). Letras maiúsculas indicam diferenças entre os siris vivos e mortos (direção horizontal).

Usando o método de qui-quadrado, não foi observada diferença estatística (p>0,05) na prevalência de CsRV2 entre fêmeas (n=84, prevalência de 78,6%) e machos (n=94, prevalência de 76,6%). Além disso, também não foi observada diferença significativa da prevalência de CsRV2 entre siris em estágio de intermuda e pré-muda (p>0,05) após 14 dias de experimento. No entanto, também usando o método do qui-quadrado, a prevalência de CsRV2 foi significativamente menor nos siris que realizaram a muda com sucesso, quando comparada com a prevalência de CsRV2 de siris em pré-muda (Tabela 7). Dos animais testados, 62,6% passaram do estágio de intermuda para o de pré-muda ao longo do período experimental. No entanto, apenas 4% dos siris em pré-muda realizaram a muda com sucesso e somente os animais já coletados em pré-muda conseguiram realizar a muda durante o período experimental.

Tabela 7. Prevalência de CsRV2 em *Callinectes danae* de diferentes estágios de muda após 0 e 14 dias em condições de laboratório.

Estágio de muda	**Tempo (dias)**			
	0		14	
	n	**Prevalência de CsRV2 (%)**	***n***	**Prevalência de CsRV2 (%)**
Intermuda	171	44,4	63	79,4[a]
Pré-muda	7	0	115	76,5[ab]
Muda	0	0	5	40[b]

Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,05) de acordo com o teste Qui-quadrado de Pearson para dados de prevalência.

3.4. AVALIAÇÃO METABÓLICA

Os níveis de glicose, triglicerídeos e proteínas totais na hemolinfa de *C. danae* não apresentaram diferenças significativas (p>0,05) entre os animais infectados e não infectados por CsRV2 (Tabela 8). Nos siris não infectados por CsRV2, os metabólitos da hemolinfa permaneceram constantes (p>0,05) ao longo do experimento. Os níveis de proteínas totais nos animais infectados por CsRV2 permaneceram constantes até o sétimo dia de experimento, mas foram significativamente reduzidos uma semana depois (p<0,05).

Nos siris não infectados por CsRV2, a concentração de proteína total diminuiu até o sétimo dia e permaneceu a mesma até o último dia do experimento, mas não houve diferença estatística ($p>0,05$) devido ao número reduzido de siris não infectados amostrados.

Quando os sexos foram analisados separadamente, não houve diferenças significativas nas concentrações de glicose, triglicerídeos e proteínas totais na hemolinfa de machos ou fêmeas infectados e não infectados. A concentração de glicose plasmática de machos infectados aumentou significativamente ao longo do tempo, mas esse aumento não foi observado para fêmeas infectadas e não infectadas. Não foi possível analisar as alterações metabólicas em machos não infectados, devido à falta de amostras de machos não infectados da última semana do experimento. Por outro lado, as concentrações de triglicérides na hemolinfa das fêmeas infectadas diminuíram ($p<0,05$) ao longo do experimento, o que não ocorreu em machos. A concentração total de proteína diminuiu significativamente do dia 7 ao 14 tanto em fêmeas infectadas quanto em machos infectados. O tamanho da amostra ($n=3$ e 1 para os dias 7 e 14, respectivamente) para siris não infectados foi muito baixo.

As concentrações de triglicerídeos nas gônadas e no hepatopâncreas seguiram um padrão semelhante entre os siris infectados com CsRV2 e não infectados. No entanto, os níveis de glicogênio no hepatopâncreas diminuíram ($p<0,05$) nos siris infectados em comparação com os não infectados (Tabela 9). A concentração de glicogênio e triglicerídeos no hepatopâncreas e gônadas não foi significativamente diferente quando o sexo dos siris infectados e não infectados foram comparados separadamente ou entre siris em diferentes estágios de muda.

Tabela 8. Relação da infecção por CsRV2 e as concentrações de glicose, triglicerídeos e proteínas totais na hemolinfa de fêmeas e machos de *Callinectes danae* mantidos em condições de laboratório. Os valores são expressos como mediana (min-máx) em mg dL^{-1}.

Metabólitos plasmáticos	Tempo (dias)	**Siris positivos para CsRV2**			Total *n*	**Siris negativos para CsRV2**			Total *n*
		Mediana (min-max)				Mediana (min-max)			
		Total	Machos	Fêmeas		Total	Machos	Fêmeas	
Glicose	0	9,3 (3,7-14,9)	7,7[a] (1,7-9,8)	9,2 (5,7-19,5)	15	8,5 (1,7-19,5)	9,3 (3,7-14,5)	10,8 (4,5-14,9)	22
	7	8,9 (3,5-44,8)	9,7[a] (6,6-16,2)	8,2 (3,5-44,8)	35	6,4 (6,4-6,4)	-	6,4 (6,4-6,4)	1
	14	7,9 (3,1-19,3)	10,6[b] (8,2-19,3)	7,1 (3,1-19,2)	26	3,8 (0,5-12,9)	-	3,8 (0,5-12,9)	4
Triglicerídeos	0	14,9 (4,9-36,2)	9,4 (4,9-14,6)	20,6[a] (7,2-36,2)	14	13,3 (6,6-79,5)	12,2 (6,6-79,5)	19,0 (7,5-63,1)	22
	7	11,0 (7,3-71,7)	9,3 (7,3-11,0)	13,8[b] (8,3-71,7)	33	25,6 (25,6-25,6)	-	25,6 (25,6-25,6)	1
	14	10,2 (5,2-74,9)	5,7 (5,2-74,9)	9,3[b] (8,1-9,7)	26	9,3 (8,1-9,7)	-	10,9 (6,5-25,4)	3
Proteínas totais	0	2,3[a] (1,0-4,0)	2,2[a] (1,0-3,8)	2,3[a] (1,5-4,0)	15	2,6 (1,0-4,2)	2,3 (1,0-3,6)	2,7 (1,5-4,2)	18
	7	2,8[a] (1,4-3,3)	2,3[a] (1,4-3,3)	3,0[a] (1,7-3,3)	32	1,8 (1,9-1,9)	-	1,9 (1,9-1,9)	1
	14	1,9[b] (1,4-3,3)	1,8[b] (1,4-2,4)	1,9[b] (1,2-2,7)	28	1,9 (1,6-1,9)	-	1,9 (1,6-1,9)	3

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p<0,05$) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis e o teste U de Mann Whitney. As letras minúsculas indicam diferenças entre os dias de experimento (direção vertical). Não houve diferença significativa entre os siris infectados por CsRV2 e os não infectados para cada dia experimental.

Tabela 9. Relação da infecção por CsRV2 e as concentrações de glicogênio no hepatopâncreas e triglicerídeos no hepatopâncreas e gônadas de siris machos e fêmeas (*Callinectes danae*) mantidos em condições de laboratório. Os valores são expressos como mediana (min-max) em mg g^{-1}.

Metabólitos plasmáticos	Tempo (dias)	**Siris positivos para CsRV2**				**Siris negativos para CsRV2**			
		Mediana (min-max)			Total *n*	Mediana (min-max)			Total *n*
		Total	Machos	Fêmeas		Total	Machos	Fêmeas	
TG	14	57,4 (19,2-325,4)	230,7 (230,6-230,6)	57,3 (19,2-325,4)	50	44,3 (13,9-154,6)	-	44,3 (13,9-154,6)	12
GH	14	0,01[A] (0,0-1,3)	0,01 (0,0-1,3)	0,02 (0,0-0,5)	124	0,02[B] (0,0-1,0)	0,02 (0,0-1,0)	0,02 (0,0-0,1)	36
TH	14	42,6 (6,0-153,2)	40,6 (6,0-92,9)	45,2 (7,2-153,2)	94	36,3 (2,9-95,5)	39,6 (2,9-70,5)	31,3 (7,3-95,5)	27

TG: Triglicerídeos das gônadas; GH: Glicogênio do hepatopâncreas; TH: Triglicerídeos do hepatopâncreas. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas ($p<0,05$), de acordo com o teste U de Mann Whitney, entre os siris infectados e não infectados por CsRV2.

3.5. AVALIAÇÃO DE ASPECTOS COMPORTAMENTAIS

O CsRV2 foi detectado em 74% (n=74) dos siris cujos reflexos foram avaliados. Entre os animais infectados, 48,6% (n=36) não perderam nenhum dos seis reflexos avaliados e 51,4% (n=38) apresentaram alguma mudança de comportamento. A proporção de comprometimento reflexo considerando todos os seis reflexos diferiu significativamente ($p<0,05$) entre os siris infectados com CsRV2 e não infectados apenas no sétimo dia do experimento (Tabela 10). Nos siris infectados com CsRV2, o comprometimento do reflexo aumentou após 7 dias e permaneceu estabilizado até o final do experimento. Dos seis reflexos de RAMP analisados, o chute foi o que apresentou maior redução ao longo do experimento (era de 23% no início, passou para 44,1% ao final de 7 dias e, ao final de 14 dias, 69,4% dos animais não apresentavam mais esse reflexo, Figura 9A).

Enquanto isso, os reflexos de retração do quelípodo, retração ocular e fechamento da boca foram mais raramente perdidos. O teste U de Mann Whitney indicou uma diferença significativa na perda do reflexo de chute entre os siris infectados e não infectados, enquanto os outros reflexos não apresentaram alterações significativas (Figura 9B). Além disso, o teste U de Mann Whitney não mostrou diferença significativa ($p>0,05$) nas concentrações de proteínas totais, triglicerídeos e glicose na hemolinfa entre os siris que mantiveram o reflexo de chute e os que o perderam no período experimental.

Tabela 10. Relação do efeito da infecção pelo CsRV2 com o comprometimento dos reflexos motores (RAMP) de *Callinectes danae* mantida em condições de laboratório.

		Proporção do comprometimento reflexo (RAMP) Mediana (min-máx)			
	Tempo (dias)	Siris negativos para CsRV2	*n*	Siris positivos para CsRV2	*n*
Todos os reflexos testados	0	0,0 (0,0-0,17)	26	0,00^{a} (0,0-0,3)	74
	7	0,0^{A} (0,0-0,17)	13	0,17^{Bb} (0,0-0,8)	58
	14	0,0 (0,0-0,17)	3	0,17^{b} (0,0-0,7)	32

Letras minúsculas indicam diferenças significativas (p<0,05), utilizando-se os testes de Friedman ANOVA e Wilcoxon entre os dias de experimento. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas, de acordo com o teste U de Mann Whitney, entre os siris infectados e não infectados por CsRV2 para cada dia do experimento.

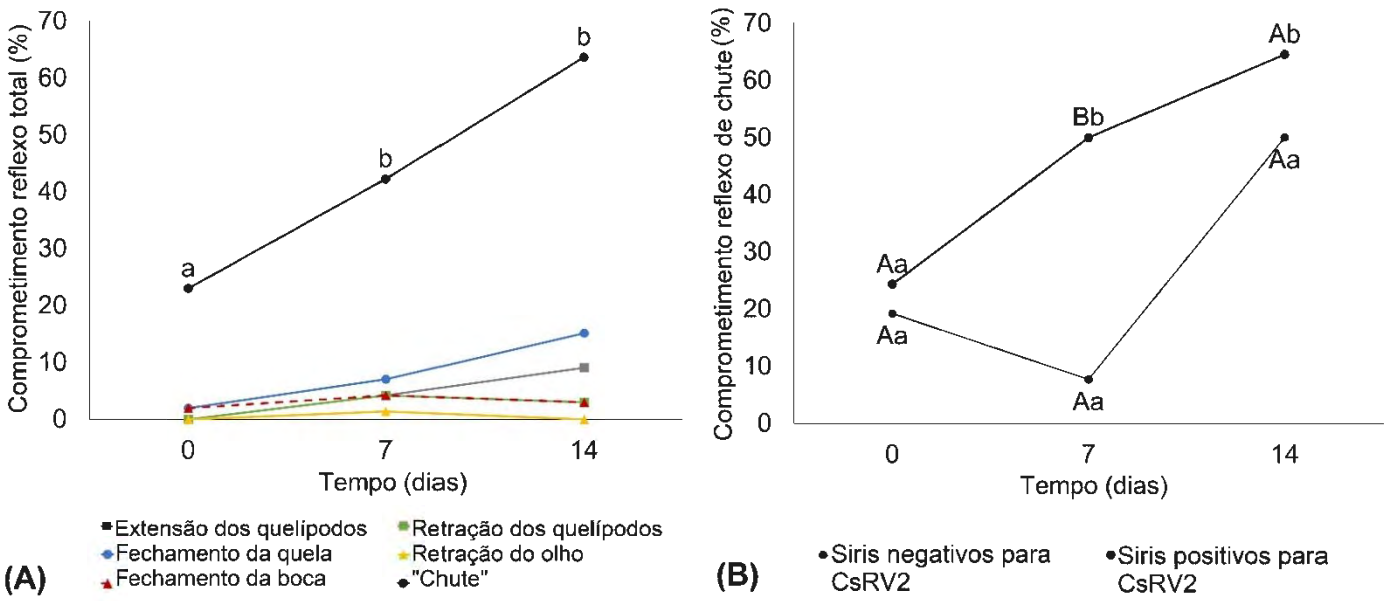


Figura 9. (A) Porcentagem de indivíduos *Callinectes danae* com reflexos comprometidos durante o experimento; (B) Porcentagem de siris infectados e não infectados por CsRV2 que tinham reflexo de chute comprometido. Letras minúsculas representam diferenças significativas no reflexo (p<0,05; teste de Friedman ANOVA seguido por Wilcoxon). Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre animais infectados e não infectados ao longo do experimento (teste U de Mann Whitney).

4. DISCUSSÃO

O presente estudo forneceu a primeira quantificação da mortalidade do siri-azul *C. danae* cultivado em sistema de recirculação. Foi também o primeiro estudo a investigar se CsRV1, que é patogênico para *C. sapidus* em sistemas de produção de siri-mole, estava

presente em *C. danae* em cativeiro. A investigação revelou que, embora o CsRV1 não tenha sido detectado, um novo reovírus putativo, provisoriamente denominado CsRV2, era altamente prevalente. A prevalência de CsRV2 não foi associada à mortalidade, embora a carga viral tenha aumentado ao longo do tempo entre os siris sobreviventes. O estudo investigou a correlação do CsRV2 com o estado metabólico e sinais comportamentais em *C. danae* capturado no ambiente natural e mantido em cativeiro.

4.1. MORTALIDADE

No Brasil, informações sobre o cultivo de siris *Callinectes* spp., bem como sobre as taxas de mortalidade em empreendimentos comerciais ainda raras, tanto em função do pequeno número de empresas brasileiras que atuam no setor, como em relação aos segredos comerciais usualmente envolvidos. No entanto, a taxa de mortalidade registrada no presente estudo foi semelhante à relatada por OSTRENSKY; VENTURA; CORRÊA; SANTOS *et al.* (2015), que teve como objetivo identificar as características biológicas de *C. danae* e *C. exasperatus* para a produção de siri-mole no Brasil. Naquele caso, os autores relataram taxas de mortalidade em um sistema de fluxo contínuo que variaram de 37,5% a 60% para *C. danae* e *C. exasperatus*, respectivamente.

Os principais microrganismos patogênicos relatados como causadores de mortalidade em *Callinectes* spp. incluem o protozoário *Hematodinium perezi* (SHIELDS, 2000; STENTIFORD; SHIELDS, 2005), a bactéria *Vibrio* spp. (THIBODEAUX; BURNETT; BURNETT, 2009), o microsporídio *Ameson michaelis* (SHIELDS; OVERSTREET, 2007) e o reovírus CsRV1 (SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.*, 2019). A causa da alta taxa de mortalidade de *C. danae* no presente estudo não foi determinada, mas não há evidências de que a maioria das mortes foi causada por infecções bacterianas ou por protistas. A mortalidade causada por bactérias ocorre rapidamente, geralmente nos primeiros três dias de infecção, pois as bactérias são normalmente controladas pela resposta imune celular e humoral dos crustáceos (JOHNSON, 1976). As infecções por *A.*

michaelis em siris são relativamente raras, geralmente encontradas em baixa prevalência e os animais infectados apresentam lise muscular severa que resulta em uma condição conhecida como "siri de algodão", uma condição não identificada nos animais analisados (KENNEDY; CRONIN, 2007). *Hematodinium perezi* é um dinoflagelado patogênico que causa uma alta taxa de mortalidade em *C. sapidus*, mas não foi detectado em *C. danae* em investigações anteriores usando RT-qPCR (Tavares et al., dados não publicados).

Os patógenos virais são os principais agentes infecciosos que limitam a sobrevivência dos siris na aquicultura em escala comercial (KENNEDY; CRONIN, 2007; PERAZZOLO; ROSA; BARRACCO, 2012; SHIELDS; OVERSTREET, 2007). Entre as oito espécies de vírus relatadas em *Callinectes* spp. ao longo da costa atlântica, quatro são letais, como o vírus Bi-Facies herpes-like (BFV ou HLV) (JOHNSON, 1978), o picornavírus da baía de Chesapeake (CBV) (JOHNSON, 1978), o Rhabdo-like virus (RhVA) (JAHROMI, 1977) e *Callinectes sapidus* reovírus 1 (CsRV1) (BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010). CsRV1 é o vírus mais associado a episódios de alta e rápida mortalidade de *C. sapidus* em instalações de cultivo de siri-mole, com mortalidade de até 100% em poucos dias após as injeções experimentais (BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010; FLOWERS; JOHNSON; AGUILAR; SCHOTT, 2018; JOHNSON, 1977; SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.*, 2019; TANG; MESSICK; PANTOJA; REDMAN *et al.*, 2011). O fato de que esse vírus não foi detectado em nenhum exemplar de *C. danae* neste estudo sugere que o patógeno está ausente da região geográfica ou que *C. danae* não é um hospedeiro para CsRV1. O primeiro é improvável, visto que ZHAO; BEHRINGER; BOJKO; KOUGH *et al.* (2020) relatam CsRV1 em toda a área de ocorrência de *C. sapidus*.

Nenhuma diferença significativa foi observada na prevalência do suposto reovírus em siris mortos ou sobreviventes no presente estudo, sugerindo que o CsRV2 não é patogênico para *C. danae* nessas condições. Vírus potencialmente patogênicos podem ocorrer em alta prevalência em ambientes de aquicultura e ainda não causar doenças ou

mortalidade até que os estresses ambientais ou de desenvolvimento se combinem com a infecção para causar a doença (WALKER; GUDKOVS; PADIYAR; STALIN RAJ *et al.*, 2011). Um exemplo bem conhecido é o surto da doença do vírus da síndrome da mancha branca em fazendas de camarão induzida por uma mudança rápida na salinidade ou temperatura (GRANJA; ARANGUREN; VIDAL; ARAGON *et al.*, 2003). Em crustáceos, o desenvolvimento da doença também está fortemente associado às características da história de vida do hospedeiro, como estágio de muda, condição física, sexo e idade (BATEMAN; HICKS; STENTIFORD, 2011).

Embora a associação entre a mortalidade e a infecção pelo suposto CsRV2 não tenha sido evidente no presente estudo, a mortalidade de crustáceos é frequentemente relatada em infecções experimentais com outras espécies de reovírus. A injeção experimental de reovírus P purificado causou inicialmente tremores em 60% dos exemplares de *Macropipus depurator*, seguido por paralisia e mortalidade de 70 a 80% dos animais infectados após 9 dias (BONAMI; COMPS; VEYRUNES, 1976). A infecção experimental de Mud Crab Reovirus (MCRV) em *S. serrata* por injeção intramuscular, inoculação por imersão em água e inoculação oral também levou a 100% de mortalidade, enquanto a coabitação causou 80% de mortalidade (WENG; GUO; SUN; CHAN *et al.*, 2007). A infecção experimental de EsRV905 e EsRV816 purificados em *Eriocheir sinensis* causou 30% de mortalidade, além disso, a taxa de mortalidade foi aumentada em coinfecções com vírus do tipo bunyavirus (BONAMI; ZHANG, 2011; ZHANG; SHI; ZHANG; BONAMI, 2004).

De acordo com ZHAO; FLOWERS e SCHOTT (2021), CsRV2 e EsRV905 pertencem ao mesmo gênero, *Cardoreovirus*, pois compartilham nucleotídeos e aminoácidos semelhantes. Devido à semelhança genômica do CsRV2 com um reovírus fatal para siris (EsRV905), entender o potencial do CsRV2 para causar doença será crucial para avaliar

os riscos associados à infecção por esse vírus até então desconhecido para a indústria aquícola de siris-moles no Brasil.

A mortalidade de siris também pode ser resultado do estresse de captura, manuseio, transporte, temperatura, lesões e má qualidade da água, especialmente em sistemas de aquicultura mal administrados (JOHNSON, 1976). Para evitar o estresse excessivo e a consequente mortalidade, o protocolo de coleta e transporte recomendado por CHAVES e EGGLESTON (2003) foi seguido rigorosamente. Embora a mortalidade dos siris tenha sido alta no presente estudo, não houve picos de mortalidade no início do período de cultivo, sugerindo que a captura e o transporte não foram as principais causas de mortalidade de *C. danae*. Além disso, a ausência de alterações nos metabólitos da hemolinfa dos siris não infectados corrobora a eficiência do método de coleta e transporte.

Também há poucas evidências de que a mortalidade dos siris em cativeiro estava relacionada aos parâmetros de qualidade da água durante o experimento. Dos valores indicados por MALONE e BURDEN (1988) e por HOCHHEIMER (1988) como ideais para o cultivo de caranguejos, apenas o nitrito apresentou variação acima dos limites recomendados, enquanto as concentrações de oxigênio dissolvido apresentaram variação abaixo dos limites considerados ideais. No entanto, conforme descrito abaixo, a variação de nitrito e oxigênio não parece ter interferido nos resultados. Segundo ARY e POIRRIER (1989) os siris-azuis possuem uma tolerância relativamente alta ao nitrito, os autores registram uma taxa mortalidade de apenas 4,5% nos siris em pré-muda após 96 horas de exposição a 10 mg L^{-1} $N\text{-}NO_2$, que representa uma concentração 10 vezes maior que a concentração média registrada no presente estudo. Já em relação ao oxigênio dissolvido, TOMASETTI; MORRELL; MERLO e GOBLER (2018) consideraram como "moderadas condições de hipóxia" concentrações inferiores a 4 mg L^{-1} O_2. BRILL; BUSHNELL; ELTON e SMALL (2015) concluíram que os níveis críticos de oxigênio dissolvido para *C. sapidus*

são da ordem de 45% de saturação e que as taxas metabólicas após alimentação ou exercício não são comprometidas com o oxigênio dissolvido acima de 50% de saturação.

4.2. PREVALÊNCIA DE REOVÍRUS

Uma das hipóteses testadas para explicar a mortalidade dos animais no presente estudo seria a presença do vírus CsRV1, semelhante à correlação desse reovírus com a mortalidade em *C. sapidus* em cultivo (BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010; SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.*, 2019). CsRV1 está presente em 30-33% dos *C. sapidus* coletados na Lagoa do Tramandaí, Rio Grande do Sul, Brasil (FLOWERS; BACHVAROFF; WARG; NEILL *et al.*, 2016) e 10% em Punta del Este, Uruguai (ZHAO; BEHRINGER; BOJKO; KOUGH *et al.*, 2020), o que mostra que este vírus é endêmico da América do Sul. Embora a ausência do CsRV1 em *C. danae* refute a hipótese, isso não significa que *C. danae* nunca poderá ser um hospedeiro. Os vírus têm habilidades diferenciais para infectar, transmitir e causar doenças em taxa de hospedeiros específicos, e essa capacidade em CsRV1 precisa ser melhor compreendida por estudos experimentais de infecção envolvendo a injeção de CsRV1 em *C. danae* (STENTIFORD; NEIL; PEELER; SHIELDS *et al.*, 2012).

A descoberta de que >70% dos exemplares de *C. danae* neste estudo foram infectados por um novo reovírus foi notável. O padrão eletroforético do dsRNA (3/4/5) é idêntico ao de um vírus putativo, CsRV2, descrito por ZHAO; FLOWERS e SCHOTT (2021) em *C. sapidus* do extremo sul do Brasil. O padrão eletroforético dos segmentos do genoma CsRV2 é muito semelhante, mas não idêntico ao de *Eriocheir sinensis* reovirus 905 (ZHANG; SHI; ZHANG; BONAMI, 2004). Em contraste, o padrão eletroforético de CsRV1 (1/5/6) é compartilhado pelo vírus W2 isolado de *Carcinus mediterraneus* (MARI; BONAMI, 1988), vírus P de *Macropipus depurator* (MONTANIÉ; P BOSSY; BONAMI, 1993) e reovírus MCRV de *Scylla serrata* (BONAMI; ZHANG, 2011; WENG; GUO; SUN; CHAN *et al.*, 2007). Para confirmar se o vírus observado neste estudo é de fato CsRV2, parte ou todo o genoma

viral deve ser sequenciado, e uma análise filogenética precisa ser conduzida para discernir sua relação com os reovírus já identificados em crustáceos braquiúros.

Mesmo na ausência da sequência do genoma do vírus, foi desenvolvido no presente estudo um método semiquantitativo para medir a intensidade da banda de dsRNA do CsRV2 em géis de agarose para estimar a carga viral em animais infectados. Métodos semiquantitativos semelhantes foram usados em outros estudos para quantificar a intensidade de bandas de Western Blot de proteínas de camarão e caranguejos e medir a abundância de amplicons de PCR da bactéria *Fusobacterium necrophorum* (ANTIABONG; NGOEPE; ABECHI, 2016; FENG; DONG; LIU; QIU, 2020; JOHNSTON; KAMATH; IYER; PRATAP *et al.*, 2019; LIN; HSIA; LIU; HUANG *et al.*, 2012). O método semiquantitativo revelou que a prevalência de CsRV2 aumentou 46,5% ao longo dos 14 dias de experimento e mostrou que a intensidade aparente média da infecção aumentou significativamente nos siris sobreviventes.

4.3. ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS NA HEMOLINFA E NO HEPATOPÂNCREAS

As flutuações de temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido são estressantes para os crustáceos e aumentam a suscetibilidade a infecções por patógenos (CHUNG; PITULA; SCHOTT; ALVAREZ *et al.*, 2015; SHIELDS; OVERSTREET, 2007; SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.*, 2019; VINAGRE; TRAPP; KUCHARSKI; SILVA, 2020). A resposta ao estresse dos crustáceos começa com alterações neuroendócrinas que desencadeiam ajustes metabólicos, fisiológicos e comportamentais, também conhecidos como resposta secundária ao estresse, a fim de restabelecer a homeostase interna (APARICIO-SIMÓN; PIÑÓN; RACOTTA; RACOTTA, 2010; INOHARA; PINTO; MODEL; TRAPP *et al.*, 2015; LORENZON; GIULIANINI; MARTINIS; FERRERO, 2007; MODEL; DOS SANTOS; DA SILVA; VINAGRE, 2019; ZAMORA-BRISEÑO; RUIZ-MAY; ELIZALDE-CONTRERAS; HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ *et al.*, 2020). Alguns desses ajustes bioquímicos e fisiológicos são monitorados como indicadores/marcadores de estresse que podem ser úteis na

previsão da mortalidade (APARICIO-SIMÓN; PIÑÓN; RACOTTA; RACOTTA, 2010; MODEL; DOS SANTOS; DA SILVA; VINAGRE, 2019; STONER, 2012).

A presente investigação revelou que a presença de dsRNA de CsRV2 não estava geralmente associada a alterações nos metabólitos quando ambos os sexos foram agrupados, exceto para o glicogênio do hepatopâncreas. Os níveis de metabólitos em siris não infectados também não mudaram durante o experimento, sugerindo que, apesar das mortes registradas, as condições ambientais eram adequadas. As concentrações de metabólitos medidas na hemolinfa e nos tecidos estão de acordo com as concentrações registradas em outros caranguejos, como *Ocypode quadrata* e *Neohelice granulata*, e validam essas análises como uma ferramenta para avaliar a saúde dos caranguejos e siris (VINAGRE; MODEL; VOGT; MANARA *et al.*, 2020). No entanto, quando os siris foram analisados separadamente por sexo, algumas diferenças nos metabólitos foram observadas, o que sugere que o impacto da infecção pelo CsRV2 no metabolismo intermediário é diferente entre machos e fêmeas.

A glicose da hemolinfa foi maior nos machos infectados por CsRV2, mas não nas fêmeas, após 14 dias de cultivo. Este aumento na glicose circulante durante doenças virais já foi descrito em outros decápodes (FAN; YE; CHEN; SHAO *et al.*, 2016; HERNÁNDEZ-PALOMARES; GODOY-LUGO; GÓMEZ-JIMÉNEZ; GÁMEZ-ALEJO *et al.*, 2018; HERRERA-SALVATIERRA; PASCUAL-JIMÉNEZ; HUCHIN-MIAN; LOZANO-ÁLVAREZ *et al.*, 2019). O aumento da glicose hemolinfa dos siris machos pode estar relacionado à redução do glicogênio do hepatopâncreas. Achados semelhantes foram relatados na lagosta espinhosa do Caribe *P. argus* infectada por PaV1, um vírus icosaédrico de dsDNA (HERRERA-SALVATIERRA; PASCUAL-JIMÉNEZ; HUCHIN-MIAN; LOZANO-ÁLVAREZ *et al.*, 2019; ZAMORA-BRISEÑO; RUIZ-MAY; ELIZALDE-CONTRERAS; HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ *et al.*, 2020). No estágio final da infecção de PaV1, o glicogênio no hepatopâncreas da lagosta diminuiu drasticamente e foi uma variável discriminante

importante para o grau de infecção viral (HERRERA-SALVATIERRA; PASCUAL-JIMÉNEZ; HUCHIN-MIAN; LOZANO-ÁLVAREZ *et al.*, 2019). Uma comparação transcriptômica de *P. argus* infectado com PaV1 e não infectado revelou que as enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos foram reguladas negativamente em lagostas infectadas, incluindo UTP-glucose-1-fosfato uridiltransferase (síntese de glicogênio) e frutose-bifosfato-aldolase (glicólise e gliconeogênese) (ZAMORA-BRISEÑO; RUIZ-MAY; ELIZALDE-CONTRERAS; HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ *et al.*, 2020). Como o hepatopâncreas é o principal local de armazenamento de nutrientes dos crustáceos, a depleção de glicogênio pode ter consequências negativas em vários processos, como locomoção, respiração e osmorregulação (GABBOTT, 2009; RAINER; BROUWER, 1993; VINAGRE; TRAPP; KUCHARSKI; SILVA, 2020).

As concentrações de triglicerídeos na hemolinfa das fêmeas de *C. danae* infectadas por CsRV2 foram 50% mais baixas do que as fêmeas não infectadas. Embora não seja significativo, os triglicerídeos da hemolinfa diminuíram 40% nos machos infectados. Em *P. argus* infectado com PaV1, os triglicerídeos da hemolinfa aumentaram e foram associados à regulação negativa da lipase de triacilglicerol, uma das principais enzimas da lipólise (ZAMORA-BRISEÑO; RUIZ-MAY; ELIZALDE-CONTRERAS; HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ *et al.*, 2020). Uma vez que a concentração de triglicerídeos nas gônadas e hepatopâncreas não foram afetados em *C. danae* de nenhum dos sexos, a diminuição dos triglicerídeos da hemolinfa das fêmeas pode estar relacionada a uma alteração específica do sexo no metabolismo lipídico e requer mais investigação.

Uma diminuição significativa nos níveis de proteínas totais na hemolinfa dos machos e fêmeas de *C. danae* infectados por CsRV2 foi registrada ao longo do período experimental. Embora não seja significativa, uma tendência semelhante foi observada em siris não infectados. Portanto, parece que a infecção pelo CsRV2 exacerba essa perda de proteína. Os processos patológicos podem explicar a redução na concentração de

proteínas da hemolinfa dos siris (FINDLEY; BLAKENEY; WEIDNER, 1981; PAULEY; NEWMAN; GOULD, 1975; SHIELDS; SCANLON; VOLETY, 2003; YOGANANDHAN; THIRUPATHI; SAHUL HAMEED, 2003). De acordo com SHIELDS; SCANLON e VOLETY (2003), as demandas metabólicas devido aos patógenos que se proliferam logaritmicamente na hemolinfa do hospedeiro drenam proteínas e carboidratos constituintes nos animais infectados. Os crustáceos fortemente infectados por patógenos também se tornam letárgicos e reduzem a ingestão de alimentos, o que pode causar declínios nas concentrações de proteínas totais (HERRERA-SALVATIERRA; PASCUAL-JIMÉNEZ; HUCHIN-MIAN; LOZANO-ÁLVAREZ *et al.*, 2019; SHIELDS; OVERSTREET, 2007; TAYLOR; FIELD; PARSLOW-WILLIAMS, 1997). Na comparação transcriptômica entre *P. argus* PaV1 infectado e não infectado, muitas enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos e proteínas foram reguladas negativamente e as proteases digestivas foram reduzidas, o que sugere que o vírus induziu uma interrupção generalizada do metabolismo protéico (ZAMORA-BRISEÑO; RUIZ-MAY; ELIZALDE-CONTRERAS; HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ *et al.*, 2020).

4.4. ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS

Além das alterações bioquímicas que estão envolvidas nas respostas ao estresse, o comportamento do animal também pode sofrer alterações em função do estresse causado pela infecção por patógenos. Mudanças comportamentais incluem ações simples ou complexas, como evasão, agressão e até mesmo a perda de reflexos específicos (MCINTYRE; PEARCE; OLLA; PEARSON *et al.*, 1980). O Reflective Action Mortality Predictor (RAMP) é um método que relaciona a perda dos reflexos motores a uma probabilidade de mortalidade (DAVIS, 2007; DAVIS; OTTMAR, 2006; STONER, 2012). O teste RAMP foi inicialmente desenvolvido para prever a mortalidade do caranguejo do Alasca *Chionoecetes opilio* capturado da pesca acessória (STONER; ROSE; MUNK; HAMMOND *et al.*, 2008) e foi testado em outros crustáceos decápodes (STONER, 2012;

YOCHUM, 2016; YOCHUM; ROSE; HAMMOND, 2015). Este estudo foi o primeiro a aplicar o teste RAMP em *C. danae* e a relacionar os resultados do teste com a presença de um vírus específico, como o CsRV2.

Dos seis reflexos aqui analisados em *C. danae*, a retração ocular e o fechamento da boca foram mais raramente perdidos, resultado semelhante aos relatados por YOCHUM; ROSE e HAMMOND (2015) para *Chionoecetes bairdi e C. opilio* coletados e descartados pela pesca de arrasto. O reflexo de chute foi mais frequentemente perdido em *C. danae* durante todas as semanas de avaliação, enquanto em *C. baird* foi o quarto reflexo mais perdido em resposta ao estresse de captura (YOCHUM; ROSE; HAMMOND, 2015). Estudos realizados por STONER (2009) e por STONER; ROSE; MUNK; HAMMOND *et al.* (2008) revelam que quando os caranguejos *C. bairdi* e *C. opilio* foram submetidos ao estresse térmico, os reflexos de fechamento de quela e chute foram frequentemente perdidos. Os autores desse último estudo concluíram ainda que o reflexo de chute foi um dos indicadores mais sensíveis de estresse em caranguejos-da-neve. Embora a coleta, transporte e manutenção em instalações de aquicultura sejam estressantes para os siris (CHAVES; EGGLESTON, 2003), os metabólitos do estresse secundário analisados no presente estudo não diferiram significativamente entre os siris normais e aqueles que perderam o reflexo de chute.

O teste RAMP revelou que os animais infectados por CsRV2 tiveram comprometimento significativo do reflexo de chute no sétimo dia de experimento, o que foi uma consequência provável de exaustão fisiológica, conforme relatado anteriormente por RABY; DONALDSON; HINCH; PATTERSON *et al.* (2012). Embora o nosso seja o primeiro relato do teste RAMP para avaliar a infecção viral, mudanças comportamentais foram relatadas em siris infectados por diferentes espécies de reovírus (ZHAO; TAVARES; SCHOTT, 2021). Além disso, as lagostas infectadas por PaV1 tornaram-se letárgicas e apresentaram um estado nutricional deficiente (HERRERA-SALVATIERRA; PASCUAL-

JIMÉNEZ; HUCHIN-MIAN; LOZANO-ÁLVAREZ *et al.*, 2019). Assim, o reflexo de chute deve ser explorado e testado como uma ferramenta auxiliar em instalações de cultivo de siri-mole para indicar uma possível infecção por CsRV2 ou outros patógenos que podem prever a mortalidade de siris antes que eles realizem a muda com sucesso.

5. CONCLUSÃO

Callinectes danae apresenta grande importância ecológica, social e econômica como espécie explorada pela pesca e, mais recentemente, pela nascente indústria de produção de siri-mole no Brasil, que sofre com altas taxas de mortalidade. Há abundante literatura mostrando que a mortalidade na aquicultura é frequentemente uma combinação de estresse e ação de patógenos infecciosos. Esta investigação de possíveis patógenos virais relacionados à mortalidade de *C. danae* revelou que um patógeno bem conhecido de *C. sapidus* estava ausente e que um novo vírus putativo, com um padrão eletroforético semelhante ao CsRV2, era altamente prevalente em *C. danae*. Além disso, a observação deste novo reovírus putativo e a descrição das mudanças metabólicas e comportamentais que afetam os siris infectados por CsRV2, servem como uma indicação para a comunidade científica e para os criadores de siri-mole de que existem muitos mais patógenos a serem descobertos em *C. danae*. Apesar dos resultados deste estudo não indicarem uma associação clara entre a infecção por CsRV2 e o aumento das taxas de mortalidade em *C. danae*, essa hipótese ainda não pode ser descartada. Portanto, uma investigação mais completa deve ser realizada, começando com três prioridades: 1) avaliar o grau de virulência e patogenicidade de CsRV2 por meio de infecções experimentais, para que medidas de controle ou de coexistência com o novo vírus possam ser desenvolvidas se necessário; 2) caracterizar geneticamente o vírus de *C. danae* revelado no presente estudo, o que exigirá o sequenciamento do genoma do vírus e permitirá o desenvolvimento de métodos de detecção baseados em PCR; e 3) avaliar a relação filogenética com os reovírus já identificados.

6. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Produtividade em Pesquisa concedida ao Dr. Antonio Ostrensky (processo Nº 304633/2017-8, pelo financiamento do projeto (processo Nº 381091/2014-7) e pela concessão de bolsa de doutorado à Camila P. S. Tavares (processo Nº 141022/2017-5). À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche no exterior (processo nº 88881.190487/2018-01).

7. REFERÊNCIAS

ABRÀMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with ImageJ. **Biophotonics**, 11, p. 36-42, 2004.

ANTIABONG, J. F.; NGOEPE, M. G.; ABECHI, A. S. Semi-quantitative digital analysis of polymerase chain reaction-electrophoresis gel: Potential applications in low-income veterinary laboratories. **Veterinary World**, 9, n. 9, p. 935-939, 2016. 10.14202/vetworld.2016.935-939

ANTUNES, G. d.; DO AMARAL, A. P.; RIBARCKI, F. P.; WIILLAND, E. d.; ZANCAN, D. M.; VINAGRE, A. S. Seasonal variations in the biochemical composition and reproductive cycle of the ghost crab *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787) in Southern Brazil. **Journal of Experimental Zoology Part A Ecological Genetics and Physiology**, 313, n. 5, p. 280-291, 2010. 10.1002/jez.593

APARICIO-SIMÓN, B.; PIÑÓN, M.; RACOTTA, R.; RACOTTA, I. S. Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute handling stress. **Aquaculture**, 298, n. 3-4, p. 308-314, 2010. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.10.016

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington, DC, USA: American Public Health Association, n. 85 ed., Washington, DC, USA: American Public Health Association, 127-132 p., 1995. https://doi.org/10.2105/AJPH.85.1.127

ARY JR., R. D.; POIRRIER, M. A. Acute toxicity of nitrite to the blue crab (*Callinectes sapidus*). **The Progressive Fish-Culturist**, 51, n. 2, p. 69-72, 1989. https://doi.org/10.1577/1548-8640(1989)051<0069:ATONTT>2.3.CO;2

BAPTISTA, C.; PINHEIRO, M. A. A.; BLANKENSTEYN, A.; BORZONE, C. A. Estrutura populacional de *Callinectes ornatus* Ordway (Crustacea, Portunidae) no Balneário Shangri-Lá, Pontal do Paraná, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 20, p. 661-666, 2003. https://doi.org/10.1590/S0101-81752003000400018

BATEMAN, K. S.; HICKS, R. J.; STENTIFORD, G. D. Disease profiles differ between non-fished and fished populations of edible crab (*Cancer pagurus*) from a major commercial fishery. **Journal of Marine Science**, 68, n. 10, p. 2044-2052, 2011. 10.1093/icesjms/fsr148

BONAMI, J.-R.; COMPS, M.; VEYRUNES, J. C. Etude histopathologique et ultrastructurale de la paralysie virale du crabe *Macropipus depurator*. **Revue des travaux de l'Institut des pêches maritimes**, 40, p. 139-146, 1976.

BONAMI, J.-R.; ZHANG, S. Viral diseases in commercially exploited crabs: A review. **Journal of Invertebrate Pathology**, 106, n. 1, p. 6-17, 2011.10.1016/j.jip.2010.09.009

BOWERS, H. A.; MESSICK, G. A.; HANIF, A.; JAGUS, R.; CARRION, L.; ZMORA, O.; SCHOTT, E. J. Physicochemical properties of double-stranded RNA used to discover a reo-like virus from blue crab *Callinectes sapidus*. **Diseases of aquatic organisms**, 93, n. 1, p. 17-29, 2010. 10.3354/dao02280

BRILL, R. W.; BUSHNELL, P. G.; ELTON, T. A.; SMALL, H. J. The ability of blue crab (*Callinectes sapidus*, Rathbun 1886) to sustain aerobic metabolism during hypoxia. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 471, p. 126-136, 2015. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.06.003

CHANG, E. S.; MYKLES, D. L. Review: Regulation of crustacean molting: A review and our perspectives. **General and Comparative Endocrinology**, 172, p. 323-330, 2011. 10.1016/j.ygcen.2011.04.003

CHAVES, J. C.; EGGLESTON, D. B. Blue crab mortality in the North Carolina soft-shell industry: Biological and operational effects. **Journal of Shellfish Research**, 22, p. 241-250, 2003.

CHUNG, J. S. Hemolymph ecdysteroids during the last three molt cycles of the blue crab, *Callinectes sapidus*: quantitative and qualitative analyses and regulation. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 73, n. 1, p. 1-13, 2010. 10.1002/arch.20327

CHUNG, J. S.; PITULA, J. S.; SCHOTT, E.; ALVAREZ, J. V.; MAURER, L.; LYCETT, K. A. Elevated water temperature increases the levels of reo-like virus and selected innate immunity genes in hemocytes and hepatopancreas of adult female blue crab, *Callinectes sapidus*. **Fish & shellfish immunology**, 47, n. 1, p. 511-520, 2015.

DAVIS, M. W. Simulated fishing experiments for predicting delayed mortality rates using reflex impairment in restrained fish. **Journal of Marine Science**, 64, n. 8, p. 1535-1542, 2007. 10.1093/icesjms/fsm087

DAVIS, M. W.; OTTMAR, M. L. Wounding and reflex impairment may be predictors for mortality in discarded or escaped fish. **Fisheries Research**, 82, n. 1, p. 1-6, 2006/12/01/ 2006. https://doi.org/10.1016/j.fishres.2006.09.004

DEFUR, P. L.; NUSBAUMER, D.; LEWIS, R. J. Physiological aspects of molting in blue crabs from the tidal fresh-water Potomac River, Virginia. **Journal of Crustacean Biology**, 8, n. 1, p. 12, 1988.

FABBRI, E.; MOON, T. W. Adrenergic signaling in teleost fish liver, a challenging path. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, 199, p. 74-86, 2016. 10.1016/j.cbpb.2015.10.002

FAN, W.; YE, Y.; CHEN, Z.; SHAO, Y.; XIE, X.; ZHANG, W.; LIU, H.-p.; LI, C. Metabolic product response profiles of *Cherax quadricarinatus* towards white spot syndrome virus infection. **Developmental and Comparative Immunology**, 61, p. 236-241, 2016. 10.1016/j.dci.2016.04.006

FAO. **Global Capture and Aquaculture Production (FishStat)**. Rome, Italy, 2020. Disponível em: http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hqp_5215617422254205836.xml&outtype=html. Acesso em: 27/06/2020.

FENG, H.; DONG, Y.-T.; LIU, X.; QIU, G.-F. Cyclin B protein undergoes increased expression and nuclear relocation during oocyte meiotic maturation of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. **Gene**, 758, p. 144955, 2020/10/20/ 2020. https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144955

FERDOUSHI, Z.; XIANG, Z.; HASAN, M. R. Mud crab (*Scylla* sp.) marketing system in Bangladesh. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, 3, n. 2, p. 17, 2010.

FINDLEY, A. M.; BLAKENEY, E. W.; WEIDNER, E. H. *Ameson michaelis* (Microsporida) in the blue crab, *Callinectes sapidus*: parasite-induced alterations in the biochemical composition of host tissues. **Biological Bulletin**, 161, n. 1, p. 115-125, 1981.

FLOWERS, E. M.; BACHVAROFF, T. R.; WARG, J. V.; NEILL, J. D.; KILLIAN, M. L.; VINAGRE, A. S.; BROWN, S.; ALMEIDA, A. S.; SCHOTT, E. J. Genome sequence analysis of CsRV1: a pathogenic reovirus that infects the blue crab *Callinectes sapidus* across its trans-hemispheric range. **Frontiers in Microbiology**, 7, n. e82202, 2016. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00126

FLOWERS, E. M.; JOHNSON, A. F.; AGUILAR, R.; SCHOTT, E. J. Prevalence of the pathogenic crustacean virus *Callinectes sapidus* reovirus 1 near flow-through blue crab aquaculture in Chesapeake Bay, USA. **Diseases of Aquatic Organisms**, 129, n. 2, p. 135-144, 2018. 10.3354/dao03232

FREEMAN, J. A.; KILGUS, G.; LAURENDEAU, D.; PERRY, H. M. Postmolt and intermolt molt cycle stages of *Callinectes sapidus*. **Aquaculture**, 61, n. 3–4, p. 201-209, 4/1/ 1987. http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(87)90149-9

GABBOTT, P. A. Energy metabolism *In*: CAMBRIDGE (Ed.). **Marine mussels : their ecology and physiology**. Cambridge; London; New York: Cambridge University Press, 2009.

GALLO, V. P.; ACCORDI, F.; CHIMENTI, C.; CIVININI, A.; CRIVELLATO, E. Catecholaminergic system of invertebrates: comparative and evolutionary aspects in comparison with the octopaminergic system. **International Review of Cell and Molecular Biology**, p. 363-394, 2016. 10.1016/bs.ircmb.2015.12.006

GRANJA, C. B.; ARANGUREN, L. F.; VIDAL, O. M.; ARAGON, L.; SALAZAR, M. Does hyperthermia increase apoptosis in white spot syndrome virus (WSSV)-infected *Litopenaeus vannamei*?. **Diseases of Aquatic Organisms**, 54, p. 73-78, 2003. 10.3354/dao054073

HERNÁNDEZ-PALOMARES, M. L. E.; GODOY-LUGO, J. A.; GÓMEZ-JIMÉNEZ, S.; GÁMEZ-ALEJO, L. A.; ORTIZ, R. M.; MUÑOZ-VALLE, J. F.; PEREGRINO-URIARTE, A. B.; YEPIZ-PLASCENCIA, G.; ROSAS-RODRÍGUEZ, J. A.; SOÑANEZ-ORGANIS, J. G. Regulation of lactate dehydrogenase in response to WSSV infection in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, 74, p. 401-409, 2018.10.1016/j.fsi.2018.01.011

HERRERA-SALVATIERRA, N.; PASCUAL-JIMÉNEZ, C.; HUCHIN-MIAN, J. P.; LOZANO-ÁLVAREZ, E.; MONTERO-MUÑOZ, J.; BRIONES-FOURZÁN, P.; RODRÍGUEZ-CANUL, R. Nutritional and immunological evaluation of juvenile spiny lobsters *Panulirus argus* (Latreille, 1804) (Decapoda: Achelata: Palinuridae) naturally infected with the PaV1 virus. **Journal of Crustacean Biology**, 39, n. 2, p. 162-171, 2019. 10.1093/jcbiol/ruy108

HOCHHEIMER, J. **Water Quality in Soft Crab Shedding**. College Park, MD, USA.: University of Maryland, Sea Grant Extension Program, 1988. 6 p.

HUNGRIA, D. B.; TAVARES, C. P. S.; PEREIRA, L. Â.; SILVA, U. A. T. d.; OSTRENSKY, A. Global status of production and commercialization of soft-shell crabs. **Aquaculture International**, 25, n. 6, p. 2213-2226, 2017. 10.1007/s10499-017-0183-5

INOHARA, E. T. S.; PINTO, C. B.; MODEL, J. F. A.; TRAPP, M.; KUCHARSKI, L. C.; DA SILVA, R. S. M.; VINAGRE, A. S. Serotonin effects in the crab *Neohelice granulata*: Possible involvement of two types of receptors in peripheral tissues. **Comparative Biochemistry And Physiology**, 85, p. 80-90, 2015. 10.1016/j.cbpa.2015.03.012

JAHROMI, S. S. Occurrence of Rhabdovirus-like particles in the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Journal of General Virology**, 36, n. 3, p. 485-493, 1977. https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-3-485

JOHNSON, P. T. Bacterial infection in the blue crab, *Callinectes sapidus*: course of infection and histopathology. **Journal of Invertebrate Pathology**, 28, n. 1, p. 25-36, 1976/07/01/ 1976. https://doi.org/10.1016/0022-2011(76)90067-7

JOHNSON, P. T. A viral disease of the blue crab, *Callinectes sapidus*: Histopathology and differential diagnosis. **Journal of Invertebrate Pathology**, 29, n. 2, p. 201-209, 1977. 10.1016/0022-2011(77)90194-X

JOHNSON, P. T. Viral diseases of the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Marine Fisheries Review**, 40, p. 13-15, 1978.

JOHNSTON, E. B.; KAMATH, S. D.; IYER, S. P.; PRATAP, K.; KARNANEEDI, S.; TAKI, A. C.; NUGRAHA, R.; SCHAEFFER, P. M.; ROLLAND, J. M.; O'HEHIR, R. E.; LOPATA, A. L. Defining specific allergens for improved component-resolved diagnosis of shrimp allergy in adults. **Molecular Immunology**, 112, p. 330-337, 2019/08/01/ 2019. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.05.006

KENNEDY, V. S.; CRONIN, L. E. **The Blue Crab: *Callinectes Sapidus***. College Park, Md, USA: Maryland Sea Grant College, University of Maryland, 2007.

LAKSHMI, G. J.; TRIGG, C. M.; PERRY, H. M.; VENKATARAMIAH, A. **The Effect of ammonia accumulation on blue crab shedding success: final report, March, 1983 through December, 1983**. Ocean Springs, Miss.: Gulf Coast Research Laboratory, 1984.

LE MOULLAC, G.; HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. **Aquaculture**, 191, n. 1, p. 121-131, 2000. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00422-1

LIN, S.-J.; HSIA, H.-L.; LIU, W.-J.; HUANG, J.-Y.; LIU, K.-F.; CHEN, W.-Y.; YEH, Y.-C.; HUANG, Y.-T.; LO, C.-F.; KOU, G.-H.; WANG, H.-C. Spawning stress triggers WSSV replication in brooders via the activation of shrimp STAT. **Developmental & Comparative Immunology**, 38, n. 1, p. 128-135, 2012. https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.04.013

LORENZON, S.; GIULIANINI, P. G.; MARTINIS, M.; FERRERO, E. A. Stress effect of different temperatures and air exposure during transport on physiological profiles in the American lobster *Homarus americanus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, 147, n. 1, p. 94-102, 2007.

MALONE, R. F.; BURDEN, D. G. **Design of recirculating soft crawfish sheddind systems**. Baton Rouge, LA, USA: Louisiana Sea Grant College Program, Center for Wetland Resources, Louisiana State University, 1988. 80 p.

MARI, J.; BONAMI, J. R. W2 virus infection of the crustacean *Carcinus mediterraneus*: a reovirus disease. **The Journal of General Virology**, 69, p. 561-571, 1988.10.1099/0022-1317-69-3-561

MCINTYRE, A. D.; PEARCE, J. b.; OLLA, B. L.; PEARSON, W. H.; STUDHOLME, A. L. **Applicability of behavioral measures in environmental stress assessment [pollution, marine animals, migration, chemoreception, predator prey interactions, daily and seasonal cycles, review]**. 179, p. 162-173, 1980.

MELO, G. A. S. **Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro**. São Paulo, SP, Brazil: Pleiade, FAPESP, 1996.

MERCIER, L.; PALACIOS, E.; CAMPA-CÓRDOVA, Á. I.; TOVAR-RAMÍREZ, D.; HERNÁNDEZ-HERRERA, R.; RACOTTA, I. S. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. **Aquaculture**, 258, n. 1, p. 633, 2006. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.036

MODEL, J. F. A.; DOS SANTOS, J. T.; DA SILVA, R. S. M.; VINAGRE, A. S. Metabolic effects of epinephrine on the crab *Neohelice granulata*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, 231, p. 111-118, 2019. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.01.028

MONTANIÉ, H.; P BOSSY, J.; BONAMI, J.-R. Morphological and genomic characterization of two reoviruses (P and W2) pathogenic for marine crustaceans; Do they constitute a novel genus of the Reoviridae family?. **Journal of General Virology**, p. 1555-1561, 1993.https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-8-1555

OSTRENSKY, A.; VENTURA, R.; CORRÊA, A. M. A.; SANTOS, G. V.; CASTILHO-WESTPHAL, G. G. Improving production of soft-shelled swimming crabs: macroscopic signs of molting as a tool for selection and management of *Callinectes danae* and *Callinectes exasperatus* (Portunidae, Decapoda, Crustacea). **Archives of Veterinary Science**, 20, n. 2, p. 122-131, 2015. 10.5380/avs.v20i2.39855

PAULEY, G. B.; NEWMAN, M. W.; GOULD, E. Serum changes in the blue crab, *Callinectes sapidus*, associated with *Paramoeba perniciosa*, the causative agent of grey crab disease. **Marine Fisheries Review**, 37, p. 34-38, 1975.

PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D.; BARRACCO, M. A. Defesas Antivirais em Crustáceos: Estado da Arte. *In*: MARINGÁ (Ed.). **Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos**. Maringá - PR: Massoni, 2012. v. 1, cap. 14, p. 315-354.

RABY, G. D.; DONALDSON, M. R.; HINCH, S. G.; PATTERSON, D. A.; LOTTO, A. G.; ROBICHAUD, D.; ENGLISH, K. K.; WILLMORE, W. G.; FARRELL, A. P.; DAVIS, M. W.; COOKE, S. J. Validation of reflex indicators for measuring vitality and predicting the delayed

mortality of wild coho salmon bycatch released from fishing gears. **Journal of Applied Ecology**, 49, n. 1, p. 90-98, 2012. 10.1111/j.1365-2664.2011.02073.x

RAINER, J.; BROUWER, M. Hemocyanin synthesis in the blue crab *Callinectes sapidus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, 104, n. 1, p. 69-73, 1993.

RODRIGUEZ-EZPELETA, N.; TEIJEIRO, S.; FORGET, L.; BURGER, G.; LANG, B. Construction of cDNA Libraries: Focus on Protists and Fungi. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, 533, p. 33-47, 02/01 2009. 10.1007/978-1-60327-136-3_3

ROGERS, H. A.; TAYLOR, S. S.; HAWKE, J. P.; SCHOTT, E. J.; ANDERSON LIVELY, J. A. Disease, parasite, and commensal prevalences for blue crab *Callinectes sapidus* at shedding facilities in Louisiana, USA. **Diseases of Aquatic Organisms**, 112, n. 3, p. 207-217, 2015. 10.3354/dao02803

SHIELDS, J. D. Infection and mortality studies with *Hematodinium perezi* in blue crab. *In*: GUILLORY, H. V., Perry, H.,Vanderkooy, S. (Ed.). **Proceeding: Blue crab Mortality Symposium** Ocean Springs, Mississippi: Gulf States Marine Fisheries Commission, 2000. v. 90, p. 50-60.

SHIELDS, J. D.; OVERSTREET, R. M. Diseases, Parasites and Other Symbionts. *In*: KENNEDY, V. S., L.E. Cronin (eds) (Ed.). **The blue crab *Callinectes sapidus***. Maryland Sea Grant College, College Park, Maryland,, 2007. cap. 8, p. 299-417.

SHIELDS, J. D.; SCANLON, C.; VOLETY, A. Aspects of the pathophysiology of blue crabs, *Callinectes sapidus*, infected with the parasitic dinoflagellate *Hematodinium perezi*. **Bulletin of Marine Science**, 72, p. 519-536, 2003. 10.3354/dao02803

SPITZNAGEL, M. I.; SMALL, H. J.; LIVELY, J. A.; SHIELDS, J. D.; SCHOTT, E. J. Investigating risk factors for mortality and reovirus infection in aquaculture production of soft-shell blue crabs (*Callinectes sapidus*). **Aquaculture**, 502, p. 289-295, 2019.https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.051

STENTIFORD, G.; NEIL, D.; PEELER, E.; SHIELDS, J.; SMALL, H. J.; FLEGEL, T.; VLAK, J.; JONES, J.; MORADO, F.; MOSS, S.; LOTZ, J.; BARTHOLOMAY, L.; BEHRINGER, D. C.; HAUTON, C.; LIGHTNER, D. V. Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. **Journal of Invertebrate Pathology**, 110, p. 141-157, 2012. 10.1016/j.jip.2012.03.013

STENTIFORD, G. D.; SHIELDS, J. D. A review of the parasitic dinoflagellates *Hematodinium* species and *Hematodinium*-like infections in marine crustaceans. **Diseases of Aquatic Organisms**, 66, n. 1, p. 47-70, 2005. 10.3354/dao066047

STONER, A. W. Prediction of discard mortality for Alaskan crabs after exposure to freezing temperatures, based on a reflex impairment index. **Fishery Bulletin**, 107, n. 4, p. 451-463, 2009.

STONER, A. W. Assessing stress and predicting mortality in economically significant crustaceans. **Reviews in Fisheries Science**, 20, n. 3, p. 111-135, 2012. 10.1080/10641262.2012.689025

STONER, A. W.; ROSE, C. S.; MUNK, J. E.; HAMMOND, C. F.; DAVIS, M. W. An assessment of discard mortality for two Alaskan crab species, Tanner crab (*Chionoecetes bairdi*) and snow crab (*C. opilio*), based on reflex impairment. **Fishery Bulletin**, 106, n. 4, p. 337, 2008.

TAGATZ, M. E. Biology of the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. **Fishery Bulletin**, 67, n. 1, p. 16, 1968.

TANG, K. F. J.; MESSICK, G. A.; PANTOJA, C. R.; REDMAN, R. M.; LIGHTNER, D. V. Histopathological characterization and in situ detection of *Callinectes sapidus* reovirus. **Journal of Invertebrate Pathology**, 108, n. 3, p. 226-228, 2011.

TAVARES, C. P. d. S.; SILVA, U. A. T.; PEREIRA, L. A.; OSTRENSKY, A. Systems and techniques used in the culture of soft-shell swimming crabs. **Reviews in Aquaculture**, 10, n. 4, p. 913-923, 2018. https://doi.org/10.1111/raq.12207

TAYLOR, A. C.; FIELD, R. H.; PARSLOW-WILLIAMS, P. J. The effects of *Hematodinium* sp.-infection on aspects of the respiratory physiology of the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (L.). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.**, 207, n. 1-2, p. 217, 1997.

THIBODEAUX, L. K.; BURNETT, K. G.; BURNETT, L. E. Energy metabolism and metabolic depression during exercise in *Callinectes sapidus,* the Atlantic blue crab: effects of the bacterial pathogen *Vibrio campbellii*. **The Journal of Experimental Biology**, 212, p. 3428-3439, 2009. 10.1242/jeb.033431

TOBIAS-QUINITIO, E. J.; LIBUNAO, G. X. S.; PARADO-ESTEPA, F. D.; CALPE, A. T. **Soft-shell crab production using hatchery-reared mud crab**. Tigbauan, Iloilo, Philippines: Southeast Asian Fisheries Development (SEAFDEC), 2015. 25 p.

TOMASETTI, S. J.; MORRELL, B. K.; MERLO, L. R.; GOBLER, C. J. Individual and combined effects of low dissolved oxygen and low pH on survival of early stage larval blue crabs, *Callinectes sapidus*. **PloS one**, 13, n. 12, p. e0208629, 2018.

VINAGRE, A. S.; MODEL, J. F. A.; VOGT, É. L.; MANARA, L. M.; TRAPP, M.; DA SILVA, R. S. M.; CHUNG, J. S. Diet composition and long-term starvation do not affect crustacean hyperglycemic hormone (CHH) transcription in the burrowing crab *Neohelice granulata*

(Dana, 1851). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 247, p. 110738, 2020. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110738

VINAGRE, A. S.; TRAPP, M.; KUCHARSKI, L. C.; SILVA, R. S. M. Metabolism. *In*: PUBLISHING, C. S. (Ed.). ***Neohelice granulata* a Model Species for Studies on Crustaceans Volume II: Morphology and Physiology**, 2020. v. II, cap. 11, p. 41.

WALKER, P. J.; GUDKOVS, N.; PADIYAR, P. A.; STALIN RAJ, V.; PRADEEP, B.; SERGEANT, E.; CHANDRA MOHAN, A. B.; RAVIBABU, G.; VIJAYAN, K. K.; KARUNASAGAR, I.; SANTIAGO, T. C.; MOHAN, C. V. Longitudinal disease studies in small-holder black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) farms in Andhra Pradesh, India. I. High prevalence of WSSV infection and low incidence of disease outbreaks in BMP ponds. **Aquaculture**, 318, n. 3-4, p. 277-282, 2011. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.029

WENG, S.-P.; GUO, Z.-X.; SUN, J.-J.; CHAN, S.-M.; HE, J.-G. A reovirus disease in cultured mud crab, *Scylla serrata*, in southern China. **Journal of Fish Diseases**, 30, n. 3, p. 133-139, 2007. 10.1111/j.1365-2761.2007.00794.x

YOCHUM, N. **Evaluating the Efficacy of Predicting Bycatch Mortality Using Reflex Impairment through an Assessment of Crab Discards**. 2016. 184 f. (Ph. D.) - Oregon State University, Oregon State University, Corvallis, Oregon. Disponível em: http://hdl.handle.net/1957/59085.

YOCHUM, N.; ROSE, C. S.; HAMMOND, C. F. Evaluating the flexibility of a reflex action mortality predictor to determine bycatch mortality rates: A case study of Tanner crab (*Chionoecetes bairdi*) bycaught in Alaska bottom trawls. **Fisheries Research**, 161, p. 226-234, 2015. https://doi.org/10.1016/j.fishres.2014.07.012

YOGANANDHAN, K.; THIRUPATHI, S.; SAHUL HAMEED, A. S. Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp, *Penaeus indicus*. **Aquaculture**, 221, n. 1, p. 1-11, 2003. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00220-X

ZAMORA-BRISEÑO, J. A.; RUIZ-MAY, E.; ELIZALDE-CONTRERAS, J. M.; HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ, I. M.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, A.; FUENTES-GARCÍA, A. G.; HERRERA-SALVATIERRA, N.; BRIONES-FOURZÁN, P.; PASCUAL-JIMÉNEZ, C.; LOZANO-ÁLVAREZ, E.; RODRÍGUEZ-CANUL, R. iTRAQ-Based proteomic profile analysis of the hepatopancreas of caribbean spiny lobsters infected with *Panulirus argus* Virus 1: Metabolic and physiological implications. **Frontiers in Microbiology**, 11, n. 1084, 2020. Original Research. 10.3389/fmicb.2020.01084

ZHANG, S.; SHI, Z.; ZHANG, J.; BONAMI, J. R. Purification and characterization of a new reovirus from the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. **Journal of Fish Diseases**, 27, n. 12, p. 687-692, 2004. 10.1111/j.1365-2761.2004.00587.x

ZHAO, M.; BEHRINGER, D. C.; BOJKO, J.; KOUGH, A. S.; PLOUGH, L.; TAVARES, C. P. S.; AGUILAR-PERERA, A.; REYNOSO, O. S.; SEEPERSAD, G.; MAHARAJ, O.; SANDERS, M. B.; CARNALES, D.; FABIANO, G.; CARNEVIA, D.; FREEMAN, M. A.; ATHERLEY, N. A. M.; MEDERO-HERNÁNDEZ, L. D.; SCHOTT, E. J. Climate and season are associated with prevalence and distribution of trans-hemispheric blue crab reovirus (*Callinectes sapidus* reovirus 1). **Marine Ecology Progress Series**, 647, p. 123 - 133, 2020. 10.3354/meps13405

ZHAO, M.; FLOWERS, E. M.; SCHOTT, E. J. Near-complete sequence of a highly divergent reovirus genome recovered from *Callinectes sapidus*. **Microbiology Resource Announcements**, 10, n. 1, p. e01278-01220, 2021. 10.1128/mra.01278-20

ZHAO, M.; TAVARES, C. P. d. S.; SCHOTT, E. J. Diversity and classification of reoviruses in crustaceans: A proposal. **Journal of Invertebrate Pathology**, p. 107568, 2021. https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107568

Pergunta 3

Como CsRV2 é estruturado geneticamente e morfologicamente?

CAPÍTULO III - INFECÇÕES VIRAIS EM *Callinectes danae* (CRUSTACEA, PORTUNIDAE): CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA E GENÉTICA DE CsRV2 E A DESCOBERTA DE UM NOVO BUNYAVIRUS[1]

Camila Prestes dos Santos Tavares[1,2], Samuel Paulo Cibulski[3], Gisela Geraldine Castilho Westphal[2], Mingli Zhao[4], Ubiratan de Assis Teixeira da Silva[2], Eric J Schott[4] e Antonio Ostrensky[2].

[1]Programa de Pós-graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Departamento de Zoologia, Curitiba, Paraná, Brasil. CEP: 80035-050. Telefone: +55 41 33505634. E-mail: camilatavares@ufpr.br

[2]Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), Universidade Federal do Paraná, Departamento de Zootecnia, Curitiba, Paraná, Brasil. CEP: 80035-050.

[3]Centro de Biotecnologia, Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil. CEP: 58051-900.

[4]Institute of Marine and Environmental Technology, University of Maryland Center for Environmental Science, Baltimore, MD 21202, USA.

RESUMO

O presente estudo descreve a sequência do genoma e a filogenia de *Callinectes sapidus* reovirus 2 (CsRV2) e a descoberta de um novo bunyavírus putativo em *Callinectes danae* coletados no Sul do Brasil. A sequência do genoma do CsRV2 consiste em 12 segmentos (20.909 nt) de dsRNA que codificam 13 proteínas. A RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) prevista apresenta elevado nível de semelhança com *Eriocheir sinensis* reovirus 905, sugerindo que CsRV2 pertença ao gênero *Cardoreovirus*. Os dados de sequenciamento genético permitiram a descoberta de um genoma semelhante à bunyavírus, aqui nominado como *Callinectes danae* Portunibunyavirus 1 (CdPBV1). O genoma de CdPBV1 é tripartido, incluindo segmentos de RNA de fita simples grande (6.654 nt), médio (3.120 nt) e pequeno (1.656 nt), que codificam três proteínas. Os segmentos mostram maior identidade com *Carcinus maenas* Portunibunyavirus 1, que sugere que CdPBV1 seja um novo representante da família *Cruliviridae*. As informações aqui obtidas indicam que estes viris podem afetar a saúde e a sobrevivência de siris na costa brasileira.

Palavras-chave: *Reoviridae*, *Bunyavirales*, dsRNA, ssRNA, siri-azul.

[1]Artigo elaborado para submissão à Virology - ISSN: 0042-6822

1. INTRODUÇÃO

Os crustáceos decápodes portunídeos, popularmente conhecidos como siris, possuem ampla distribuição geográfica e são considerados como importantes recursos pesqueiros em muitos países (FAO, 2020; MELO, 1996). *Callinectes danae* SMITH (1869) é uma das espécies mais abundantes nas Américas, ocorrendo ao longo do Atlântico Ocidental, incluindo Bermudas, Flórida, Golfo do México, Antilhas, Colômbia, Venezuela, Brasil (da Paraíba ao Rio Grande do Sul) e Argentina (MELO, 1996). Além da sua importância ecológica, atuando na cadeia trófica como predador generalista e consumidor da matéria orgânica depositada nos estuários, *C. danae* é comumente pescado e considerado como fonte de renda e alimento para comunidades de pescadores artesanais da costa brasileira (ANACLETO; BAPTISTA-METRI; GONÇALVES; CALADO *et al.*, 2015; BRANCO; VERANI, 1997). *Callinectes danae* também é conhecido por seu potencial técnico e econômico para a aquicultura, podendo ser comercializado como siri-mole, considerada uma iguaria gastronômica de alto valor, apreciada em todo o mundo (HUNGRIA; TAVARES; PEREIRA; SILVA *et al.*, 2017; TAVARES; SILVA; PEREIRA; OSTRENSKY, 2018).

Os siris podem ser infectados por um amplo espectro de microrganismos patogênicos, no entanto, são os patógenos virais aqueles que constituem o principal agente infecioso limitante para a sobrevivência desses animais em ambiente natural e para o sucesso dos cultivos em escala comercial (KENNEDY; CRONIN, 2007; PERAZZOLO; ROSA; BARRACCO, 2012; SHIELDS; OVERSTREET, 2007). Já foram registradas cerca de 25 espécies de vírus em crustáceos portunídeos de interesse comercial ao longo da costa atlântica. Dessas, quatro espécies são letais para *Callinectes* spp. como Bi-Facies herpes-like virus (BFV ou HLV) (JOHNSON, 1978), Chesapeake Bay picornavirus (CBV) (JOHNSON, 1978), Rhabdo-like virus (RhVA) (JAHROMI, 1977) e *Callinectes sapidus* reovírus 1 (CsRV1) (BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010), duas são

encontradas simultaneamente com outros vírus, como CsRV1 com RhVA e CBV, com evidências de causarem efeitos patogênicos sinérgicos aos organismos infectados (KENNEDY; CRONIN, 2007).

Os vírus pertencentes à família *Reoviridae* são os mais bem estudados dentre todas as famílias de vírus de RNA de fita dupla (dsRNA) que infectam *Callinectes* spp. (MERTENS, 2004). Os reovírus possuem simetria icosaédrica, sem envelope, medem de 60 a 85 nm de diâmetro e são compostos por genomas de 9 a 12 segmentos de dsRNA (ATTOUI; MERTENS; BECNEL; BELAGANAHALLI *et al.*, 2012). A família *Reoviridae* contém quatro grupos distintos de reovírus que infectam organismos aquáticos, *Aquareovirus*, *Orthoreovirus*, *Mimoreovirus* e *Cardoreovirus*. Dentre os gêneros, os *Aquareovirus* e *Orthoreovirus* infectam peixes teleósteos, *Mimoreovirus* infectam uma espécie de protista fotossintético marinho e os *Cardoreovirus* infectam diferentes espécies de crustáceos (ATTOUI; MERTENS; BECNEL; BELAGANAHALLI *et al.*, 2012; BRUSSAARD; NOORDELOOS; SANDAA; HELDAL *et al.*, 2004; GODOY; KIBENGE; WANG; SUAREZ *et al.*, 2016; ZHANG; SHI; ZHANG; BONAMI, 2004). Os reovírus já foram isolados de uma ampla variedade de espécies de crustáceos, principalmente Portunidae e Varunidae (BATEMAN; STENTIFORD, 2017; SHIELDS; WILLIAMS; BOYKO, 2015). A variedade de hospedeiros e os sinais clínicos da infecção são fatores importantes na identificação de diferentes gêneros virais (ATTOUI; MERTENS; BECNEL; BELAGANAHALLI *et al.*, 2012).

Callinectes sapidus Reo-like Virus 1 (CsRV1 ou também chamado RLV para Reo-Like Virus (JOHNSON, 1977; TANG; MESSICK; PANTOJA; REDMAN *et al.*, 2011), tem sido frequentemente associado a mortandades de siris (*Callinectes sapidus*), causando significativas perdas econômicas à indústria do siri-mole cultivado nos Estados Unidos (BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010; FLOWERS; JOHNSON; AGUILAR; SCHOTT, 2018; SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.*, 2019). Recentemente,

ZHAO; FLOWERS e SCHOTT (2021) descobriram um novo reovírus de dsRNA, que apresentava uma organização genômica eletroforética distinta de CsRV1, em *C. sapidus* capturados no Rio Grande do Sul, Brasil, denominando-o de *Callinectes sapidus* reovirus 2 (CsRV2). Simultaneamente, CsRV2 também foi detectado em uma alta prevalência (78%) em *C. danae* mantidos em um sistema experimental de produção de siri-mole (TAVARES *et al.*, no prelo). No entanto, ainda pouco se sabe sobre a morfologia, inclusão viral de CsRV2 e os efeitos da sua infecção nos hospedeiros (ZHAO; TAVARES; SCHOTT, 2021).

Este estudo descreve a sequência do genoma de *Callinectes sapidus* reovirus 2 (CsRV2) e relata a descoberta de um novo bunyavírus putativo infectando *Callinectes danae* coletados na baía de Paranaguá, Paraná, Brasil, bem como a filogenia e similaridade de genes em relação a outros reovírus e bunyavírus que infectam crustáceos. Além disso, o presente estudo apresenta abordagens diagnósticas tradicionais para ambos os vírus, como histopatologia e microscopia eletrônica de transmissão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. COLETA E MANUTENÇÃO DOS SIRIS

Espécimes de *C. danae* (n=178) foram obtidos por pescadores artesanais na Vila de São Miguel, Paranaguá, Paraná, Brasil (25°25'48" S/48°27'12" W). Os siris foram capturados usando armadilhas cobertas por malha de abertura de 20 mm e utilizando-se carne de peixe como isca. Imediatamente após a captura, os animais foram transferidos para caixas de polietileno (70 L) contendo água do mar do local da captura, sob aeração constante. Em seguida, foram transportados até o Centro de Aquicultura Marinha e Repovoamento, pertencente ao Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), da Universidade Federal do Paraná (25°41'29.94"S, 48°27'57.09"W).

Em laboratório, os animais foram mantidos em caixas de polietileno de 70 L (n=6 siris por caixa), divididas por placas de PVC perfuradas, para evitar canibalismo. As caixas (n=31) foram interconectadas a um sistema de recirculação, composto por filtros mecânicos

e biológicos, sob aeração artificial. O fotoperíodo foi ajustado para 12:12 h (claro: escuro), controlado por um temporizador analógico. A temperatura foi mantida em 25 ± 2°C e a salinidade em 25 ups.

Todos os animais que morreram durante os 14 dias de cativeiro foram dissecados com lâminas de bisturi estéreis e todas as superfícies de manuseio foram limpas com solução de hipoclorito de sódio a 10%, para evitar possíveis contaminações. Imediatamente após a dissecação, as amostras de brânquias, hepatopâncreas e o músculo de um dos pereiópodos foram excisados de cada siri para histologia e microscopia eletrônica. Simultaneamente, uma amostra de músculo de um dos pereiópodos de cada animal foi excisada para posterior isolamento do RNA viral.

2.2. HISTOLOGIA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA

As amostras de tecidos (n=55) para histologia (1 cm^3) foram fixadas em ALFAC – Fixador de Davidson (33% álcool 95°, 22% formol, 11,5% ácido acético e 33,5% de água destilada) por 24 horas e processados em um processador histológico (Leica TP1020, Leica Biosystems, Germany), de acordo com métodos histológicos padronizados descritos por JOHNSON (1980). Os tecidos foram seccionados através de cortes de 5 µm de espessura, em um micrótomo rotativo (Leica RM2125RT, Leica Biosystems, Germany). Lâminas permanentes foram produzidas em colorações de Hematoxilina de Harris e Eosina (HE), segundo BEHMER; DE TOLOSA e DE FREITAS NETO (1976), e analisadas em microscópio óptico.

Para a microscopia eletrônica de transmissão, amostras (1 mm^3) foram fixadas por imersão em uma solução contendo glutaraldeído (2,5%) tamponado com cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,4) por 24 horas. Os tecidos foram pós-fixados em uma solução contendo tetróxido de ósmio (1%) em tampão de cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,4), desidratados em um gradiente crescente de etanol, seguido de óxido de propileno como fluido de transição e incorporado em Araldite 502 (EMS, EUA). Secções ultrafinas (70 nm) foram

coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo e imagens foram obtidas em microscópio Zeiss 900 TEM (Zeiss, Germany).

2.3. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO RNA VIRAL

Fragmentos de 25-100 mg de tecido muscular foram excisados de um dos pereiópodos e homogeneizados em 1,0 mL de solução ácida, seguindo protocolo de preparação de solução utilizando tiocianato de guanidínio, acetato de sódio, fenol e clorofórmio (adaptado de RODRIGUEZ-EZPELETA; TEIJEIRO; FORGET; BURGER *et al.* (2009)). A extração do RNA foi realizada seguindo o protocolo proposto por SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.* (2019). Os fragmentos de RNA resultantes foram então dissolvidos em 1 mM de EDTA para diminuir a degradação do RNA e armazenados a -20°C. As amostras de controle negativo (músculo de *Astyanax altiparanae*) foram extraídas antes e depois dos conjuntos de amostras dos siris testados para monitorar a contaminação cruzada entre cada amostra. A pureza e concentração do RNA foram avaliadas por fluorimetria Qubit® 4.0 (Thermo Fisher Scientific, USA), realizada de acordo com recomendações do fabricante.

O dsRNA foi isolado do RNA total baseado no método desenvolvido por FRANKLIN (1966) e MORRIS-KRSINICH e HULL (1983). Este método separa dsRNA de ssRNA explorando diferenças na hidrofobicidade e afinidade para a matriz de celulose microcristalina (Sigma–Aldrich, USA). O RNA total extraído foi adicionado a uma coluna com pó de celulose equilibrada com tampão contendo etanol (16,5%) e 1× STE (10 mM TRIS HCl pH 8,0, 100 mM NaCl e 1mM EDTA pH 8,0). A coluna foi lavada três vezes com 1 mL de tampão EtOH 16,5%/1× STE e o fluxo direto foi descartado.

Para eluir o dsRNA, 800 µL de 1× STE foram adicionados à coluna e o fluxo foi coletado em um tubo de microcentrífuga. O dsRNA foi precipitado (12.000 x g em 4°C por 15 min.) usando isopropanol e acetato de sódio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Após uma lavagem com etanol, o pellet seco ao ar foi ressuspenso em 50 µL de 1

mM de EDTA. Um total de 5 µL do RNA dissolvido foram submetidos à eletroforese em gel de agarose corado com GelRed™ (Biotium, CA, USA) a 1%. Para cada amostra aplicada, utilizou-se 1 µL de corante Gel Loading Dye Purple (6X) (Cat.No.:B70255, New England Biolabs, USA). No caso do ladder, utilizou-se 1 µL do corante e 1 µL de marcador de peso molecular 1 kb (Cat.No.:N32325, New England Biolabs, USA).

2.4. SEQUENCIAMENTO DO GENOMA

As amostras que apresentaram os segmentos do dsRNA de CsRV2 aparentes no gel de agarose foram tratadas com turbo DNAse (Ambion Inc., USA) e 50 ng foram utilizados para conversão em cDNA, utilizando o kit High-Capacity RNA-to-cDNA (Thermo Scientific), após desnaturação a 100°C por 2 min. A fita complementar ao cDNA foi sintetizada com DNA polimerase I e DNA ligase (Promega). O cDNA dupla fita foi utilizado para construção de bibliotecas Nextera XT (Illumina, San Diego, CA). As bibliotecas foram sequenciadas em uma configuração de extremidade emparelhada (paired-end) do tipo 2 x 250 pb na plataforma Illumina MiSeq, usando o kit de reagente MiSeq Reagent 500V2 (Illumina, San Diego, CA).

A qualidade das sequências geradas foi avaliada por meio da ferramenta FastQC (ANDREWS, 2010). As sequências de baixa qualidade foram trimadas com o auxílio do software CLC Genomics Workbench 12 (Qiagen). As leituras de sequências pareadas foram montadas em contigs por meio de montagem *de novo* com o software CLC Genomics Workbench 12 (Qiagen). Todas as montagens foram confirmadas por mapeamento de leituras para contigs, usando como referência as sequências conhecidas de CsRV2 (MW208677 - MW208688) e *Carcinus maenas* Portunibunyavirus 1 (MK861116.1 - MK861118.1), com auxílio do Geneious Software (versão R9). As previsões de Open Reading Frame (ORF) e anotações dos genomas foram realizadas com o auxílio do Geneious Software e do localizador de ORF NCBI e posteriormente identificados por

BLASTx/BLASTn. As comparações de genes e proteínas foram realizadas com os programas BLASTn e BLASTp.

2.5. ANÁLISE FILOGENÉTICA

As sequências de aminoácidos mais conservadas das famílias virais conhecidas, como o RNA polimerase dependente de RNA, foram obtidas do GenBank e, em seguida, alinhadas com as sequências identificadas no presente estudo usando o software MAFFT (Geneious) (KATOH; STANDLEY, 2013), que foi otimizado para alinhamento global e posteriormente aparado com trimAL (CAPELLA-GUTIÉRREZ; SILLA-MARTÍNEZ; GABALDÓN, 2009). Esses alinhamentos foram usados para gerar árvores filogenéticas de máxima verossimilhança a partir do uso de PhyML (GUINDON; DUFAYARD; LEFORT; ANISIMOVA *et al.*, 2010) e empregando modelos de substituição de melhor ajuste para o conjunto de dados (LEFORT; LONGUEVILLE; GASCUEL, 2017). Análises de significância estatística de topologias de árvore foram realizadas com o teste de suporte de ramo de verossimilhança aproximada (aLRT) (GUINDON; GASCUEL, 2003). Os números de acesso do GenBank das sequências virais usadas nas análises filogenéticas são mostrados nas árvores filogenéticas.

3. RESULTADOS

3.1. SEQUENCIAMENTO, MONTAGEM E ANOTAÇÃO DO GENOMA DE *Callinectes sapidus* REOVIRUS 2 EM *C. danae*

Os 12 contigs virais integraram 2.430.960 reads (71,7% do total de reads) e definiram 20.909 nucleotídeos (nt) com cobertura teórica (total de bases de alta qualidade sequenciadas) de mais de 36 mil vezes e um conteúdo G + C médio de 41,8%. Os tamanhos da maioria dos contigs de 745 a 3.660 nt foram consistentes com as bandas de dsRNA aparentes no gel de eletroforese (Figura 10 e Tabela 11). Os 12 contigs não apresentaram terminais conservados de 5′ ou 3′. A sequência completa do genoma de CsRV2 obtida foi

incluída como ANEXO 1 e foi depositada no GenBank sob os números de acesso MZ508293 a MZ508304.

Os 12 segmentos montados de CsRV2 foram anotados com base na semelhança com reovírus mais bem caracterizados, por meio de comparações BLASTX e BLASTN com GenBank usando parâmetros padrões. Um único open reading frame (ORF) que codifica uma proteína viral (VP) foi identificado em cada segmento, com a exceção do quinto segmento, que apresentou duas ORFs parcialmente sobrepostas. Entre as 13 proteínas que o genoma de CsRV2 codifica, duas são proteínas não estruturais (VP5A e VP8) e quatro são proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3 e VP4), ou seja, aquelas que fazem parte da estrutura física da partícula viral.

O ORF mais longo codificado por cada segmento de CsRV2 foi submetido à análise BLASTx para identificação de homólogos no banco de dados GenBank. A ORF de cada segmento apresentou identidade de 96,5 a 100% em relação às ORFs correspondentes ao reovírus CsRV2 de *C. sapidus*, sugerindo que se trata da mesma espécie de reovírus. O segmento 1 codifica uma proteína referente ao gene RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), que é o produto com a maior similaridade com qualquer outra proteína conhecida ou prevista no GenBank, apresentando alta identidade e cobertura com a RdRP de CsRV2 de *C. sapidus* (identidade: 99,51%; cobertura: 100%; E-value: 0,0) e de EsRV905 de *Eriocheir sinensis* (identidade: 79,09%; cobertura: 100%; E-value: 0,0).

Além de CsRV2 de *C. sapidus* e EsRV905, o genoma de CsRV2 carece de alta identidade com outras sequências de vírus no Genbank. A terceira e quarta maior identidade com a proteína do segmento 1 de CsRV2 com outros reovírus foram o RdRp de dois vírus pertencentes ao gênero *Seadornavirus*, o Liao ning virus (identidade: 29,04%; cobertura: 93%; E-value: 4e-109) e o Kadipiro virus (identidade: 28,9%%; cobertura: 94%; E-value: 7e-108). A proteína do segmento 2 (VP2) compartilha semelhança (identidade: 22,9%%; cobertura: 77%; E-value: 1e-34) com a proteína de revestimento da camada

interna correspondente ao vírus Kadipiro. Já, VP3 e VP4, que possuem, respectivamente, função estrutural putativa de enzima de cobertura e revestimento externo, apresentam identidade ao Liao ning virus. Ambos os reovírus, Kadipiro e Liao ning virus, possuem um genoma composto por 12 segmentos de RNA de fita dupla. No entanto, tais vírus não foram ainda identificados em crustáceos.

3.2. FILOGENIA DE *Callinectes sapidus* REOVIRUS 2 EM *C. danae*

Para realizar a análise filogenética baseada em RdRp de CsRV2, foram selecionados 15 gêneros e 34 espécies disponíveis no GenBank (espécies mostradas na Figura 11). A análise filogenética mostrou uma relação estreita bem suportada (aLRT=1) entre as sequências de aminoácidos do RdRP putativo de CsRV2 (VP1) e as proteínas RdRP dos genomas de CsRV2 isolado de *C. sapidus* e ESRV905 de *E. sinensis*, ambos membros do gênero *Cardoreovirus*.

A comparação do RdRP putativo de CsRV2 com o RdRP de outros reovírus indicou apenas uma relação distante (identidade inferior a 30%) com os *Seadornavirus*, sugerindo que eles têm uma origem distante, mas comum. Da mesma forma, as filogenias construídas baseadas nas sequências de aminoácidos de VP2, VP3 e VP4 indicaram resultados semelhantes. Porém, não foi possível analisar a relação com os outros membros do gênero *Cardoreovirus*, pois além das sequências do RdRp de EsRV905 (VP1), nenhuma outra sequência está disponível no GenBank. A análise filogenética realizada mostrou ainda que os membros do gênero *Cardoreovirus* e *Seadornavirus* compartilham de um possível ancestral comum com o gênero *Rotavirus*.

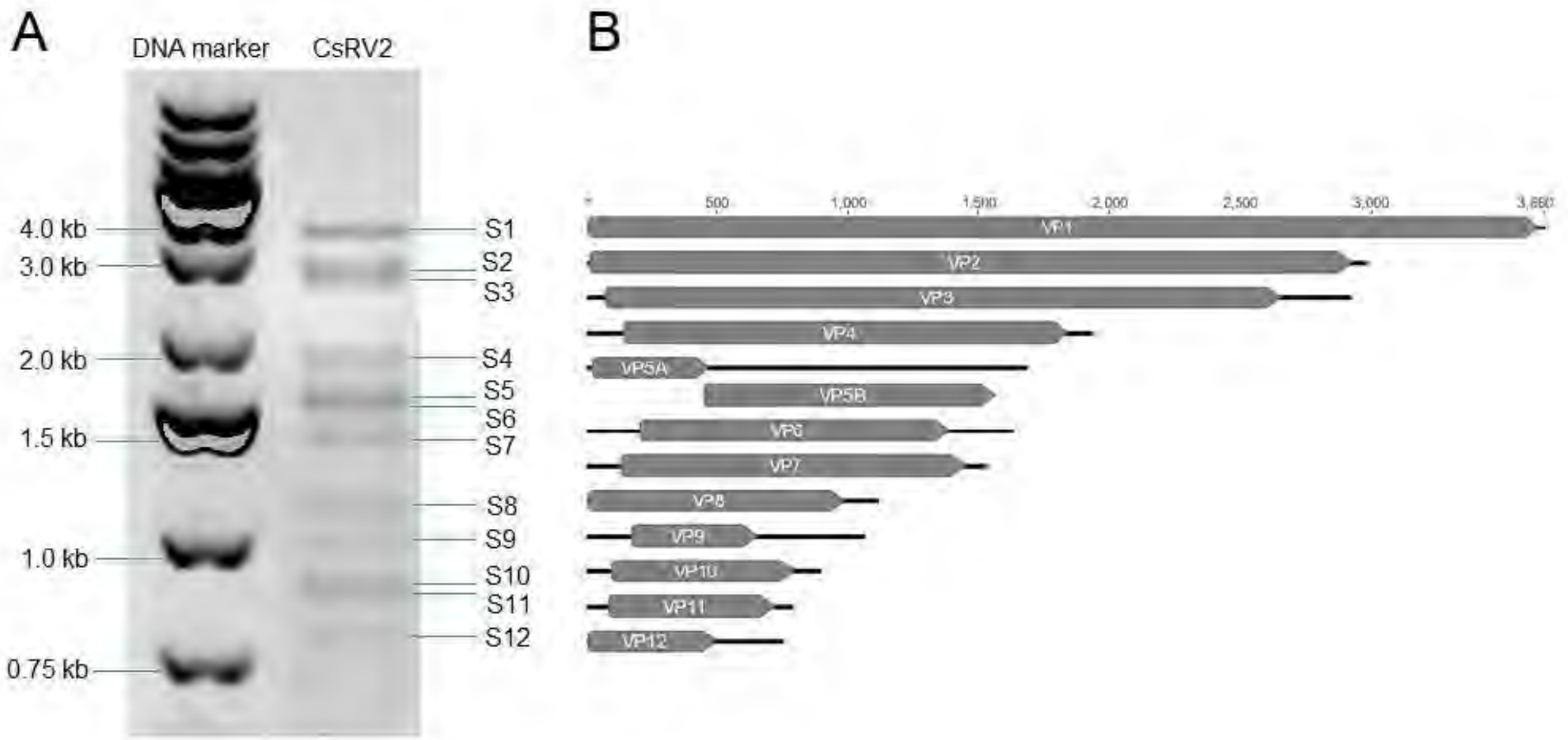


Figura 10. A) Eletroforese em gel de agarose de CsRV2 (dsRNA) extraído de um espécime de *Callinectes danae* coletado na Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. Os tamanhos das bandas de dsRNA foram determinados por comparação com o marcador de peso molecular de 1 kb mostrado na primeira coluna (Cat.Nº. N32325, New England Biolabs, EUA). B) Ilustração da organização do genoma dos 12 segmentos de dsRNA do CsRV2, os ORFs são representados pelas barras cinza e as sequências não codificantes pelas linhas pretas.

Tabela 11. Anotação da sequência do genoma CsRV2 em comparação com outras sequências de proteínas usando o banco de dados NCBI. S: segmentos de CsRV2; TM: tamanho do segmento; P: nome da proteína.

S	TM (nt)	P	Cobertura	Tamanho teórico (kDa)	Localização putativa	Função putativa	CsRV2 GenBank	Vírus com sequência semelhante	Identidade de aminoácidos (%)	Vírus semelhantes GenBank
1	3660	VP1	25954	138,3	Estrutural/ núcleo	RNA polimerase dependente de RNA	MZ508293	CsRV2 EsRV905 Liao ning virus Kadipiro virus	99,51 79,09 29,04 28,90	QPK66770.1 Q698V5.1 AAQ83562.1 AWE75154.1
2	2977	VP2	34648	108,7	Estrutural/ núcleo	Proteína de revestimento da camada interna	MZ508294	CsRV2 Kadipiro virus	99,38 22,91	QPK66771.1 NP_694470.1
3	2917	VP3	24701	97,8	Estrutural/ núcleo	Enzima de cobertura	MZ508295	CsRV2 Liao ning virus	100,00 35,39	QPK66772.1 AVP49973.1
4	1932	VP4	16247	63,3	Estrutural/ revestimento externo	Proteína de revestimento externo	MZ508296	CsRV2 Liao ning virus	97,89 24,87	QPK66773.1 AVP72169.1
5	1678	VP5A	21480	16,6	Não estrutural	proteína de ligação a dsRNA	MZ508297	CsRV2	97,39	QPK66775.1
		VP5B		42,1	Desconhecida	Desconhecida		CsRV2	96,53	QPK66774.1
6	1628	VP6	24261	44,4	Desconhecida	Desconhecida	MZ508298	CsRV2	98,74	QPK66776.1
7	1530	VP7	12935	50,3	Desconhecida	Desconhecida	MZ508299	CsRV2	98,86	QPK66777.1
8	1109	VP8	5555	38,0	Não estrutural	Proteína quinase	MZ508300	CsRV2	99,70	QPK66778.1
9	1055	VP9	14976	18,6	Desconhecida	Desconhecida	MZ508301	CsRV2	97,53	QPK66779.1
10	891	VP10	1778	25,7	Desconhecida	Desconhecida	MZ508302	CsRV2	99,15	QPK66780.1
11	787	VP11	4597	24,3	Desconhecida	Desconhecida	MZ508303	CsRV2	99,53	QPK66781.1
12	745	VP12	5940	18,2	Desconhecida	Desconhecida	MZ508304	CsRV2	98,81	QPK66782.1

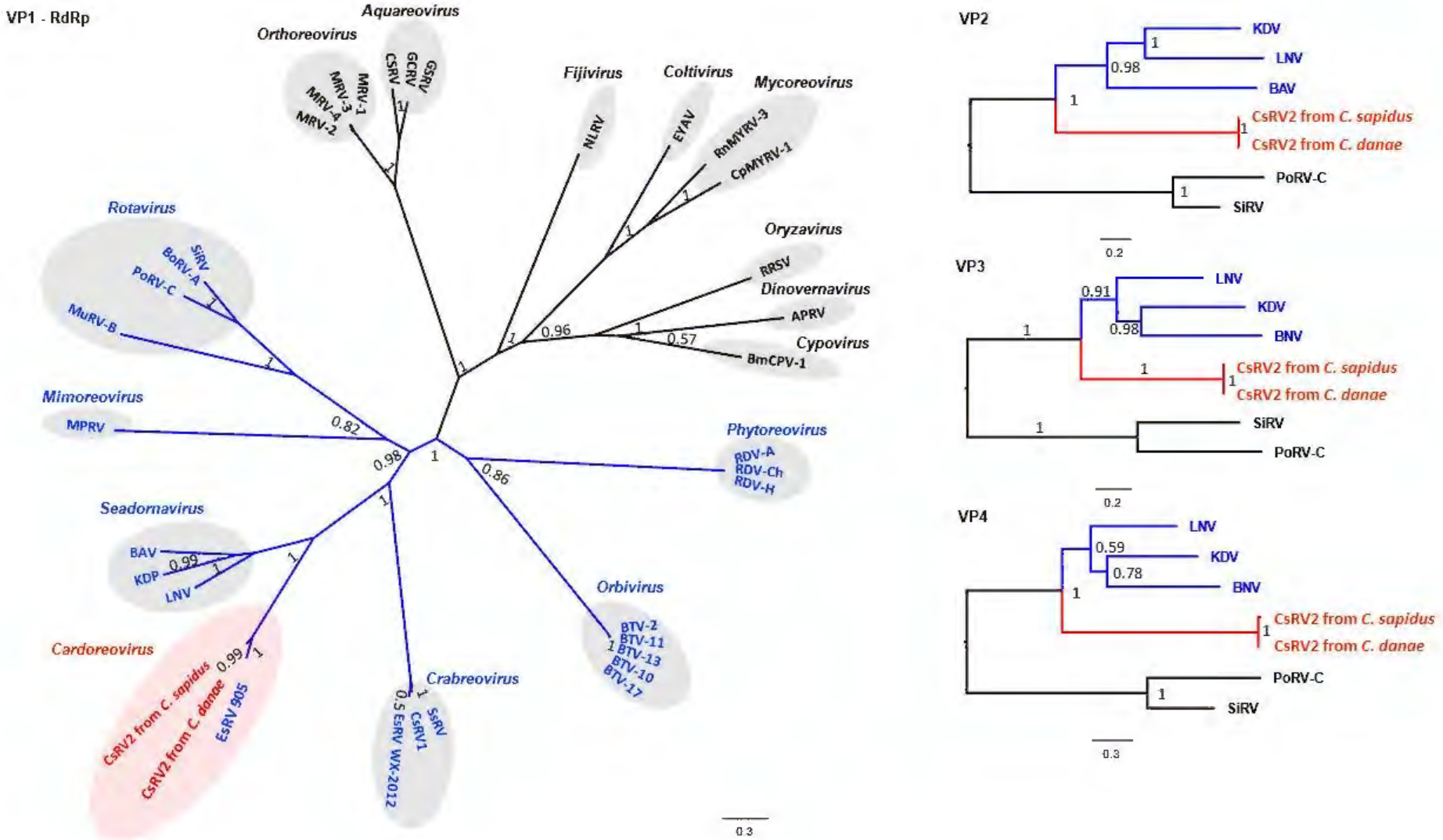


Figura 11. Árvore filogenética de máxima verossimilhança de reovírus de crustáceos e outros reovírus com base nas sequências de aminoácidos codificadas de RdRp, VP2, VP3 e VP4. A árvore foi construída usando PhyML (GUINDON; DUFAYARD; LEFORT; ANISIMOVA et al., 2010) com modelos de substituição de melhor ajuste (GTR_G + I) determinados por Smart Model Selection (LEFORT; LONGUEVILLE; GASCUEL, 2017). As análises de significância estatística das topologias das árvores foram realizadas com o teste de suporte de ramos de verossimilhança aproximada (aLRT) (GUINDON; GASCUEL, 2003). O gênero *Cardoreovirus* de crustáceos braquiúros da família *Reoviridae* é mostrado em vermelho.

3.3. VARIAÇÃO DO GENOMA DE CsRV2

A partir das análises das sequências de nucleotídeos e aminoácidos do genoma de diferentes isolados de CsRV2, realizada no presente estudo com *C. danae* e do estudo de ZHAO; FLOWERS e SCHOTT (2021), com *C. sapidus*, foi possível observar que, embora pertencentes à mesma espécie, os dois vírus pareciam ser de duas linhagens distintas. Comparações realizadas com as sequências de nucleotídeos de CsRV2 isolado de *C. danae* e CsRV2 de *C. sapidus* diferiram uma da outra entre 0,3 e 4,5%, com maior diferença na identidade no quinto e nono segmento. As sequências de aminoácidos do RdRP putativo de CsRV2 (VP1) isolado de *C. danae* e de CsRV2 isolado de *C. sapidus* apresentaram níveis elevados de identidade, com diferença na identidade de 0,49%. No entanto, foram observadas seis substituições de aminoácidos em CsRV2 isolado de *C. danae*, com a substituição de Aspargina, Treonina, Leucina, Lisina e Arginina por Serina, Isoleucina, Fenilalanina, Glutamato e Lisina, respectivamente (Figura 12). As proteínas do segmento 5B, 5A, 9 e 4 mostraram maior diferença na identidade, variando de 3,47, 2,61, 2,47 e 2,11%, respectivamente.

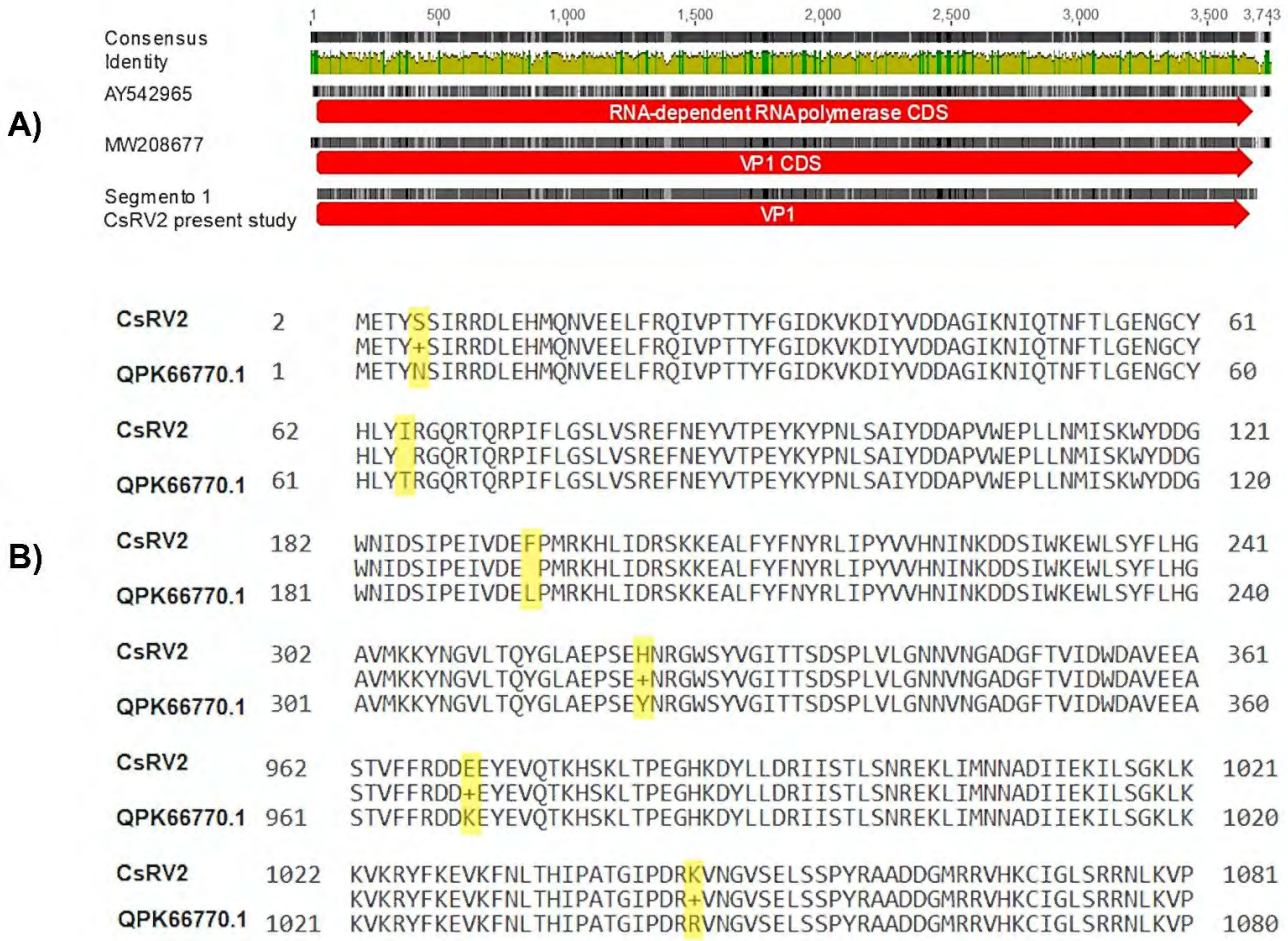


Figura 12. A) Alinhamento de sequências de nucleotídeos do gene RdRp de *Cardorevirus* (EsRV905 - AY542965, CsRV2 de *Callinectes sapidus* - MW208677.1 e CsRV2 isolado de *Callinectes danae* do presente estudo). Os aminoácidos conservados foram destacados em preto, as lacunas foram indicadas como linhas no software Geneious (versão R9). B) Alinhamento da sequência de aminoácidos traduzida (RdRp) de CsRV2 isolado de *C. danae* e CsRV2 de *C. sapidus* - QPK66770.1, as incompatibilidades de aminoácidos foram destacadas em amarelo. As substituições de aminoácidos do mesmo grupo físico-químico e função são representadas por "+".

3.4. SEQUENCIAMENTO, MONTAGEM E ANOTAÇÃO DO GENOMA DE *Callinectes danae* PORTUNIBUNYAVIRUS 1 EM *C. danae*

Além de CsRV2, os dados de sequenciamento também revelaram um genoma semelhante a bunyavírus de 11.430 nucleotídeos, nomeado provisoriamente aqui de *Callinectes danae* Portunibunyavirus 1 (CdPBV1). O genoma putativo é composto por três segmentos correspondentes a categorias previamente definidas de nomenclatura de segmento genômico para bunyavírus (Grande, Médio e Pequeno). O segmento grande (L) consistiu em 6.564 nt e um conteúdo G + C médio de 41,8%, o segmento médio (M) em 3.120 nt e G + C de 36,9% e o segmento pequeno (S) em 1.656 nt e G + C de 39,0%. Os três segmentos do genoma sequenciado não apresentaram terminais conservados de 5′ ou 3′. A sequência completa do genoma putativo de CdPBV1 obtida foi incluída como ANEXO 2 e foi depositada no GenBank sob os números de acesso MZ508290 a MZ508292.

Os três segmentos montados do genoma putativo de CmPBV1 foram anotados com base na semelhança com outros bunyavírus, por meio de comparações BLASTX e BLASTN, usando parâmetros padrões (Tabela 12). Um ORF que codifica uma proteína viral foi identificado no segmento L e M, enquanto o segmento S apresentou duas ORFs parcialmente sobrepostas (Figura 13). Entre as quatro proteínas que o genoma de CmPBV1 codifica, três são proteínas estruturais e uma é não estrutural. A proteína do segmento M mostrou ser uma proteína estrutural putativa que desempenha um papel nas interações com o receptor das células hospedeiras.

As sequências de aminoácidos do genoma putativo de CmPBV1 mostraram identidade de 75,94 a 91,39% com as sequências de *Carcinus maenas* Portunibunyavirus 1 (CmPBV1), um bunyavírus isolado recentemente de *Carcinus maenas* em zonas costeiras e estuarinas europeias. O segmento L do genoma putativo de CmPBV1 codifica uma ORF prevista que codifica um RdRp com alta identidade com o RdRp de CmPBV1 e, em menor porcentagem, com o RdRp de Wenling crustacean virus 9 e *Eriocheir sinensis* bunya-like

virus. O segmento M codifica uma ORF prevista com maior identidade com a glicoproteína de membrana de CmPBV1. Por fim, o segmento S apresentou duas ORFs previstas, incluindo uma que mostrou maior identidade com a proteína do nucleocapsídeo prevista de CmPBV1 e outra ORF com uma proteína não estrutural putativa de CmPBV1 divergente de outros isolados de bunyavírus.

3.5. FILOGENIA DE *Callinectes danae* PORTUNIBUNYAVIRUS 1 EM *C. danae*

A análise filogenética baseada em RdRp de CdPBV1 e outros membros da Ordem *Bunyavirales*, agrupou, com alto suporte (aLRT=1), o genoma putativo de CdPBV1 na família *Cruliviridae*, um clado contendo vírus infectantes de crustáceos (Figura 14). Além disso, a filogenia baseada em RdRp colocou os membros da família *Hantaviridae* como o grupo mais basal do clado e uma relação estreita (aLRT=1) da família *Cruliviridae* com *Fimoviridae*, *Tospovirus* e *Peribunyaviridae*.

A filogenia baseada nas sequências de glicoproteína e nucleocapsídeo também agrupou CdPBV1 com os membros da família *Cruliviridae* com alto valor de suporte (aLRT de 1 e 0,78, respectivamente). A análise das sequências de glicoproteína revelou que a família *Cruliviridae* compartilha um ancestral comum com *Phasmaviridae* (aLRT=0,72), enquanto as sequências da proteína do nucleocapsídeo revelaram um ancestral comum com *Hantaviridae*, porém com baixo suporte (aLRT=0,58).

Tabela 12. Anotação do genoma -ssRNA da sequência CdPBV1 em comparação com outras sequências de proteínas usando o banco de dados NCBI.

S	Cobertura	Tamanho teórico (kDa)	Função putativa	CdPBV1 GenBank	Vírus com sequência semelhante	Identidade de aminoácidos (%)	Vírus semelhantes GenBank
L	9379	248,8	RNA polimerase dependente de RNA	MZ508290	CmPBV1	91,39	QEQ51085.1
					Wenling crustacean virus 9	73,19	YP_009329879.1
					Eriocheir sinensis Bunya-like virus	73,24	QBP05470.1
M	9403	101,0	Proteína de membrana - glicoproteína	MZ508291	CmPBV1	83,63	QEQ51086.1
					Eriocheir sinensis Bunya-like virus	65,68	QBP05471.1
					Wenling crustacean virus 9	65,90	YP_009329880.1
S	5288	23,7	Proteína não estrutural	MZ508292	CmPBV1	81,04	QEQ51087.1
					CmPBV1	75,94	QEQ51088.1
		24,7	Nucleocapsídeo		Wenling crustacean virus 9	59,43	YP_009329881.1
					Eriocheir sinensis Bunya-like virus	58,49	QBP05472.1

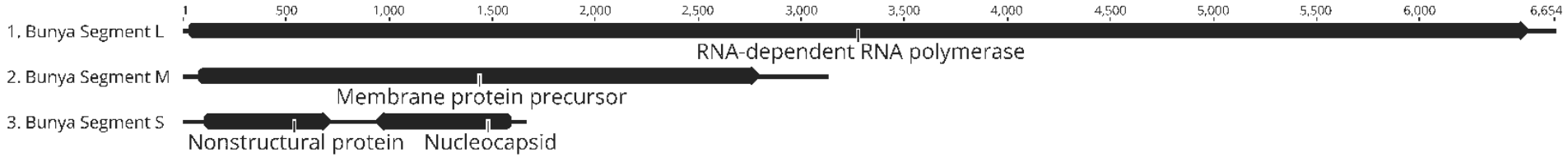


Figura 13. Representação gráfica dos três segmentos genômicos (-ssRNA) de CdPBV1 com anotação para ORFs associados ao bunyavírus. ORFs são representados pelas barras cinzas e sequências não codificantes pelas linhas pretas.

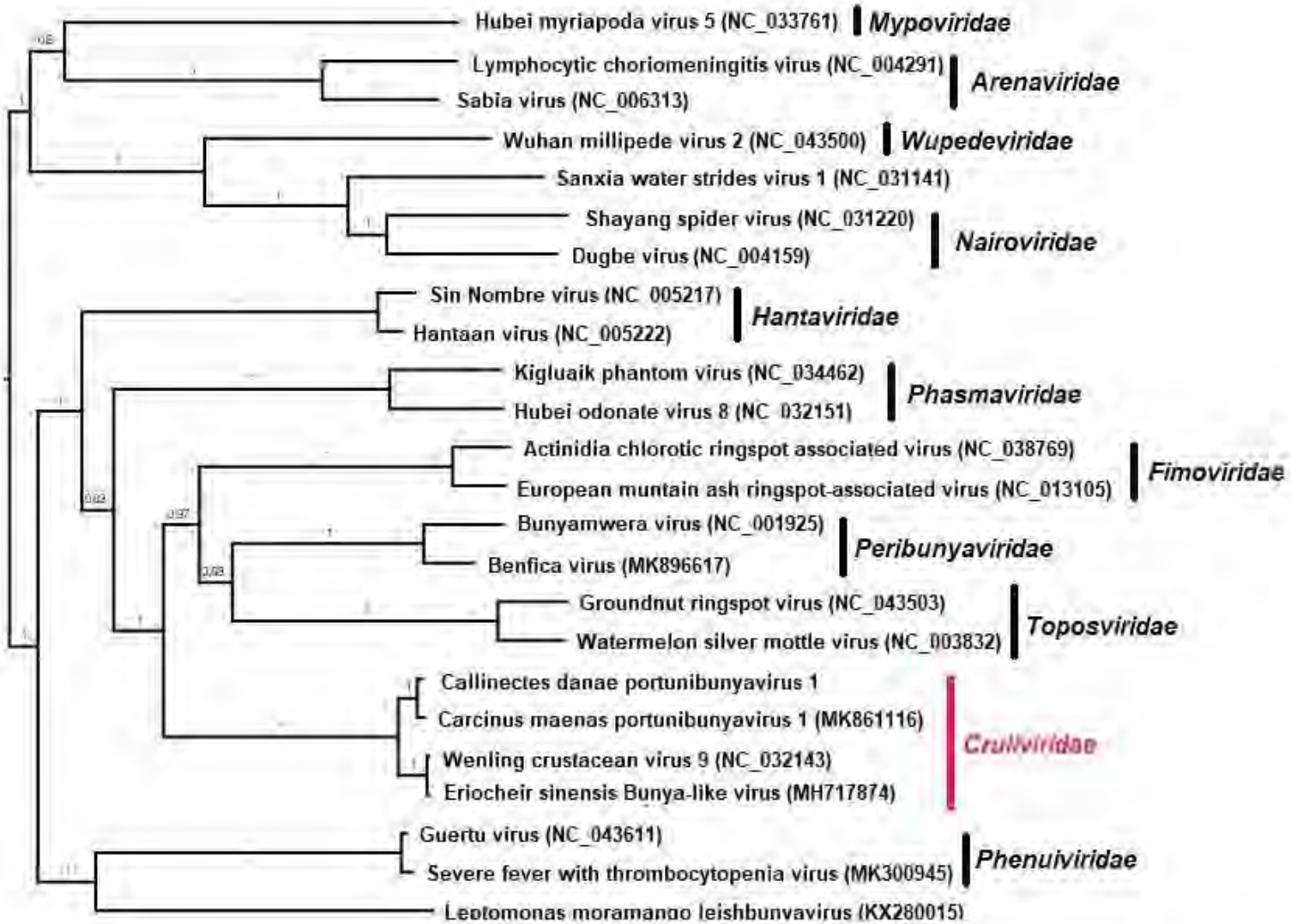


Figura 14. Uma árvore filogenética desenvolvida a partir das proteínas do gene RdRp previstas de 24 bunyavírus. Os dados da sequência da proteína foram alinhados no Geneious usando o protocolo padrão MAFFT. A árvore foi desenvolvida usando Figtree (versão 1.4.4). Os bunyavírus que infectam crustáceos são destacados em vermelho na árvore.

3.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

A análise por microscopia eletrônica de transmissão revelou a presença de partículas previstas como CsRV2 com simetria icosaédrica no citoplasma dos hemócitos das brânquias e nas células do músculo, medindo 59,0 ± 8,5 nm de diâmetro, e apresentando uma morfologia típica de reovírus non-turreted (Figura 15A). Também foi observada a presença de vesículas grandes e pequenas contendo vários vírions em desenvolvimento no citoplasma da célula, formando um arranjo paracristalino (Figura 15B). Esses vírions em desenvolvimento, pareciam se tornar progressivamente mais densos em elétrons à medida que os vírions amadureciam antes de sua saída da vesícula (Figura 15D).

Além de CsRV2, partículas esféricas de 126,3 ± 45,4 nm de diâmetro com uma morfologia típica de bunyavírus também foram identificadas principalmente nas células do tecido conjuntivo frouxo do hepatopâncreas (Figura 15C). A partir das micrografias das secções do hepatopâncreas, foi possível observar que a infecção por CdPBV1 começou com vírions ligados a uma única membrana, que aparentemente entraram na célula hospedeira por meio de endocitose e adquiriram extremidades mais densas em elétrons, semelhante à uma segunda membrana (Figura 15E). CdPBV1 e CsRV2 também foram observados infectando simultaneamente as células do epitélio branquial (Figura 15F).

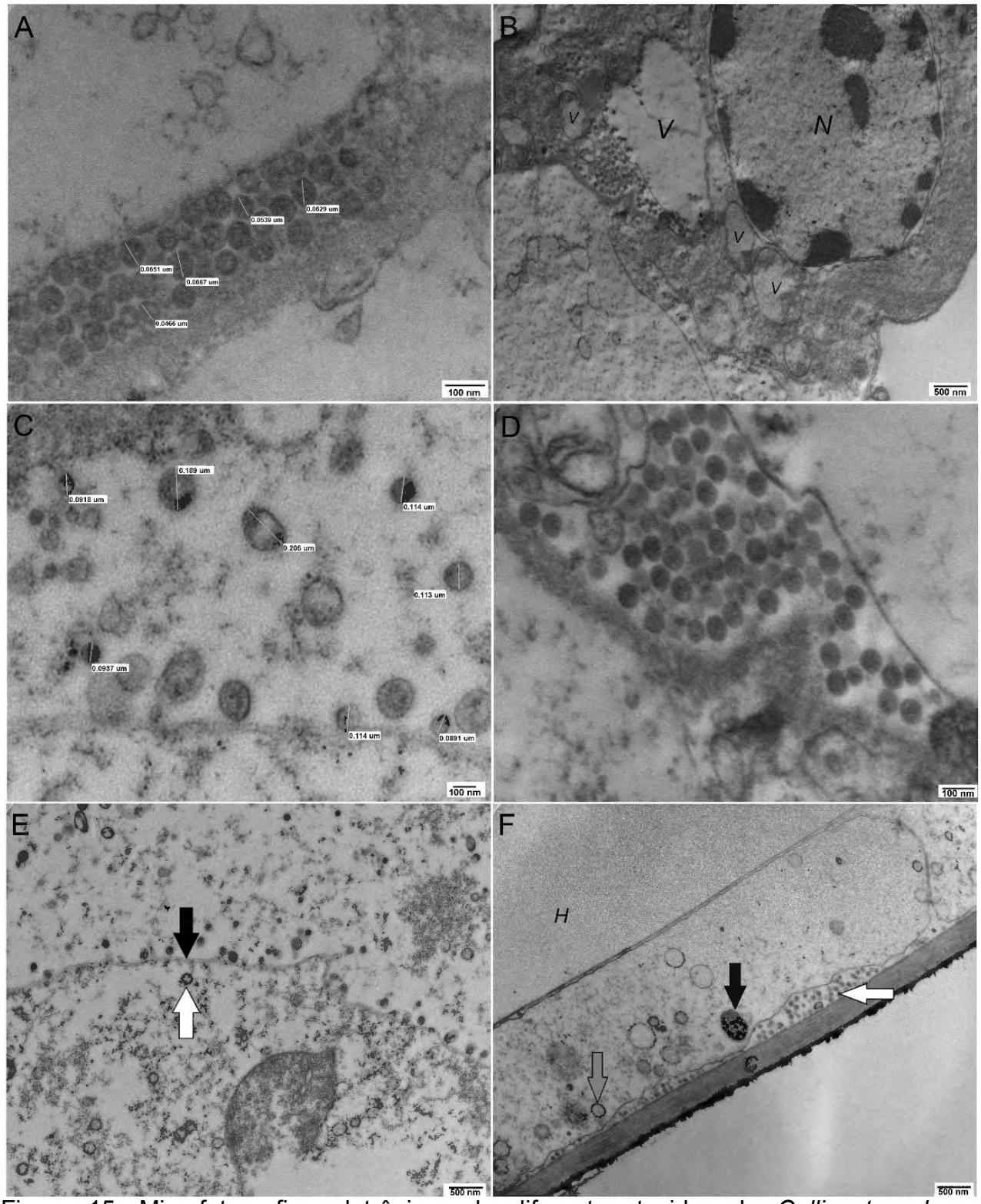


Figura 15. Microfotografias eletrônicas de diferentes tecidos de *Callinectes danae*. Presença de partículas virais (59,0 ± 8,5 nm de diâmetro) previstas como CsRV2 no citoplasma da célula do tecido muscular (A) e hemócito das brânquias (B). A imagem (D) mostra com ampliação o arranjo paracristalino no hemócito das brânquias, que inclui partículas de CsRV2 em diferentes fases de desenvolvimento. (C) Partículas previstas como CdPBV1 (126,3 ± 45,4 nm de diâmetro) presentes na célula do tecido conjuntivo frouxo entre os túbulos do hepatopâncreas. (E) As partículas de CdPBV1 de membrana única saem/entram na célula por meio da citose da membrana celular (seta preta) e entram na célula com uma membrana dupla (seta branca). (F) presença de partículas de CsRV2 (seta branca) e CdPBV1 (seta cinza) no epitélio das brânquias, com presença de vesículas

preenchidas de CsRV2 (seta preta). V: Vesículas; N: núcleo; C: cutícula; H: espaço da hemolinfa.

3.7. HISTOPATOLOGIA

Para contextualizar os resultados obtidos através da histopatologia, é preciso destacar que por meio de eletroforese, constatou-se que o dsRNA de CsRV2 foi detectado em 72,7% das amostras de tecido muscular de *C. danae* e que não foi possível determinar a prevalência do bunyavirus (-ssRNA) por eletroforese. As alterações histopatológicas de brânquias e hepatopâncreas de *C. danae* estão apresentadas na Figura 16 e Figura 17. Entre as alterações histopatológicas, foram observadas inclusões intracitoplasmáticas nos hemócitos do hepatopâncreas (frequência de 2,5%) e tecidos branquiais (34,5%) dos animais positivos para CsRV2. Os corpúsculos de inclusão presentes nas brânquias apresentaram áreas hipercromáticas perinucleares nas células infectadas. No hepatopâncreas, as inclusões foram encontradas principalmente nos hemócitos do seio hemal, porém presentes em poucas células.

Nos filamentos branquiais também foram encontradas infiltração de hemócitos (63,6%), formação de granulomas nas lamelas (43,6%) e sincícios (23,6%). Também foram identificados sincícios no tecido conjuntivo frouxo entre túbulos do hepatopâncreas (22,5%), infiltração de hemócitos (15%) e necrose (10%). Em menor ocorrência, também foram observadas nas brânquias desprendimento da cutícula (7,3%), necrose (3%) e uma alteração semelhante à neoplasia de hemócitos (3,6%). Já no hepatopâncreas, foi identificada a presença de células com núcleos picnóticos (5%), pleomorfismo de hemócitos (2,5%) e alteração semelhante à neoplasia de hemócitos no espaço entre túbulos do hepatopâncreas (2,5%). Não foram encontradas alterações no tecido muscular dos animais infectados.

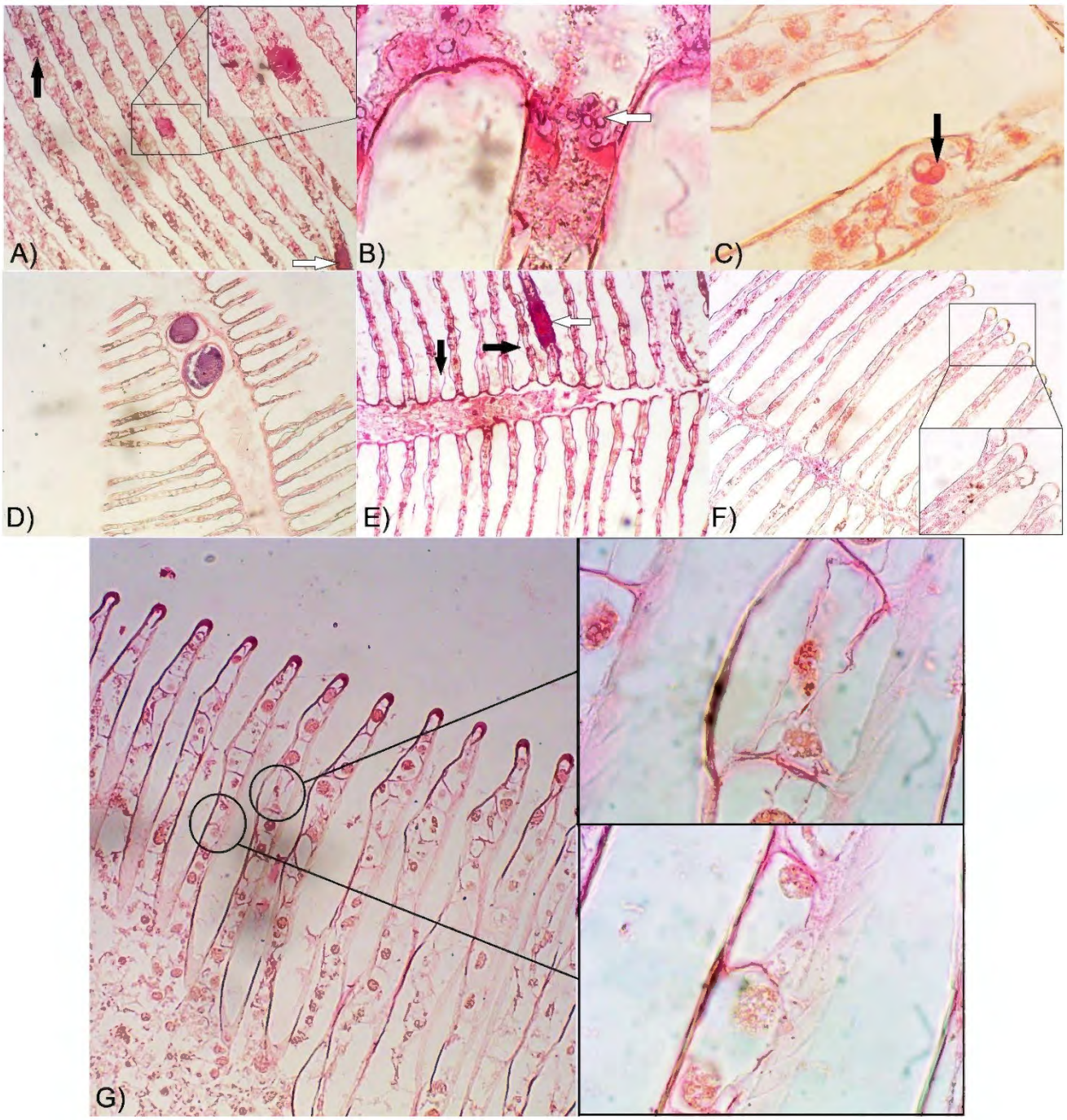


Figura 16. Histopatologia das brânquias de *Callinectes danae* infectadas com CsRV2. A) Granuloma nas lamelas branquiais é destacado em aumento de 400X, seta branca indica a ocorrência de outro granuloma e seta preta infiltrado de hemócitos. B) Sincícios em ampliação de 1000X (seta branca). C) Inclusões intracitoplasmáticas em hemócitos, os corpos de inclusão são destacados por setas pretas (aumento de 1000X). D) Parasitas presentes nas lamelas das brânquias (aumento 100X). E) Descolamento da cutícula da lamela (setas pretas) e granuloma (seta branca) em aumento de 100X. F) A fusão da lamela é destacada com aumento de 400x. G) Aumento de volume e divisão mitótica celular semelhante à neoplasia nas lamelas branquiais, as neoplasias são destacadas em aumento de 1000x.

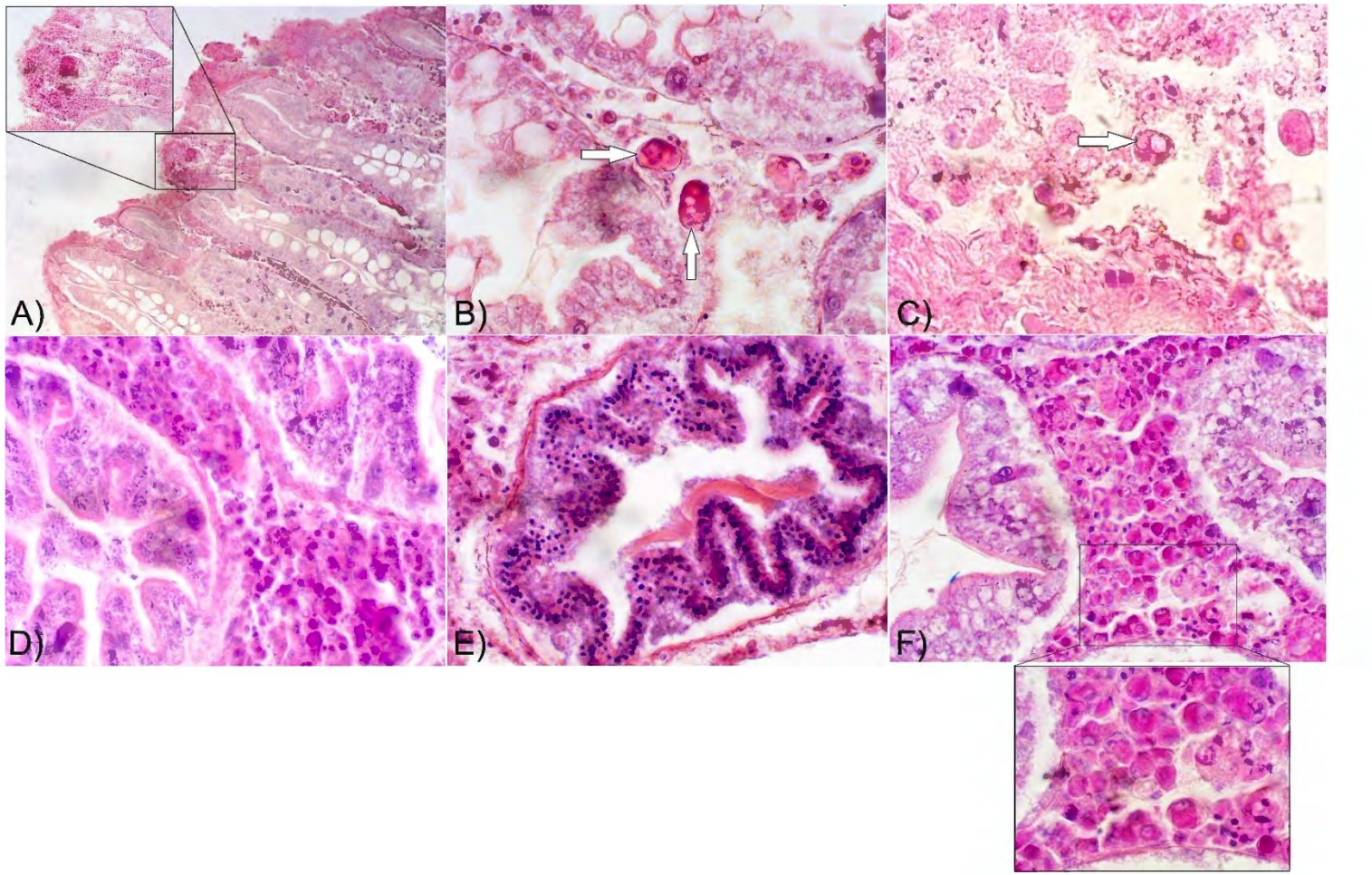


Figura 17. Histopatologia do hepatopâncreas de *Callinectes danae* infectado com CsRV2. A) O granuloma é destacado em aumento de 400X. B) Sincícios no tecido conjuntivo frouxo entre os túbulos do hepatopâncreas em aumento de 400X (setas brancas). C) Inclusões intracitoplasmáticas nos hemócitos do hepatopâncreas, os corpos de inclusão são destacados por uma seta branca (aumento 1000X). D) Infiltração de hemócitos entre os túbulos do hepatopâncreas em aumento de 400X. E) Células com núcleos picnóticos nos túbulos (aumento 400X). F) Hemócitos de diferentes tamanhos com núcleos de diferentes formas e cores semelhantes à neoplasia são destacados em aumento de 1000X.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo forneceu a sequência do genoma e a filogenia de dois novos vírus que infectam *C. danae* no Sul do Brasil. Além disso, este foi o primeiro estudo a investigar a morfologia destes vírus emergentes, bem como as alterações histopatológicas provocadas pela infecção viral em *C. danae* em condições laboratoriais. Os dados aqui apresentados sugerem que CsRV2 é um novo membro da família *Reoviridae*, originalmente identificado por meio de eletroforese, a partir de extratos de RNA do músculo e hemolinfa de *C. danae*, durante experimentos para a produção de siri-mole em sistema de recirculação (TAVARES *et al.*, no prelo). Já, CdPBV1 é um novo membro da família *Cruliviridae*, relatado pela primeira vez em *C. danae* pelo presente estudo.

4.1. *Callinectes sapidus* REOVIRUS 2 EM *C. danae*

O genoma do CsRV2 foi montado em 12 contigs, que correspondem qualitativamente aos tamanhos dos segmentos de dsRNA visualizados previamente em gel de agarose (TAVARES *et al.*, no prelo) e agora confirmado pelo presente estudo. O gênero *Cardoreovírus* é o único gênero de reovírus de crustáceos reconhecido pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) que possui genoma de 12 segmentos, incluindo como um dos membros *Eriocheir sinensis* reovirus (ESRV905) (ATTOUI; MERTENS; BECNEL; BELAGANAHALLI *et al.*, 2012; SHEN; MA; HU, 2015). As características do genoma de CsRV2, como a presença de 12 segmentos e semelhança na sequência de RdRp com o reovírus ESRV905, dão suporte à inclusão do CsRV2 no gênero *Cardoreovirus*. A afinidade de *Cardoreovirus* observada na análise filogenética com os reovírus que infectam insetos, o gênero *Seadornavirus*, foi observada no presente estudo e também em relatório apresentado por ATTOUI; MERTENS; BECNEL; BELAGANAHALLI *et al.* (2012). Porém, a análise de semelhança do RdRp de CsRV2 e EsRV com os seadornavírus indica uma relação distante (identidade menor que 30%), mas comum entre si.

Exceto pela sequência do RdRp do segmento 1, os segmentos de CsRV2 também mostraram identidade baixa com os *Seadornavirus*, mas, em grande parte, em função da escassez de dados de sequência de EsRV905 ou outros *Cardoreovirus* para construir alinhamentos. A análise filogenética de VP1, VP2, VP3 e VP4 também relevou que os *Cardoreovirus* compartilham um ancestral comum com os *Rotavirus*, sugerindo que ocorreu um salto evolutivo entre os grupos. Acredita-se que isso tenha envolvido a duplicação e o rearranjo de genes, alterando o número de segmentos do genoma de 11 dos rotavírus para 12 para os cardoreovírus (KING; ADAMS; CARSTENS; LEFKOWITZ, 2012).

As análises de homologia indicaram fortemente que as proteínas putativas que os segmentos de CsRV2 codifica são um RdRP (VP1), uma proteína de revestimento da camada interna (VP2), uma enzima de cobertura (VP3), uma proteína de revestimento externo (VP4) e uma quinase (VP5). DENG; LU; OU; SU *et al.* (2012) e FLOWERS; BACHVAROFF; WARG; NEILL *et al.* (2016) também usaram buscas por homologia para fazer atribuições às funções das proteínas putativas do reovírus que infecta *Scylla serrata* (Mud Crab Reovirus) e *Callinectes sapidus* (CsRV1). A proteína VP4 mostrou ser uma proteína estrutural do capsídeo externo que interage diretamente com o receptor das células hospedeiras.

Embora os padrões eletroforéticos dos genomas de CsRV2 isolado de *C. danae* e CsRV2 de *C. sapidus* sejam semelhantes, foram observadas algumas divergências genéticas nas sequências de nucleotídeos entre as linhagens. Divergências a nível de nucleotídeos e aminoácidos também foram observadas em 10 isolados de CsRV1 em *C. sapidus* coletados em diferentes locais nos EUA (nt: 0,2-1,4%, aa: 1,1%) e também entre 5 isolados no Brasil (nt: 0,3-1,2%, aa: 2,6%) (FLOWERS; BACHVAROFF; WARG; NEILL *et al.*, 2016). As análises filogenéticas gerais apoiam a hipótese de co-especiação de que os reovírus co-evoluíram com seus respectivos hospedeiros (KING; ADAMS; CARSTENS; LEFKOWITZ, 2012). Essas divergências genéticas nas sequências do genoma dos

diferentes isolados de CsRV2 no Brasil, sugerem que o vírus faça parte da ecologia do siri há muito tempo e que o genoma do vírus pode ser um marcador útil para entender a conectividade da população em escalas espaciais e temporais.

4.2. *Callinectes danae* PORTUNIBUNYAVIRUS 1 EM *C. danae*

A ordem *Bunyavirales* é um grupo recente de vírus com genomas de RNA de fita simples negativa (-ssRNA), envelopados, medindo cerca de 100 nm de comprimento e 70 nm de diâmetro e compostos de 2 a 4 segmentos (GUTERRES; DE OLIVEIRA; FERNANDES; DE LEMOS *et al.*, 2017; MAES; ADKINS; ALKHOVSKY; AVSIC-ZUPANC *et al.*, 2019). Até o momento, a família *Cruliviridae* é a única família viral que agrupa os bunyavírus que infectam crustáceos, contendo um único membro reconhecido pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), o 'Wenling Lincruvirus'. Embora numerosos vírus relacionados à família tenham sido propostos em crustáceos hospedeiros (BOJKO; SUBRAMANIAM; WALTZEK; STENTIFORD *et al.*, 2019; BONAMI; VAGO, 1971; CORBEL; COSTE; BONAMI, 2003; SAKUNA; ELLIMAN; TZAMOUZAKI; OWENS, 2018), essa é primeira vez que foi possível identificar o genoma do bunyavírus CdPBV1 associado a este subfilo.

As características genômicas de CdPBV1, como a presença de um genoma tripartido e semelhança na sequência de RdRp, glicoproteína e proteína do nucleocapsídeo do bunyavírus *Carcinus maenas* Portunibunyavirus 1, recentemente sequenciado e descrito por BOJKO; SUBRAMANIAM; WALTZEK; STENTIFORD *et al.* (2019), dão suporte à inclusão do CdPBV1 na família *Cruliviridae*. As análises filogenéticas apresentadas aqui também mostraram que CdPBV1 possui parentesco com os membros das famílias *Peribunyaviridae*, *Fimoviridae* e *Tospovirus*, a mesma organização foi observada por (BOJKO; SUBRAMANIAM; WALTZEK; STENTIFORD *et al.*, 2019). Ambos resultados sugerem que a evolução da ordem *Bunyavirales* inclui a ramificação inicial da família *Phenuiviridae*, que contém dois vírus infectantes de crustáceos, o Wenzhou Shrimp virus 1

e o Wenling Crustacean virus 7 (LI; SHI; TIAN; LIN *et al.*, 2015; SHI; LIN; TIAN; CHEN *et al.*, 2016). A presença de vírus que infecta crustáceos em outras famílias, como *Phenuiviridae*, pode indicar que os ambientes marinhos sejam uma fonte em potencial de diversidade de bunyavírus ainda não descoberta (BOJKO; SUBRAMANIAM; WALTZEK; STENTIFORD *et al.*, 2019).

As análises filogenéticas também apresentaram a família *Hantaviridae* como o grupo mais basal do clado que inclui *Cruliviridae*. *Phenuiviridae* e *Hantaviridae* incluem vírus que são transmitidos por mosquitos, carrapatos e até roedores silvestres e associados a doenças (doença febril, encefalite, febre hemorrágica) em humanos e mamíferos (KAZIMIROVA; THANGAMANI; HERMANCE; THANGAMANI *et al.*, 2017; LING; VERNER-CARLSSON; ERIKSSON; PLYUSNINA *et al.*, 2019; YADAV; NYAYANIT; SHETE; JAIN *et al.*, 2019). O parentesco dos vírus que infectam crustáceos com estes grupos pode refletir vetorização semelhante de doenças (BOJKO; SUBRAMANIAM; WALTZEK; STENTIFORD *et al.*, 2019).

4.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA E HISTOPATOLOGIA

A morfologia das partículas de CsRV2 foi semelhante aos reovírus já registrados em crustáceos braquiúros, como o CsRV1 de *C. sapidus* (BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010; ZHAO; TAVARES; SCHOTT, 2021), MCRV de *S. serrata* (WENG, S. P.; GUO, Z. X.; SUN, J. J.; CHAN, S. M. *et al.*, 2007), EsRV905 e EsRV WX-2012 de *E. sinensis* (SHEN; MA; HU, 2015; ZHANG; SHI; ZHANG; BONAMI, 2004) e W2 de *C. mediterraneus* (MARI; BONAMI, 1988). As partículas de CsRV2 estavam em um arranjo paracristalino ou espalhadas dentro do citoplasma, semelhante ao observado nas células infectadas por MCRV, CsRV1, EsRV905 e EsRV WX-2012, exceto para W2, que apresentou um arranjo do tipo roseta em *C. mediterraneus* (MARI; BONAMI, 1988). As partículas de CdPBV1 também foram semelhantes aos vírus relacionados à ordem *Bunyavirales* registrados em crustáceos, como o CmPBV1 isolado de *C. maenas* (BOJKO;

SUBRAMANIAM; WALTZEK; STENTIFORD *et al.*, 2019) e o S vírus de *C. mediterraneus* (MARI ; BONAMI, 1986). No entanto, as partículas de CdPBV1 estavam espalhadas dentro do citoplasma das células, diferente do bunyavírus de *C. maenas* que desenvolveu matrizes paracristalinas.

Os siris positivos para CsRV2 apresentaram diversas alterações histopatológicas, incluindo quatro alterações relacionadas aos efeitos citopáticos dos vírus (inclusão intracitoplasmática, sincício, pleomorfismo e neoplasia), dois de processos inflamatórios (granuloma e infiltração de hemócitos) e três alterações consideradas irreversíveis (necrose, picnose e desprendimento de cutícula). Em relação às alterações envolvidas nos processos inflamatórios, a infiltração de hemócitos esteve entre as mais prevalentes nos animais infectados. Sua presença é resultado da resposta imunológica dos crustáceos. Microrganismos infectantes são reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro, que induz à migração de hemócitos para os locais de infecção, promovendo uma clássica resposta inflamatória, a infiltração (ANJEL; MORALES, 2008). Esta resposta inflamatória também foi observada na lagosta vermelha *Cherax quadricarinatus* infectada por um orthobunyavírus (família *Peribunyaviridae*), recentemente identificado e sequenciado por SAKUNA; ELLIMAN; TZAMOUZAKI e OWENS (2018), evidenciando o papel dos hemócitos na resposta a agentes virais em crustáceos.

Os hemócitos circulantes de crustáceos desempenham um papel fundamental no sistema de defesa do hospedeiro, neutralizando os agentes invasores por fagocitose e/ou a formação de agregados celulares em torno das partículas invasoras (ANJEL; MORALES, 2008; JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006). Os siris positivos para CsRV2 também apresentaram formação de granulomas nas lamelas branquiais, sugerindo a ocorrência de infecção por algum agente invasor. JOHNSON (1977) também registrou formação de granulomas nas brânquias de *C. sapidus* positivos para o reovírus CsRV1. Estes agregados celulares são igualmente comuns em infecções parasitárias,

principalmente aquelas causadas por dinoflagelados do gênero *Hematodinium* (RYAZANOVA; ELISEIKINA; SEMENCHENKO, 2018). No entanto, a prevalência de protozoários parasitos foi identificada em apenas 5% dos animais infectados por CsRV2, com ocorrência simultânea de granulomas em apenas um animal.

Inclusões intracitoplasmáticas nos hemócitos do hepatopâncreas e das brânquias também foram evidentes nos animais positivos para CsRV2. Os corpúsculos de inclusão viral em hemócitos branquiais se caracterizaram por áreas hipercromáticas perinucleares. Segundo FLOWERS; SIMMONDS; MESSICK; SULLIVAN *et al.* (2016), a presença de inclusões intracitoplasmáticas indica a presença de vírus de RNA, a afirmação foi confirmada através da extração de RNA de amostras de tecido muscular de *C. sapidus* infectados por CsRV1 e analisados em eletroforese, que revelou a presença dos 12 segmentos de dsRNA do reovírus. Isso pode ser explicado pelo fato da replicação do reovírus ocorrer no citoplasma das células do hospedeiro (ATTOUI; MERTENS; BECNEL; BELAGANAHALLI *et al.*, 2012; TANG; MESSICK; PANTOJA; REDMAN *et al.*, 2011). CHEN; YANG; LOU e JUAN (2011) e WENG, S.-P.; GUO, Z.-X.; SUN, J.-J.; CHAN, S.-M. *et al.* (2007) também registraram inclusões intracitoplasmáticas nas brânquias de todos os espécimes de *Scylla serrata* infectados por RLV, atualmente chamado de CsRV1. Os autores também reportaram que os corpúsculos de inclusão eosinófilos apresentavam diferentes tons de vermelho próximo ao núcleo das células infectadas. Inclusões intracitoplasmáticas também foram comuns em infecções por bunyavírus e foi registrado nos hemócitos das brânquias de *C. maenas* infectados por um bunyavírus recentemente nomeado de CmPBV1 (BANG, 1971; BOJKO; SUBRAMANIAM; WALTZEK; STENTIFORD *et al.*, 2019).

Durante a infecção viral, as proteínas presentes no envelope do vírus são usadas para invadir a célula do hospedeiro, em seguida são transportadas para a superfície da célula, fazendo com que a membrana da célula hospedeira se funda com células vizinhas,

ocasionando os sincícios (ALBRECHT; FONS; BOLDOGH; RABSON, 1996). Os sincícios podem se formar quando as células são infectadas com certos tipos de vírus, como a SARS-CoV-2 em células humanas, por exemplo (BUCHRIESER; DUFLOO; HUBERT; MONEL *et al.*, 2020; GIACCA; BUSSANI; SCHNEIDER; ZENTILIN *et al.*, 2020; XU; SHI; WANG; ZHANG *et al.*, 2020). Certos membros da família *Reoviridae* possuem um conjunto único de proteínas para a fusão com a célula do hospedeiro, no entanto, a formação de sincício induzida por reovírus não é encontrada em humanos, mas é usualmente registrada em várias espécies de répteis, como cobras, lagartos e iguanas (DUNCAN; CORCORAN; SHOU; STOLTZ, 2004; SALSMAN; TOP; BOUTILIER; DUNCAN, 2005). Em crustáceos, hemócitos hialinos multinucleados foram registrados em *C. sapidus* durante os estudos histopatológicos realizados por JOHNSON (1977). No entanto, segundo o autor, a associação com o reovirus CsRV1 não ficou evidente. No presente estudo, os sincícios foram encontrados com frequência nas brânquias e no tecido conjuntivo frouxo entre os túbulos do hepatopâncreas de *C. danae*, podendo ser utilizados como referência para o diagnóstico.

Relatos de proliferação anormal de tecidos em crustáceos decápodes marinhos são extremamente raros (VOGT, 2008). A maioria das neoplasias é considerada espontânea ou resultante de contaminação ambiental, malformação congênita, idade ou predisposição genética, não sendo transmissível. As exceções são justamente as neoplasias causadas por vírus infecciosos (MEYERS; BURTON; BENTZ; STARKEY, 2008). LIGHTNER e BROCK (1987) descreveram a ocorrência de neoplasia em vários tecidos de *Litopenaeus vannamei* infectados pelo vírus causador da necrose hipodérmica e hematopoiética infecciosa (IHHN) e sugeriram uma relação entre a doença e a neoplasia. No presente estudo, alterações semelhantes a neoplasia foram identificadas em baixa prevalência nas brânquias e hepatopâncreas de *C. danae* infectado por CsRV2, mas a etiologia dessa alteração ainda é desconhecida.

4.4. POTENCIAIS IMPACTOS DA INFECÇÃO POR CsRV2 E CdPBV1 EM *C. danae*

Entre os reovírus que causam mortalidade em crustáceos, o CsRV1 é uma das espécies mais associadas a episódios de elevada e rápida mortalidade de *C. sapidus* em cultivo (BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010; FLOWERS; JOHNSON; AGUILAR; SCHOTT, 2018; JOHNSON, 1977; SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.*, 2019; TANG; MESSICK; PANTOJA; REDMAN *et al.*, 2011). Há registros de alta prevalência de CsRV1 associados à mortalidade de animais em sistemas de produção de siri-mole (FLOWERS; BACHVAROFF; WARG; NEILL *et al.*, 2016; SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.*, 2019). Os sinais clínicos típicos associado a infecções por reovírus em crustáceos braquiúros são letargia, anorexia, tremores e paralisia nas fases finais da infecção (BONAMI; ZHANG, 2011; JOHNSON, 1977). Sob condições laboratoriais, Injeções de CsRV1 causam 100% de mortalidade em *C. sapidus* em poucos dias (BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010).

A mortalidade de diferentes espécies de crustáceos também foi reportada em infecções experimentais com outras espécies de reovírus. A injeção experimental de vírus P purificado causou inicialmente tremores em 60% de *Macropipus depurator*, seguido de paralisia e mortalidade de 70 a 80% dos animais infectados após 9 dias (BONAMI; COMPS; VEYRUNES, 1976). A infecção experimental de *S. serrata* com MCRV por injeção intramuscular, inoculação em banho e inoculação oral também levou a 100% de mortalidade, enquanto a coabitação causou 80% de mortalidade (WENG, S.-P.; GUO, Z.-X.; SUN, J.-J.; CHAN, S.-M. *et al.*, 2007). Já a infecção experimental de *E. sinensis* com EsRV905 e EsRV816 purificados causou apenas 30% de mortalidade, sem relatos de tremores (BONAMI; ZHANG, 2011; ZHANG; SHI; ZHANG; BONAMI, 2004).

Em relação aos bunyavírus, o lagostim *Cherax quadricarinatus* pode ser infectado por um bunyavírus que causa mortalidade do hospedeiro quando a carga viral excede 10^6 cópias virais por mg de tecido muscular, resultando em mortalidade populacional de 20 a

40% em apenas 3 semanas (SAKUNA; ELLIMAN; TZAMOUZAKI; OWENS, 2018). BOJKO; SUBRAMANIAM; WALTZEK; STENTIFORD *et al.* (2019) sugere que CmPBV seja um patógeno que poderia coinfectar *C. maenas* e interagir positiva ou negativamente com a fauna local em novos ambientes. Além de detectarem o reovírus EsRV905, ZHANG; SHI; ZHANG e BONAMI (2004) também identificaram simultaneamente em *E. sinensis* um vírus do tipo bunya e, conforme indicado por infecções experimentais, esse vírus seria o agente causador da síndrome do tremor em *E. sinensis*. Além disso, a taxa de mortalidade foi acelerada quando os animais estavam coinfectados com EsRV905 e pelo vírus do tipo bunya. Estudos complementares sobre o grau de virulência e patogenicidade de CsRV2 e CdPBV1, bem como a coinfecção em *C. danae* serão fundamentais para a melhor compreensão dos potenciais impactos que esses vírus emergentes podem causar para empreendimentos aquícolas ou aos estoques naturais de *C. danae* no Brasil.

5. CONCLUSÃO

Nosso estudo apresentou evidências consistentes de que o CsRV2, um vírus recentemente detectado em *C. danae*, está relacionado aos membros da família *Reoviridae* e do gênero *Cardoreovirus,* apresentando variação genética em comparação com o CsRV2 detectado em *C. sapidus* no extremo sul do Brasil. A utilização da abordagem metagenômica no estudo, também permitiu a descoberta de um genoma relacionado a ordem *Bunyavirales* coinfectando o exemplar de *C. danae*, o CdPBV1. Por meio da combinação do uso de abordagens diagnósticas modernas e tradicionais, foi possível constatar que CsRV2 e CdPBV1 apresentam características moleculares e morfológicas semelhantes aos reovírus e bunyavírus já detectados em crustáceos. Por fim, este estudo constatou que ambos os vírus infectam os tecidos derivados da ectoderme (epitélio branquial) e mesoderme (tecido muscular, tecido conjuntivo do hepatopâncreas e hemócitos), podendo ser capazes de causar alterações histopatológicas com potencial associação com doença e, consequentemente, com mortalidade dos animais infectados.

Os dados apresentados aqui abrem as portas para uma compreensão mais ampla desses vírus, incluindo estudos complementares que deverão envolver o desenvolvimento de um ensaio de RT-qPCR para quantificar a carga viral de ambos os vírus, bem como a realização de ensaios de infecção experimental de CsRV2 e CdPBV1 em *C. danae*, que possibilitarão uma melhor compreensão da patogenicidade e grau de virulência de ambos os vírus. Para que, dessa forma sejam desenvolvidas, caso necessário, medidas de mitigação ou de convivência com estes novos vírus.

6. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Produtividade em Pesquisa concedida ao Dr. Antonio Ostrensky (processo Nº 304633/2017-8, pelo financiamento do projeto (processo Nº 381091/2014-7) e pela concessão de bolsa de doutorado à Camila P. S. Tavares (processo Nº 141022/2017-5). À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche no exterior (processo nº 88881.190487/2018-01). Agradecemos ao Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior e Dr. Marcos Letaif Gaeta (Laboratório de microscopia eletrônica e microanálise da Universidade Estadual de Londrina) pela preparação e análise das amostras para MET, Eduardo Balsanelli pela ajuda nas análises da sequência do genoma (UFPR).

7. REFERÊNCIAS

ALBRECHT, T.; FONS, M.; BOLDOGH, I.; RABSON, A. S. Effects on Cells. *In*: BARON, S. (Ed.). **Medical Microbiology**. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. v. 4, cap. 44.

ANACLETO, A.; BAPTISTA-METRI, C.; GONÇALVES, T.; CALADO, A.; ROSÁRIO, É.; PONTES, M.; NEVES, P. Extrativismo do siri com gaiolas no litoral paranaense: implicações socioeconômicas. **Sodebras**, 10, p. 5, 2015.

ANDREWS, S. **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data**. 2010.

ANJEL, J. C.; MORALES, V. **Guía técnica patología e inmunología de camarones penaeidos**. 1 ed. Panamá city, Panamá: Editorial New Concept Publications, 2008. 270 p. 978-9962-661-02-3

ATTOUI, H.; MERTENS, P. P. C.; BECNEL, J.; BELAGANAHALLI, S.; BERGOIN, M.; BRUSSAARD, C. P.; CHAPPELL, J. D.; CIARLET, M.; DEL VAS, M.; DERMODY, T. S.; DORMITZER, P. R.; DUNCAN, R.; FANG, Q.; GRAHAM, R.; GUGLIELMI, K. M.; HARDING, R. M.; HILLMAN, B.; MAKKAY, A.; MARZACHÌ, C.; MATTHIJNSSENS, J.; MILNE, R. G.; MOHD JAAFAR, F.; MORI, H.; NOORDELOOS, A. A.; OMURA, T.; PATTON, J. T.; RAO, S.; MAAN, M.; STOLTZ, D.; SUZUKI, N.; UPADHYAYA, N. M.; WEI, C.; ZHOU, H. Family Reoviridae. *In*: LEFKOWITZ, E. J., Dempsey, D.M., Hendrickson, R.C., Orton, R.J., Siddell, S.G., Smith, D.B., (Eds.) (Ed.). **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. New York: Elsevier Academic press, 2012. p. 541-637.

BANG, F. B. Transmissible disease, probably viral in origin, affecting the amebocytes of the european shore crab, *Carcinus maenas*. **Infection and Immunity**, 3, n. 4, p. 617-623, 1971. 10.1128/iai.3.4.617-623.1971

BATEMAN, K. S.; STENTIFORD, G. D. A taxonomic review of viruses infecting crustaceans with an emphasis on wild hosts. **Journal of Invertebrate Pathology**, 147, p. 86-110, 2017. 10.1016/j.jip.2017.01.010

BEHMER, O. A.; DE TOLOSA, E. M. C.; DE FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo Livraria Editora, 1976.

BOJKO, J.; SUBRAMANIAM, K.; WALTZEK, T. B.; STENTIFORD, G. D.; BEHRINGER, D. C. Genomic and developmental characterisation of a novel bunyavirus infecting the crustacean *Carcinus maenas*. **Scientific Reports**, 9, n. 1, p. 1-10, 2019. https://doi.org/10.1038/s41598-019-49260-4

BONAMI, J.-R.; COMPS, M.; VEYRUNES, J. C. Etude histopathologique et ultrastructurale de la paralysie virale du crabe *Macropipus depurator.* **Revue des travaux de l'Institut des pêches Maritimes**, 40, p. 139-146, 1976.

BONAMI, J.-R.; ZHANG, S. Viral diseases in commercially exploited crabs: A review. **Journal of Invertebrate Pathology**, 106, n. 1, p. 6-17, 2011. https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.009

BONAMI, J. R.; VAGO, C. A virus of a new type pathogenic to crustacea. **Experientia**, 27, n. 11, p. 1363-1364, 1971. https://doi.org/10.1007/BF02136742

BOWERS, H. A.; MESSICK, G. A.; HANIF, A.; JAGUS, R.; CARRION, L.; ZMORA, O.; SCHOTT, E. J. Physicochemical properties of double-stranded RNA used to discover a reo-like virus from blue crab *Callinectes sapidus*. **Diseases of Aquatic Organisms**, 93, n. 1, p. 17-29, 2010. 10.3354/dao02280

BRANCO, J. O.; VERANI, J. R. Dinâmica da alimentação natural de *Callinectes danae* Smith (Decapoda, Portunidae) na Lagoa da Conceição, Florianôpolis, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 14, n. 4, p. 1003-1018, 1997. https://doi.org/10.1590/S0101-81751997000400014

BRUSSAARD, C. P.; NOORDELOOS, A. A.; SANDAA, R. A.; HELDAL, M.; BRATBAK, G. Discovery of a dsRNA virus infecting the marine photosynthetic protist *Micromonas pusilla*. **Virology**, 319, n. 2, p. 280-291, 2004. https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.10.033

BUCHRIESER, J.; DUFLOO, J.; HUBERT, M.; MONEL, B.; PLANAS, D.; RAJAH, M. M.; PLANCHAIS, C.; PORROT, F.; GUIVEL-BENHASSINE, F.; VAN DER WERF, S.; CASARTELLI, N.; MOUQUET, H.; BRUEL, T.; SCHWARTZ, O. Syncytia formation by SARS-CoV-2-infected cells. **The EMBO Journal**, 39, n. 23, p. e106267, Dec 1 2020. 10.15252/embj.2020106267

CAPELLA-GUTIÉRREZ, S.; SILLA-MARTÍNEZ, J. M.; GABALDÓN, T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. **Bioinformatics**, 25, n. 15, p. 1972-1973, 2009. 10.1093/bioinformatics/btp348

CHEN, J. G.; YANG, J. F.; LOU, D.; JUAN, X. a. W., S.Y. . A Reo-like virus associated with high mortality rates in cultured mud crab, *Scylla serrata*, in East China. **Diseases in Asian Aquaculture VII**, p. 111-118, 2011. 10.1111/J.1365-2761.2007.00794.X

CORBEL, V.; COSTE, F.; BONAMI, J. R. CpSBV, a systemic virus of the edible crab, *Cancer pagurus* (L.). **Diseases Journal of Fish Diseases**, 26, n. 2, p. 121-126, 2003. 10.1046/j.1365-2761.2003.00430.x

DENG, X. X.; LU, L.; OU, Y. J.; SU, H. J.; LI, G.; GUO, Z. X.; ZHANG, R.; ZHENG, P. R.; HE, J. G.; WENG, S. P.; CHEN, Y. G. Sequence analysis of 12 genome segments of mud crab reovirus (MCRV). **Virology** 422, n. 2, p. 185-194, 2012. 10.1016/j.virol.2011.09.029

DUNCAN, R.; CORCORAN, J.; SHOU, J.; STOLTZ, D. Reptilian reovirus: a new fusogenic orthoreovirus species. **Virology**, 319, n. 1, p. 131-140, 2004. 10.1016/j.virol.2003.10.025

FAO. **Global Capture and Aquaculture Production (FishStat)**. Rome, Italy, 2020. Disponível em: http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hqp_5215617422254205836.xml&outtype=html. Acesso em: 27/06/2020.

FLOWERS, E. M.; BACHVAROFF, T. R.; WARG, J. V.; NEILL, J. D.; KILLIAN, M. L.; VINAGRE, A. S.; BROWN, S.; ALMEIDA, A. S.; SCHOTT, E. J. Genome sequence analysis of csRV1: a pathogenic reovirus that infects the blue crab *Callinectes sapidus* across its trans-hemispheric range. **Frontiers in Microbiology**, 7, n. e82202, 2016. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00126

FLOWERS, E. M.; JOHNSON, A. F.; AGUILAR, R.; SCHOTT, E. J. Prevalence of the pathogenic crustacean virus *Callinectes sapidus* reovirus 1 near flow-through blue crab aquaculture in Chesapeake Bay, USA. **Diseases of Aquatic Organisms**, 129, n. 2, p. 135-144, 2018. 10.3354/dao03232

FLOWERS, E. M.; SIMMONDS, K.; MESSICK, G. A.; SULLIVAN, L.; SCHOTT, E. J. PCR-based prevalence of a fatal reovirus of the blue crab, *Callinectes sapidus* (Rathbun) along the northern Atlantic coast of the USA. **Journal of Fish Diseases**, 39, n. 6, p. 705-714, 2016. 10.1111/jfd.12403

FRANKLIN, R. M. Purification and Properties of the Replicative Intermediate of the RNA Bacteriophage R17. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 55, n. 6, p. 1504-1511, 1966. 10.1073/pnas.55.6.1504

GIACCA, M.; BUSSANI, R.; SCHNEIDER, E.; ZENTILIN, L.; COLLESI, C.; ALI, H.; BRAGA, L.; SECCO, I.; VOLPE, M.; COLLIVA, A.; ZANCONATI, F.; BERLOT, G.; SILVESTRI, F.; ZACCCHIGNA, S. Persistence of viral RNA, widespread thrombosis and abnormal cellular syncytia are hallmarks of COVID-19 lung pathology. **MedRxiv**, 2020. https://doi.org/10.1101/2020.06.22.20136358

GODOY, M. G.; KIBENGE, M. J. T.; WANG, Y.; SUAREZ, R.; LEIVA, C.; VALLEJOS, F.; KIBENGE, F. S. B.; SPRINGERLINK. First description of clinical presentation of piscine orthoreovirus (PRV) infections in salmonid aquaculture in Chile and identification of a second genotype (Genotype II) of PRV. **Virology Journal**, 13, p. 98, 2016. 10.1186/s12985-016-0554-y

GUINDON, S.; DUFAYARD, J.-F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W.; GASCUEL, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, 59, n. 3, p. 307-321, 2010. 10.1093/sysbio/syq010

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, 52, n. 5, p. 696-704, 2003. 10.1080/10635150390235520

GUTERRES, A.; DE OLIVEIRA, R. C.; FERNANDES, J.; DE LEMOS, E. R. S.; GUTERRES, A.; SCHRAGO, C. G. New bunya-like viruses: Highlighting their relations. **Infection, Genetics and Evolution**, 49, p. 164-173, 2017. 10.1016/j.meegid.2017.01.019

HUNGRIA, D. B.; TAVARES, C. P. S.; PEREIRA, L. Â.; SILVA, U. A. T.; OSTRENSKY, A. Global status of production and commercialization of soft-shell crabs. **Aquaculture International** 25, n. 6, p. 2213-2226, 2017. 10.1007/s10499-017-0183-5

JAHROMI, S. S. Occurrence of Rhabdovirus-like particles in the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Journal of General Virology**, 36, n. 3, p. 485-493, 1977. https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-3-485

JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B. L.; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology Immunobiology**, 211, n. 4, p. 213-236, 2006. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.10.015

JOHNSON, P. T. A viral disease of the blue crab, *Callinectes sapidus*: Histopathology and differential diagnosis. **Journal of Invertebrate Pathology**, 29, n. 2, p. 201-209, 1977.

JOHNSON, P. T. Viral diseases of the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Marine Fisheries Review**, 40, p. 13-15, 1978.

JOHNSON, P. T. **Histology of the blue crab, *Callinectes sapidus*: a model for the Decapoda**. New York, N.Y.: Praeger, 1980. 0030567084 9780030567087

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, 30, n. 4, p. 772-780, 2013. 10.1093/molbev/mst010

KAZIMIROVA, M.; THANGAMANI, S.; HERMANCE, M.; THANGAMANI, S.; HERMANCE, M.; THANGAMANI, S.; HERMANCE, M.; BARTIKOVA, P.; HOLIKOVA, V.; STIBRANIOVA, I.; NUTTALL, P. A.; NUTTALL, P. A. Tick-borne viruses and biological processes at the tick-host-virus interface. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 7, p. 339, 2017. 10.3389/fcimb.2017.00339

KENNEDY, V. S.; CRONIN, L. E. **The Blue Crab: *Callinectes Sapidus***. College Park, Md, USA: Maryland Sea Grant College, University of Maryland, 2007.

KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. Family - Reoviridae. *In*: KING, A. M. Q.;ADAMS, M. J.;CARSTENS, E. B. e LEFKOWITZ, E. J. (Ed.). **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Elsevier, 2012. cap. Virus Taxonomy, p. 541-637.

LEFORT, V.; LONGUEVILLE, J. E.; GASCUEL, O. SMS: Smart Model Selection in PhyML. **Molecular Biology and Evolution**, 34, n. 9, p. 2422-2424, 2017. 10.1093/molbev/msx149

LI, C.-X.; SHI, M.; TIAN, J.-H.; LIN, X.-D.; KANG, Y.-J.; CHEN, L.-J.; QIN, X.-C.; XU, J.; HOLMES, E. C.; ZHANG, Y.-Z. Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. **eLife**, 4, p. e05378, 2015. 10.7554/eLife.05378

LIGHTNER, D. V.; BROCK, J. A. A lymphoma-like neoplasm arising from hematopoietic tissue in the white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda). **Journal of Invertebrate Pathology**, 49, n. 2, p. 188-193, 1987. 10.1016/0022-2011(87)90159-5

LING, J.; VERNER-CARLSSON, J.; ERIKSSON, P.; PLYUSNINA, A.; LÖHMUS, M.; JÄRHULT, J. D.; VAN DE GOOT, F.; PLYUSNIN, A.; LUNDKVIST, Å.; SIRONEN, T. Genetic analyses of Seoul hantavirus genome recovered from rats (*Rattus norvegicus*) in the Netherlands unveils diverse routes of spread into Europe. **Journal of Medical Virology**, 91, n. 5, p. 724-730, 2019. 10.1002/jmv.25390

MAES, P.; ADKINS, S.; ALKHOVSKY, S. V.; AVSIC-ZUPANC, T.; BALLINGER, M. J.; BENTE, D. A.; BEER, M.; BERGERON, E.; BLAIR, C. D.; BRIESEL, T. Taxonomy of the order *Bunyavirales*: second update 2018. **Archives of Virology**, 164, n. 3, p. 927-941, 2019. 10.1007/s00705-018-04127-3

MARI , J.; BONAMI, J. R. Les infections virales du crabe *Carcinus mediterraneus* Czerniavski, 1884. *In*: C.P. VIVARES, J. R. B. a. E. J. (Ed.). **Pathology in Marine Aquaculture**. Bredene, Belgium: European Aquaculture Society, Special Publication, 1986. v. 9, p. 283–293.

MARI, J.; BONAMI, J. R. W2 virus infection of the crustacean *Carcinus mediterraneus*: a reovirus disease. **The Journal of general virology**, 69, p. 561-571, 1988. 10.1099/0022-1317-69-3-561

MELO, G. A. S. **Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro**. São Paulo, SP, Brazil: Pleiade, FAPESP, 1996. Handbooks.

MERTENS, P. The dsRNA viruses. **Virus Research**, 101, n. 1, p. 3-13, 2004. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.12.002

MEYERS, T.; BURTON, T.; BENTZ, C.; STARKEY, N. Common diseases of wild and cultured fishes in Alaska. **Alaska Department of Fish and Game**, 2008.

MORRIS-KRSINICH, B.; HULL, R. Replication of turnip rosette virus RNA in inoculated turnip protoplasts. **Journal of General Virology**, 64, n. 12, p. 2661-2668, 1983. https://doi.org/10.1099/0022-1317-64-12-2661

PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D.; BARRACCO, M. A. Defesas Antivirais em Crustáceos: Estado da Arte. *In*: MARINGÁ (Ed.). **Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos**. Maringá - PR: Massoni, 2012. v. 1, cap. 14, p. 315-354.

RODRIGUEZ-EZPELETA, N.; TEIJEIRO, S.; FORGET, L.; BURGER, G.; LANG, B. Construction of cDNA libraries: focus on Protists and Fungi. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, 533, p. 33-47, 2009. 10.1007/978-1-60327-136-3_3

RYAZANOVA, T.; ELISEIKINA, M.; SEMENCHENKO, A. A. A new host for *Hematodinium* infection among lithodid crabs from the Sea of Okhotsk. **Journal of Invertebrate Pathology**, 153, p. 12-19, 2018. 10.1016/j.jip.2018.02.002

SAKUNA, K.; ELLIMAN, J.; TZAMOUZAKI, A.; OWENS, L. A novel virus (order Bunyavirales) from stressed redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) from farms in northern Australia. **Virus Research**, 250, p. 7-12, 2018. 10.1016/j.virusres.2018.03.012

SALSMAN, J.; TOP, D.; BOUTILIER, J.; DUNCAN, R. Extensive syncytium formation mediated by the Reovirus FAST proteins triggers apoptosis-induced membrane instability. **Journal of Virology**, 79, n. 13, p. 8090-8100, 2005. 10.1128/jvi.79.13.8090-8100.2005

SAMBROOK, J.; FRITSCH, F. E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SHEN, H.; MA, Y.; HU, Y. Near-Full-Length Genome Sequence of a Novel Reovirus from the Chinese Mitten Crab, *Eriocheir sinensis*. **Genome Announcements**, 3, n. 3, e00447-15, 2015. 10.1128/genomeA.00447-15

SHI, M.; LIN, X.-D.; TIAN, J.-H.; CHEN, L.-J.; CHEN, X.; LI, C.-X.; QIN, X.-C.; LI, J.; CAO, J.-P.; EDEN, J.-S.; BUCHMANN, J.; WANG, W.; XU, J.; HOLMES, E. C.; ZHANG, Y.-Z. Redefining the invertebrate RNA virosphere. **Nature**, 540, n. 7634, p. 539-543, 2016. 10.1038/nature20167

SHIELDS, J. D.; OVERSTREET, R. M. Diseases, Parasites and Other Symbionts. *In*: KENNEDY, V. S., L.E. Cronin (eds.) (Ed.). **The blue crab *Callinectes sapidus***. Maryland Sea Grant College, College Park, Maryland,, 2007. cap. 8, p. 299-417.

SHIELDS, J. D.; WILLIAMS, J. D.; BOYKO, C. B. Parasites and diseases of Brachyura. *In*: PETER CASTRO;PETER DAVIE;DANIÈLE GUINOT;SCHRAM, F. e KLEIN, C. v. V. (Ed.). **Treatise on Zoology - Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea**. The Netherlands: Brill, 2015. v. Volume 9 Part C, p. 639-774.

SPITZNAGEL, M. I.; SMALL, H. J.; LIVELY, J. A.; SHIELDS, J. D.; SCHOTT, E. J. Investigating risk factors for mortality and reovirus infection in aquaculture production of soft-shell blue crabs (*Callinectes sapidus*). **Aquaculture**, 502, p. 289-295, 2019. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.051

TANG, K. F. J.; MESSICK, G. A.; PANTOJA, C. R.; REDMAN, R. M.; LIGHTNER, D. V. Histopathological characterization and in situ detection of *Callinectes sapidus* reovirus. **Journal of Invertebrate Pathology**, 108, n. 3, p. 226-228, 2011. https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.08.010

TAVARES, C. P. S.; SILVA, U. A. T.; PEREIRA, L. A.; OSTRENSKY, A. Systems and techniques used in the culture of soft-shell swimming crabs. **Reviews in Aquaculture**, 10, n. 4, p. 913-923, 2018. 10.1111/raq.12207

VOGT, G. How to minimize formation and growth of tumours: Potential benefits of decapod crustaceans for cancer research. **International Journal of Cancer**, 123, n. 12, p. 2727-2734, 2008. https://doi.org/10.1002/ijc.23947

WENG, S.-P.; GUO, Z.-X.; SUN, J.-J.; CHAN, S.-M.; HE, J.-G. A reovirus disease in cultured mud crab, *Scylla serrata*, in southern China. **Journal of Fish Diseases**, 30, n. 3, p. 133-139, 2007. 10.1111/j.1365-2761.2007.00794.x

XU, Z.; SHI, L.; WANG, Y.; ZHANG, J.; HUANG, L.; ZHANG, C.; LIU, S.; ZHAO, P.; LIU, H.; ZHU, L.; TAI, Y.; BAI, C.; GAO, T.; SONG, J.; XIA, P.; DONG, J.; ZHAO, J.; WANG, F.-S. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **Lancet, Respiratory Medicine**, 8, n. 4, p. 420-422, 2020. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30076-X

YADAV, P. D.; NYAYANIT, D. A.; SHETE, A. M.; JAIN, S.; MAJUMDAR, T. P.; CHAUBAL, G. Y.; SHIL, P.; KORE, P. M.; MOURYA, D. T. Complete genome sequencing of Kaisodi virus isolated from ticks in India belonging to *Phlebovirus* genus, family *Phenuiviridae*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 10, n. 1, p. 23-33, 2019. 10.1016/j.ttbdis.2018.08.012

ZHANG, S.; SHI, Z.; ZHANG, J.; BONAMI, J. R. Purification and characterization of a new reovirus from the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. **Journal of Fish Diseases**, 27, n. 12, p. 687-692, 2004.

ZHAO, M.; FLOWERS, E. M.; SCHOTT, E. J. Near-complete sequence of a highly divergent reovirus genome recovered from *Callinectes sapidus*. **Microbiology Resource Announcements**, 10, n. 1, p. e01278-01220, 2021. 10.1128/mra.01278-20

ZHAO, M.; TAVARES, C. P. d. S.; SCHOTT, E. J. Diversity and classification of reoviruses in crustaceans: A proposal. **Journal of Invertebrate Pathology**, p. 107568, 2021. https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107568

Pergunta 4

Infecções experimentais de CsRV2 causam mortalidade em *Callinectes danae* em laboratório?

CAPÍTULO IV - PATOGENICIDADE DE CsRV2 E CdPBV1 EM *Callinectes danae*: UMA PREOCUPAÇÃO IMINENTE PARA A PRODUÇÃO DE SIRI-MOLE NO BRASIL[1]

Camila Prestes dos Santos Tavares[1,2], Giorgi Dal Pont[1,3], Paula Valeska Stica[1], Ubiratan de Assis Teixeira da Silva[1], Gisela Geraldine Castilho Westphal[1], Eric J Schott[4] e Antonio Ostrensky[1]

[1]Programa de Pós-graduação em Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Departamento de Zoologia, Curitiba, Paraná, Brasil. CEP: 80035-050. Telefone: +55 41 33505634. E-mail: camilatavares@ufpr.br

[2]Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), Universidade Federal do Paraná, Departamento de Zootecnia, Curitiba, Paraná, Brasil. CEP: 80035-050.

[3]Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil. CEP: 80035-050.

[4]Institute of Marine and Environmental Technology, University of Maryland Center for Environmental Science, Baltimore, MD 21202, USA.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a patogenicidade de CsRV2 em *Callinectes danae*, bem como os efeitos da infecção sobre os parâmetros metabólicos, imunológicos e comportamentais do hospedeiro. Para isso, os exemplares de *C. danae* negativos para CsRV2 conforme análise por RT-qPCR foram distribuídos em dois grupos experimentais. Um grupo recebeu injeção de um inóculo de CsRV2 (n=10) e o outro recebeu uma injeção intramuscular de solução salina (n=15). Após 14 dias de experimento, todos os siris que receberam a injeção de CsRV2 testaram positivos para CsRV2. No entanto, constatou-se que 11 siris do grupo controle também testaram positivos e passaram a ser considerados como um grupo experimental adicional. A mortalidade cumulativa no grupo desafiado com CsRV2 atingiu 70% após 14 dias. Já no grupo controle que foi contaminado com CsRV2 durante o experimento foi registrada somente uma morte (9%). No grupo controle negativo (animais do grupo controle que se mantiveram negativados durante todo o experimento) nenhuma morte foi registrada. Ao final do experimento usando testes de RT-PCR, detectou-se a presença de *C. danae* Portunibunyavirus 1 (CdPBV1) nos siris que receberam o inóculo de CsRV2, o que explicou a alta taxa de mortalidade registrada no grupo desafiado. O fluxo de amônia nos siris não foi afetado significativamente ($p>0,05$) pela infecção viral. Por outro lado, o consumo de oxigênio foi afetado ($p<0,05$) pela infecção por CsRV2 e pela coinfecção por CsRV2 e CdPBV1 em comparação com o grupo controle negativo, sugerindo que houve um maior gasto energético metabólico na tentativa de combater a

[1]Artigo elaborado para submissão ao Journal of Invertebrate Pathology - ISSN: 0022-2011

infecção viral. Também foi observado um aumento da proporção de comprometimento reflexo dos siris infectados por CsRV2 e CdPBV1 em comparação com o grupo controle, como provável consequência da exaustão fisiológica. Além disso, foi observada uma tendência na redução do número de granulócitos nos siris infectados por CsRV2 e CdPBV1 em comparação com o grupo controle. Os dados gerados evidenciam que CsRV2 é patogênico para *C. danae*, mas que a coinfecção de *C. danae* por CsRV2 e CdPBV1 exacerba as alterações metabólicas, comportamentais e imunológicas, aumentando a mortalidade dos organismos infectados.

Palavras-chave: Reovírus; Bunyavírus; Portunidae; Mortalidade; $\dot{M}O_2$

1. INTRODUÇÃO

Os siris pertencentes ao gênero *Callinectes* spp. estão amplamente distribuídos nas regiões neotropicais e subtropicais, desde o Atlântico Norte, na costa dos Estados Unidos, até o sul da América, na costa do Uruguai (MELO, 1996; WILLIAMS, 1974). Em toda essa faixa continental, os siris-azuis são considerados importantes recursos pesqueiros, tendo gerado cerca de 1 milhão de toneladas capturadas entre 2010 e 2019 (FAO, 2020). Além disso, os siris são conhecidos por seu grande potencial econômico para a aquicultura (TOBIAS-QUINITIO; LIBUNAO; PARADO-ESTEPA; CALPE, 2015). O cultivo de siri-mole é uma das formas mais lucrativas de agregar valor à pesca do siri e um componente efetivo da indústria global de frutos-do-mar, além de ser uma importante fonte de emprego e renda em diversos países, como nos Estados Unidos e em vários países da Ásia (FERDOUSHI; XIANG; HASAN, 2010; HUNGRIA; TAVARES; PEREIRA; SILVA *et al.*, 2017; KENNEDY; CRONIN, 2007; TAVARES; SILVA; PEREIRA; OSTRENSKY, 2018).

Ao longo da costa brasileira, *Callinectes danae* (Smith, 1869) apresenta grande importância ecológica, social e econômica como espécie explorada pela pesca (BRANCO; MASUNARI, 2000; BRANCO; VERANI, 1997; CHACUR; NEGREIROS-FRANSOZO, 2001; COSTA; NEGREIROS-FRANSOZO, 1998; JOYEUX; NALESSO; SFORZA, 2010). Mais recentemente, a espécie também tem sido explorada pela nascente indústria de produção de siri-mole, principalmente pela abundância de animais provenientes da pesca e da simplicidade das técnicas de cultivo (HUNGRIA; TAVARES; PEREIRA; SILVA *et al.*, 2017;

TAVARES; SILVA; PEREIRA; OSTRENSKY, 2018). No entanto, um dos principais fatores que limitam a indústria de siri-mole é a alta taxa de mortalidade geralmente registradas nas instalações de cultivo, que podem chegar e superar o patamar de 50% dos organismos estocados, o que compromete a viabilidade financeira dos empreendimentos (CHAVES; EGGLESTON, 2003; SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.*, 2019). Apesar do grande potencial econômico do cultivo de *C. danae* como siri-mole no Brasil, poucos estudos se dedicam a elucidar as causas da mortalidade desta espécie em cultivo.

Em estudos anteriores, que tiveram como objetivo identificar as características biológicas de *C. danae* para a produção de siri-mole no Brasil, OSTRENSKY; VENTURA; CORRÊA; SANTOS *et al.* (2015) relataram uma taxa de mortalidade de 37,5% em um sistema de fluxo contínuo em condições laboratoriais, porém as causas da mortalidade não puderam ser determinadas. Mais recentemente, durante um episódio de mortalidade (48,9%) de *C. danae* mantidos em sistema de recirculação, na região Sul do Brasil, a presença de um novo vírus foi detectada e esse vírus recebeu provisoriamente a denominação de *Callinectes sapidus* reovirus 2 (CsRV2) (Tavares et al., no prelo). A primeira descrição da presença do CsRV2 foi realizada em siris coletados próximos ao município de Tramandaí - Rio Grande do Sul, no extremo sul do Brasil (ZHAO; FLOWERS; SCHOTT, 2021). Na ocasião, foi relatada a presença do genoma de dupla fita de RNA do vírus em extratos de RNA de *C. sapidus*. Mais recentemente, o reovírus foi sequenciado utilizando abordagem metagenômica, o que permitiu a descoberta de um genoma semelhante à bunyavírus provisoriamente nominado como *Callinectes danae* Portunibunyavirus 1 (CdPBV1) coinfectando *C. danae* (TAVARES *et al.*, no prelo).

O CsRV2 é um reovírus com genoma de 12 segmentos de RNA de fita dupla (dsRNA), com partículas virais de simetria icosaédrica de aproximadamente 60 nm de diâmetro (TAVARES *et al.*, no prelo; ZHAO; FLOWERS; SCHOTT, 2021). Durante a infeção, o vírus forma matrizes paracristalinas no citoplasma dos hemócitos e células do

tecido conjuntivo, principalmente nas brânquias e hepatopâncreas (TAVARES *et al.*, no prelo). Já o CdPBV1 é um vírus semelhante à bunyavírus, com genoma tripartido, incluindo segmentos de RNA de fita simples grande (6.654 nt), médio (3.120 nt) e pequeno (1.656 nt), que mostram maior identidade com *Carcinus maenas* Portunibunyavirus 1, membro da família *Cruliviridae* (BOJKO; SUBRAMANIAM; WALTZEK; STENTIFORD *et al.*, 2019). Em exemplares de *C. danae* infectados por CsRV2 foram descritas alterações histológicas branquiais como inclusão intracitoplasmática, infiltração de hemócitos, formação de granulomas e sincícios (TAVARES *et al.*, no prelo). Além disso, a infecção por CsRV2 foi associada a alterações fisiológicas e comportamentais significativas em *C. danae*, como a redução de reservas de substrato energético no hepatopâncreas e perda da ação reflexa em animais infectados, indicando que o CsRV2 poderia alterar o estado fisiológico dos animais e, consequentemente, a saúde dos siris, tanto no ambiente natural como em cativeiro (TAVARES *et al.*, no prelo). No entanto, mesmo com a descoberta e descrição do CsRV2 em *C. danae*, a sua patogenicidade para o hospedeiro ainda não foi completamente compreendida.

Nos crustáceos o tecido branquial é multifuncional e responsável por vários processos fisiológicos, incluindo o transporte e regulação iônica (TOWLE; BURNETT, 2007); excreção de produtos residuais nitrogenados (HENRY; LUCU; ONKEN; WEIHRAUCH, 2012); trocas gasosas (BURNETT; MCMAHON, 1985; MANGUM; MCMAHON; DEFUR; WHEATLY, 1985; WEIHRAUCH; MORRIS; TOWLE, 2004; WEIHRAUCH; ZIEGLER; SIEBERS; TOWLE, 2001); além de desempenharem um papel importante na resposta imunológica contra patógenos (BURGENTS; BURNETT; STABB; BURNETT, 2005; JOHNSON, 1976; MARTIN; QUINTERO; QUIGLEY; KHOSROVIAN, 2000; WHITE; RATCLIFFE; ROSSA, 2009). O consumo de oxigênio ($\dot{M}O_2$) e a excreção de amônia têm sido utilizados como bons biomarcadores para avaliar o metabolismo dos crustáceos, pois possibilitam estimar a atividade metabólica de um animal submetido a

diferentes fatores estressantes, incluindo os casos de infecções virais (CLAYBROOK, 1983; FREIRE; SAMPAIO, 2021; ROSAS; MARTINEZ; GAXIOLA; BRITO *et al.*, 1999; ROSAS; VANEGAS; ALCARAZ; DÍAZ, 1991; VILLARREAL; HINOJOSA; NARANJO, 1994; WEIHRAUCH; FEHSENFELD; QUIJADA-RODRIGUEZ, 2017). Além destes, o acompanhamento de parâmetros imunológicos durante o cultivo também pode funcionar como um indicador do estado de saúde de crustáceos em resposta à ação de patógenos (BARRACCO, 2004). Entre os parâmetros imunológicos, a contagem total e diferencial de hemócitos (THC) na hemolinfa é um dos parâmetros mais afetados por condições de estresse ambiental ou por infecções virais (PERAZZOLO; ROSA; BARRACCO, 2012; SHIELDS; OVERSTREET, 2003).

O objetivo inicial do presente estudo era avaliar, *in vivo*, a patogenicidade de CsRV2 em *C. danae*, bem como os efeitos da infecção sobre indicadores de atividade metabólica (taxas de consumo de O_2 e excreção de amônia), imunológicos (contagem total e diferencial de hemócitos) e comportamentais (teste de preditor de mortalidade por ação reflexa, RAMP) no hospedeiro após infecção experimental via injeção intramuscular. Porém, no decorrer do estudo, também foi detectada a presença de CdPBV1 nos animais que foram desafiados com CsRV2, o que proporcionou uma compreensão mais abrangente dos efeitos da coinfecção por CsRV2 e CdPBV1.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. COLETA, TRANSPORTE E ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS

A Figura 18 mostra o fluxograma das etapas de coleta, transporte, seleção dos animais, tratamentos experimentais e análises realizadas durante o experimento. Exemplares machos de *C. danae* (n=44), com largura de carapaça de 55 a 70 mm foram obtidos por pescadores artesanais na Vila de São Miguel (25°25'48"S/48°27'12"W), localizada na baía de Paranaguá, município de Paranaguá, Paraná, Brasil. Os siris foram capturados utilizando armadilhas iscadas, confeccionadas com metal e cobertas por uma

rede com abertura de 20 mm entre nós. Imediatamente após a coleta, os siris vivos foram acondicionados individualmente em garrafas PET vazias e protegidos com tecido de fibra de juta umedecido com água do próprio local da captura. Nessas condições os animais foram transportados até o Laboratório de Pesquisa com Organismos Aquáticos (LAPOA) do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), da Universidade Federal do Paraná (UFPR), localizado em Curitiba, Paraná (25°24'47.5"S/49°14'52.6"W).

No laboratório, os siris foram identificados até o nível específico, com base no manual de identificação elaborado por MELO (1996). De cada exemplar, foi mensurada a largura da carapaça (distância entre a base dos espinhos laterais), com o auxílio de um paquímetro manual (Vonder, Brasil), e aferido o peso, com o auxílio de uma balança digital de precisão (Marte AL 500c - 0,001g, Brasil). Os siris foram colocados individualmente em aquários de vidro, preenchidos com 7 L de água marinha artificial (25 ups) e submetidos à aeração artificial. Nestes aquários, os animais foram mantidos durante três dias, a título de aclimatação às condições laboratoriais. Para garantir que os siris estivessem livres de CsRV2 antes da infecção experimental, um dos pereiópodos de cada animal foi coletado para extração de RNA, como descrito na seção 2.4.

2.2. PREPARAÇÃO DO INÓCULO DE CSRV2

Um exemplar de *C. danae* comprovadamente infectado com CsRV2 foi utilizado para a preparação do inóculo viral. A presença do reovírus foi confirmada após a visualização das bandas de dsRNA do extrato de RNA em gel de agarose. Para a preparação do inóculo, uma amostra contendo 218,8 mg de tecido muscular foi homogeneizada em 6 mL de água marinha artificial (Blue Treasure, China), na salinidade de 15 ups, usando um homogeneizador ultrassônico (Eco-Sonics, QR500, Brasil). Após centrifugação (1500 *g* por 5 min. a 4ºC) do homogenado, o sobrenadante foi filtrado (0,45 µm) e mantido a -80ºC até utilização. O número de cópias de CsRV2 no filtrado foi quantificado por RT-qPCR, como descrito na seção 2.5.

2.3. TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS

Somente os animais que testaram negativo para CsRV2 (n=25) foram utilizados no experimento. Duas salas experimentais independentes, mantidas sob temperatura (24 ± 1°C) e fotoperíodo controlados (12:12 horas de claro e escuro) foram utilizadas para a manutenção dos tratamentos controle e infectado. Os siris do grupo controle (n=15) foram injetados com 40 µL de solução salina estéril (15 ups). Já nos animais do tratamento infectado (n=10) foram injetados 40 µL de solução homogeneizada de CsRV2, representando cerca de 1,5 mg de tecido infectado. Em ambos os tratamentos, as injeções intramusculares foram precedidas pela antissepsia do local com etanol 70% e realizadas na base do quinto pereiópodo, utilizando seringas do tipo insulina. Os animais do grupo controle e os desafiados com CsRV2 foram separados em duas salas para evitar contaminação cruzada entre os grupos, além disso o compartilhamento de utensílios entre as salas foi evitado. Adotando-se todas as medidas de boas práticas de laboratório e biossegurança para a manipulação de patógenos classificados como agentes de risco biológico classe II.

Os animais foram monitorados diariamente ao longo de 14 dias. Imediatamente após a identificação de animais mortos, era realizado o registro do animal e a coleta de tecidos, de acordo com a metodologia descrita na seção 0. A cada 12 horas, a água das unidades experimentais era renovada (100%) com água previamente tratada com solução de hipoclorito de sódio a 12% (5 ppm), neutralizada com solução de tiossulfato de sódio e reconstituída com sal artificial a 25 ups (Blue Treasure, China). Diariamente foi realizada a mensuração dos seguintes parâmetros físicos e químicos da água: salinidade [refratômetro óptico (Instrutemp, Brasil)]; pH [pHmetro digital (Horiba, Japão)]; temperatura (°C), oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) e saturação de oxigênio (%) [oxímetro digital (YSI, 550A, EUA)]; e concentração de nitrogênio na forma de amônia total (mg L^{-1} de N-AT). A concentração de N-AT foi determinada colorimetricamente de acordo com a metodologia de indofenol

descrita por VERDOUW; VAN ECHTELD e DEKKERS (1978), mediante leitura das amostras em 595 nm (SpectraMax 340PC, Molecular Devices®, EUA). Além disso, antes da primeira troca de água diária nos dias 4, 8 e 12, cerca de 180 mL foi filtrado (membrana de nitrato celulose de 0,45 µm) para detectar e quantificar a presença de CsRV2 na água de cultivo por RT-qPCR, como descrito na seção 2.5.

Todos os siris foram alimentados a cada quatro dias com carne de peixe (*Oreochromis niloticus*) na proporção equivalente a 4% do seu peso vivo. Uma hora após a oferta do alimento, os resíduos eram coletados e pesados e o valor utilizado para estimativa da taxa de ingestão de alimentos (em %), calculada pela diferença do peso (g) do alimento ofertado e o alimento residual, dividido pelo peso (g) ofertado e multiplicado por 100. Após quatorze dias de experimento ou assim que era constatada a morte, um dos pereiópodos de cada animal era coletado e imediatamente armazenado a -80°C para posterior análise molecular para confirmação da presença de CsRV2.

2.4. EXTRAÇÃO DE RNA

Todas as superfícies de manuseio eram previamente desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio a 10% para evitar possíveis contaminações. Os pereiópodos foram dissecados com material cirúrgico estéril. Fragmentos de 25 a 100 mg de músculo foram excisados de um pereiópodo e homogeneizados em 1,0 mL de solução ácida de extração, contendo tiocianato de guanidínio, acetato de sódio, fenol e clorofórmio, elaborada conforme o protocolo de preparação da solução descrito por RODRIGUEZ-EZPELETA; TEIJEIRO; FORGET; BURGER *et al.* (2009). A extração do RNA foi realizada seguindo o protocolo proposto por SPITZNAGEL; SMALL; LIVELY; SHIELDS *et al.* (2019). Os fragmentos de RNA resultantes foram dissolvidos em EDTA 1 mM para diminuir a degradação do RNA e armazenadas a -20°C. As amostras de controle negativo (tecido muscular de *Oreochromis niloticus*) foram extraídas antes e depois dos conjuntos de amostras dos siris testados, para monitorar a ocorrência de contaminação cruzada e

garantir controle de qualidade ao processo de análise molecular. A pureza e concentração do RNA foram avaliadas por fluorimetria Qubit® 4.0 (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA), seguindo as recomendações do fabricante.

2.5. DESENHO DE PRIMERS E ENSAIO RT-qPCR PARA CsRV2

Os conjuntos de primers para o ensaio de RT-qPCR (do inglês *Reverse Transcriptase Quantitative PCR*) foram projetados com base na sequência do gene RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) do primeiro segmento do genoma de CsRV2, com o auxílio da ferramenta computacional Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi). A validação dos primers selecionados incluiu uma avaliação da fluorescência em controles negativos e a presença de produtos secundários por RT-PCR end-point, conforme indicado por temperaturas de melting anômalas e tamanho do amplicon previsto e produzido em gel de agarose (2%).

O par de primer escolhido foi projetado para amplificar uma região de 97 bp do segmento 1 do genoma de 3,6 kb: forward primer (5'-AGGATGAGCCAAATGTTGAAGTCC-3'); reverse primer (5'-GGGTTGCACTTCTTCCCAAACC-3'). Para preparar os padrões de dsRNA para RT-qPCR, o RNA total foi extraído do músculo de um siri infectado com CsRV2. Em seguida, o dsRNA foi enriquecido com pó de celulose e precipitado com etanol (BOWERS; MESSICK; HANIF; JAGUS *et al.*, 2010). A eletroforese em gel de agarose foi usada para confirmar a pureza e integridade dos segmentos genômicos do dsRNA. A quantificação espectrofotométrica do dsRNA (Qubit® 4.0, Thermo Fisher Scientific, USA) foi usada para calcular o número de cópias do genoma (cópias μL^{-1}) com base no tamanho do genoma estimado de 20,9 Kb, conforme metodologia de MIJATOVIC-RUSTEMPASIC; TAM; KERIN; LEWIS *et al.* (2013). Os padrões de dsRNA para RT-qPCR foram preparados a partir de diluições, utilizando água ultrapura, em série (log_{10}) do dsRNA viral, variando de $2{,}02 \times 10^8$ cópias μL^{-1} a $2{,}02 \times 10^5$ cópias μL^{-1}.

Antes da transcrição reversa, uma etapa de fusão e anelamento de dsRNA para os primers e o template foi introduzida para melhorar a sensibilidade e diminuir a fluorescência de fundo. Os extratos de RNA total, controle negativo e os padrões de dsRNA foram combinados com um volume igual de mistura de primer, que continha o primer forward e o reverse (3,33 µM), todos executados em triplicata. O template com os primers foram aquecidos a 95°C durante 5 min. e rapidamente resfriados a 4°C. Dois microlitros da mistura de primer e template foram usados na reação de 10 µL de RT-qPCR. A reação de RT-qPCR incluiu uma etapa com 2x SYBR Green RT-PCR Master Mix, QN SYBR Green RT-Mix (QuantiNova™ SYBR Green RT-PCR Kit, Qiagen) e 0,5 µM de cada primer. A transcrição reversa e amplificação foram conduzidas em um sistema de PCR em tempo real no Rotor-Gene Q (Qiagen, Alemanha) com as seguintes condições: 10 min. a 50°C (transcrição reversa), seguido por 2 min. a 95°C (inativação da transcriptase reversa e desnaturação do template). A amplificação foi alcançada por 40 ciclos de 5 segundos a 95°C (desnaturação), seguido por 10 segundos a 60°C (anelamento e alongamento).

2.6. RT-PCR END-POINT PARA DETECÇÃO DE CdPBV1

Para a detecção da presença de CdPBV1 nos siris dos grupos controle e desafiado com CsRV2 após 14 dias de experimento, um conjunto de primers para o ensaio de RT-PCR end-point foi projetado, com base na sequência do gene RdRp, para amplificar uma região de 127 bp do segmento 1 do genoma de 6,5 kb: forward primer (5'-CAGTCAGCACCGAGATTCATTTGG-3'); reverse primer (5'-GTACATCATGCCGTTGTTTGTTTCC-3'). A reação de RT-PCR incluiu uma etapa com 2x SYBR Green PCR Master Mix (QuantiNova™ SYBR Green PCR Kit, Qiagen), QN SYBR Green RT-Mix (QuantiNova™ SYBR Green RT-PCR Kit, Qiagen), 0,5 µM de cada primer e o extrato de RNA total (volume de 1,5 µL para reações de 10 µL). A transcrição reversa e a amplificação foram conduzidas em um sistema de PCR em tempo real no Rotor-Gene Q (Qiagen, Alemanha) seguindo as mesmas condições citadas na seção 2.5. O produto da

PCR (3 µL) foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% (solução tampão TBE 0,5X) e visualizado por coloração GelRed™ (Biotium, CA, USA), para a confirmação do tamanho do amplicon previsto. Para cada amostra aplicada, utilizou-se 1 µL de corante BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X) (Thermo Fisher Scientific, USA). No caso do ladder, utilizou-se 1,3 mL de marcador de peso molecular 100 bp (TrackIt™ 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, USA).

2.7. FLUXO DE AMÔNIA TOTAL

Um dos parâmetros utilizados como indicativo de atividade metabólica dos animais foi sua taxa de excreção de amônia. No quarto dia de experimento, antes e após a realização do manejo alimentar, amostras de água (2 mL) foram coletadas a cada duas horas, durante oito horas, para determinação da concentração de amônia total. Os tubos vedados e identificados foram armazenados (−20°C) até a realização da análise. A concentração de amônia total (mg de N-AT L^{-1}) foi realizada de acordo com a metodologia de indofenol descrita por VERDOUW; VAN ECHTELD e DEKKERS (1978), com leitura das amostras em 595 nm (SpectraMax 340PC, Molecular Devices®, EUA). As taxas de fluxo de amônia-N (J_{amm} [µmol N kg h^{-1}]) foram calculadas de acordo com DAL PONT; SOUZA-BASTOS; GIACOMIN; DOLATTO *et al.* (2019), usando a equação (1) apresentada a seguir:

(1) $$J_{amm} = \frac{(amm_{inicial} - amm_{final}) \cdot V}{W \cdot T}$$

Onde $amm_{inicial}$ representa a concentração inicial de amônia (µmol L^{-1}) e amm_{final} a concentração final de amônia (µmol L^{-1}), V é o volume de água experimental (L), W é o peso do animal (kg) e T é a duração do período de fluxo (h).

2.8. TAXA DE CONSUMO DE OXIGÊNIO ($\dot{M}O_2$)

Ao final do período experimental foi realizado um experimento com os animais sobreviventes (controle negativo n=4, controle infectado por CsRV2 n=10 e tratamento n=3) para avaliar a $\dot{M}O_2$. Para isso, os siris foram cuidadosamente acondicionados em frascos de vidro (volume de 830 mL) cobertos com material plástico de cor preta, para evitar contato

visual dos animais com o meio externo, e preenchidos até a tampa com água salgada (25 ups) saturada com oxigênios dissolvido (O_2). A pressão parcial inicial de oxigênio (PO_2) foi medida usando um medidor de oxigênio portátil e uma sonda (YSI, 550A, EUA). Em seguida, a tampa do recipiente foi selada com látex de borracha (127mm × 127mm - K-Dent®, Sanctuary Health SDN, Malásia) para evitar a difusão de O_2 do ar atmosférico para a água. A PO_2 inicial (média ± DP) foi de 174,5 ± 4,0 Torr. Os siris foram mantidos nessa condição por 35 minutos. Ao final deste período, uma medição final da PO_2 foi realizada. As concentrações de O_2 (μmol O_2 L^{-1}) na água foram obtidas convertendo os valores de PO_2 usando as constantes de solubilidade descritas por BOUTILIER; HEMING e IWAMA (1984). A taxa de consumo de oxigênio ($\dot{M}O_2$ [μmol O_2 kg h^{-1}]) foi calculada de acordo com DAL PONT; SOUZA-BASTOS; GIACOMIN; DOLATTO *et al.* (2019), usando a equação (2) apresentada a seguir:

(2) $$\boldsymbol{MO_2 = \frac{(O_{2inicial} - O_{2final}) \cdot V}{W \cdot T}}$$

O $O_{2inicial}$ e O_{2final} representam as concentrações de oxigênio na água (μmol L^{-1}) no início e no final do experimento, respectivamente. V é o volume de água experimental (L), W é o peso do animal (kg) e T é a duração do período de fluxo (h).

2.9. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Para avaliar se a infecção viral de CsRV2 causou alterações comportamentais detectáveis em *C. danae*, nos dias 0, 7 e 14 do experimento as respostas comportamentais de todos os siris foram analisadas usando o teste RAMP (Preditor de Mortalidade por Ação Reflexa). Este teste envolveu a análise dos seis reflexos motores previstos na metodologia desenvolvida por STONER (2012) e validada por TAVARES *et al.* (no prelo) para *C. danae*. A partir dos resultados obtidos, foi criado um índice com pontuação variando de 0 (nenhum reflexo perdido) a 6 (todos os reflexos ausentes). A proporção de comprometimento reflexo foi calculada por meio da soma da pontuação dos reflexos para cada animal e divisão desse

valor pelo número total de reflexos observados. Os valores obtidos foram utilizados para a análise estatística e correlacionados com a presença/ausência do vírus.

2.10. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HEMÓCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Ao final do período experimental, a hemolinfa (~1 mL) foi coletada dos siris sobreviventes (controle negativo n=4, controle infectado por CsRV2 n=10 e tratamento n=3) para avaliar a contagem total de hemócitos (THC). A coleta foi feita por meio de uma seringa de insulina contendo 10 µL de citrato de sódio (10%) como anticoagulante e imediatamente analisada usando um citômetro de fluxo Cytoflex® (Beckman Coulter, Califórnia, EUA). Os hemócitos foram contados e analisados com base em seus tamanhos (dispersão direta; FSC) e granularidade celular (dispersão lateral; SSC), de acordo com a metodologia de CHUNG; PITULA; SCHOTT; ALVAREZ *et al.* (2015). Os dados de contagem total de hemócitos (THC) são apresentados como THC/mL hemolinfa (n), onde n é o número de animais.

2.11. ANÁLISE DE DADOS

A sobrevivência dos siris foi analisada com a aplicação das curvas de Kaplan-Meier e comparadas através dos métodos Mantel-Cox, Breslow e Tarone-Ware (software IBM SPSS® Statistical Package for Social Sciences, versão 22). Os dados de $\dot{M}O_2$, fluxo de amônia total (Jamm), teste de reflexo de RAMP, THC e de carga viral foram previamente submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnoff, seguido pelo teste de homogeneidade das variâncias de Chochan C., Hartley & Bartlett e pelo teste de homoscedasticidade. Os dados paramétricos foram analisados através de ANOVA One-way, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Os dados não paramétricos foram analisados através dos testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Em todas as análises, realizadas utilizando-se o software Statsoft Statistica®, versão 10, foi considerando um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

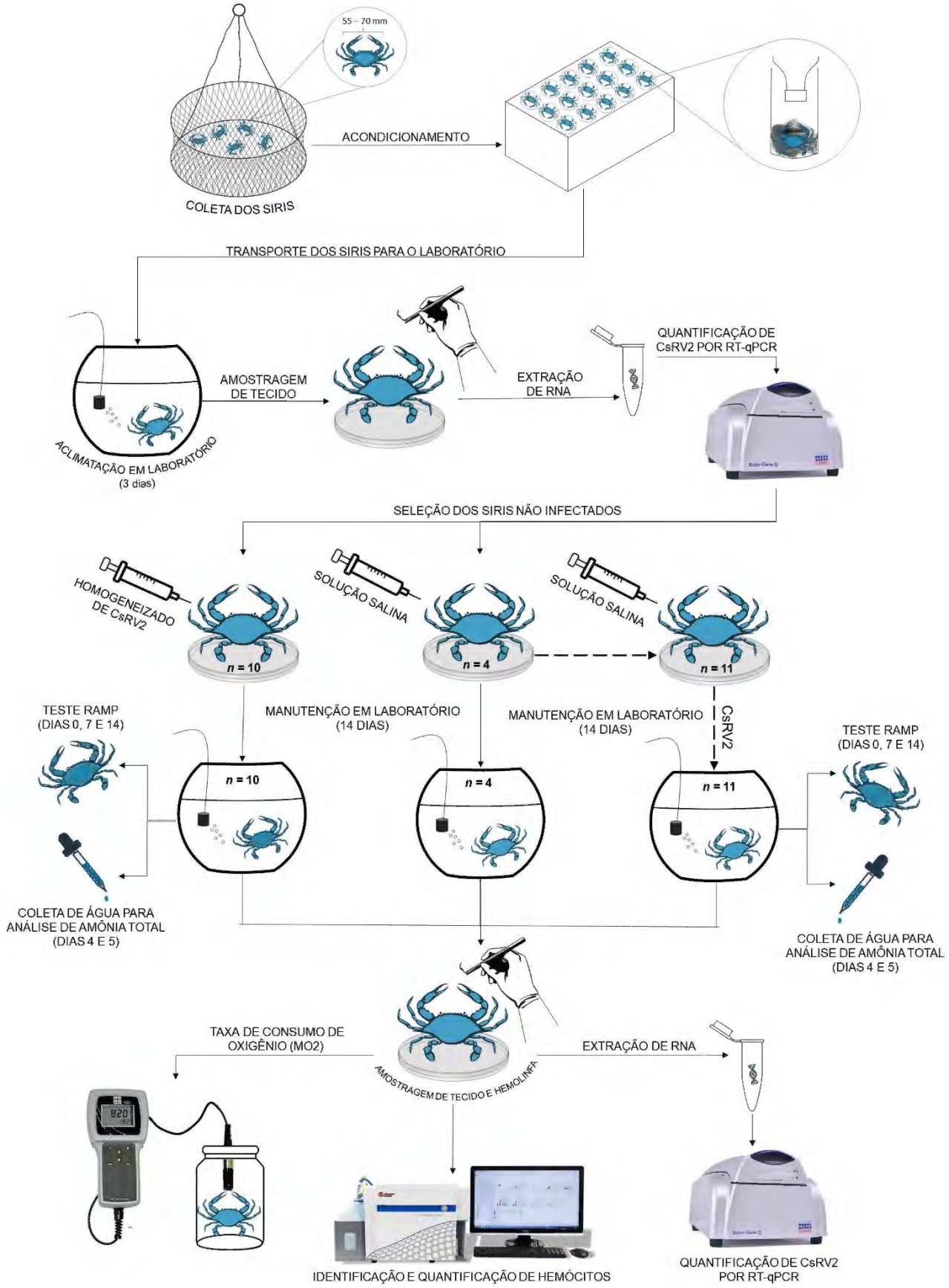


Figura 18. Fluxograma esquemático das etapas do experimento de infecção experimental de CsRV2 em *Callinectes danae* em condições de laboratório. As setas tracejadas indicam o grupo experimental adicional, os siris que receberam injeção de solução salina, mas que se infectaram com CsRV2 durante o período experimental.

3. RESULTADOS

3.1. QUANTIFICAÇÃO DE CsRV2 POR RT-qPCR

No processo de validação dos primers, a análise da curva de melting para os produtos de PCR produzidos a partir de dsRNA indicaram, de forma consiste, temperaturas de melting entre 81,9 e 82,5°C. Ao analisar o gel de agarose após o ensaio de RT-qPCR usando os primers de CsRV2, o produto esperado de 97 bp era obtido. Já, para o controle negativo para CsRV2 (água ultrapura) os primers não produziram produtos.

O RNA total do músculo de *C. danae* foi analisado antes e depois da infecção experimental usando o ensaio RT-qPCR para CsRV2. As curvas de calibração usualmente apresentavam uma inclinação próxima a -3,4258 e coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,985 entre a cópia do genoma e o ciclo do limiar (Ct), revelando uma eficiência de amplificação de 96% e mostrando-se confiável para a detecção do reovírus CsRV2. Com base na curva padrão e no valor Ct, a carga viral do inóculo de CsRV2 usado para a infecção dos siris foi calculada como 2,2 x 10^6 cópias μL^{-1}.

A prevalência natural de CsRV2 nos siris (n=44) antes da infecção experimental foi de 15,9%, com carga viral variando de 2,47 x 10^5 a 8,69 x 10^6 cópias por mg de tecido muscular. Todos os siris selecionados para o experimento apresentaram resultados negativos para CsRV2. Após a infecção experimental via injeção intramuscular de CsRV2, os animais apresentaram carga viral variando de 4,39 x 10^6 a 2,81 x 10^8 cópias por mg de tecido muscular (Tabela 13). Surpreendentemente, mesmo com a manutenção dos siris do grupo controle negativo em sala completamente separada para evitar a contaminação cruzada entre os grupos, no final do experimento 11 siris do grupo controle também testaram positivo para CsRV2. Além disso, não houve diferença estatística ($p>0,05$) na carga viral média dos animais do grupo controle que acabaram sendo contaminados durante a condução do experimento quando comparados com os siris que receberam injeção intramuscular de CsRV2.

Os siris do grupo controle que receberam injeção salina, mas que foram contaminados com CsRV2 durante o experimento passaram então a ser considerados como um grupo experimental adicional para fins de avaliação da taxa de mortalidade. Além disso, o CsRV2 também foi detectado nas amostras de água coletadas a partir do oitavo dia do experimento, com cargas virais variando de $2,50 \times 10^2 \pm 1,31 \times 10^1$ cópias μL^{-1} no dia 8 e $2,73 \times 10^2 \pm 8,18 \times 10^1$ cópias μL^{-1} no dia 12.

Tabela 13. Carga viral de CsRV2 em *Callinectes danae* após período experimental em condições laboratoriais. Não foram detectadas diferenças estatísticas na carga viral média de CsRV2 entre os grupos experimentais (Mann Whitney, p>0,05).

Grupo experimental	***n***	**Prevalência de CsRV2 (%)**	**Carga viral média (cópias por mg de tecido)**	**Pico de carga viral (cópias por mg de tecido)**
			(Média ± DP)	(Média ± DP)
Controle negativo*	4	0	0	0
Controle positivo para CsRV2**	11	100	$1,02 \times 10^8 \pm 1,24 \times 10^7$	$2,54 \times 10^8 \pm 2,32 \times 10^7$
Siris infectados por CsRV2***	10	100	$1,10 \times 10^8 \pm 2,71 \times 10^7$	$2,81 \times 10^8 \pm 9,48 \times 10^7$

**Siris que receberam injeção de solução salina (15 ups). **Siris que receberam injeção de solução salina e inicialmente pertenciam ao grupo controle negativo, mas que testaram positivos para CsRV2 após o período experimental. ***Siris que foram injetados com CsRV2 de tecido muscular homogeneizado de um animal infectado.*

3.2. MORTALIDADE

No intervalo temporal (de cerca de 2 horas) compreendido entre a coleta e acondicionamento dos animais capturados nas unidades de transporte e sua chegada ao laboratório foi registrada uma taxa de mortalidade de 29,5% (n=13). Constatou-se que nesse grupo cerca de 23% (n=3) estavam infectados pelo vírus. Já a totalidade dos siris (n=4) que morreram durante o período de aclimatação testou positivo para CsRV2.

O pico de mortalidade dos siris infectados com CsRV2 via injeção intramuscular ocorreu no nono dia pós-injeção. A partir deste período, mortes foram registradas diariamente até o último dia de experimento. A mortalidade cumulativa registrada no grupo desafiado com CsRV2 via injeção intramuscular chegou a 70% após 14 dias de infecção.

Já no grupo controle que foi contaminado com CsRV2 durante o experimento foi registrada somente uma morte (9%), que ocorreu no penúltimo dia de experimento (Figura 19). No grupo controle negativo para CsRV2, nenhuma morte foi registrada.

A carga viral de CsRV2 nos siris que morreram após a injeção de CsRV2 foi variável ao longo do período experimental, oscilando de 1,88 x 10^7 cópias por mg de tecido no nono dia até 2,78 x 10^8 cópias por mg de tecido no décimo quarto dia de experimento (Figura 20A). O único siri do grupo controle contaminado com CsRV2 que morreu durante o experimento, apresentou carga viral de 5,02 x 10^7 cópias por mg de tecido. Além disso, o coeficiente de correlação de Spearman mostrou que não houve correlação significativa entre a carga viral de CsRV2 nos siris mortos e o tempo até a morte (Coeficiente de Spearman = 0,351, $p>0,05$).

Os siris do grupo controle que foram contaminados com CsRV2 durante o experimento também apresentaram carga viral variável após 14 dias de experimento, oscilando de 1,51 x 10^7 a 2,54 x 10^8 cópias por mg de tecido (Figura 20B). Embora, os siris infectados por CsRV2 via injeção intramuscular tenham sofrido com uma alta taxa de mortalidade, os animais do grupo controle que se contaminaram com CsRV2 apresentaram carga viral semelhante às dos siris que morreram pós-injeção de CsRV2 ($p>0,05$), porém a taxa de mortalidade foi significativamente menor.

As características físicas e químicas da água dos aquários individuais de cada grupo experimental permaneceram estáveis e dentro dos limites recomendados para siris cultivados durante todo o período experimental (Tabela 14). Portanto, sem relação direta com a mortalidade observada durante o experimento.

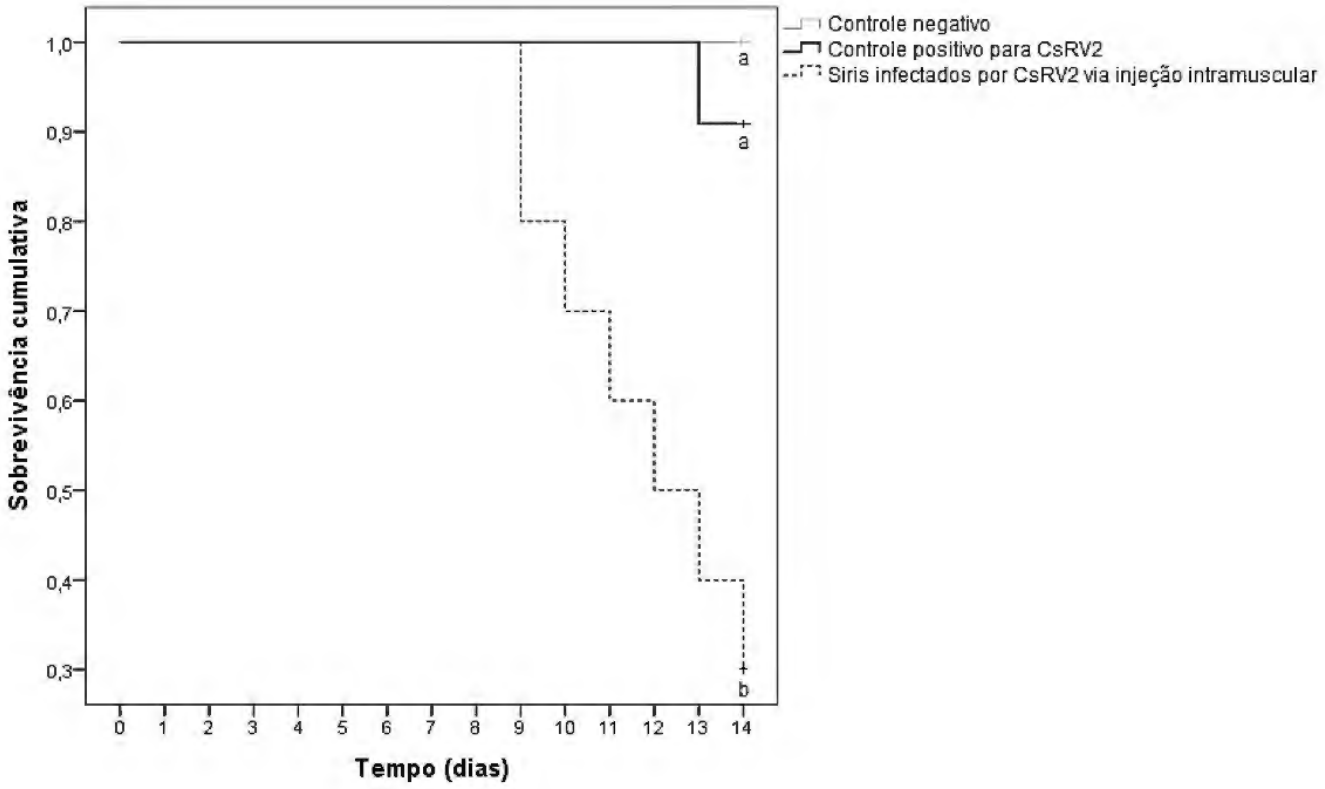


Figura 19. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de espécimes de *Callinectes danae* desafiados com injeção intramuscular de CsRV2 (linha tracejada), grupo controle positivo para CsRV2 (linha contínua preta) e grupo controle negativo (linha contínua cinza) em condições experimentais por 14 dias. As diferentes letras representam diferença estatística ($p<0,05$) entre o grupo controle e desafiados, usando o teste de Mantel-Cox, Breslow e Tarone-Ware.

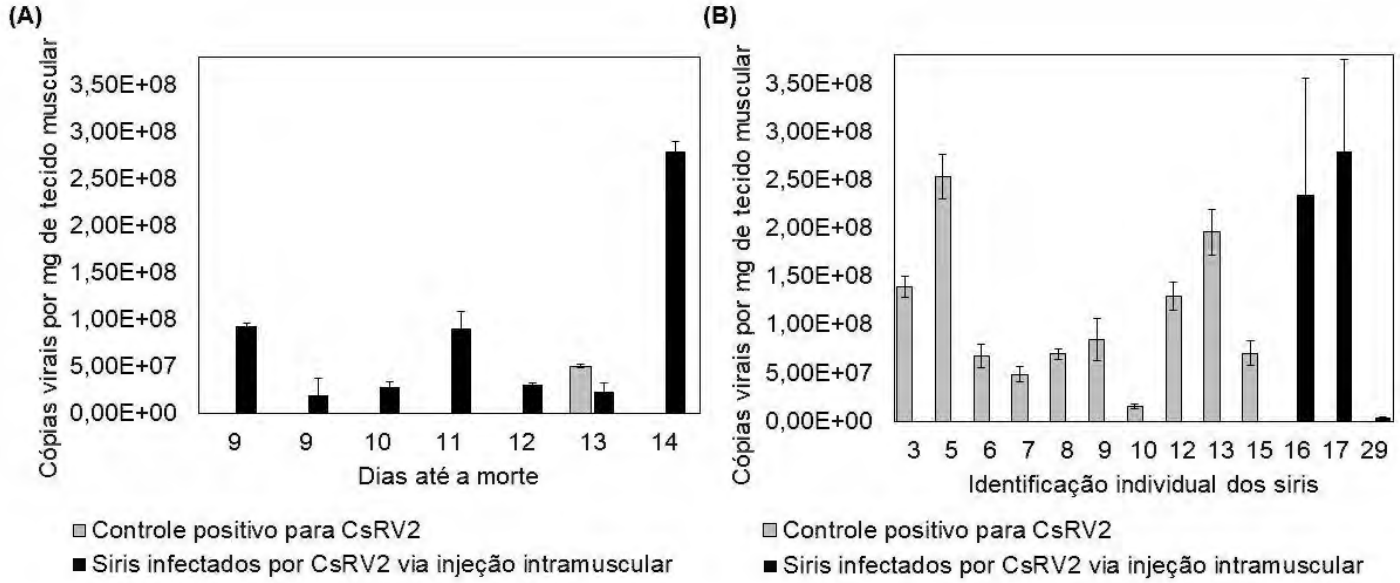


Figura 20. Carga viral de CsRV2 (Média ± DP) em *Callinectes danae* que morreram (A) ou sobreviveram (B) durante o período experimental em condições de laboratório. As barras pretas representam a carga viral nos siris que receberam injeção intramuscular de CsRV2 e as barras cinzas os siris do grupo controle que se contaminaram com CsRV2 durante o experimento.

Tabela 14. Média ± desvio padrão das variáveis físicas e químicas monitoradas na água de cada grupo experimental, bem como os valores recomendados para os caranguejos e siris propostos por MALONE e BURDEN (1988) e por HOCHHEIMER (1988).

Variáveis físicas e químicas	**Controle negativo***	**Controle positivo para CsRV2****	**Siris infectados por CsRV2*****	**Valores recomendados por MALONE e BURDEN (1988) e HOCHHEIMER (1988)**
	Média ± desvio padrão			
Temperatura (ºC)	24,71 ± 0,69	24,68 ± 0,72	24,01 ± 1,14	22-28
Oxigênio dissolvido (mg L^{-1})	5,51 ± 0,27	5,49 ± 0,25	5,66 ± 0,22	>7.0
Oxigênio dissolvido (%)	75,84 ± 2,68	75,45 ± 2,41	76,41 ± 4,88	Nd
pH	8,15 ± 0,07	8,15 ± 0,07	8,11 ± 0,05	6.5-8.5
Salinidade	25,07 ± 0,25	25,07 ± 0,25	25,09 ± 0,28	± 5 ups do local de coleta
Amônia total (mg L^{-1})	0,33 ± 0,12	0,42 ± 0,14	0,40 ± 0,13	<1.0

**Siris que receberam injeção de solução salina (15 ups). **Siris que receberam injeção de solução salina e inicialmente pertenciam ao grupo controle negativo, mas que testaram positivos para CsRV2 após o período experimental. ***Siris que foram injetados com CsRV2 de tecido muscular homogeneizado de um animal infectado*. Nd: Não disponível.

3.3. PRESENÇA DE CdPBV1 POR RT-PCR

No experimento anterior, por meio do sequenciamento de nova geração, o genoma de CsRV2 foi detectado simultaneamente com o bunyavírus CdPBV1 em um exemplar de *C. danae* (TAVARES *et al.*, no prelo). Portanto, com base na detecção dos dois vírus infectando *C. danae* no estudo anterior e na busca por respostas sobre o motivo da diferença entre as taxas de mortalidade registradas entre os grupos infectados por CsRV2, a presença do CdPBV1 foi analisada por RT-PCR no RNA total de todos os siris do experimento e no inóculo usado na injeção de CsRV2.

Para isso, os primers para o bunyavírus foram testados usando RNA transcrito reversamente de um siri infectado por CdPBV1, e quando testados após o ensaio de RT-PCR e leitura em gel de agarose, o produto esperado de 127 bp era obtido. Já, as amostras negativas para CdPBV1 (água ultrapura), os primers não produziram qualquer produto. Além disso, a análise da curva de melting para os produtos de PCR produzidos a partir de

amostras positivas para CdPBV1 mostraram consistentemente temperaturas de melting de 77,8 a 78,2°C.

A análise mostrou então que o CdPBV1 também estava presente na solução homogeneizada de CsRV2 usada para inocular o vírus nos siris do tratamento experimental, pois a amplificação do RNA transcrito reversamente produziu o amplicon de CdPBV1 (Figura 21B, linha 9). Além disso, todos os siris que receberam a injeção de CsRV2 (n=10) também testaram positivos para CdPBV1, enquanto os siris do controle negativo para CsRV2 (n=4) e controle positivo para CsRV2 (n=11) testaram negativos para CdPBV1 (Figura 21C).

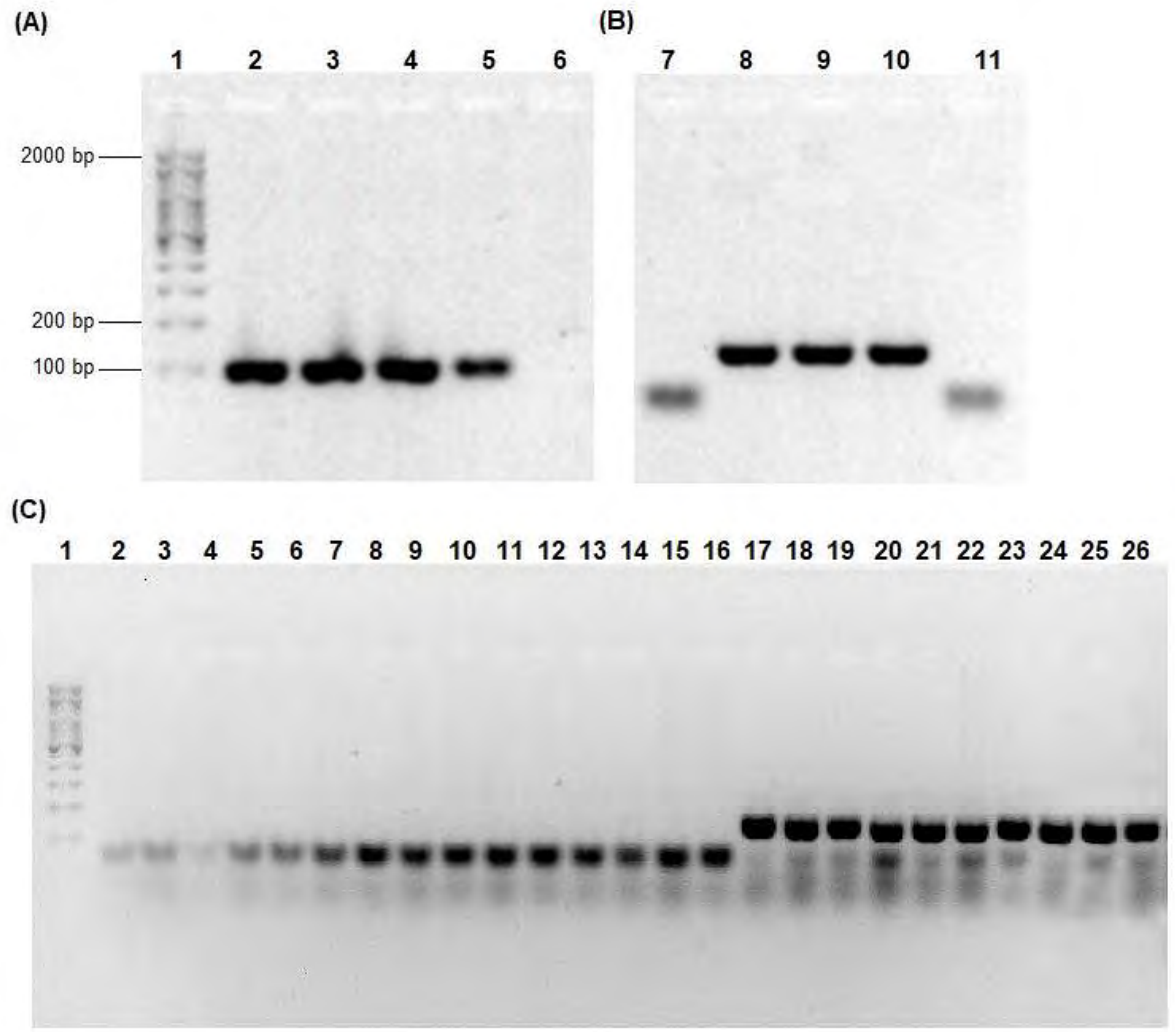


Figura 21. Gel de agarose corado com GelRed™ (Biotium, CA, USA) representando o ensaio de RT-PCR a partir de RNA total extraído de *Callinectes danae* após 14 dias de experimento em laboratório. (A) Produtos de RT-PCR usando primers específicos para amplificar uma região de 97 bp de CsRV2. Trilha 1: marcador de peso molecular de 100 bp; Trilha 2: RNA extraído de um exemplar do grupo controle que se contaminou com CsRV2 durante o experimento (ID: 5); Trilha 3 e 4: Um exemplar do experimento infectado por

CsRV2 via injeção intramuscular (ID: 20 e 21); Trilha 5: Inóculo usado na injeção de CsRV2; Trilha 6: Controle negativo (água ultrapura). (B) Produtos de RT-PCR usando primers específicos para amplificar uma região de 127 bp de CdPBV1. Trilha 7: Um exemplar do grupo controle que se contaminou com CsRV2 durante o experimento (ID: 5); Trilha 8: Um exemplar do experimento infectado por CsRV2 via injeção intramuscular (ID: 20); Trilha 9: Inóculo usado na injeção de CsRV2; Linha 10: Um exemplar positivo para CdPBV1 (ID: BR37); Trilha 11: Controle negativo (água ultrapura). (C) Produtos de RT-PCR usando primers específicos para CdPBV1 a partir do RNA total extraído de todos os siris do grupo controle negativo (trilhas 2-5), grupo controle positivo para CsRV2 (trilhas 6-16) e do grupo infectado por CsRV2 via injeção intramuscular (trilhas 17-26).

3.4. AVALIAÇÃO METABÓLICA

A taxa de fluxo de amônia (Jamm) nos siris não foi afetada significativamente ($p>0,05$) pela infecção por CsRV2 após a contaminação durante o experimento, nem pela coinfecção por CsRV2 e CdPBV1 quando da comparação com o controle negativo (Figura 22A). Por outro lado, foi observada uma tendência de aumento do Jamm nos animais infectados quando comparados ao controle negativo, aumento que se manteve antes e após a alimentação. Antes da alimentação, a Jamm apresentou um aumento de 47% nos siris infectados por CsRV2 e 37% nos siris coinfectados, quando comparados ao controle negativo (-151,59 μmol AT kg^{-1} h^{-1}). Após a alimentação, o aumento registrado foi de 12% e 20% nos siris do controle positivo para CsRV2 e nos siris coinfectados, respectivamente, em comparação com o controle negativo (-212,22 μmol AT kg^{-1}).

Ao longo do período experimental, também foi observado que alguns siris coinfectados por CsRV2 e CdPBV1 rejeitaram ou comeram parcialmente os pedaços de peixe oferecidos, enquanto os siris do controle negativo e do controle que se contaminaram com CsRV2 durante o experimento consumiram a totalidade do alimento todas as vezes que lhes foi ofertado (Tabela 15). Em contraste com as taxas de fluxo de amônia nos siris analisados, o consumo de oxigênio foi significativamente afetado pela infecção por CsRV2 e pela coinfecção de CsRV2 e CdPBV1 em comparação com o controle negativo (Figura 22B). Enquanto o valor médio de consumo de oxigênio no grupo controle negativo foi de 4298,34 μmol O_2 kg^{-1} h^{-1}, o $\dot{M}O_2$ foi 69% maior no controle positivo para CsRV2 e 93% nos siris coinfectados por CsRV2 e CdPBV1 ($p<0,05$).

Tabela 15. Taxa de ingestão de alimento de *Callinectes danae* após infecção por CsRV2 e coinfecção por CsRV2 e CdPBV1 via injeção intramuscular em condições de laboratório. Não foram detectadas diferenças na taxa de ingestão (%) entre os grupos experimentais (Mann Whitney, p>0,05).

Grupos experimentais	Tempo (dias)	*n*	Alimento ofertado (g)	Quantidade de alimento ingerido (g)	Taxa de ingestão média ± DP (%)
Controle negativo*	4	4	0,61	0,61	100,0 ± 0,0
	8	4	1,00	1,00	100,0 ± 0,0
	12	4	1,01	1,01	100,0 ± 0,0
Controle positivo para CsRV2**	4	11	0,77	0,77	100,0 ± 0,0
	8	11	0,97	0,97	100,0 ± 0,0
	12	10	1,00	1,00	100,0 ± 0,0
Siris injetados com CsRV2 e CdPBV1***	4	10	0,66	0,63	94,2 ± 20,2
	8	10	1,13	1,04	92,9 ± 16,7
	12	7	1,18	0,99	82,6 ± 37,3

**Siris que receberam injeção de solução salina (15 ups). **Siris que receberam injeção de solução salina e inicialmente pertenciam ao grupo controle negativo, mas foram positivos para CsRV2 por RT-qPCR após o período experimental. ***Siris que foram injetados com CsRV2 e CdPBV1 de tecido muscular homogeneizado de um animal infectado.*

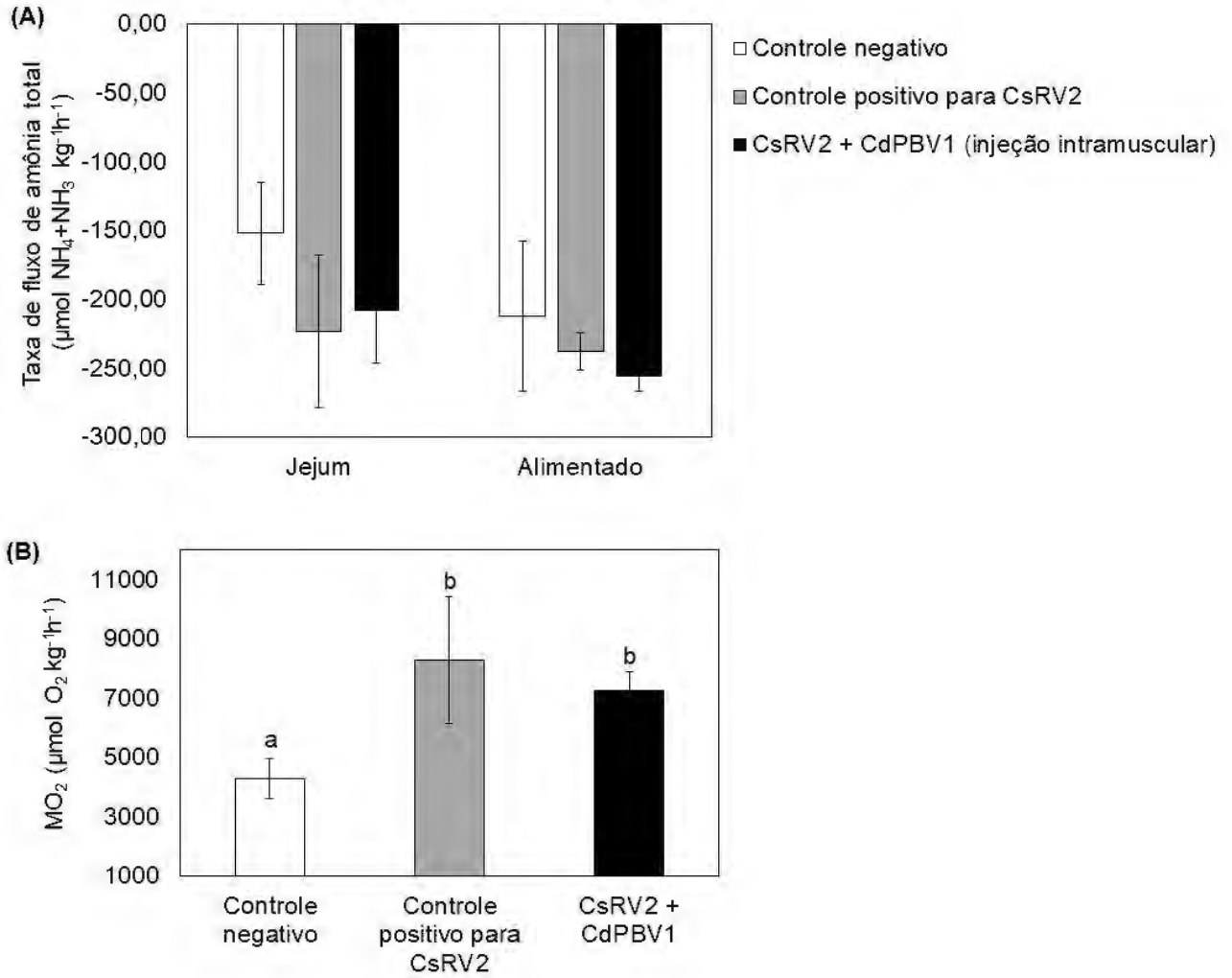


Figura 22. (A) Valores médios ± erro padrão das taxas de fluxo de amônia total (AT) e (B) consumo de oxigênio de exemplares de *Callinectes danae* infectados por CsRV2 e CdPBV1

via injeção intramuscular (barra preta), por CsRV2 após contaminação durante o experimento (barra cinza) e do grupo controle negativo, que receberam injeção de solução salina (barra branca). As letras indicam diferenças entre o grupo controle e o tratamento (One-way ANOVA, teste de Tukey, $p<0,05$).

3.5. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Observou-se uma tendência de elevação do comprometimento dos reflexos comportamentais analisados nos animais do controle positivo para CsRV2 e nos coinfectados por CsRV2 e CdPBV1. No entanto, o teste U de Mann Whitney não indicou diferença significativa ($p>0,05$) em comparação com os animais do controle negativo (Figura 23A). Dos seis reflexos de RAMP analisados, o chute foi o que apresentou maior redução nos siris do controle positivo para CsRV2. A proporção dos animais com este comportamento comprometido, que era de 9,1% no início, passou para 18,2% ao final de 7 dias e ao final de 14 dias 30,0% dos animais não apresentavam mais esse reflexo (Figura 23B).

Já, nos siris que foram injetados propositalmente com CsRV2 e incidentalmente com CdPBV1, além do reflexo de chute, os reflexos de fechamento de quela e retração de quelípodo também foram comprometidos ao longo do experimento (Figura 23C). Enquanto isso, os reflexos de extensão do quelípodo, retração ocular e fechamento da boca foram menos alterados em ambos os grupos. No controle negativo apenas o reflexo de chute foi parcialmente comprometido, o reflexo permaneceu intacto no início e ao final de 7 dias, mas foi reduzido em 25% ao final do experimento.

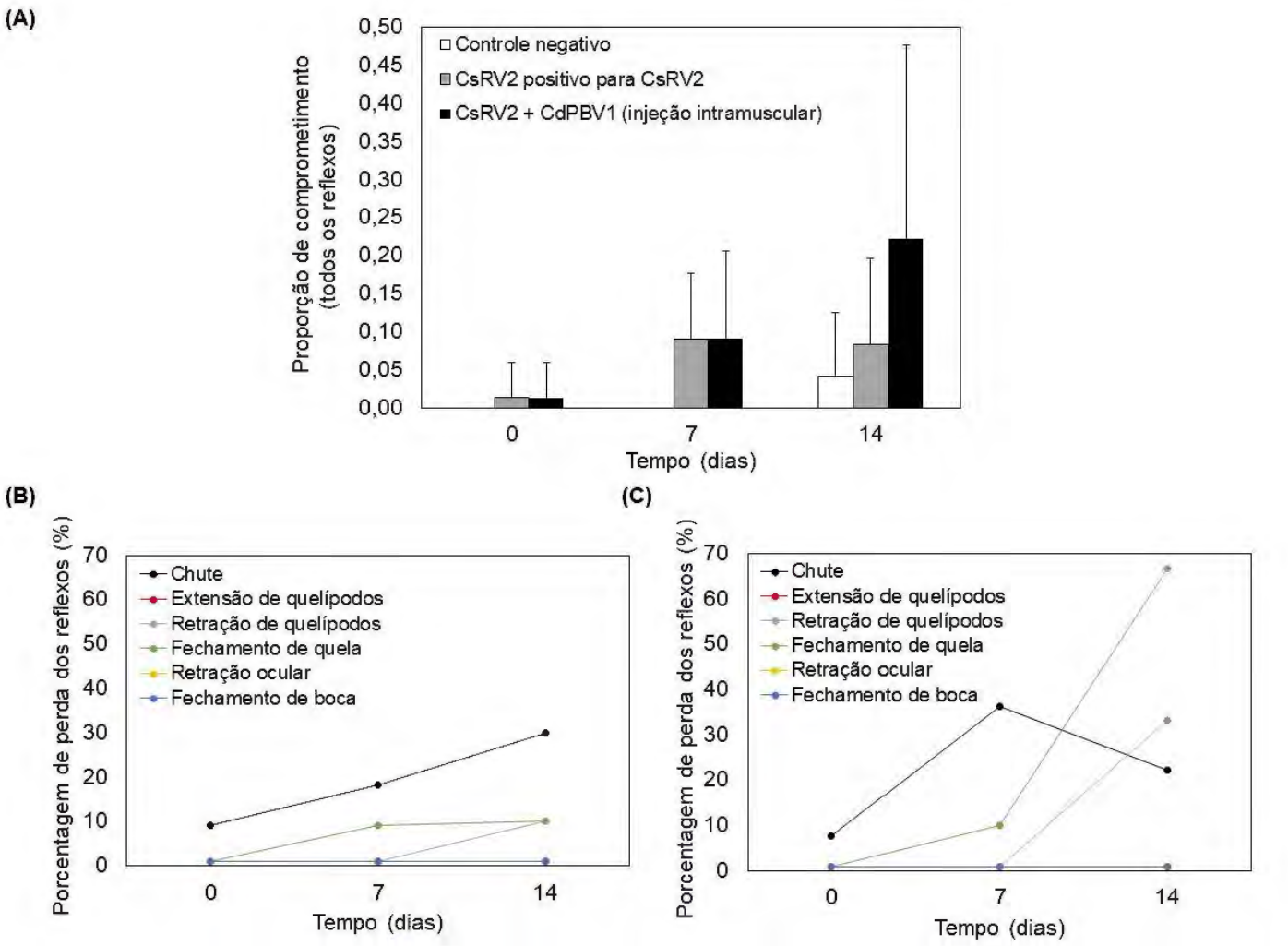


Figura 23. Avaliação da ação reflexa de *Callinectes danae* durante 14 dias de experimento em condições de laboratório. (A) Proporção do comprometimento reflexo (média ± DP) de C. danae infectados por CsRV2 e CdPBV1 via injeção intramuscular (barra preta), controle positivo para CsRV2 (barra cinza) e controle negativo para CsRV2 e CdPBV1 (barra branca). (B) Porcentagem de perda de cada um dos seis reflexos dos exemplares de C. danae do grupo controle positivo para CsRV2 e (C) dos exemplares infectados por CsRV2 e CdPBV1 via injeção intramuscular. Não foram detectadas diferenças estatísticas (p>0,05) na proporção do comprometimento reflexo e porcentagem da perda dos reflexos entre os grupos para cada dia analisado, usando o teste U de Mann Whitney.

3.6. AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA

As contagens de hemócitos totais (THC) não foram afetadas significativamente (p>0,05) pela infecção viral entre os grupos experimentais, segundo os resultados analisados através do teste de U de Mann-Whitney. Nos siris infectados por CsRV2 e CdPBV1 a THC foi de 7,96 x 10^4 ± 1,33 x 10^5 por mL de hemolinfa (n=3). Nos animais do controle que se contaminaram com CsRV2 durante o experimento a THC foi de 5,02 ± 6,71 x 10^4 por mL de hemolinfa (n=10). Já no controle negativo foi de 4,90 ± 5,75 x 10^4/mL

hemolinfa (n=4). Os hemócitos também foram agrupados em três classes de acordo com o tamanho (FSC) e granularidade (SSC), usando citometria de fluxo (Figura 24): células hialinas (H), granulócitos (G) e semigranulócitos (H).

Quando a porcentagem de cada classe de hemócitos foi analisada entre os grupos experimentais, foi observado que os granulócitos foram menos abundantes nos siris injetados com CsRV2 e CdPBV1 (30,36 ± 3,15%, n=3) em comparação com o controle negativo (40,04 ± 16,95%, n=4) e controle positivo para CsRV2 (47,48 ± 18,30%, n=10), representando redução de 24% e 36%, respectivamente (Figura 24D). Além disso, também foi observado um aumento de 45% e 21% nos semigranulócitos e de 25% e 4% nos hialinos nos siris infectados por CsRV2 e CdPBV1 por injeção intramuscular em comparação com os siris do grupo controle positivo para CsRV2 e do controle negativo, respectivamente.

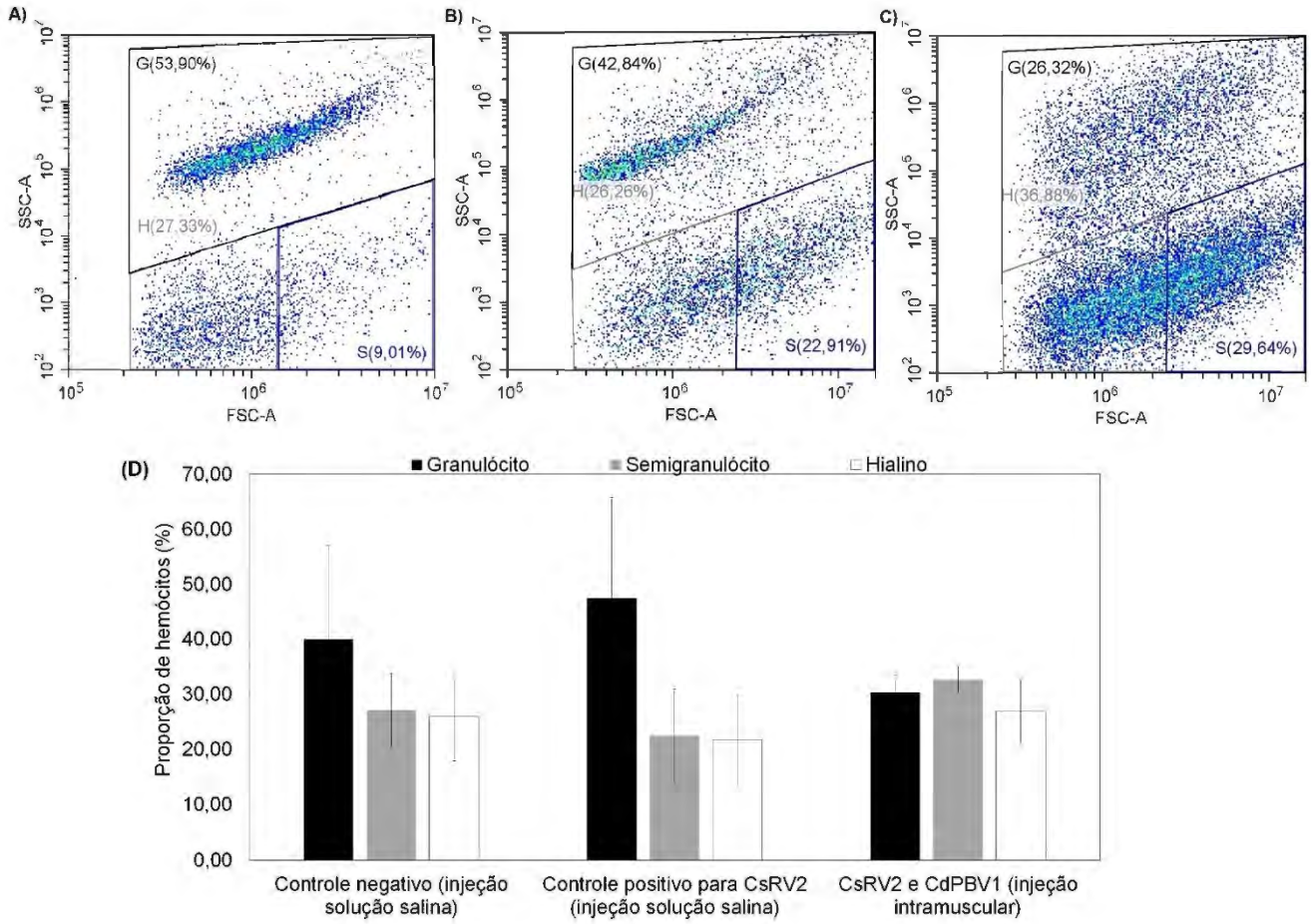


Figura 24. (A) Análise de citometria de fluxo dos hemócitos obtidos de exemplares de *Callinectes danae* que receberam injeção de solução salina e que testaram negativo para CsRV2 e CdPBV1; (B) que receberam injeção de solução salina, mas se contaminaram com CsRV2 durante o experimento; e (C) exemplares que foram injetados propositalmente

com CsRV2 e incidentalmente com CdPBV1 e mantidos em condições de laboratório durante 14 dias. As letras maiúsculas indicam a porcentagem dos granulócitos (G), células hialinas (H) e semigranulócitos (S), estimados pela dispersão direta (FSC) e dispersão lateral (SSC). O gráfico D apresenta a proporção média de hemócitos (média ± DP) para todos os siris analisados de cada grupo experimental.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo forneceu uma melhor compreensão da patogenicidade de CsRV2, um reovírus recentemente isolado de *C. danae* e *C. sapidus* no Sul do Brasil TAVARES *et al.*, no prelo; ZHAO; FLOWERS; SCHOTT, 2021), em exemplares de *C. danae* infectados experimentalmente. Além disso, foi desenvolvido um ensaio de RT-qPCR que permitiu que o CsRV2 fosse quantificado no RNA em tecido muscular de *C. danae* antes e depois da infecção experimental. A metodologia utilizada, além de sua alta sensibilidade e precisão, permite a coleta do tecido a ser utilizado para extração de RNA por autotomia de um dos pereiópodos, não implicando na morte dos animais.

Inicialmente, o experimento foi desenhado apenas para avaliar a patogenicidade de CsRV2 em *C. danae,* uma vez que nosso grupo já havia comprovado a presença desse vírus em animais da região de coleta (TAVARES *et al.*, no prelo). Essa avaliação foi feita por meio de injeção intramuscular de extratos contendo o vírus e a posterior comparação dos resultados com os obtidos através de siris que receberam injeção de solução salina (grupo controle). No entanto, por meio do ensaio de RT-qPCR também foi possível detectar a presença de CsRV2 em alguns animais do próprio grupo controle. Embora tais animais tenham sido mantidos em uma sala experimental sem conexão direta com a sala onde foram mantidos os animais infectados e tenham testado negativo para CsRV2 no início do experimento, é muito provável que, apesar dos cuidados e precauções adotados, o contágio tenha se dado por contaminação cruzada via manipulador, que fazia o manejo de rotina das unidades experimentais. No estudo realizado por SPITZNAGEL (2019) e voltado à compreensão das rotas naturais de transmissão do CsRV1, *C. sapidus* negativos para CsRV1 foram expostos ao reovírus por coabitação com um siri morto, comprovadamente

infectado por CsRV1 em alta carga viral (>2 x 10^6 cópias virais por mg de tecido). O autor constatou que, mesmo após 90 minutos de exposição e após o acompanhamento dos animais por 15 dias, nenhum siri testou positivo para CsRV1.

Há, porém, evidências de que os vírions de outros reovírus que infectam uma ampla gama de hospedeiros são estáveis e podem se manter viáveis por pelo menos 10 semanas em água sem perder a infectividade, como é o caso do orthoreovírus ARV (Reovírus Aviário) (SAVAGE; JONES, 2003). Estudos adicionais conduzidos em laboratório, usando água destilada e águas residuais, demonstraram que os reovírus podem se manter viáveis por mais de 30 dias a 26°C e mais de 1 ano a 8°C, aumentando a oportunidade de sua transmissão diretamente pela água (MCDANIELS; COCHRAN; GANNON; WILLIAMS, 1983). Isso pode ser explicado pelo fato de que, as características dos reovírus, como RNA de fita dupla e uma cápside icosaédrica de camada dupla, não envelopado, constituem os principais determinantes da estabilidade do vírion de reovírus no ambiente e da resistência contra agentes físicos e químicos (DRAYNA; FIELDS, 1982; GOMATOS; TAMM, 1963). No presente estudo, foi possível detectar, por meios das análises de RT-qPCR, a presença do CsRV2 na água de cultivo dos siris infectados a partir do oitavo dia de experimento. Há indícios, portanto, que essa possa ter sido a via de contaminação dos siris durante o experimento que, ao mesmo tempo, sugere que CsRV2 possa ser altamente transmissível em instalações de cultivo.

A carga viral estimada nos siris do grupo controle que se contaminaram naturalmente com CsRV2 e nos siris que receberam a injeção de CsRV2 não diferiram significativamente entre si, sugerindo que a transmissão de CsRV2 em *C. danae* também é eficiente por meio de rotas entéricas e de superfície corporal. Em contrapartida, a mortalidade do grupo controle foi significativamente menor que a registrada no grupo contendo os siris injetados com CsRV2. Nesse caso, o fato mais relevante que diferenciou os dois grupos, além da via de infecção, foi a presença do bunyavírus CdPBV1 nos animais do grupo contaminado

intencionalmente com o CsRV2. Ressalta-se: o CdPBV1 estava presente apenas nos animais do grupo intencionalmente infectado com o CsRV2, não sendo identificado nos animais do controle infectados involuntariamente, sugerindo que a sua transmissibilidade seja menor quando comparado ao CsRV2. Como a mortalidade foi significativamente mais elevada no grupo infectado intencionalmente e, mais uma vez, como a carga viral de CsRV2 não diferiu significativamente nos dois grupos, conclui-se a mortalidade dos siris que receberam a injeção de CsRV2 possa ter sido potencializada pela coinfecção com CdPBV1.

Nos estudos de ZHANG; SHI; ZHANG e BONAMI (2004), a infecção experimental via injeção intramuscular do reovírus EsRV905 purificado casou mortalidade de 30% em *Eriocheir sinensis* após 15 dias de experimento. Além do reovírus, os autores também identificaram um vírus semelhante à bunyavírus infectando *E. sinensis* simultaneamente com EsRV905. ZHANG; SHI; ZHANG e BONAMI (2004) sugeriram que o bunyavírus detectado poderia ser o principal agente causador da síndrome do tremor (TD) em *E. sinensis*, pois a taxa de mortalidade foi acelerada com a coinfecção. No experimento anterior realizado por nosso grupo (TAVARES *et al.*, no prelo), que detectou, por meio de eletroforese, pela primeira vez o dsRNA de CsRV2 em *C. danae*, a prevalência de CsRV2 não foi associada à mortalidade, confirmando que o CsRV2 não seria o principal agente causador da mortalidade de *C. danae* em cativeiro, mas um agente secundário.

No presente estudo, também foi testada a hipótese de que a infecção por CsRV2 interferiria nas funções respiratória e excretora das brânquias de *C. danae*. Em estudos anteriores (TAVARES *et al.*, no prelo), foram registradas alterações histopatológicas frequentes nas brânquias de *C. danae* infectados por CsRV2. Tais alterações poderiam levar a alterações no consumo de oxigênio e excreção de amônia do hospedeiro. O consumo médio de oxigênio de *C. danae* do controle negativo do presente experimento (4298,3 ± 193,1 μmol O_2 kg^{-1} h^{-1}, n=4) foi semelhante ao consumo observado por BURNETT; HOLMAN; JORGENSEN; IKERD *et al.* (2006) em *C. sapidus* negativos para

Vibrio campbellii e injetados com solução salina (4530,0 ± 590,0 µmol O_2 kg^{-1} h^{-1}, n=6). Também foram semelhantes ao consumo de oxigênio registrado por BATTERTON e CAMERON (1978) em adultos de *C. sapidus* mantidos em salinidade entre 25 a 35 ups e temperatura de 20 a 28ºC. No entanto, animais positivos no presente estudo apresentam divergências dos obtidos por BURNETT; HOLMAN; JORGENSEN; IKERD *et al.* (2006). Estes autores concluíram que os siris infectados pela bactéria *V. campbellii* apresentaram redução significativa das taxas de consumo de oxigênio. Já os siris infectados por CsRV2 via contaminação ou coinfectados com CsRV2 e CdPBV1 via injeção intramuscular apresentaram aumento significativo das taxas de consumo de oxigênio em comparação com os siris não infectados.

O aumento da demanda por oxigênio em siris em condições estressantes foi relatado por vários pesquisadores. Por exemplo, KETPADUNG e TANGKROCK-OLAN (2006) e por O'MAHONEY e FULL (1984), que relacionaram o aumento da taxa de consumo de oxigênio em resposta à redução da salinidade; BOOTH; MCMAHON e PINDER (1982) em função do aumento da atividade natatória; MANGUM; MCMAHON; DEFUR e WHEATLY (1985) logo após ao processo de muda; MAURO e MANGUM (1982) em função do aumento da temperatura ambiente em cerca de 10ºC. Além disso, as condições de estresse ou infecções por patógenos são geralmente associadas à perda da homeostase pelo animal, levando ao aumento da necessidade de energia para lidar com o estresse ou estado de doença (FREIRE; SAMPAIO, 2021; TOWLE; BURNETT, 2007). No metabolismo energético, as reações químicas que produzem trifosfato de adenosina (ATP) para que organismo dos animais funcionem da maneira adequada, usam principalmente o oxigênio para produzir a maior quantidade de ATP possível (WILLMER; STONE; JOHNSTON, 2009). Portanto, o maior consumo de oxigênio dos siris infectados por CsRV2 e coinfectados por CsRV2 e CdPBV1, sugere que houve aumento da demanda energética para combater a infecção viral. O aumento metabólico registrado no presente estudo corrobora com os

resultados do experimento anterior de TAVARES *et al.* (no prelo), que registrou redução do glicogênio no hepatopâncreas e aumento da glicose na hemolinfa de *C. danae* infectados por CsRV2, ambos os processos direcionados a atender as necessidades energéticas suplementares dos animais infectados. Além disso, o aumento da demanda energética provocada pela infecção por CsRV2 e CdPBV1 pode ser exacerbado pela diminuição das taxas de ingestão de alimentos, sugerindo que a depleção de nutrientes possa ser um dos fatores que contribuem para a morte dos animais doentes.

A amônia é geralmente o principal produto residual do metabolismo proteico de invertebrados aquáticos (BROWN; PEICK; PICKETT; FANARA *et al.*, 2021; HENRY; LUCU; ONKEN; WEIHRAUCH, 2012; WEIHRAUCH; WILKIE; WALSH, 2009) e a excreção de amônia em crustáceos é realizada principalmente através das brânquias (ALLEN; WEIHRAUCH, 2021). Alterações na taxa de excreção de amônia já foram observadas em crustáceos sob estresse osmótico (SPAARGAREN, 1982), nutricional (COMOGLIO; SMOLKO; AMIN, 2005), por exposição ao ar durante o transporte e cultivo (BAO; LI; XING; FENG *et al.*, 2019) e até quando os animais foram expostos a substâncias tóxicas, como inseticidas (MONTAGNA; COLLINS, 2008). O aumento da taxa de excreção de amônia nos caranguejos *Carcinus maenas* e *Paralomis granulosa* foi associada à redução de salinidade ambiental (SPAARGAREN, 1982) e após 6 dias de jejum (COMOGLIO; SMOLKO; AMIN, 2005), respectivamente. Ambos os autores sugeriram que, nestas condições, os mecanismos regulatórios demandam quantidades crescentes de energia, usando aminoácidos como fonte predominante e, como resultado do aumento do catabolismo proteico, tanto a produção quanto a excreção de amônia aumentam. Apesar do aumento observado nas taxas de excreção nos siris infectados por CsRV2 e coinfectados por CsRV2 e CdPBV1, a exposição aos vírus não alterou significativamente a taxa de fluxo de amônia de *C. danae* antes ou após a alimentação. No experimento anterior, TAVARES *et al.* (no prelo) observaram que as concentrações de proteínas totais na hemolinfa de *C. danae*

infectados com CsRV2 permaneceram constantes até o sétimo dia do experimento, mas foram significativamente reduzidas uma semana depois, sugerindo que as proteínas também podem ter sido usadas para suprir o aumento da demanda energética que ocorre durante a infecção.

O comportamento de um animal também pode sofrer alterações devido ao estresse causado pela infecção viral. O teste RAMP é um método que relaciona a deficiência do reflexo a uma probabilidade de mortalidade e já foi testado em crustáceos decápodes (STONER, 2012; YOCHUM, 2016; YOCHUM; ROSE; HAMMOND, 2015). Além disso, TAVARES *et al.* (no prelo) também aplicaram o teste RAMP em *C. danae* infectado com CsRV2 e observaram um aumento significativo na proporção de comprometimento reflexo nos siris infectados com CsRV2 em comparação com os animais não infectados. No presente estudo, a não diferença estatística entre os grupos pode ter sido influenciada pelo baixo número de organismos sobreviventes no tratamento infectado intencionalmente, uma vez que houve uma evidente tendência de aumento na proporção de comprometimento reflexo entre os siris infectados. Dos seis reflexos analisados, o reflexo de chute foi mais frequentemente perdido em *C. danae* do grupo controle que se infectaram com CsRV2 durante o experimento. Exatamente o mesmo resultado foi observado nos siris infectados por CsRV2 no experimento de TAVARES *et al.* (no prelo). Já os siris que receberam a injeção intencional de CsRV2 e involuntária de CdPBV1, além do reflexo de chute, também perderam os reflexos de fechamento de quela e retração de quelípodos, o que pode ter sido uma consequência provável da exaustão fisiológica relatada anteriormente por RABY; DONALDSON; HINCH; PATTERSON *et al.* (2012). Assim, recomenda-se que reflexos de chute, fechamento de quela e retração de quelípodos sejam mais bem estudados e testados, pois poderão servir como uma ferramenta prática e rápida para indicar uma possível coinfecção por CsRV2 e CdPBV1 em instalações de siri-mole, auxiliando na previsão de mortalidades dos siris antes que eles possam realizar a muda.

Alterações nos parâmetros imunológicos, como a THC, em resposta a infecção por patógenos em crustáceos já foram reportadas em vários estudos (CHANG; SU; CHEN, 1999; HENNIG; ITAMI; MAEDA; KONDO *et al.*, 1998; MARTIN; POOLE; POOLE; HOSE *et al.*, 1993; SONG; YU; LIEN; HUANG *et al.*, 2003). No presente caso, a infecção por CsRV2 ou coinfecção com CdPBV1 não interferiram significativamente na THC de *C. danae* em comparação com os siris não infectados. Esse resultado corrobora com os encontrados por CHUNG; PITULA; SCHOTT; ALVAREZ *et al.* (2015), que não registraram diferença na THC entre *C. sapidus* infectados e não infectados pelo reovírus CsRV1. No entanto, também observamos uma tendência de redução dos granulócitos e aumento dos semigranulócitos e hialinos nos siris coinfectados com CsRV2 e CdPBV1, indicando que a infecção pode ter afetado de forma distinta os tipos de hemócitos e, consequentemente, o sistema imunológico do hospedeiro. Esses resultados também corroboram os resultados apresentados por CHUNG; PITULA; SCHOTT; ALVAREZ *et al.* (2015), que registraram uma redução significativa dos granulócitos e aumento das células hialinas em *C. sapidus* infectados por CsRV1.

Pelo menos, duas razões poderiam explicar a diminuição dos granulócitos circulantes nos siris infectados: a degranulação seguida de morte celular (GALLO; SCHIAVON; BALLARIN, 2011; XIAN; ZHANG; WANG; LI *et al.*, 2017) ou a apoptose dos granulócitos induzida por vírus (CUI; LIANG; TANG; XING *et al.*, 2020; EVERETT; MCFADDEN, 1999). Os estudos de XIAN; ZHANG; WANG; LI *et al.* (2017) e GALLO; SCHIAVON e BALLARIN (2011) mostraram que a degranulação dos granulócitos aumentou gradativamente durante infecção bacteriana em *Penaeus monodon* e *Squilla mantis*, respectivamente. No entanto, o mecanismo de degranulação é induzido principalmente pela presença de lipopolissacarídeos e peptidoglicanas de bactérias durante as infecções bacterianas, que estimulam a liberação dos grânulos que possuem ação bactericida ou bacteriostática (SHIELDS; OVERSTREET, 2003). Já, no estudo de CUI; LIANG; TANG;

XING *et al.* (2020), foi registrada uma diminuição rápida e significativa dos granulócitos de *Fenneropenaeus chinensis* após a infecção viral por WSSV. Os autores postularam que a taxa de apoptose dos granulócitos induzida pelo vírus foi maior do que a dos hialinos, indicando uma maior suscetibilidade e vulnerabilidade dos granulócitos à infecção por WSSV em comparação com os hialinócitos. HAVANAPAN; TAENGCHAIYAPHUM; KETTERMAN e KRITTANAI (2016) também observaram que o Vírus da Cabeça Amarela (YHV) foi detectado principalmente nos granulócitos do camarão *Penaeus monodon*. Em relação ao aumento dos hialinos e semigranulócitos, essa pode ser uma resposta compensatória devido a necessidade de aumentar a fagocitose e/ou formação de agregados celulares para neutralizar os patógenos virais em resposta à infecção, como sugerido nos estudos de WSSV em camarões (CUI; LIANG; TANG; XING *et al.*, 2020; LI; CHANG; XU; YANG, 2018).

5. CONCLUSÃO

Este estudo apresentou evidências consistentes e robustas de que as elevadas taxas de mortalidade de *C. danae* identificadas e relatadas em instalações de cultivo de sirimole no Sul do Brasil possam estar intimamente relacionadas à presença de dois novos vírus, o CsRV2 e o CdPBV1. Confirmamos, através de experimento e testes laboratoriais, que a coinfecção do CsRV2 e do CdPBV1 foi a responsável por taxas de mortalidade que chegaram a 70% dos animais coinfectados em condições experimentais. Constatamos que o CsRV2 é um vírus altamente contagioso. Que, em poucos dias, a carga viral presente em *C. danae* infectados involuntariamente durante o simples manejo dos animais em laboratório era tão elevada como a quantificada em animais que receberam injeção contendo extratos de tecidos com alta carga desse vírus. Por fim, constatamos que o CsRV2 também é capaz de causar alterações metabólicas, comportamentais e imunológicas ao hospedeiro.

Os próximos passos dessa pesquisa deverão envolver: 1) o desenvolvimento de um ensaio de RT-qPCR para quantificar a carga viral de CdPBV1 que causou a mortalidade nos siris, o que possibilitará uma melhor compreensão da virulência do CdPBV1; 2) a realização de estudos para avaliar os efeitos isolados de CdPBV1 na sobrevivência de *C. danae. O*u seja, sua letalidade individual. As descobertas aqui apresentadas acendem uma luz de alerta e devem despertar o interesse da comunidade científica na busca por medidas de mitigação ou de convivência com os novos vírus, bem como pela identificação dos potenciais impactos que estes patógenos virais podem causar às populações de siris e para as indústrias aquícola e pesqueira do Brasil.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao CNPq pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa ao Dr. Antonio Ostrensky (processo nº 304633/2017-8; pelo financiamento do projeto (processo nº 381091/2014-7), e pela concessão de bolsa de doutorado para Camila P. S. Tavares (processo nº 141022/2017-5). À CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado Sanduíche no exterior para Camila P. S. Tavares (processo nº 88881.190487/2018-01).

7. REFERÊNCIAS

ALLEN, G. J. P.; WEIHRAUCH, D. Exploring the versatility of the perfused crustacean gill as a model for transbranchial transport processes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 254, p. 110572, 2021. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2021.110572

BAO, J.; LI, X.; XING, Y.; FENG, C.; JIANG, H. Respiratory metabolism and antioxidant response in chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* during air exposure and subsequent reimmersion. **Frontiers in Physiology**, 10, n. 907, 2019. 10.3389/fphys.2019.00907

BARRACCO, M. A. Mecanismos de resistência a doenças em crustáceos. *In*: RANZANI-PAIVA;;TAKEMOTO, R. e LIZAMA, M. (Ed.). **Sanidade de organismos acuáticos**. São Paulo: Ed. Varela, 2004. p. 51-74.

BATTERTON, C. V.; CAMERON, J. N. Characteristics of resting ventilation and response to hypoxia, hypercapnia, and emersion in the blue crab *Callinectes sapidus* (Rathbun).

Journal of Experimental Zoology, 203, n. 3, p. 403-418, 1978. https://doi.org/10.1002/jez.1402030308

BOJKO, J.; SUBRAMANIAM, K.; WALTZEK, T. B.; STENTIFORD, G. D.; BEHRINGER, D. C. Genomic and developmental characterisation of a novel bunyavirus infecting the crustacean *Carcinus maenas*. **Scientific Reports**, 9, n. 1, p. 1-10, 2019. https://doi.org/10.1038/s41598-019-49260-4

BOOTH, C. E.; MCMAHON, B. R.; PINDER, A. W. Oxygen uptake and the potentiating effects of increased hemolymph lactate on oxygen transport during exercise in the blue crab,*Callinectes sapidus*. **Journal of Comparative Physiology**, 148, n. 1, p. 111-121, 1982. 10.1007/BF00688894

BOUTILIER, R. G.; HEMING, T. A.; IWAMA, G. K. Appendix: Physicochemical Parameters for use in Fish Respiratory Physiology. *In*: HOAR, W. S. e RANDALL, D. J. (Ed.). **Fish Physiology**: Academic Press, 1984. v. 10, p. 403-430.

BOWERS, H. A.; MESSICK, G. A.; HANIF, A.; JAGUS, R.; CARRION, L.; ZMORA, O.; SCHOTT, E. J. Physicochemical properties of double-stranded RNA used to discover a reo-like virus from blue crab *Callinectes sapidus*. **Diseases of Aquatic Organisms**, 93, n. 1, p. 17-29, 2010. 10.3354/dao02280

BRANCO, J. O.; MASUNARI, S. Reprodutive ecology of the blue crab, *Callinectes danae* Smith, 1869 in the Conceição Lagoon system, Santa Catarina Isle, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, 60, p. 17-27, 2000. https://doi.org/10.1590/S0034-71082000000100004

BRANCO, J. O.; VERANI, J. R. Dinâmica da alimentação natural de *Callinectes danae* Smith (Decapoda, Portunidae) na Lagoa da Conceição, Florianôpolis, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 14, n. 4, p. 1003-1018, 1997. https://doi.org/10.1590/S0101-81751997000400014

BROWN, L.; PEICK, J.; PICKETT, M.; FANARA, T.; GILCHRIST, S.; SMILEY, A.; ROBERSON, L. Aquatic invertebrate protein sources for long-duration space travel. **Life Sciences in Space Research**, 28, p. 1-10, 2021. https://doi.org/10.1016/j.lssr.2020.10.002

BURGENTS, J. E.; BURNETT, L. E.; STABB, E. V.; BURNETT, K. G. Localization and bacteriostasis of Vibrio introduced into the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Developmental and Comparative Immunology**, 29, n. 8, p. 681-691, 2005. 10.1016/j.dci.2005.01.004

BURNETT, L. E.; HOLMAN, J. D.; JORGENSEN, D. D.; IKERD, J. L.; BURNETT, K. G. Immune defense reduces respiratory fitness in *Callinectes sapidus*, the Atlantic blue crab. **The Biological Bulletin**, 211, n. 1, p. 50-57, 2006. 10.2307/4134577

BURNETT, L. E.; MCMAHON, B. R. Facilitation of CO_2 excretion by carbonic anhydrase located on the surface of the basal membrane of crab gill epithelium. **Respiration Physiology**, 62, n. 3, p. 341-348, 1985. 10.1016/0034-5687(85)90089-1

CHACUR, M. M.; NEGREIROS-FRANSOZO, M. L. Spatial and seasonal distributions of *Callinectes Danae* (Decapoda, Portunidae) in Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. **Journal of Crustacean Biology**, 21, n. 2, p. 414-425, 2001. 10.1163/20021975-99990142

CHANG, C.-F.; SU, M.-S.; CHEN, H.-Y. A rapid method to quantify total haemocyte count of *Penaeus monodon* using ATP analysis. **Fish Pathology**, 34, n. 4, p. 211-212, 1999. 10.3147/jsfp.34.211

CHAVES, J. C.; EGGLESTON, D. B. Blue crab mortality in the North Carolina soft-shell industry: Biological and operational effects. **Journal of Shellfish Research**, 22, p. 241-250, 2003. 10.1016/j.aquaculture.2018.12.051

CHUNG, J. S.; PITULA, J. S.; SCHOTT, E.; ALVAREZ, J. V.; MAURER, L.; LYCETT, K. A. Elevated water temperature increases the levels of reo-like virus and selected innate immunity genes in hemocytes and hepatopancreas of adult female blue crab, *Callinectes sapidus*. **Fish and Shellfish Immunology**, 47, n. 1, p. 511-520, 2015. 10.1016/j.fsi.2015.09.027

CLAYBROOK, D. The biology of crustacea. **Internal anatomy and physiological regulation**, 5, p. 163-213, 1983.

COMOGLIO, L.; SMOLKO, L.; AMIN, O. Effects of starvation on oxygen consumption, ammonia excretion and biochemical composition of the hepatopancreas on adult males of the False Southern King crab *Paralomis granulosa* (Crustacea, Decapoda). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 140, n. 3, p. 411-416, 2005/03/01/ 2005. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.11.003

COSTA, T. M.; NEGREIROS-FRANSOZO, M. L. The reproductive cycle of *Callinectes danae* Smith, 1869 (Decapoda, Portunidae) in the Ubatuba Region, Brazil. **Crustaceana**, 71, n. 6, p. 615-627, 1998. http://dx.doi.org/10.1163/156854098X00617

CUI, C.; LIANG, Q.; TANG, X.; XING, J.; SHENG, X.; ZHAN, W. Differential apoptotic responses of hemocyte subpopulations to white spot syndrome virus infection in *Fenneropenaeus chinensis*. **Frontiers in Immunology**, 11, n. 3174, 2020. 10.3389/fimmu.2020.594390

DAL PONT, G.; SOUZA-BASTOS, L. R.; GIACOMIN, M.; DOLATTO, R. G.; BAIKA, L. M.; GRASSI, M. T.; OSTRENSKY, A.; WOOD, C. M. Acute exposure to the water-soluble fraction of gasoline (WSFG) affects oxygen consumption, nitrogenous-waste and Mg excretion, and activates anaerobic metabolism in the goldfish *Carassius auratus*.

Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 226, p. 108590, 2019/12/01/ 2019. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108590

DRAYNA, D.; FIELDS, B. N. Biochemical studies on the mechanism of chemical and physical inactivation of reovirus. **Journal of General Virology**, 63, p. 161-170, 1982. 10.1099/0022-1317-63-1-161

EVERETT, H.; MCFADDEN, G. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. **Trends Microbiol**, 7, n. 4, p. 160-165, 1999. 10.1016/s0966-842x(99)01487-0

FAO. **Global Capture and Aquaculture Production (FishStat)**. Rome, Italy, 2020. Disponível em: http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hqp_5215617422254205836.xml&outtype=html. Acesso em: 27/06/2020.

FERDOUSHI, Z.; XIANG, Z.; HASAN, M. R. Mud crab (*Scylla* sp.) marketing system in Bangladesh. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, 3, n. 2, p. 17, 2010.

FREIRE, C. A.; SAMPAIO, F. D. F. Chapter 7 - Stress and disease in aquaculture, and their effects on homeostasis and osmoregulation: The metabolic connection. *In*: KIBENGE, F. S. B.;BALDISSEROTTO, B. e CHONG, R. S.-M. (Ed.). **Aquaculture Pharmacology**: Academic Press, 2021. p. 273-295.

GALLO, C.; SCHIAVON, F.; BALLARIN, L. Insight on cellular and humoral components of innate immunity in *Squilla mantis* (Crustacea, Stomatopoda). **Fish and Shellfish Immunology**, 31, n. 3, p. 423-431, 2011. 10.1016/j.fsi.2011.06.013

GOMATOS, P. J.; TAMM, I. ANIMAL AND PLANT VIRUSES WITH DOUBLE-HELICAL RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 50, n. 5, p. 878-885, 1963. 10.1073/pnas.50.5.878

HAVANAPAN, P. O.; TAENGCHAIYAPHUM, S.; KETTERMAN, A. J.; KRITTANAI, C. Yellow head virus infection in black tiger shrimp reveals specific interaction with granule-containing hemocytes and crustinPm1 as a responsive protein. **Developmental and Comparative Immunology**, 54, n. 1, p. 126-136, 2016. 10.1016/j.dci.2015.09.005

HENNIG, O.; ITAMI, T.; MAEDA, M.; KONDO, M.; NATSUKARI, Y.; TAKAHASHI, Y. Analyses of hemolymph immunoparameters in kuruma shrimp infected with Penaeid Rod-shaped DNA Virus. **Fish Pathology**, 33, n. 4, p. 389-393, 1998. 10.3147/jsfp.33.389

HENRY, R. P.; LUCU, C.; ONKEN, H.; WEIHRAUCH, D. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. **Frontiers in physiology**, 3, p. 431-431, 2012. 10.3389/fphys.2012.00431

HOCHHEIMER, J. **Water Quality in Soft Crab Shedding**. College Park, MD, USA.: University of Maryland, Sea Grant Extension Program, 1988. 6 p. (Crab Shedders Workbook Series.

HUNGRIA, D. B.; TAVARES, C. P. S.; PEREIRA, L. Â.; SILVA, U. A. T.; OSTRENSKY, A. Global status of production and commercialization of soft-shell crabs. **Aquaculture International** 25, n. 6, p. 2213-2226, 2017. 10.1007/s10499-017-0183-5

JOHNSON, P. T. Bacterial infection in the blue crab, *Callinectes sapidus*: course of infection and histopathology. **Journal of Invertebrate Pathology**, 28, n. 1, p. 25-36, 1976. https://doi.org/10.1016/0022-2011(76)90067-7

JOYEUX, J.-C.; NALESSO, R. C.; SFORZA, R. Distribution and population structure of *Callinectes danae* (Decapoda: Portunidae) in a tropical brazilian estuary. **Journal of Crustacean Biology**, 30, n. 4, p. 597-606, 2010. https://doi.org/10.1651/09-3223.1

KENNEDY, V. S.; CRONIN, L. E. **The Blue Crab: *Callinectes Sapidus***. College Park, Md, USA: Maryland Sea Grant College, University of Maryland, 2007.

KETPADUNG, R.; TANGKROCK-OLAN, N. Changes in oxygen consumption and heart rate of the blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1766) following exposure to sublethal concentrations of copper. **Journal of Environmental Biology**, 27, n. 1, p. 7-12, 2006.

LI, F.; CHANG, X.; XU, L.; YANG, F. Different roles of crayfish hemocytes in the uptake of foreign particles. **Fish and Shellfish Immunology**, 77, p. 112-119, Jun 2018. 10.1016/j.fsi.2018.03.029

MALONE, R. F.; BURDEN, D. G. **Design of recirculating soft crawfish sheddind systems**. Baton Rouge, LA, USA: Louisiana Sea Grant College Program, Center for Wetland Resources, Louisiana State University, 1988. 80 p. (Lousiana Sea Grant College Program.

MANGUM, C. P.; MCMAHON, B. R.; DEFUR, P. L.; WHEATLY, M. G. Gas exchange, acid-base balance, and the oxygen supply to the tissues during a molt of the blue crab *Callinectes sapidus*. **Journal of Crustacean Biology**, 5, n. 2, p. 188-206, 1985. 10.2307/1547866

MARTIN, G. G.; POOLE, D.; POOLE, C.; HOSE, J. E.; ARIAS, M.; REYNOLDS, L.; MCKRELL, N.; WHANG, A. Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 62, n. 3, p. 308-315, 1993. 10.1006/jipa.1993.1118

MARTIN, G. G.; QUINTERO, M.; QUIGLEY, M.; KHOSROVIAN, H. Elimination of sequestered material from the gills of decapod crustaceans. **Journal of Crustacean Biology**, 20, n. 2, p. 209-217, 2000. 10.1163/20021975-99990032

MAURO, N. A.; MANGUM, C. P. The role of the blood in the temperature dependence of oxidative metabolism in decapod crustaceans. II. Interspecific adaptations to latitudinal changes. **Journal of Experimental Zoology**, 219, n. 2, p. 189-195, 1982. https://doi.org/10.1002/jez.1402190208

MCDANIELS, A. E.; COCHRAN, K. W.; GANNON, J. J.; WILLIAMS, G. W. Rotavirus and reovirus stability in microorganism-free distilled and wastewaters. **Water Research**, 17, n. 10, p. 1349-1353, 1983/01/01/ 1983. https://doi.org/10.1016/0043-1354(83)90263-4

MELO, G. A. S. **Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro**. São Paulo, SP, Brazil: Pleiade, FAPESP, 1996. Handbooks.

MIJATOVIC-RUSTEMPASIC, S.; TAM, K. I.; KERIN, T. K.; LEWIS, J. M.; GAUTAM, R.; QUAYE, O.; GENTSCH, J. R.; BOWEN, M. D. Sensitive and specific quantitative detection of rotavirus a by One-Step Real-Time Reverse Transcription-PCR assay without antecedent Double-Stranded-RNA denaturation. **Journal of Clinical Microbiology**, 51, n. 9, p. 3047-3054, 2013. 10.1128/JCM.01192-13

MONTAGNA, M. C.; COLLINS, P. A. Oxygen consumption and ammonia excretion of the freshwater crab *Trichodactylus borellianus* exposed to chlorpyrifos and endosulfan insecticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 92, n. 3, p. 150-155, 2008/11/01/ 2008. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2008.07.009

O'MAHONEY, P. M.; FULL, R. J. Respiration of crabs in air and water. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, 79, n. 2, p. 275-282, 1984/01/01/ 1984. https://doi.org/10.1016/0300-9629(84)90429-8

OSTRENSKY, A.; VENTURA, R.; CORRÊA, A. M. A.; SANTOS, G. V.; CASTILHO-WESTPHAL, G. G. Improving production of soft-shelled swimming crabs: macroscopic signs of molting as a tool for selection and management of *Callinectes danae* and *Callinectes exasperatus* (Portunidae, Decapoda, Crustacea). **Archives of Veterinary Science**, 20, n. 2, p. 122-131, 2015. 10.5380/avs.v20i2.39855

PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D.; BARRACCO, M. A. Defesas Antivirais em Crustáceos: Estado da Arte. *In*: MARINGÁ (Ed.). **Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos**. Maringá - PR: Massoni, 2012. v. 1, cap. 14, p. 315-354.

RABY, G. D.; DONALDSON, M. R.; HINCH, S. G.; PATTERSON, D. A.; LOTTO, A. G.; ROBICHAUD, D.; ENGLISH, K. K.; WILLMORE, W. G.; FARRELL, A. P.; DAVIS, M. W.; COOKE, S. J. Validation of reflex indicators for measuring vitality and predicting the delayed mortality of wild coho salmon bycatch released from fishing gears. **Journal of Applied Ecology**, 49, n. 1, p. 90-98, 2012. 10.1111/j.1365-2664.2011.02073.x

RODRIGUEZ-EZPELETA, N.; TEIJEIRO, S.; FORGET, L.; BURGER, G.; LANG, B. Construction of cDNA Libraries: Focus on Protists and Fungi. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, 533, p. 33-47, 2009. 10.1007/978-1-60327-136-3_3

ROSAS, C.; MARTINEZ, E.; GAXIOLA, G.; BRITO, R.; SÁNCHEZ, A.; SOTO, L. A. The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* (Linnaeus) juveniles. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 234, n. 1, p. 41-57, 1999. https://doi.org/10.1016/S0022-0981(98)00139-7

ROSAS, C.; VANEGAS, C.; ALCARAZ, G.; DÍAZ, F. Effect of eyestalk ablation on oxygen consumption of *Callinectes similis* exposed to salinity changes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, 100, n. 1, p. 75-80, 1991. https://doi.org/10.1016/0300-9629(91)90186-G

SAVAGE, C. E.; JONES, R. C. The survival of avian reoviruses on materials associated with the poultry house environment. **Avian Pathology,** 32, n. 4, p. 419-425, 2003.

SHIELDS, J. D.; OVERSTREET, R. M. The Blue Crab: Diseases, Parasites, and Other Symbionts. **The Blue Crab: Diseases, Parasites and Other Symbionts**, p. 119-119, 2003.

SONG, Y. L.; YU, C. I.; LIEN, T. W.; HUANG, C. C.; LIN, M. N. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. **Fish and Shellfish Immunology**, 14, n. 4, p. 317-331, 2003. 10.1006/fsim.2002.0440

SPAARGAREN, D. H. The ammonium excretion of the shore crab, *Carcinus maenas*, in relation to environmental osmotic conditions. **Netherlands Journal of Sea Research**, 15, n. 2, p. 273-283, 1982. https://doi.org/10.1016/0077-7579(82)90008-4

SPITZNAGEL, M. I. **Mortality and reovirus infection in soft-shell blue crab (*Callinectes sapidus*) aquaculture**. Dissertação de mestrado, University of Maryland, Baltimore, Maryland, 2019. - Disponível em: https://sci-hub.st/https://drum.lib.umd.edu/handle/1903/22183.

SPITZNAGEL, M. I.; SMALL, H. J.; LIVELY, J. A.; SHIELDS, J. D.; SCHOTT, E. J. Investigating risk factors for mortality and reovirus infection in aquaculture production of soft-shell blue crabs (*Callinectes sapidus*). **Aquaculture**, 502, p. 289-295, 2019.

STONER, A. W. Assessing stress and predicting mortality in economically significant crustaceans. **Reviews in Fisheries Science**, 20, n. 3, p. 111-135, 2012. 10.1080/10641262.2012.689025

TAVARES, C. P. S.; SILVA, U. A. T.; PEREIRA, L. A.; OSTRENSKY, A. Systems and techniques used in the culture of soft-shell swimming crabs. **Reviews in Aquaculture**, 10, n. 4, p. 913-923, 2018. https://doi.org/10.1111/raq.12207

TOBIAS-QUINITIO, E. J.; LIBUNAO, G. X. S.; PARADO-ESTEPA, F. D.; CALPE, A. T. **Soft-shell crab production using hatchery-reared mud crab**. Tigbauan, Iloilo, Philippines: Southeast Asian Fisheries Development (SEAFDEC), 2015. 25 p.

TOWLE, D. W.; BURNETT, L. Osmoregulatory, digestive, and respiratory physiology. *In*, V. S. Kennedy, L. E. Cronin (eds). Biology of the Blue Crab Chapter: 9, Publisher: Maryland Sea Grant. p. 419-449, 2007.

VERDOUW, H.; VAN ECHTELD, C. J. A.; DEKKERS, E. M. J. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. **Water Research**, 12, n. 6, p. 399-402, 1978. https://doi.org/10.1016/0043-1354(78)90107-0

VILLARREAL, H.; HINOJOSA, P.; NARANJO, J. Effect of temperature and salinity on the oxygen consumption of laboratory produced *Penaeus vannamei* postlarvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, 108, n. 2, p. 331-336, 1994. https://doi.org/10.1016/0300-9629(94)90103-1

WEIHRAUCH, D.; FEHSENFELD, S.; QUIJADA-RODRIGUEZ, A. Nitrogen excretion in aquatic crustaceans. *In*: Weihrauch D., O'Donnell M. (eds). Acid-base balance and nitrogen excretion in invertebrates. Springer, Cham, p. 1-24, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39617-0_1

WEIHRAUCH, D.; MORRIS, S.; TOWLE, D. W. Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. **The Journal of Experimental Biology**, 207, n. Pt 26, p. 4491-4504, 2004. 10.1242/jeb.01308

WEIHRAUCH, D.; WILKIE, M. P.; WALSH, P. J. Ammonia and urea transporters in gills of fish and aquatic crustaceans. **The Journal of Experimental Biology**, 212, n. 11, p. 1716-1730, 2009. 10.1242/jeb.024851

WEIHRAUCH, D.; ZIEGLER, A.; SIEBERS, D.; TOWLE, D. W. Molecular characterization of V-type H(+)-ATPase (B-subunit) in gills of euryhaline crabs and its physiological role in osmoregulatory ion uptake. **Journal of Experimental Biology**, 204, n. 1, p. 25-37, 2001. 10.1242/jeb.204.1.25

WHITE, K. N.; RATCLIFFE, N. A.; ROSSA, M. The Antibacterial activity of haemocyte clumps in the gills of the shore crab, *Carcinus maenas*. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, 65, n. 4, p. 857-870, 2009. 10.1017/S0025315400019366

WILLIAMS, A. B. The swimming crabs of the genus *Callinectes* (Decapoda: Portunidae). **Fishery Bulletin**, 72, n. 3, 1974.

WILLMER, P.; STONE, G.; JOHNSTON, I. **Environmental physiology of animals**. John Wiley and Sons, p. 768, 2009. 9781444309225.

XIAN, J. A.; ZHANG, X. X.; WANG, D. M.; LI, J. T.; ZHENG, P. H.; LU, Y. P. Various cellular responses of different shrimp haemocyte subpopulations to lipopolysaccharide stimulation. **Fish and Shellfish Immunology**, 69, p. 195-199, 2017. 10.1016/j.fsi.2017.08.025

YOCHUM, N. **Evaluating the Efficacy of Predicting Bycatch Mortality Using Reflex Impairment through an Assessment of Crab Discards**. 2016. Tese de doutorado, Oregon State University, Oregon State University, Corvallis, Oregon. Disponível em: http://hdl.handle.net/1957/59085.

YOCHUM, N.; ROSE, C. S.; HAMMOND, C. F. Evaluating the flexibility of a reflex action mortality predictor to determine bycatch mortality rates: A case study of Tanner crab (*Chionoecetes bairdi*) bycaught in Alaska bottom trawls. **Fisheries Research**, 161, p. 226-234, 2015. https://doi.org/10.1016/j.fishres.2014.07.012

ZHANG, S.; SHI, Z.; ZHANG, J.; BONAMI, J. R. Purification and characterization of a new reovirus from the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. **Journal of Fish Diseases**, 27, n. 12, p. 687-692, 2004.

ZHAO, M.; FLOWERS, E. M.; SCHOTT, E. J. Near-complete sequence of a highly divergent reovirus genome recovered from *Callinectes sapidus*. **Microbiology Resource Announcements**, 10, n. 1, p. e01278-01220, 2021. 10.1128/mra.01278-20

Pergunta 5

Como divulgar para a comunidade não-científica os resultados obtidos durante os estudos?

Investigação de patógenos virais associados à mortandade de siris

NO LITORAL PARANAENSE

Por Camila Prestes dos Santos Tavares

Cultivo de siri-mole

Saiba o que é e como o siri-mole é produzido

Página 3

Patógenos virais

O siri pode ser infectado por diversos vírus que podem causar mortalidade

Página 6

Descobertas no Brasil

Saiba o que os pesquisadores do GIA-UFPR descobriram nos últimos anos

Página 7

Siri-azul do Atlântico: o tesouro do mar

Siris-azuis pescados na baía de Chesapeake, EUA
FONTE: Keviikev

O siri-azul, também chamado de siri-mirim ou siri-açú, são crustáceos que pertencem ao Gênero *Callinectes.* Este nome científico representa muito bem as características do siri: "*calli*" é grego para "*bonito*" e "*nectes*" para "*nadador*".

Estes animais vivem principalmente em manguezais e em zonas costeiras com até 75 metros de profundidade. São encontrados desde o Atlântico Norte, na costa dos Estados Unidos, até o sul da América, na costa do Uruguai. Nessas regiões, os siris-azuis são considerados importantes recursos da pesca, servindo como fonte de renda e alimento para muitas comunidades.

Página 1

A PESCA DO SIRI-AZUL

Uma atividade de importância econômica e sociocultural

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) cerca de 2 milhões de toneladas de siris foram pescados em todo o mundo entre 2010 e 2018. Diversos siris são altamente valorizados como espécies para a aquicultura. Cerca de 1,2 milhões de toneladas desses organismos foram produzidas no mundo, com um aumento na produção de cerca de 34% nos últimos 10 anos e gerando um valor global de produção estimado, em 2019, em 12 milhões de dólares.

No Brasil, uma das espécies de siris mais capturadas, principalmente como pesca acessória na pesca de arrasto de camarão, é o *Callinectes danae*. A espécie também é considerada a mais abundante na América do Sul. Este siri-azul possui largura da carapaça de até 12 centímetros, uma característica que atrai a sua pesca nos estuários, servindo como fonte de renda e alimentar para comunidade de pescadores artesanais no Paraná.

Pesca de siri na baía de Paranaguá, PR

Pesca de siri por arrasto em Pontal do Paraná, PR

CULTIVO DE SIRI-MOLE NO BRASIL

Mas, afinal, o que é siri-mole?

Como todos os demais crustáceos, estes animais trocam seu esqueleto externo, chamado de exoesqueleto, para poder crescer e se reproduzir. Nesse processo, conhecido como ecdise ou muda, o exoesqueleto duro é substituído por um novo, flexível e macio. Nesse momento, o animal é chamado de "siri-mole", podendo ser comido inteiramente, sem a necessidade de retirar a carne de seu exoesqueleto.

Siri logo após o processo de muda

Siri-mole frito
FONTE: Cookpad Inc.

O siri-mole apresenta grande valor gastronômico e costuma atingir elevados valores no mercado internacional, apresentando-se como uma das formas mais lucrativas de comercialização de siris.

O valor de venda atual da carne do siri no mercado brasileiro gira em torno de R$ 30,00/kg, porém, se comercializado como siri-mole, pode ser vendido inteiro por pelo menos R$ 100,00/kg, o que indica a potencialidade comercial desse produto.

Siri-mole assado
FONTE: The Hungry Excavator

Página 3

CULTIVO DE SIRI-MOLE NO BRASIL

E como o siri-mole é produzido?

As técnicas de obtenção do siri-mole são baseadas na pesca dos siris que estão próximos do processo de muda e na sua manutenção em cultivo, até o momento da muda.

sinal de muda no quinto par de pereiópodo

O cultivo é feito principalmente em tanques, onde a água é continuamente tratada e reutilizada, constituindo um "sistema fechado". Embora a cadeia produtiva de siri-mole no Brasil seja ainda pequena e em desenvolvimento, é considerada uma atividade multimilionária no leste dos Estados Unidos, que rendeu cerca de U$ 27 milhões entre 2010 e 2015.

Instalações de cultivo de siri-mole em Deal island, EUA.

O PROBLEMA

A alta taxa de mortalidade que afeta os siris cultivados

Não raro, porém, são registradas taxas de mortalidades nas instalações de cultivo de siri-mole, que podem afetar 50% ou mais dos animais mantidos em cativeiro, representando significativa perda de tempo, materiais e atividade laboral, o que pode comprometer até mesmo a própria viabilidade financeira dos empreendimentos. As principais causas de mortalidade de animais utilizados durante o processo produtivo de siris-moles estão associadas a fatores como:

Os siris podem ser infectados e mortos por diversos microrganismos patogênicos, porém, são os patógenos virais o principal grupo de agentes infeciosos limitantes para a sobrevivência de siris e para o sucesso de seu cultivo em escala comercial.

Dados gerados em diferentes estados norte-americanos sugerem que a mortalidade de siris, causadas por um único agente viral em instalações de produção de siri-mole, pode causar perdas econômicas de mais de 2 milhões de dólares.

PATÓGENOS VIRAIS

Conheça os vírus que já foram detectados em siris no mundo

Já foram registrados cerca de oito espécies de virus em siris-azuis, seis são letais e três são encontradas simultaneamente com outros virus.

Espécie viral	Abreviação	Mortalidade		Principal efeito que causa no siri	Espécie de siri afetado
Callinectes sapidus Reovirus virus 1	CsRV1	SIM		Causa lentidão, tremores e, eventualmente paralisia total	*C. sapidus*
Rhabdo-like virus A	RhVA	SIM		Coinfecção de RhVA e CsRV1 causam paralisia	*C. sapidus*
Rhabdo-like virus B	RhVB		NÃO		*C. sapidus*
Virus da Baia de Chesapeake	CBV	SIM		cegueira e natação de forma desorientada	*C. sapidus*
Bi-facies Virus	BFV	SIM		Lentidão e hemolinfa leitosa e coagula inadequadamente	*C. sapidus*
Baculovirus A	Baculo-A		NÃO		*C. sapidus*
Baculovirus B	Baculo-B	SIM		Lentidão	*C. sapidus*
White Spot Syndrome Virus	WSSV	SIM		Fraqueza, letargia, desprendimento das apêndice, atraso na coagulação e hemolinfa amarelada.	*C. sapidus, C. arcuatus e C. danae*

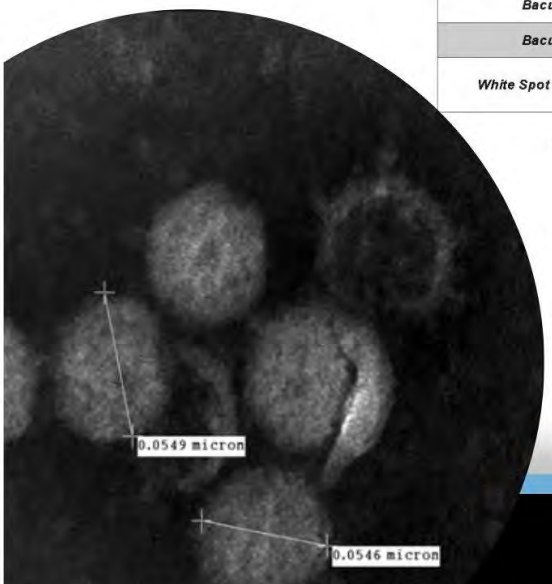


Imagem de partículas de CsRV1 por microscopia eletrônica
FONTE: Dr. Eric Schott

CsRV1 é frequentemente associado a episódios de elevada e rápida mortalidade de siri-azul em cultivo. Há registros de alta prevalência de CsRV1 nos animais mortos em sistemas de produção de siri-mole e também em animais selvagens nos estuários da costa atlântica dos EUA e no Rio Grande do Sul, Brasil

DESCOBERTAS NO BRASIL

Detecção de novos vírus em siris-azuis do Paraná

O GIA

durante investigações sobre os possíveis patógenos virais que causam mortalidade em siris-azuis em cultivo no litoral paranaense, descobriram novos vírus infectando o siri *Callinectes danae.*

Procedimento de análise molecular para detecção de patógenos virais

Durante um episódio de alta mortalidade de siris mantidos em cultivo no Paraná, foi detectada por meio de técnicas moleculares a presença de um reovírus que foi, denominado como CsRV2.

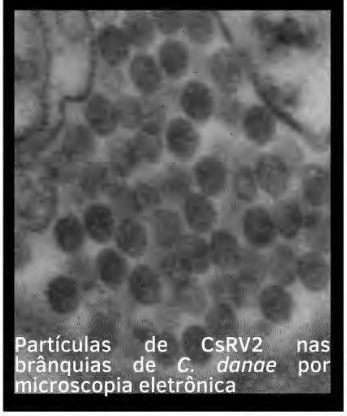
Coleta de amostra (hemolinfa)

O CsRV2 foi detectado durante uma pesquisa em parceria com um instituto de pesquisa norte-americano, o Institute of Marine and Environmental Technology (IMET).

Dr. Eric Schott (IMET)

CsRV2

O Callinectes sapidus Reovirus 2 (CsRV2). é um vírus de fita dupla de RNA, pertencente a Família Reoviridae. com partículas virais de simetria icosaédrica com diâmetro de cerca de 60 nm. Durante a infeção, o vírus forma matrizes paracristalinas no citoplasma dos hemócitos e células do tecido conjuntivo das brânquias e hepatopâncreas. Também causa alterações histológicas branquiais fisiológicas e comportamentais significativas em C. danae,



Partículas de CsRV2 nas brânquias de *C. danae* por microscopia eletrônica

Página 7

DESCOBERTAS NO BRASIL

Detecção de novos vírus em siris-azuis do Paraná

Para a surpresa da equipe do GIA, após o sequenciamento genético de amostras teciduais de siris infectados com CsRV2, também foi detectado mais um novo vírus, nomeado de CdPBV1.

As surpresas não pararam por aí. Recentemente, a equipe do GIA realizou um ensaio experimental de infecção experimental de CsRV2 e CdPBV1 em *C. danae* por injeção intramuscular.

Injeção experimental de patógenos virais em *C. danae*

O ensaio revelou que os siris que estavam infectados somente com CsRV2, apenas 9% morreram. Enquanto, os siris que estavam coinfectados com CsRV2 e CdPBV1, 70% morreram após duas semanas de cultivo. Os pesquisadores chegaram a conclusão que as mortes de siris em sistemas de cultivo de siri-mole no Paraná estão relacionadas a presença destes dois novos vírus.

CdPBV1

O Callinectes danae Portunibunyavirus 1 (CdPBV1) é um vírus de fita simples de RNA, pertencente a Ordem Bunyavirales e a Família Cruliviridae. o bunyavírus possui partículas virais maiores que de CsRV2, com diâmetro de cerca de 100 nm. Assim como CsRV2, o CdPBV1 também infecta o citoplasma das células das brânquias, músculo e hepatopâncreas de C. danae.

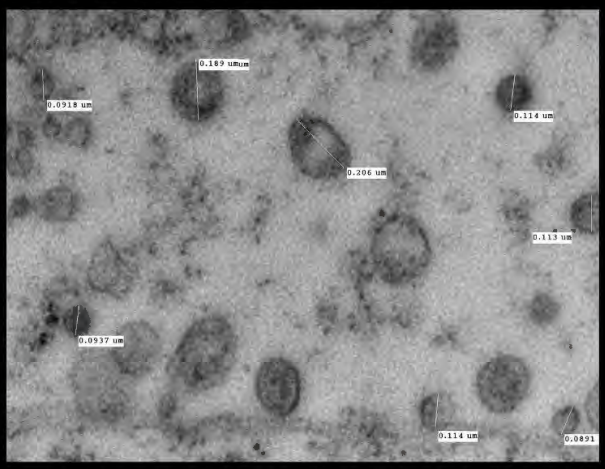


Imagem de partículas de CdPBV1 no hepatopâncreas de *C. danae* por microscopia eletrônica

PRÓXIMOS PASSOS

O que essas descobertas podem significar no futuro?

Imagem do procedimento de coleta de tecido para análise de patógenos virais em laboratório

As descobertas do novo reovírus CsRV2 e do bunyavírus CdPBV1 elucidaram a principal pergunta sobre a causa de mortalidade de siris em cultivo no litoral do Paraná. Esses resultados abriram um leque de oportunidades de pesquisas científicas, principalmente sobre o impacto desses patógenos virais nas populações de siris do ambiente natural.

Por meio de um estudo mais aprofundado sobre a prevalência, transmissão e distribuição geográfica de CsRV2 e CdPBV1, ficará claro qual papel eles desempenham na mortalidade natural dos siris e beneficiará tanto a indústria da pesca de siris como do cultivo de siri-mole em todo o Brasil.

Página 9

EQUIPE

Conheça os pesquisadores por trás dessas descobertas

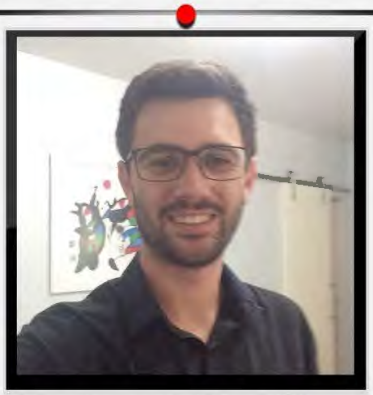
MSc. Camila Tavares

Dr. Antonio Ostrensky

Dr. Eric Schott
Dra. AnaPaula Vinagre
MSc. Mingli Zhao

Dr. Ubiratan A. T. Silva

Dra. Gisela G. Castilho



Dr. Samuel Cibulski

Equipe do GIA

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS
Universidade Federal do Paraná (UFPR)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Universidade Federal da Paraíba(UFPB)
University of Maryland, Institute of Marine and Environmental Technology (IMET)

APOIO FINANCEIRO
CNPq
CAPES

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese abordou, em uma sequência lógica e organizada, as etapas envolvidas na descoberta e descrição de dois novos vírus que infectam o siri *C. danae* no litoral paranaense. Os resultados obtidos demostraram que a mortandade de siris em instalações direcionadas à produção de siri-mole no Brasil está fortemente relacionada à presença de dois novos vírus patogênicos, CsRV2 e CdPBV1. Além de apresentar vírus que eram antes desconhecidos pela comunidade científica, esta tese apresentou os efeitos da infecção no hospedeiro utilizando várias abordagens diagnósticas, ampliando consideravelmente o conhecimento sobre mais essa ameça aos empreendimentos aquícolas comerciais.

Este estudo apresentou evidências consistentes de que CsRV2 e CdPBV1 são vírus de RNA pertencentes à família *Reoviridae* e *Cruliviridae* (ordem *Bunyavirales*), respectivamente, que são táxons compostos por vírus que infectam uma ampla gama de hospedeiros, mas ainda pouco estudados em crustáceos. Também mostrou que ambos os vírus podem ser identificados por meio de ferramentas tradicionais de diagnóstico, como a histopatologia e microscopia eletrônica de transmissão, mas também pelas ferramentas modernas para o diagnóstico qualitativo e quantitativo de maior precisão, como o sequenciamento genético de nova geração, eletroforese, RT-qPCR e RT-PCR.

Além disso, usando diferentes abordagens para avaliar a relação da infecção viral por CsRV2 e CdPBV1 e os parâmetros metabólicos, imunológicos e comportamentais, demonstramos que a presença dos patógenos levou os siris ao aumento da necessidade de energia para lidar com o estado de doença (Redução do glicogênio no hepatopâncreas e aumento do consumo de oxigênio), alterações no perfil das células imunocompetentes circulantes (Redução de granulócitos) e mudanças na ação motora (Redução dos reflexos de RAMP). Assim, além das ferramentas moleculares, histológicas e de microscopia eletrônica, também recomendamos o uso desses biomarcadores no rastreamento de

CsRV2 e CdPBV1 nos siris, pois eles podem exibir mudanças em seus padrões de resposta.

A descoberta destes novos patógenos virais pode ser desanimadora para a nascente indústria do siri-mole no Brasil, pois impõem que medidas de biossegurança sejam desenvolvidas e adotadas na atividade. No entanto, reconhecer e compreender a natureza de qualquer ameça é o primeiro passo para enfrentá-la adequadamente. A partir de agora será necessário o estudo e desenvolvimento de novas abordagens para aumentar a sobrevivência dos animais em cultivo. O aumento do conhecimento sobre os métodos de mitigação ou de convivência com os novos patógenos de ocorrência natural no litoral paranaense, CsRV2 e CdPBV1, provavelmente será a principal forma para que a cadeia produtiva de siris-moles atinja um patamar sustentável a longo prazo e se desenvolva em larga escala no Brasil.

ANEXOS

ANEXO 1. Sequência completa do genoma de CsRV2

>CsRV2 Segmento 1
GAGGATGGAGACGTATAGTAGCATTAGGCGTGATTTAGAGCATATGCAAAATGTAGAGGAATTGTTTAGGCAAATTGTTC
CCACCACATATTTTGGAATTGATAAAGTTAAGGATATATATGTGGATGATGCAGGTATAAAGAATATACAAACAAATTTC
ACATTAGGAGAGAATGGTTGCTATCATTTATATATTAGAGGACAAAGGACTCAAAGACCAATATTCTTAGGTTCTCTTGT
TTCAAGAGAGTTTAATGAGTATGTCACACCTGAGTACAAATACCCAAATCTCAGTGCCATTTATGATGATGCACCCGTAT
GGGAGCCTCTTCTTAATATGATTAGTAAATGGTATGATGATGGTTGGACTGTACATAAAAGTGAATCCCCAGCTTATGAT
CCTAATTACATTAAGTGTCTGTCACGTGATGCTGATGAGTATAAGTTTAAGCATAAGTCAGTGAGTGAAGTGGATTATGA
TGCATTTAAGTGGAGTATTAATGTAAGTGATGAACATATGGAGAAGCCTCATATAATAAGAGCTTGGAATATTGACTCTA
TTCCCGAAATTGTTGATGAATTTCCGATGCGTAAGCATTTGATTGATAGGTCCAAGAAAGAGGCATTATTCTATTTCAAT
TATAGGCTGATTCCATATGTTGTTCATAACATTAATAAAGACGATTCAATCTGGAAAGAATGGTTGAGTTACTTCTTGCA
TGGTGATCACTTCAAGCCTGATAGAGGCAGTTATGAGAATTTTGGCTCATTATTAGGTCATAAGCGTTTGGAAGTAGCTC
TGATGTATCACAGTAGGCTTAGTCTGATGCCATTGTCCGACCGAGCTAAGGATGCAATGGAGGAAGGTGCACGTTTTCTC
ATGAAAGATCCAACATACCATACCGCTGTAATGAAGAAGTATAATGGAGTATTAACACAATATGGATTGGCAGAACCTTC
AGAACATAACAGAGGATGGAGCTATGTTGGAATCACTACATCTGATTCTCCTTTAGTGTTAGGCAATAATGTAAATGGTG
CAGATGGGTTTACTGTAATTGATTGGGATGCGGTTGAAGAGGCAAGGGACATAGGGTTAAAATATACACCAAAGCTAGTA
AGGCTACAATTAGATAACATGAAGAAAAGCTCAAGTCCACAAAATTTAATTGACTCATTGATAGGTAATGCTATTGTTAG
TTTGACTGGATTTGCAGGATCTGAGCGGGTAGCTACTGCACTTGACCAATTTGAGAAAGAGGATATTGAGCGGAAGGTTC
CTGATGAGTTGTTCAAGTCAATAAGTGACGTTACTTACGAGATGGTGAGGAGTAGCTTCCAACCACTCGAAAGAGCAAGT
CTTACTCGCAGGGATCGCTTATTGAGATTGTACAACGCTGGGACATCTGCATCATCATCAGCCCCACCTGGGGCTAGGTA
TATACTTAACAAAAGGAGGATATTATATAACACCTTTTTGTCAAAATCTATGGATGTTAAAGATGAATATGCACCATTGT
CATTTACAACAGGTTTGAACTTTAATAATAAGACTGCTAATATCATAACACACCCTGAGAATTATTTCTTATATGATTGG
AGTGATAATCATAGTAGAGTCATTAACTCAGGCTCACGGGAGGTGAGGGGTGGTAGGGCTACACGTATAATCACACCTGA
TCCCCCTTCAAATTACATGTTAATGCTATTGGGAGCTTTAAACATTGTTAGAGATATGGGTAGTCATAGAACTGGATTCT
CAAATTTGGGCATGAATGAGGTTGTGGGATCAAGTTATTTAGATGCTGTGTCTCATGATGCTTTAGCACCTCAGTGTTTA
GCAACATCTAGTTCTAGATCACTTTGCGCGCAAGCTCTGGATTACTCAACTTGGGACAGGCAGCAGGGTGGTAGAATTGC
AGAAGCTAAAGCTGATGGTATAATGAGAGCTGCGAATGAATTGTTCCCAATTGCAGAAACTAGTTTGACTGATATACATA
ATTTACTTGACCTTCCTATGGCTAGCATTCTATACCTCTGGTCTAAATCCATTCAGAGTCATTATAGATATAAAATTGAT
CATACAATTGTATCCGTGGATGCAGTAAGATCTGGTGAGCTCACCACTCAATTTTCTAATCATGTTACCAATCTTGCTGC
ATTAAGGAAATATCATGAAACTTACAATACCATTAAAGTTCCTCAGGGTTACAGGCCAATAGAGATGGCTCAGATTAACA
TAGTCGGAGATGATGTAAATGTCATCTTACGTACTACTGATAGGAAGCCGTTTACCTTGAAGGACATGCAGGCATATCAC
GACCATACTTTTGATAAAGCCAGTGAGTATGAGTTTAGCATATCTAAGAAAAGGTCTATGATGAGTAATGTTGTCACAGA
GCATATTAAGCAGTATTTTAAGATGGGTGATATACTCTTAGATGTCATGTTGAGTAGTATGACTAGTGAGAGGAACACGT
TCAGAGAACAAGGGTATATGAATGGTGTGAATTTGTTGTATGATATAGCTGTGACTATCATGGCTAGGTATGCTCAGAAT
GATAGATTGTTTGATGATATAGTTTCTAATTTACCATTTATGGAAGGAGTGACTTATAGACATGGGACACAGAAATACCA
TTTTCACCCTACACCTTGTCATCTATTGGGGTCAGGTAGTCCTGAAATCCTTCCATCGGCTATTGATTTGAGGACATTTG
CCAGGGTAATCACAGTACTTGGTGACTATGAAAGTGATTTGTATGATGTAATGAGTTCTCTCAACGCCACTTTGCTTTCT
ACCTCTGGAACAACACAATTTGAGAGTCAGGTACGTAAAATTCTTCATGATGAGTTGGGAGATAAAGTAGTATCACCAAT
TTGGAGTACAGTATTCTTTAGGGATGATGAAGAGTATGAGGTGCAAACTAAACATTCAAAACTAACACCAGAGGGACACA
AGGACTATTTGCTAGATAGAATAATCTCAACATTGTCAAACAGGGAGAAATTAATAATGAATAATGCTGACATTATTGAA
AAAATACTTTCTGGCAAGCTAAAGAAAGTCAAGCGTTATTTTAAAGAAGTTAAATTTAATTTGACTCATATTCCAGCAAC
TGGTATACCTGATAGAAAGGTTAATGGTGTTAGTGAACTTAGTAGCCCTTATCGAGCTGCTGATGATGGCATGCGTAGAG
TGCATAAGTGTATTGGATTGTCCAGAAGAAATCTCAAGGTACCTTCAGTTACTGAGAGGATGAGCCAAATGTTGAAGTCC
TTTGGGTTGGTAACGCATGCGGATGCAGCCAAGATTCTTTCAGCAGCAGCAGGTTTGGGAAGAAGTGCAACCCGTTATAA
GCAATTAGGAACTGATCTTGGATTATCTGACATGCACGCATCCAATTTTGCACAACGACTGCCCGCGATGCTAACCAGGT
ATGAAATTGAGAAGGCATCAGGGTCGTTTCAATTTTATGATACGGCAACCAGCACATATGATATCTCTGAGACGAGCATA
AACAATCGCGTGGGTGATGTTACCAATAATCCTATGGCTAAAGTGAATTCGAGCACCACTACGTATTATCGTCTTAGAGG
TATGCTACACTGTGTATATGGTGCTCGGATGGGAATGTCGCTTAAAGCATGAGTTGAATA
>CsRV2 Segmento 2
ATTCGTAGTATGCCGTCGAGACGTACCAAACGAAAATCAATAGCCAACCGTGAAAAAGCAAAGGATATCTCAGGTAAAAA
TGGAAAGGGAGGACAAGGAAAAGGAGACCAAGGAATTGGAACGGGAGTTGGAGCAACAGGCCCGCCCGTCGGTAATGGCA
AGGATGTCAACATATCTTCGGACGCCTATTCGACTAGGTTTCCGTCAAAGGCGATCGACGTGGAGATGGAAAGAGAACCT
GTTCCAAAGGTACCCAATGTCGAGCGAGCAGCTGAAGGCCCGACAAATGAAGGATTCAAAACCAACATAGCCACAAGACG
TGGTTTGGACAAGGTTGTGAATGTTAAGGCAGACAGTGATGATCAGCCAAGTACCTCTAATTTACAGGTTTTGGTTGATT
CATCATATAAGGAAAAGATTCAGCAGCTATCTCACAGTAGAGCGCTGCTTGAGAAGGATGAGATTGGTCCTGAACTGCTG
ATTAGAGCTAACTACCCTACAACAACGCTCACTCAGCTTGAGAATTTGGCTGATGCTGTTATTGAGGCTACTCTATCTGA
GCCAACAACAGTCACTTTTAACAAGCATTTAGCTTATGAGAAATTGCCACTTCCTAACACTAACCTCGAATACTTGGTGA
GTGAGGACCGTGCTTTCATCATTGTCAGGGAGGAGCTGCCTCATATAACAGTTGATATGAATGTTGAGTTAGGTATACAG
ATAAAGGCTGTTGCAACACAGTTAATAGATAAGTCTCTGTTGAATCCTTGTGTATGGGCACCAGCTATGGAAGGAGAGAT
TCACTTTGAAACATCAGGCGTGCTTGTAGCTAGAGAGGGAGCTAACATTGATGAGATCATTAAGATTGAGAGAGCCAGGA

GAAGGGCAACTGGTGATAGCATGGATATAGTGGGTGATGAGTACATTAAATACAAGACTGCACCACATATTCTGTCTGAG
ACTGATGGTAGCTCCAGGACTATACGTATTGACGGGCTGATTCGCAATGACCTACACAATGGAGTGATGGATCAGTGGAA
GCCTGGAATTCGTAGAGTAGCTGAACTTCAAGCTATGTTACTCACTAAAGTACCGGCAGGATATGTGTTCCCAAATTTGA
CTCCTCAGATGCAGAAGTGGTTTTACACCTATCATGATGATCATAGTGTTAGTGTTGGGGCGTTGTTTGATGCATTGCCC
GAAGAGTGCAGTGAGTATTACAGGAATGTTTACTTACAAGCTCTGAGTGGATTAAGAATGATATCAAACAATGTTCTACC
TCTAGCACGCACATTCAGTGCTAAAGCTGGCATAAATATGAATGCCACTACAGCTGGGTCATTACTCACTTCTGCTCTAA
CTGAGAAGCAAGACGTCCTTGTTATTTTACAAACTCTGATGATGTGCTCAGCCTTCAATAACTATAGGATAACATTCCCT
GAGCCTAGGTCTACCACAGTAGTTGAAGCAGTTGCCGCTTGTGTCGTGCTGTTAACCTTTAGTACGCAAAGCATAGATGC
TGAGACGCACCGGGTATTGTTGGGTCATATTCATAGCTTTGTTGTAGGTAGTGTTAATCGACTTACACGCGTGGCACAGA
TGATTCATGATCTGGAGGATAGACGTTGGCCTATCATATATCCCCGTGCTCCATTTGAATTTGTAGCTGAGGGCATTTCA
CCAATGTTGGATGACAACAGGGCAACAATGATGAATGCTATTTTCAACCTGGATCCTGCAAATGCGCGTTTGGCAGTTGA
AGATCTTGTGCTTGAGGTTCAGCGTATTAGATATGCTGACTTTGATGAGACTGTGCGTTTCAAGAGTGCACTGTCACAAT
ATCTCACACAGTATTGCTATGCTATGGCAGATGCTAGTTTGAGCATGCATAGATTTGCAGTTGATTTCAGGTTGAGCGTA
CCGAATGAGCTAAGAGATAGGTTTAAGGCTGACCACTCTCCTGTTATGATATCGCCTAAGAAGATACTTAGCTTTACTGC
TCAATTGAGCGAGCTAATGTATGATAGTACAACCACTCAGGATCTCACTGAGTTTGCCAATGCCAGAAATGATGAATTCT
TGGAACTGGACAAGGATATACAACAGGCACTGAGTTTGATCAAGTCTGCTGATCTTGTTAATGAGACTGTCAGAACTGGA
GCAACTAAGAAGCTGATAGCTGTCGAAAGATTCATCAATAAGAATATGCCACAGGTTTCAAAAGCTATGTCTCAAATTCT
GACTTTGGTAGCTCACTCAGATGATATAAAGTCAGGATATAAAGCTTTGATATCTGTACTCTCTGGAATTGGCGGACCTC
ATCTGAATGAGGAACTGCTCAGAAATCCTATAAACAGGATAAATGAGCACATTGTTAACAACGTTATGGAGAATCTTGAA
GCATATGGTATAACTAGGCAGGTGCTTGTATGTAGAAGGGACAAAGCAGCTCGCTTGCCAGCTGGACTTTTTGAAACTGA
TATAAATGGCCTCCTTTATAAGTCTCCTTTCTTAGTTACCATTCCAACCGGCATTGATAACCTACCATTACAGCGTCTAA
CATACCCTGACTGTCTACTTCGTGGCTTCGCTGTTCTGGCTAAAGATGGTGCTTTCATACTTGATACAAGATGCAATTTT
GAGTATGAGATAATGACTGAGGACTCAGCTGTAACTAGCCATGATCATAAGATTGTATCTGAATCTCAGGGTTTTAAGAT
CACTGAGTTGCGCTGGAGCATTGGTATGGCCAGTATGCACCCTGACGACAATCGTGATAACATCAGTATGATGAATAGCA
ATTTCTTTGCTTTCATCGTCAAACCTCAGAATTTAATGCCCTGGAATGACATACTAAGGCTTGAGGCTGTGACTGAGCAC
ATGCCTAAAGAGATAGTGCCATACGGTAAGGCTTTGACTGCCACACTTATAACCTGAAAAGGCAAATACGAAAGTACTGC
GTGAGAGCGTGTTAAGT
>CsRV2 Segmento 3
TCCCTTCTTCTCATTAATCTTAAAAGTTAATGTGTTGAGCTCTGACAATATCTGTTGAACTATAGTCGTCGCAATGGCGT
CACTCATGGATAGTGCGTCTAAGGTTCAACAGATATTGTCAGAGCTCAACACATTAACTTTTAAGATTAATGAGAAGAAG
GGAAAGTACAAGAATTATGAAGGTAGAGATCACGTTTCGAACGCAGTGTATTATTCACTCGGTGATGGCTACCAGGCAGC
ATTAGATGGGCAGGCTATACACATTAAAGATGCAGAAACTTATATGAGATTTCAGCAGTTGGGATTCAGAACCGATGATC
ATGGTACTGGATTTACTTCTGTACTCAGAGGAATGTTGCCTAAATTGATAAAGGACAGGGGTATAACTGAGGTACAAGGA
GTTGATGCACAGACTATGCGTATCTTAAGTTTGTATGATTTGAGTGGAGTGAGTGTTAAAGATATGTATGTTCCTGTTAC
AGGTCTAAATTTCATAGATGATTTTAGAAAACACTGTGAGAATAGGTTAAGTATGCCTTGGTCCAGGTCCTTGTATGTCA
CATTGAAGAGGTTAGCTAAGTATTATGAAAATTTTGAAAATACATTTGCTGATCTGTCAGGCATAACGCCTACTTTGCTC
CCTAATTTTGAGAAAAGCACTTGTGGTTTTTCGAAAGTTAGAATTGCAAAGTTGGAACCTACCTCTTATGTCCTATTTGG
TCCTCCAGGTATTGGAAAGTCAACCATAGTAAGAGAGATGAATGGATTAGATCTTGAGGGAAATAGACCAATTGAGGATG
CTTATAAACGGAAATATCAGGTTATAGGTGCAGCAGCTTATCAACCAGAAGATTTTGATCCAGTTAGGTTTACCAATGTA
TTATTATATATGGATCAGTCTGGCTATGAGGAAAGGAGAATGAACCGAGATTTACTGAATGTAGCCAAAGCTGATCAACC
ACACATGTATGTAAGTCAGTTCATGCAGGGTGATGGGTATGATCACGTATTATATTCTAGTGTAGATAGTATTAATAATT
TATTGAAAGATACTCAGGTAAAAGAGCTTGAGCTTGAGTGTGAATATCCATGTAAAGCTCCAGCTATCGGATCAGTATTA
GGAGATGGTGTTAAGAAGAATACCATGTCAACAGTAGGTTTAGTTTGTAAGCACAACATGCTTATTACCATAGGTGATAG
TCCTGGACCCCATTACAGAAACTACCCTCATATGATTGGCAATACATACTCATGGGATCCACTGCCACCAGAATATGATA
CTAAGCATGTTTTGGATATATTCACTTATGATGATATCCCAAAACTCATCTCATTAGTGGAAGCGAATGCGGATAAACAG
ATACTGCTACGTATGGATATAAGGGCAGACAGACCGGATCAGCCGCAGGTAACTAAAAATGAGAAGAGTGTGGGTGTCAA
CCGTGGTGTATCACAATCATTTGAGATGAATGTGCATAATGATAATTTATTAATGTCTGCGGTAGCTAGAGCAGTGTGTA
ATTATGACAATTTGAGTTTTTCCATCAAATTACGGCCATCATATTCAGATGAGTTTTCTGGTTACACACTGGATTATGGT
TGTGATGTGCTGTTAATTCCATTGCCTTTCACAGCACCTACTACAATGGAGATGAATGTGGTGAGGTTAAGGTCAGGTAT
CAAAAGGAAGTCAGGTTTAGTGAGGTTCATCTCTTACACTGATTTGATTAAGGCTCAAACTGAGTTTATAGCATTAAAGA
AGCTATGTGCACCACTGTATACACATTTCTTAAGTGATGCTCACTACTCTTTGATGATTGATGAGGATGAATTCAAACCT
GTAAACAACAGCTTTGCCAGTTTCTCTATGTCAAATATCAATAATCCAAGTCCTTATAGCATTATTATACCAAAGAATTT
CTTATATACATACCCATATGGAGTCATTGGTTCTGATGAGACTTATTTTGTTACAAGGAATAGGAAATATAAGGATTATA
CAGTGAGTTTAAAATTTGAGATATTTCATGAGGAGTTGTATGTAACACCGCTTAATGCTATAGGTGGTGGCAGGAATGTA
GGTGTACATGGACGTGACATAACCACTGTTATCGTTTCTGACTTTCCTGTGACTAGCTTTAATCAACCAGTTGGCACTTT
CTCTACTCAAGTTGTCAAGTTAGTTTCAGCTATAATGAAGAAGCGTTTTCCTAAATGGCATGAAACTGATAATTCAATGA
GAGAGATAGCTATGGATAACATCTCCAAGCGCTACAAGAATCTAATAATTAGAGTTGGTGGTGGTGTTGCATTACATAAC
ACTAATGTTATGACATCATCAGGACATGTCATGTATATACTCTTAGGATCATTACTTGGCATACCATATGGGTTCTATAA
GTATTTGAGAGAACTTGAGGTAAACATTCAAAATGAAGATGTTGGATATGAGAGAAAGTCTGGGAGTAGGGTATGGCATG
GATATCTTAGTCATTTGTGCGGCGTTGAAGCTGCACGGCTGGTGGCCAATAGGTTATTTACATTAACCACAGAGCAAATA
GATGTATTTAACATAGCTTGTGCTTTGTTTTCTGGTAGAATAGCTTCATACGCTAATAAACACAGTAGAAAGTACATAGA
TGTTGACGAGACGGATACTATCCATTGAGATGATTGCGTTGCGTGGGTTTGGACACGTAGTTCAAACTGAGGCTTGTCGT
CCTTAACGCGGGGATCATGTCACATTCTCGCGGTTTGGATAAGAGATAGCCCAGTCTAGGCATCTCATGGAGTCTCTTCC

GGAAGCGTCTGTTATCATTAACAGTCGCTTCCGGAAGAGACTCCATGAGATGCCTAGACTGGGCTATCTCTTATCCAAAC
CGCGAGAATGTGACATGATCCCCGCGTTAAGGACGAC
>CsRV2 Segmento 4
GTTGTCATAAGTCCATTCGATACCAACTCAGGATTAAGTGAAGCAGTACCACCTTATGATTATGGATTAGATCCACTCTA
TTCCCCAAGCTCAGGTATATTCGCCAGTCTTTCCTCACCCATCACCAATGCTTATGAACGGAACATGTATGGTTCAATTG
CAATGGCGAGGGCAGAGATTAAGAAGGCGACTAAAGATACTGATGTTTATCGAAAGCAGCTGGAAAATGACCTCAATGAA
ATGTCAATGTACATTAGTTATGATCATGATAAATCAGTCGCTAGTGATAGGGTTTTACATCATCTGGCTGATGCATTACA
TGCAGAAGTTGATAATGAGAATGATCTAGCAGCTGACCTCACATCAGCTATCATTAAGGATGAATCCGCGATGAAGCAGA
TAATTGAGGATACAAGGGTAATCAACGCAGCAGAGAAGGCTGACCTAGCTCTTGAGCAAATTTCGAGTTATGCTTCCATA
GCTCGAGACACTGCTAACCTAGCTGCTGATGCAGCCGAAGTAATACCATTCGGCGCTTCAGCTGCTGGAGTTATAAGAAC
TGGAGCTGATACTGCTGATTTGATTGCTGAGACTGCTACCACTATCAAGCGGTCAGGTATAACACGCACTTTGAGTAATG
TAGTTACTAACCTACACACAGGTGAGTTGTCACCTGTTGACTTACTCACACAGTCAATGGCCGTAGCTAGTGATGTTGAC
AGTTTAGTGAGAGAGTTGAAGACTATCCCACAGAGAAGAGAAAGAAGGATTGACTTAACTTTCGCATCAGCTTCTGATCC
TACCCCAGCTTTACATGACTCTGAGTATTATGCTACTTATGGAGTTGAGGGTGCACCAATGTGTTATGTCGTACGAGACT
CTCGCTCTCCGTATTATGCTCGCATCAAAATTGATCAGTATGGATTGATGTATGAGTTTCTGCGACGTAAAGACGATGGG
ATCAGGATGTCTAATGGGAAAGTTTCGTTGACTGGCTCCAAGAGAAAAATTGCTAATAAATCAGAGATGCACAGTTTAAT
GGCAATTTGTAAGTTGTTTGGTTCATTTAATGGTATATCTTACAATGTTAATACAGTGCGTGGTGTAGTTGAAACTCTTA
TACTAATGGGAACTGTCGTCAGGGAGTCACTTAGCGGTGATACATATGATACTTATGTTAGATATAAGAGTGAACTAGAT
CATGATGAAACTGAGCGCTCTGACCATACTGAAATGATAACTCATTTAAAGAGCCAGAGGAACGCTTGGAAGCTAGCCAA
CGCTGATAGAGTTGATCTAATACCCAAAGACTCTAGAACTGACTTTATTCATCAGATGCGTGCAGCTCATCTAAAGCTAC
TTTTTGTGGAAGCTAATGATTATAGAGTCCTTGGTTGTAGGTATGGTCCAGTTTCCAAGCCAGGCACTCTCAAAATTGCT
TTCATGATAGGAGGGTGTTCCAACAATGAGAGAGCAGTGGTACAGATGGCTACGCAACAGAAGAACTTTGTTGTTGTTGT
GCAAAATGAGAACATCAGTATGCGTCCATTCCCCATAACTAATGATGGTGGATTAAAGGTGTCTGGCGGCGACATGATTT
TTATCAGGATGTATGTTAAACCAGACATGAATCCTCGTCTTTACATGCAATTGGTTAGTAACACGGATGGTTCTGATGTA
CCAGTTGTTGGTGATAACCATCACCCTGATGTTCAATTTGATAGACCATACAAACATAGGTACATGGAGATGCCTGCAGT
TATAACAAATGAAACTGTTTCCTATGGTGCTTATGAGTGGTCTGATTACAATGCACCTAATTGGACGCTTGTACCTGATG
ATGCTTCTTAGATGAAGGTATCGATTCTTGTGACGCCGCAGCGGCAGAGTCTCTGACATTGCTGTCTGCCGTGTGTCGCG
ACGCATTACAAA
>CsRV2 Segmento 5
TTTGATGAAGCATCAAATTGTGATGGCTAATGTTAGAGGATGCTTTCAAAATCAGTGTGATTTAAAGGGTATCAATCACT
CAGTTGCAGTTGATAGAATAGAAGGGGGTTTTCGCTGTACTGTGATATTTTGTGGAAATAGTGTTAGCGGTGAAGGTAGA
CGTAAGAAAGAGGCAGAAGCTGCAGCTTTCAACGACGCACTCGCGCTGTTGGTAAGTGAGTTAGGTTATTCTGAAAGACA
GGGCTGCCCACACCTTACTGCCTTAGTAGATAACATAGGTGCAAATCTGCTTCCATTCGCTGTGTTTGAAAGTGAGTTGT
GTACATTAAGCAGTGACGTTGCTACATTGTATTCAATTCTCTTCAACTCGATTACTTCAGGGCATTTTGCTGAGTACGCT
GAGTTTAAGAGAATATTGAAGACTCGTGGCTACGAAGCGCATCAGAATGGAAGCGGTTGCATCAATGTATGGAAACGTGG
TTAGGCCGGCAAGCAGCTGGGATGTCATGCCTGATCATGCTCTGTGGGAATTCACTATCTCAGACTTGAGTAGGTACACC
GCACTGACACCTTATGTTGATAGGATGAAAGGGTTGAAAGATAACATCTGTGTGTATGTAGCTGTGACAGTCGTCGAATC
TGATTCTGATGACATCAAAGAGATATTCAGGTGTCCGTGTGGTGTACATCGCGAGTTGATCATCTGCGTAAGCGAAAGAC
TGCAGGTTTATACTGATCACATCAGCACATCTGTGTCTAGAATTATAAGAAAAGAGATCACGGTAGGTAACTTCAACATC
CATCATCTGATCGCTCATTGCGCGTATTGCGATGAACCTGTACGTGAGAGTAGAGTTGTAACTGACAGAGTGTATGATGT
GAGAAGACACCTGGCGCATGAACTCAAGGTTGATGATGGAGTAAGGTTGTGTTATTGTAATAAGAGTAACGCCTGCAGGT
GCTACCTTGAGGAGTCAGTTGGTTTTGGTTGTTGTGTCCCTATGTTGTATGCCTCAGAGGGCCATAATGCTGGTCATAGT
ACATGGTGTAATCGTTGTGAATATCCACGATTTTGTACTACTCCAATAGTTAATCACAATATTGCTGACACCTTGTTGAA
TGCGAGGAATGGCGGTACTGCTGAAGTACCATTTAGACATGAGTACAATGTAGTACCACTCAGGATGATGCCAGTTCTGT
CTCGCATACTGCAAAAGTGTCTCTCAGTCATAGGTGTAAGAAGAACTGTATACCTACAAAGTGGATGTGATCATGATGGA
GCATTAATGTGCGCCTGTGACAGTGGTGACGTACTTACTGACACTGTGTTCGTGGACACCTGTATCACATACTCTATGGC
AATGTGGCTTAGAAGTGCGTTGGCTTCGCGTGGCATAACATTGGTTACTGAGTGTATTATGTGCAGCAAGACCCACTTAT
GCCCTGAAAGAGAGATGAATGCATTACATGAATATGGGGATATTTGTGTAGGACTGAGTAAGAACTCTGTATGTATACAG
GGCACTGAGCAGGTACAGGATAGGCAACAGGCTGACTTGATACTACATGGATAAATGTCTAATGTATTGAGCAACCTCTA
GCAAATCTCTTGGTGAGCGCTCGCGGCTGCTCACTGAGGGGGCCATCTGTGACGCTGTTAAAGCGTCCTTTTGGTGTG
>CsRV2 Segmento 6
CAACACGCTGCTAAGTTTCGAACAGTTCAGTGCTCTAAGTGTTTGTGATCAGTATCTGAACTATGTGAGAGAGTATAATG
CTAAGGTAGAAGCTAAGGCTAGTTTAGCATCTGCAGAGCAGTATGGGTTAACCCGTACTCGTAAGGTTAGGAGAGGGCTT
GAATTACCACAGGGATTCAATGATTTGGAAAGGTTTGATCAAGGTATGATCATTGTTATGCTTCGTCAGGTTGAGAAGGC
TAAGGCACGTAATGCTCCAGATTTGAATGACTTGTTGTATAATTTAAGGCAAGAGTGCAGTGCTAAGCGTATGTCATTTG
ACAACTTAAAGGTTTTTACATCTGATGATCTGATTACTGCTACATTAAACCCATTGAGCAGGATTGATCTTTGTAAGTAT
TATGCTTTAATGGTTGATCTACTTTCTGAGGTTACACCAATAGAGCATAAGACTTTGAAGACTATGCCACTGGTTACAAA
TGACATACCAACACCATTAGACAATGTCACTGTTGCACATCATGAGATAGGTCAGGTGATTGAGACTAGATACCATAAAC
ATTCGGCATCATTCTCATCACTTAGTGAATTACATAAGCTTCAACATCTGGACGTTATGAATGATGAGTTGGCAGTTTAC
AATCTTGGAGTGGCTGGTAATATGTTTGACTGTATGTTCATTGATGATAATGGTAAGACTGTATCTTGTTCAAGCTTAAG
TAATTGGAATGGTGGTGTCTCTTTCTGCTCATTGATGCCTAGAATGACATCCAAAGATGAAGTTCACACAATAGTGCGAA
GATTAGCTGGTTTACCAACTAATGCGCGACTATGCAGAGATAGTGATGTGACTCACGTTAGGTATCATGTGGGAAGAGCG
ATCACTTACATTCTCTCCAAGTATGCTATCTCTTCTTGGAGTATTGGGTTTGATGAGATTGGTGCTCCTACCTTTCACTT

CAATGCTGTACGTGATGATAGACCAATACCAAGTACATGCTGTGCAAGGCCAAAACCTGTTAAGGAGCAAAAGAGGATTG
ACAACAACATGGGTAAAAGACATTACCATACGTGGAGAATGCTCGGCGATGCAACTGGGAATACCTCAACACCTGTAGAT
TGTACTGTGCGTGGACGTAAGACCAAGAGTAGCAAAAAGAATACAGATTGCATGCCACGTAAGTACCGTATAACTAAGGC
GATTACAACATGCACGGCACAGGTCCTACAGTATGATGAGATACGTAAACCTTCGGATGCACAGCTCTCTACTGTAACAT
CGGGGTATGCTCAATCACCAACCACCTTTTCACTTGATGATAACGCAGAGTATCCACCACTTGGCGTTCAGATTATAAGT
GATGCTTTCTCCGGTATGAGTTGTTGGTCTCCATAATTACATCACCACGCTTTTGGATAACACCGATGCTCTCGATGAAT
GGTGGGACTGTATCATATATACATGACTGAGCACAGACCATGGCTAAGGGGTAAGGAGTGCAACTCTCCCCCCCTGAGTC
ATGAGACTTTGCAGCCGGACCCTAAGAACTAACAGATTCTATGGACTTCCCGCTGTCGCGTAGCCATATGGTCTGTGCTC
AGTCATGTATATATGATACAGTCCCACC
>CsRV2 Segmento 7
ATACGCAGTATAAGACTAATCTTGCTGCTTATTGCCTCATTGACTCTGAAGTATCCTACCTACTAAATTTGAGGATGTGA
AATCCGAMAGCCGGATATCCAGCATCGGTCCATCCTTAGAATTCACCCTGGTCCGATGTTGGATATCCGGCTGTCGGATT
TCACAACATTATCTGAAAGGAATGTGCTATTGGAGTATGAACCATTAGTCAACAACATCAGGTATGCTCTTTATCCTAGA
CTAATCAATGCTCTGAGGGCTGTGTATGGTAACATCGACCATAAGCGTGCACTTGCTAGAATTGTAGGTCACATGCATGA
TTATAACATCATACCTCGTGGACTTGAACAGCTGCTTCAATACTTGACTCATGGTATACAGGTAGGTGGTGAACTAGTGC
AGTACAATGCAGAGAAGAACATTAACGAAGCTACCTACAAAATTCTGTTTGGAATATTCAAACGCAATGAAGGGCAGTTA
GTAGATGATAGACACCAGCGGTGTTATAAGTATTTTTCCGATAAGGATGGATTCTTATACACACCTATGTATACCGTGAT
GCCTGCTGAAGTAGCTGCTGAGTATCAAAAGGGTAAGATTAAAGTCAGGTCAGAGAGGTTGGGTAGGGGTAAGACTCTTG
CTTACTGTTATACTCATGATGGTAGTTATGACTTTTACATTGATGATACGCAGTATAAGACTAATCTTGCTGCTTATTGC
CTCATTGACTCTGAAGTATCCTACCTACTAAATTTGAGGAGGGATAAGAATAAAGCTAAGCTCAGGGTTCATAAGCTATG
CTACTTCATGTTCAGTGCATCTAATAAGAAGAGGAGTAACACACAGTTTGTGACTGACGTGGTATTTGAGCATGCACGTG
TGCATTACAACAGAGGTGATGATGTTACTTTCAGTATGCCACATCTTAATATAGCTGAGAATGAGGTAGTTAGCAGGAGC
AAGATGACTAGCATGCTGTTGAAGTATTACATCGCTCATCTGTACGGATTGGGAGAGCCTTGTCCTAGTTGTGATCTGAG
GATCATCGGCAAGCTGCCGAACTCATTGAACATTCCTTCTGCTGAGTTTCCTCTTACGTTGAGTCAAAGGCGTCAAGCTA
ATGAAATGCGTAATAACAGGGATCTCGAAGACAATGATGATAATGAGGAGGATTCTTCAGATGATGAAGCAGCTGACAGG
GCGGAGAGACTGGCTAACGCAACTACTTGCTTAGCTGAAAGTACAAGAAGTAAGTATATTCCTCTTGGACCTGGAGCCTC
TCCCGTACGTAGAGATTGTGCATACATGGAATTGAGTGATCGTCATGCATCAACAATGAAACAACTATCAAATGATGATG
ACGGAGCATATGAAGCTACAAATCTTGTGCAGAATGCTGTTGACGTCAGTAAGTCACCAATGGGTAATGATAATGGTGCT
GAGAACTGGTATTAGTCGATAGCTGAGTCCAGTACCATCTTTAGTTACACACCTGCGAGTGTGTCCGGTTGGTTGCAGCA
AAACCCACCG
>CsRV2 Segmento 8
GTGATGGCATTGGCTAAGGATAACGTTGACTATATTAAAGGAGGAACCGGCACTGTAAGATGCATTGCTGGAGTACAAAT
ACTTAGATTTAGATATAGTGACTCTGATCCTGTTATTGATTTACCATTACCGGGTAGTAACCGAGTGGATGCAATTGCAG
TTTTGGTTAATTCAATGAGGCTGTCACTCATTGATTATGATGGTAAATACAGGTCAGAGATACTAACTATGATGAAGAGA
ATTGGCACATCATCAACATTCAAGGTGGGCAGGAGATACCAACCATTGTACATGAAGAAACTCAGGTTTGATGAGGATCA
CCCATATGTGCACAGTCATCATGCAGCTGTGGTTAAGTGTCGTGGATTATTAAGGTTTGATGGATTGGATGACAGCATGT
TGATAATGGAGAGATGTAAGCCCTTGAGACCTGAGGATGTCACCATGCATGCTATTCTCTCCTTTATTAGTAGATTGAAG
ATGATGCACGCTAATGGTGTAGTGCATGAGGATGTAAGACCTGATAATCTCATGCTTTCTAACGATGATGAAATAGTACT
GGTTGATCCTGAGATAGTGGTAGGAGCTAAAGTACAGAATAGGAGTGTGCATTATCTGAACATAGTTGGTGATAACGCAA
GGTTGAAAACTTTGAAAGAACGTATGGCTCTTGATGTGCAACTAGCATTGCAAAGCTTTTTACAGATAAGATATAAAGAG
AATTTCAGTGATTTTATGTACTACAATGGTGAACTGTTGGACAATAGACCTGAGGTTGTGCATGAGGATGAATTTTTCTG
CACTGATTGGCAAATGTTCACCGAATTTCAAAGTTGTGATGAATTCCTCACTTCTCTATTCGCTCACAGTACGCGCAAAA
TGTTGTTAAAAAGTGCTTTTAACGATGATGAGGATACTGATAGCAGCGAATATGATGATGAGGAAGATGTGTCATTTGAT
GTTAGTAATAGATCATTTTTAGTTGATGAGTCATAAAATGTGATAATGGTCAATGTGTCCTAAGCCATGTCAACGGCGTG
GCTGCCAGACCACGACGTATGGGCTTGTTCCCGCCCGTAAAGATCGACTCTGGGGGGGTATGGCTTACC
>CsRV2 Segmento 9
TTCTGACACTTCGCGTATCAATCGTGCATTCAATTGTTCCTGTATATATCTGCAGAAAGCATGAATGCCAACGATCAAGG
TATACATGTTGATTTGTCTTTTGTTATACCCCAATTGTAATGTAATCAGGAAAGGAACATTCAGCTGCGGTCACTGGTGT
CATCGCTAGCTGGGATGAAGTGTGTGCGTCAGCATCCAGCTGAGGTGATTCCTCGTGCGATGGTGTTTCGAATTGAGAGT
TTCAGAGATTTGGCTTGCCATTATCTGCAATTTGGATCACCACCGCTGAAGAATTACTTCATAGCCATTACTTTTGAGTT
TGATTTGTTTAGTGGGGTGCACCCTGGTGCATTCTGCCTTTCAGTCAGGCGCGGAAGTAGGATGACGGCATACACATTTC
ATCCCAACGACGGTGATTTTGTGAAGTATGTCAAAGATCAGATCAAGGTTGATGATGAGCTCAACTTCCGCGTGATGGAG
GGCTCAGATGCTACCATCCACTACTTTCCCGTCAAGCCTAAACTGCCTGTGAACAAGCCCATCCTGTTCTTCGCGCACTC
TGAGCTTGAGTCTGATCTCTTTGTCATGTTCACTGCTGCCAGTTTGGCCTATTACCAGTATCCCAAAGCTGGATATCCGT
TGGAGGGAGCTGATGATTTTTAAGATGTAATGTTGTAATAAAGGTCCGTTTCAAGTAATTAGCATTCAAAATTAATTAAA
TTATTTAAATTCTGAGTAATGTAAATTTGTCACTTCCCCTTAATAATTCACTCTTGCTAGTTCCCATAATTAAAGTAAAG
TAAAGTAATTCAACAATATTTAACATGCTTCACATCGTTAAATACATGTTGACTTTGTCTTTTGTTATACCCCAATTGTA
ATGTAATCAGGAAAACATTTGATTGCACATTGGCACTGCGAAACCATTGGTAAACCCTGCTCTGCACACCGAGCAGGGGT
ATGTTCGCACTTCGTCGCACCGCGGGTGGACGTCGTTAGCGGGCAGCGCCTTTGGGTCACGAAATTGGATACAGACCTTT
ATTACAACATTACAT
>CsRV2 Segmento 10
CCAACTACAATCGTCTTCGCTCGTTGCGATGTGCAGGCGTATCGTTTCGGCCGTTCACTTGGCTTTTATGCTAATGAGTT
TATTAAGCTTAGTGGAATGCCGAACACAAGCGAATCTGCGGTACGGACAGCTAGTTATAATCTAACAAATGAGTATTTGA

CTGTGAAGTACAGATCATTATCCAAAGCACCACTTAATATCCTCACTTCAGTGATTGCTTCCATTGTCAGTCAGAACGCT
GGACCAACAGACCCAGCTTTAGTCTTATCATATATCAAAGGAAATTTTACTAGACTACAATATCCGGAAATGATTGCTGC
TGTTAAGGGTACGGCGGGTAGCTTTACACTAGTTAATAACATCTGGCTATCTGGTGGTGATGGTGAGGCAGTATATGAGG
GTTTGATTAACCAACCAGCTGCAGTAACTGTAACAATGCTTAGCAATGAGAATATGTGGGTTACCTCAGATAGGGGAAAC
ATCAACATCGATGGTATTGGAGCGGCAGCTAGAGACTTCAACATGTCAATACCATTTACTGCCAGATTGCCAGCTGGTCC
TGTCAAAATACGTATGCAGGCTACGTGCTACTTACCATTTGACGCTGATTTGTTGGATGATGCTAGGTTGGGTTATACCC
GATTCAGGAAATATGCTCTTGCTACTCTTGGTGGTCAATTCTATCTACCATACAGTCTTGACATGCTAATTGTAGCCGCA
TACAAGCAGAACGCTTTTGAAAGAAACGTTCCTGCAATTTTAGTATCACTATTCTCGGCGTACGAGTTGGTGTCCAGATG
TTATTGAGCTCAGACGGTTCGGGGTGTGCTACGGGAATTCCTGAAGTTCCCGTAGCGAACCGAGTAAGGTCAGTAACAAA
TGGACACCAAC

>CsRV2 Segmento 11

TTAAATCTTTAGTTCTAGATTGTTTGGCAGCCACACCCAATAGTAGGACAAATTATGTTATATCTCCACCTAGCAATGCA
AAGATGTTTGACAGTTGGGGGATAATCGAAATGGGCAATTATTCAGTTGATGTGAATAACACAACGGACCTTGCTTTTAT
GTCAATGCTGATGAGATTTGTTGCTACTGGTACCAAGTCTGGAGCAAGTTTTGATTTAATCGCTCAATACATATCAATAT
ATGAAAGGATGAGGCTGGTTGATCTTACTGTTATTGACGCTAAGTTGTTGGTTGATTTCGCAGCTATACAACGTGTTGAC
TCTGGAACTCGAGCATTTATTGCACTGTATGAAGTCTACAGAATACAGGGACAGACAGCAGTTTTGAAACCACATGTACT
CAGAACAACATCTGCTTTGCTCAATGTTTATACCAGATTGGAAAACAGAGGCACCGTTTCATGCCCGAGTTACATTTTCA
CTGGACCTAGAATGCCAACTGACTTTGAGCCTAGATTGAGTGCCTTCATTAGGCAAGATCGTATAAATAACAGATGGAAT
AATGTGATGAGGGTTAATCTTTTAAGAGCTGGATTTGGATATGGATCATTGGATAATAGTCCAAACATGATCAAAGCTTA
TGACAGTGTACGAAGTAGAGGCATCAATTACCTGACAGCCGCTCGATTCATCGATGCACGGCCCGCTGCTGACAGAGTCT
GGCGATAACTTCCTCGTGTGACATCTACTCTTGATTGACGTGTCAGTCACTACTCGTAGGACTGACA

>CsRV2 Segmento 12

TTATCATGGCGAGTATGGTAGCAAGACGCATCGTAGCAGCTATTGACGGGTTATCGTTGTCAGTCATAATTATGTTTGAT
TATCTTATACAGGATGAAGTGTTGCCTGAATTGGCTTCGAAGTATGTTACTTCTGGAGTTGCGGCTCTCGTGACTGTTCT
GCATTTAGTTATTTATGCAGCAGGGTTTGACATTAAATTGGCAAGGGAGCAAATGAAGAGGGATGAGTTAAATAACGATA
GTGCACCAACTGATATGTCAGCAGTGAGGTATGCCCCCGCTACTGCTCCGACTCTTGAGTCACTACATATTCCTGGTTAT
ATGCGTGAATATGTAAAATTACACCCAACTGTGAACATGTCTGAGCCAGTAAAACCAATAGTAAATGCTGTACAGCAAGA
CTTCATCAATACTACGGGTATTAAAGATAAAGTCATAAATACAGCTAGGAGTACAGCAGCTGCAGCAGTTAAACCACTAA
GAAGTAGTAAAGCTGTAGTTAATGATCGTTAGCTTACTTGCTACAAACTCGTCAGCAGAAACCATGACTAGACCAGCTCT
TTCCACTCCGGAGTGGCTTTGACTCCGGAGCTAACACGTGTGCGGTAGTGGGGAGGGCCTGTGCCACACCTAAGTCCAAG
GGGGCAGGTGTGGCATCTAATGTGCCCTCTCGGCCAAAGACGCACGTGGGACTGAGTTGCTGTAATTTTCATGGTGAAAG
GTATTGACGCACTAAAGCTATGAGG

ANEXO 2. Sequência completa do genoma de CdPBV1.

>CdPBV1 Segmento L
CCGTTGTTTATATACGCCTGTATACTTGAAATGGATTGGGTAAGACCGCATAGGTTAAAAGTCCGTCAACTAGCTGCTCA
ATACACTGATAGTACCAGTGCTGCTGAGGCTGGAGGGATAGTGAAAGATTTGAGGATTGCTAGGCATGATGGTTTCATCT
CATATCTCAATAGCCAAATTGCCGACATAGATTTTGGAATTGATTCAACTGGTGACATACCAGCGGAATACATTCATAAG
TTTGTAGCAGATTCTTTAAATGTAGATTTGGATGAAGATTTGGTCATTCCATCAAAGACACCAGATGGATTCATGTTATT
GGACAACTGCTTATACATTATTGATGTGAAGACAGTGACAAACATGGAACTGCAGGATGATACAGTCAGGAAATACAGAG
AAGTATTTCAAATCATAACAAATAGGTATGGTATAAACCTTAGTGTAAATACAATAAACTTTCATCCATATCACCATACT
ATAAATGTTTACCCAAATCCTGATATCTTACCTGTGATTCATGCAGATGATGATTTAATTGATTTCAGTGACGAAATTAC
TACAAGTATCCAGAGGATACAGATAAAGTGGCAGGGAAATCAAACATTCCAAGCCGCACAACATGATGCGGCTGTCAATT
TTAAAGGTAGTTTTACAGATGTGGGAGAATGGGAGGAAAAATGCTTAATGCATCCTGAATGGGTGAGTGTCACCACAGGA
ATGGGAAGGAGCATTGCTAAACTCATGAAGCACTGCATAACCAATAGATTGACACAGCCTGAAAGAGATGAATTGGCTAA
TTATTATGAGAGGTCTACTAGATCAAAAGGATATTTAATGAAAAGTAAATTGATGGATGGTGCTGATCTTGACCTAATTA
TGACACAAGGAACATCTGAAGAAGTAACTAATGCCATCAGGGTCATGCATGAAAATACAGGATCTAGAAAAACATTTGTT
CATCAACCAAAACCTAGTTGCTTTTACTATTCAACTAAGAGCCATTACGGGCTACCAGATGGAAATTATGCAAGGATTCA
TAAATTTGCTAACATGGCAAAGGAATGTAACAGTAGACATCCAATAATTGAGATGTTGAAGAATATCAAGATTGATAACC
CTGATGTATATGATGGGCAAGGATTGCCAACTAAGCAAGAAGGTTTCCCATTTAGAGCTAAGCAAATTCTGAAATTGCAA
AATACTGAAATAAAAAATAGACTTTACCAGAATGCTAAGGTTGGTATGGATTACATCAAACGATCCAATCGTGATAATAG
AACTTACACTGAGGAAAAACCAGAATGTTTGGATTATACTGATGCAGAAATTGTAAGTCAACATTCAAATCTTATCGTTG
AACAATTCCCTAAATTGGTACAAGAATCATATAGAATTAATGATGTTTCACATATATATCTGGATGATACCAAGATGGAA
CAGAAGAATGCTGAAGCAATGAAATTCATCAAATGGATGAGAGAAACACAGGCATTTTCATGGCTGTCAGATCAAGAAGA
TAAATTGCCTAATATGCTAGCTGTATCAGGATTGCTGAAAAATGCTGAAGTTGGACTTATATTAGGGAAAAGCAATACAA
GTATGCATATTGTCTATCCTGGGAAATCTTTGACAACACAAGATGCCAATCTGTGCTATAACAGTATTCATATAGTGACA
GATACATACTCACCTATTGATGTTGGCTTAATAGATGCATACATTAAAGTCCCAAGATCCATGTATGCCTTAGTAATCAC
AAAGCCTGTTAGATTGGATACTACTAGGCTTGGTGTGTTAACATGCTCACATACAAGATTTCAAATGGTGGCATTGCATT
ATTTTCTAACCTCTCTAGATACATACAAGAAATTTGAGAGTGTTCCATTAGGACTACTTAGAAATATTGTTGGTGTTTCA
TTTTTCTTAGTCCAACAATGCACATTACCCTTCACTAACTTAGTTGATAAAATGAAGTACATTGTCCAAGATGTTTTGGC
TGATATGTCTAATGTCTCTGGTTATATCAGTGAGAAATTGGACATTACACCTAAAAATAGTTTCACCTTATTCTTATACT
ATCACTTCATGACACAGATTAAATATCTTAGACAGCATTTTAAACAAGGTAGAAACCAACCGATAGTGATTGAAGCAGAT
GATGTTGTTGAAGCTGGAATAGAAGGTTTGATAATACCTAGCATTGTTATACCTGGATTAAAATTACCAAATGTCCAAGC
AATTGTTCAAGATTATGTCCTGGCTTGGTATGTCACAGCAAAAGGTCTGCATAATCCTGTACATAATCTGATCAAACTCT
ATAAAGTACCCCTTGAATTCCAAGAAGAATTAAATATGAATGATGGATTGAGACCTGATGTGGATAAGAGGTTGATGTTG
GCATCATTTCTAAAGTATTGGGATACTAGAGTTAGCACTAGTATTGAAGCTAGGAATAGATGTTTCACACGTATGAAAAT
TGACAAATCATGGACTCAAGTGCCAACTATGACTTCTACTAAATCAGTTGTTCATAAACTGAATCAAAATGAAATAAGGA
GAAATAAGATAACTGAGCAGGAACTGCTGAATATGGATAAGGATGAGTTCTTAAAGAAGTACCCTGGTTTGAAAATTGTT
AATGGTAGAGTCCTGAATAGACACACAGGACAGATTCCATTAAATCTTAGGGATCAAACACACTGGAAACAGGTGAGATC
TGGAAGAGTGTTCGATGAAATGGAGAGGTTAAATAAGGGGCAGAATGCAGATCTAAATATCAGAAATTCCAAATCTATCA
TAACAATAACTGATCATGGGAAAGTTCTAGAACCCTGCGTGACAGTTTTCCCAAAGCAACAAAGAACAGGGGATGATAGA
GAGATTTACATGGTTGACATAGTCACCAAATGTTCATTATATTTGATTGAAAGCTTAATGAAACAACTATGTGTGGAAAA
TCAAAGAGAGTGCATAAGTTTACCTGGTGACAGGAAAACTCAGAAGATCAAAAGTTTGCTAATTCAATCTATGAGAAATC
AGCAGGAGTTTGATGACAAGTCAAGTCAGGGGCTACAATTTGTGAAATTGAATATCTCTGCCGATGCAAGCAAGTGGTCA
GCTAGGGATTATTCAGACAAATTCATATTACTAATTGCAAGTTTGCCATGCCTATTGCCAGAAGAGAAATGGAAGATGAT
TTTCTTACTTATGAATTATAGGAGCAAACATGTAGTTCTGAAAGAAAGTGTTTTGGAGTCTATAATAGATAAAAATCTAA
CTAATGATAGTGTATTCTGGAGGATGACTGAGGGATTCAAATATAATTCTGTCAAAATCACACAGAATTGGTTACAAGGA
AACTTCAATTACATGTCTAGTTTAGTACATGCTATAATGCACGAAACGATCGATGATTGTCTAGTGCATTTCAATCATGC
TATGTCTGCCCATAATGGTGGAGTTCCCACTACTCATTACCCATTGAATTCTGCTGTGCACTCAGATGATTCCTTGCTAA
GTTTTTGTTTTGAAGTGCCTGAAGATGTTACTCTCAACCGTTTGGCAAACTGCATATTTGATCTAATGGTTTCAACAGGA
GGATGTTTCAGTATAAAGTACAATGATAAGAAAACATTCATTTCAAAGGATATCGTGGAGTTCCTATCAAAGTTATTTAT
CAATTCTGAATATCACACAAATTATATGAGGAGCCTGTTGCCAATATTCATAGAATTGCCATTTGGGAATATTACCCAAG
ATATGGCTGCAGGATTAGGACCATTAACACAAGCTACTGCTGAAGGTGCCCCACCTAGTCTGGTTTATTTAGCACAATGT
TTACTTCCTTACAGAATAGCCAATTTGAATGCAATGTTACCTGGCATGGTAAATGACTGTAAGCAGTATTTTCAAAATCA
CTTCAGTGAGCTGCCCACATGTCTTACAGGTTCTATAGGAGATGATATAACAGACTCATGTATTCTGGGTGGAGCTGCAT
ATGATTATTCCAGGGTATTTCAAATTTTAAGCAAGAATGCACCACCACAAATTGAGATACCCAAGATGATAGAAGGGTTT
AGATCTGACATGATTTCATCAACAGATCTGGAGTTTATGAAGATTCTTTCTGTATCATTAGAAGGACATAGAGAAGCAGA
TATTACCCAGGTTGGGATATATGGGGTTAAAGATAGATTCTTCAATACTGCATTAGTACCAATGAACATATCCAGAATCA
AAGAGACATCTAAATATCTAGCATCAGCTAGGTATAACAGTCTGGCCAAGGATGGAGAACTGAAGCCAATAATAGACCAG
CTGAAAAGAAGACATCCAATGTGGAGTATATCAAAACCAGTCAGGCCAGAAGATTACTCAGACTACAATTTATATAAGAT
GACAGAACTAAGATTTAGACAAAGTCTATTTCTACCACATAGCTCACATGGATTCCTTTTGAAGATATTGAATCGACGAA
CAAAGGTCGTCCCAAAGAAAGCATTGGAGTTGCATGATCCATTTCTACCAGTTATTGAAGTAAATGATGAAATGGAAATG
ATAACACTGAATGAAGCATTGGCATACCTCAAGTCTAAAATTGATGCTATAGAATTAAGCAGTGAGCAAATGAAAGCAAT
AATGTACACAATGCTAACATCAAATCAGCAAGTGATTGATTACCTAACCACAAGGAATGCATCAAAATTGACAAGTGAGG
TAATGAAGAAATCTAGATTCTTAGTGCAAGAACCAAGTGGGTTCCGGCAGAAAGTAGTCCAGAATCCGCCAAGTTTGGTA

ATAAAGAGGTATTTCTTTCCTGATGAGTTTGAAATGGATGGAGATGTGCTATATCTGGATGAAGCTGTACAAAGTGATTT
GGATACCATTTCAAGTGTATTAAGAGCATACAATCTAATTGATCTGAGTAGGCCAACACATCCTGATTTTACCCAAAATA
TCACAAAGATTCTATCATTGGTATTTAACCATATCACCAATAAAATGGGATCAAATAGAATTTATATACTACCAAGTAGA
TTGCAGTCAGCACCGAGATTCATTTGGACATTGATGGGCTCTAGGATGAATGATTACAAACACTACATATACACCAGTGT
TGTACCTAATATACATCTTTATTTGAAGGGAAACAAACAACGGCATGATGTACAAATGCAGAAAGCTAGGCTCCAAGAAT
TATTTGGTGTGTTGTGGATATTGGATCACATCACATCTGGTGCTGGAGATCAAAGTGCTCCATTAAGAATCTTAATTGGG
AATTTGATTGTAGAAGGTGTTCCTGCTAGAGATGTACTTGACAGAGGATTAACAGATAAATACACAAGGTCTACTTGTGC
TGCTATCTTGTACTGGTCTGGGAACTTAGATTTTGCAAGCTTCAAAAGACAATCAATCCCTAGTATTGTGCAGAAAGAAT
GGTTGATTGCACAAAGGACCGCTGATGTAGGTGAGTTTCATGTAATATATGAATTAAAAGGAGTGGCACTGATAGTCAAA
GGAAATACCAGAACCATAACAACCATCAGGTTTGAGATACCTGATGGTCAAGAATTATCTGGAATAGAAGGCCCACTCTT
GACAGCATTTTACAAAGATTTTTCAAGGATTATCACAGGTATGACTCTCATGACATCAAACACAAGATCGAATAGTAGAT
CTTATTCACTAAGATATAAGTCTCTACGGCCTGATCCACAAGGTTCGTGGCTTATTGGGATAAGAAGAGGGTTTGGTACT
AGGATAACAACAATTGTAGAGGAAGACTTTTTAGATGCAGTTGAATCTTGCACATGGGTCAGCTACCCTATACCATACAG
AAGCCAAGACATGGGACTTAAGACAGTGAAACCATATAGACCATTTTTGGACCATATGAATATTTCATCAAGCACACCTC
TTTTTATTAATAGGACTGATCTTGTGAAATTAATCAACATTGATTCATTCAGGGATGCTATTGTTAGTAGAGGTGAAACA
TACAATTATGGCCCATGGCTGAACTGCTTGGCATACAGAGGTGTCGGATTTCAGATAAAAGCACAAGCAGATGATGATTT
ATTCATTCCTGCACCAAGTATCCCAGTAGGGGTGAGAGCAATGCCTAAAGTCAGCATAGTGGAAACCTATAATAAGACTT
GGCATTGGTATCACAAGATGTACAAAATCTATAAAGGTCTACATGATGTTTTTATGACTGGACCCAATGGTAACCATGAA
CCAAGAGGAGAGAGAATTTTAACACATTTGCTACAAATCCAAGAATACATGTGGTACAACACAGGGAAAGTAGGATTCAC
ATTGTTCTTGGCAGAATGGGTTGGCACACTATCTGTACTTAATCCAGAGCATGTTACAGCAGAAGTCTTTGATGGAGAAC
AGCAGATTGCCACGAATAAGGCAAATTACATAATCGAGAGATTAGAGACTTTAAGGTCCAAAGGGCTGCATGAATTCAGC
ACTGATGTCCTCATTGTCAAATTATATAGGGATCAGCACATTGGAGATATTGGGGTGGACTGGTGATCATAATTTAGTGG
TTGATATTGATATCTAGTTTGTTTAGAATTGTCTATAGGTTAATAGGGGGTGGGAAAATATCCCAACTGTGAGCATTTTC
CCACCCCCTATTAA

>CdPBV1 Segmento M

AGCACACAGTTCTGGAACTTGCTTGGCTAATTACCCAAGAAAGTAATAAGGCAAAGATCCACTGCGGAGACATCCTCATG
TGGATCTTTGCCTTATTACTTTCTTGGGTAATTAGCCAAGCAAGTTCCAGAACTGTGTGCTCTACCACCAGTAGTGTGTC
AGGGCTACTTAAAGAATGTCCCATTGGTTTACCTGGTACTTGTAGGCATGTACTCACCACACTCCATACCCAACTTTACC
TCTTTCAAAATGATACCTACGTCATGACAGATCAACCAAGTAAATTCTGTGACCCATACCAAGTCCCATGGCCCACATCA
ACATACAAAGTGTCAGATGTTGACAAGATAGGACATGTTGTGAGTTATCAGGTTTGTGATGCCAAAGCTGAGCTTCAATA
TGGCAAATTCCAATTCTGCCCTGCTTTTGTATCATTGACTGGTGAATGCACATACAAGTCTATTAATAAAAGGCAGTTTG
AATTATCAACAGCTAGTCGCCTTGTTGCAGTTGACATGCATGGTGTCATTAATCACCGAACTACTCTAGAAGGAACTCAG
ATCTTTACCATCCCTCTTGTCACCACTGGGAATAATATTCTATATATTAATTGTGGTAAGCATTCATGGGCAATGATGGT
TGTTGATGACCCTGTTGACAAGTGTATTTCAAGTCACATCCCAATATATAATTATGGGATTGTAGCACGATTTAGGTGTG
AACAACCAGTTTGGTTCTTTACATTGATAGTAATTGTTATTATTCTAGCCATTAACAAAGCCTTAATTTGGACTGGTCTT
GATGTCATAATCTATCCGATTTATTCAGCCTTTCTTGCAGTTCTTTACCAGCCAATTATCTATGCTGTTAGAAAAGTATC
AGGTTGTAAATATTGTGGTAAAATTTCACACTTCTATCACAAGTGTCAGCTTGTTTGTTGTGGTGTTAATCATTATACAA
AGGAAATATTAATGCAACATAAAATTGATAGCTCATGTTCAGAACAAGATCTCATTCATAATGCCAAATATATTTCCAGA
AGTTTTATTCCTAAAACTTTGAATCTAATACTCTGCATTCTTGTTCTCATGATCATTCTACCAGTTGGCTCTGCATACAC
ATGCAATGGGACAGCTGTTCCTGGTGGCCATAGCATACCTGAGTGCCAAGTCGCAATAAGTACAACTGCGTGCAATATAG
TATCTACATTTTACCCTGATTTTACCTGTGCCGATTTAGAATTTTTTGGTTTAATTATCGGAACAAATCAAATTGGGCAT
TCACGTCATCGCCGTAATATCATCATACCTGATGAAAGTTACAAAACCACTGTCCCTCGTGTGAAGATTGATAAAAGATT
TGCAGAAAAAGTTAGTGTCCAAGATGCGGTCATTACATCATCACTTTTATCAGGATTTATAGAAGTTGATTTACCAGGTC
AACTAGGTGAATCAAGGATGTTTAAAATACAAGAAGAAGGAATGATTACACCAATTACATTCACTGTATCAATTGCAGAT
GCTAAATGTATCCATAGGGTAACTAGATCCTACACTACCTGTGATGTTCAAATTGCAACTCGTGATTTAACTGAATCATG
CACTGGTGACGCATCAGACTGTTATATCAATGTTACATCTGGTGTGCCTGCAGTTAGAAAAGTATGGCCTCAAGTGCAGA
ATTGGGGTTGTGAAGAGCCAGGATGTTTAAGCATTTACACAGGATGCCTTGGTGCAACATGTGTTGCTAATGCAAAACCT
GATTGTGCTGATGTCATTGAAGTTTCAGAACCAGAATGCTCAATAACAGTCTGTGTTGAGTCCTATAACCTTCATGAGTG
CCAGACTCTGACCCGGGATGTTGAAAAAGGATCAATATATGCAACATGGACTTATCAAGAACCAAGTAGACTTTTGACAA
CAAACAAATATGTCATTTATAAAAATAGGTTGCTCACAGGACCTGTCAATTCTCTAGGTGAATTTGATTACAAATTTGGT
AGTTATCAGATGGCAACTAATGATGCTACATACTTTTTGGGTGAACCTGTTGCAAGTTATCAATGCCATGCAGTTGCTTA
TAAAGATGTTACCTTCAGTAAATGTGTTCGAAACACATTCCATCTTATTCAAACACTCCATCCTGTCACAGGATTGTACC
TTAGTGAATCAAAGAAAACGCTAGTAGAACAAGATCTTTTGTTAGGCGTTATCACTGCAAGGTACAAACTTAGAGGTGTT
CTCATTAATGAGTTAGAATCAACAAGCACTGTTTCTCTTGGATCAGCTACATGCAAAGGTTATGCAGGCCACATTAAAGG
TTTGAATTGCACACTTGGTGTAACTAGTGACACAATTGGAGTTGCCCATATAGCTTGCAATAATTTATTCATATCTGACG
GCAAGATAATTTTGCATACTGGTCATACTCTTTTGTCATGGTTTGGATATGTTGATAACTCAGGTCATAGCACAGACAAT
TGCACATTTAAATTTTCAACACGGACCCTGCCATTTAAAGTATCCATAGATGCAACACCATTAGGTGCATTGGATCTATT
TACTGAACCATTTTTCACAGCTCAGACAATTCACGGACAAGGTCCTTGCCAAACTTTCATTTGCACTATCTGGACATCTG
TAAGCGATTTCTTCACAGGAGTATTCAATACTACCTCCATAATTATGGGCATTATTGTGTTGATCTTGTTGGCTTTGATA
ATTTATATAATGATATTCCTAGTTATCAAAGCATATTACTCATTTAGTGCAACATATAATGCAGTCTCTAAGGAGTACCT
AAAGACTGCATAAACTACTACTAAGGAATTAAGTTAAGACTAATACTAATTTATAGAAATAAGTTCTAATTTTAAACACT
TATACCCACATATATAATCAATGTAGTTTTAAGTGCTTTTAGGATTAGAATAGATTAGTTTACTAATCTATTTCTAAATG

CTTTACAAGTTCTAATAGTGCAGAGGAGACCAAGTTATTCTTAATTATTAATCTAGAGGTCAATTCAACTAATTGCGGTT
GATCATAACTTTTAACAACATTGTCGCTGAAGAGTCCTCCAGCAACACTAGTATTCCAATACAACACATGACTTGCTAAA
>CdPBV1 Segmento S
TTGTCAAAGCTTGGTGGGCAGACGCAATTGTAGTTGATATTGGTTGTTACCGGTAACCCTGTTTACTACTATTGCGTCTG
CCCACCAAGCTTTGACAATAGAACCATGGCAACTTGTGCAGCAAACCCATTCCAGACAGTCATTGCTAGTCCCAATGAGA
AAAGGACAGAAACATCAGTGATTCATGAACTTGCTCAAAAGAAATGCATCCAAATAGAGAAATTTGAAACTTGCATCAAA
ATTGTAGTCCCTTGCTGTAATTTGAGTCAAACTTTTAGCGGTGGCAATAAGGCATCATTTGCCAGAGCATATCATGAGGC
ATACAATTGGCTCCTTACAGATCACCTTGGCATATTTGATTCAAGTCTAGTCTGGCAATGCCATCAGTGTGTAAGTTGCC
CTTATTGTTATGACATAAAGTCTATAAGACCGAATCATAAGATGATTCTCATTGATGCGGATAATCCAAGTAGTATGACA
AAACTGCAATTATGGGCAACAAGTAGTTACTTCTTTGTGTTAGAATGCAAATTCACATTCAAAGCCAATTACTGCTGCGG
GATTACAACTTATGCCTCTAGTAAGCAACAAGGGACTATGCTTATGGATACATGGAATCAGTTGATGGACACTGATCATC
ATGTTGTTGTTGATGATAAACATTATTTGCTCATAGATACATCAAGTATTGATGATGGATTCTGCCCTGCATGTGCACGC
CGTTATACTGAATAGATGGTGTAGCATACATGGTGGTATTATATAATTAGTATCAGGTCTATACTTAATATTAAGTCCTA
TATATACCCTTAATATTAATTTTAATATTAATTCCAATATATAACTTTAGATTAAGTATATACCTTAATATTAATCCATT
ATATATTACTAATAGACCTGATACTAATTATATAATACCTGATGCTAGATCTCCTTACAGAGAATCAAAGGCACGCTGAG
CTCTAGCACCAATTGCAGAACCACTAGTCAAACGACCCAATACAGCCACTTCAGCAGTAATGAGTGCTTCATTGCCTCTT
ACATAATTCTCAAAGGGTTGTGCATTAACACTTTGGCGTGTGAGAGCATAAAATTTATCAGCAGTGTAACCAAGATCCCT
TTTCTGCAATTTAGCAATGGCAGCTATCTTAGCAGGTGCCAATGAGAAGTTGAATTCCATTCCAGATGTGTAAAGGGTGA
AGAATTCTCTCTTATCTGGGGTGATTCCAACACTGGCAGCAAGTGGGTTGCTATCCGGATACGCAGCATTAATGTAGAGG
TACCTGGCTACACATGCAAAGAATCTCTTATGTGTCATGACTCCTTGATCTGAACGATCATGACGAAGTACAATCCTGAC
ATCATGGTTATTATTGTTCTTTAGTTTCAAGAAGACCGTTTCATTTTTCACACGATCCCTTAAGTTCTTGCTGAGAACAT
AGAGAGGCTTGAGTGCATCAGTTTTAATATTCAAAGCAGAAAATTCTTGGTAGAGTGTGTCAAAGCTGAAGGCTGCCTGC
ACACCTGTGACCTGGAACTCATTTCCTTCCAGGCTTGTGGTAAAATCAGACATCTTCATCCCTAACAGGTTCACCAACAT
GTCTGATTTTACCACAAGCCTGGAAGGAAATGAGTTCCAGGTCACAGGTGTGCAGG