



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020002689-1 A2



(22) Data do Depósito: 07/08/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 25/08/2020

(54) **Título:** SISTEMAS E MÉTODOS PARA O CONTROLE DE DOENÇA DE NECROSE HEPATOPANCREÁTICA AGUDA

(51) **Int. Cl.:** A01N 59/06; A01N 63/02; A23K 1/00.

(30) **Prioridade Unionista:** 02/04/2018 US PCT/US2018/025766; 07/08/2017 US 62/541,824; 22/05/2018 US PCT/US2018/033976.

(71) **Depositante(es):** PEBBLE LABS USA INC..

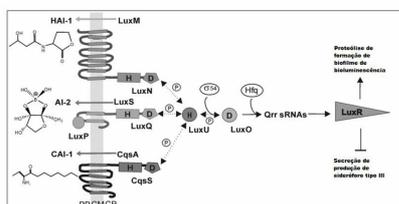
(72) **Inventor(es):** SAYRE, RICHARD; VINOGRADOVA-SHAH, TATIANA; SINEVA, ELENA.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2018045687 de 07/08/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/032629 de 14/02/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 07/02/2020

(57) **Resumo:** Geralmente, a tecnologia inventiva se refere a novas estratégias para controle de doença em sistemas animais. Especificamente, a tecnologia inventiva se refere a novos métodos, sistemas e composições para o biocontrole de patógenos em sistemas aquáticos. Especificamente, a invenção pode compreender novas técnicas, sistemas e métodos para o biocontrole de patógenos transmissores de doenças que afetam camarão em sistemas de aquacultura.



RELATÓRIO DESCRITIVO

SISTEMAS E MÉTODOS PARA O CONTROLE DE DOENÇA DE NECROSE HEPATOPANCREÁTICA AGUDA

[001] Este pedido reivindica o benefício e a prioridade de: Pedido de Patente Provisório U.S. 62/541.824, depositado em 7 de agosto de 2017, intitulado “Systems and Methods for the Control of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease A/K/A Early Mortality Syndrome; e Pedido PCT Internacional PCT / US18 / 25766, depositado em 2 de abril de 2018, intitulado Novel System for the Biocontrol of Pathogens in Aquaculture and Other Animal Systems; e Pedido Internacional PCT PCT / US18 / 33976, depositado em 22 de maio de 2018, intitulado Transbiotic Regulation of Bacterial Gene Expression. Todo relatório descritivo e as figuras dos pedidos acima mencionados são incorporados por meio deste em suas totalidades por referência.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[002] O presente pedido contém uma Listagem de sequências, que foi submetida eletronicamente no formato ASCII e está incorporada por meio deste a título de referência em sua totalidade. A cópia ASCII, criada em 7 de agosto de 2018, é denominada PCT7-AF.txt e tem 12 Kbytes de tamanho.

CAMPO TÉCNICO

[003] Geralmente, a tecnologia inventiva refere-se a novas estratégias transbióticas para controlar agentes causadores de doenças. Em particular, a tecnologia inventiva pode incluir novos sistemas, métodos e composições para o tratamento e / ou prevenção de organismos sensíveis à mortalidade associados à Síndrome de Mortalidade Precoce (EMS), através do uso de bactérias geneticamente modificadas que expressam uma ou mais moléculas que reduzem a virulência / aptidão de *Vibrio* sp. patogênico no intestino do camarão.

[004] A tecnologia inventiva pode incluir novos sistemas para interromper a detecção de quorum bacteriano e sua virulência associada e formação de

biofilme, através da introdução de moléculas de "extinção de quorum" distribuídas a um hospedeiro alvo por bactérias geneticamente modificadas. Em algumas modalidades, a tecnologia inventiva pode incluir uma nova estratégia de controle de EMS que inclui introduzir cepas bacterianas de doadores geneticamente modificadas configuradas com muita eficiência e distribuição contínua de moléculas de extinção de quorum a um hospedeiro/ambiente de destino, resultando na redução nos níveis de moléculas de detecção de quorum bacteriano que podem regular os estados patogênicos dos patógenos mediados por EMS.

[005] A tecnologia inventiva pode ainda incluir novos sistemas para regular expressão de gene bacteriano através da introdução de RNA antissentido (asRNA) que pode interromper a expressão de genes patogênicos de alvo e/ou seus produtos (RNA, proteínas). Em algumas modalidades, a tecnologia inventiva pode incluir novas cepas bacterianas de doador geneticamente modificadas configuradas de maneira muito eficiente e distribuir continuamente moléculas disruptivas de patógenos e / ou polinucleotídeos asRNA a um patógeno / hospedeiro receptor para tratar e / ou prevenir condições de doença mediada por EMS.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[006] O desenvolvimento da aquicultura gerou uma mudança significativa na produção global de alimentos, longe dos métodos tradicionais de produção de capturas. Impulsionada principalmente pelo aumento da população e pela falta de crescimento da captura de produção pesqueira tradicional, a aquicultura se expandiu rapidamente para se tornar um componente importante no ecossistema mundial de produção de alimentos. A aquicultura agora é vista como desempenhando um papel fundamental em muitas economias emergentes, devido ao seu potencial para contribuir para o aumento da produção de alimentos, ajudando a reduzir a pressão sobre os recursos pesqueiros. Conforme observado pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e

Alimentação (UNFAO) em seu Relatório de 2016 sobre o Estado das Pescas e Aquicultura no mundo, a aquicultura é a área de crescimento mais rápida da produção de proteínas animais e ultrapassou significativamente a produção pesqueira de captura tradicional. Por exemplo, a UNFAO estima que a produção da aquicultura agora represente metade de todos os frutos do mar produzidos para consumo humano.

[007] O aumento da população global, a crescente demanda por frutos do mar e as limitações na produção da pesca de captura conduzirão inevitavelmente à contínua expansão global da aquicultura com seus riscos associados ao surgimento e propagação de doenças. Apesar da crescente dependência mundial da aquicultura como fonte primária de produção de alimentos, especialmente em muitas economias em desenvolvimento, os sistemas tradicionais de aquicultura apresentam vários desafios técnicos e biológicos que limitam sua eficácia geral. Uma grande desvantagem dos sistemas de aquicultura é que os animais aquáticos são tipicamente colocados em sistemas de produção de alta densidade. Isso pode resultar em estresse devido às condições de aglomeração e qualidade da água abaixo do ideal, que facilitam a transmissão da doença. Em particular, surtos de doenças nos sistemas de aquicultura podem resultar em perdas maciças entre as populações aquáticas, resultando em grandes perdas econômicas na aquicultura comercial. De fato, esses surtos de doenças custaram à indústria da aquicultura dezenas de bilhões de dólares nos últimos 20 anos.

[008] No caso da aquicultura de camarão, o problema da doença é especialmente grave. De acordo com a UNFAO, embora a produção mundial de camarão de aquicultura tenha aumentado, os principais países produtores, particularmente na Ásia, experimentaram um declínio significativo na produção como resultado da doença generalizada de camarão. Existem várias causas para isso. Primeiro, ao contrário dos vertebrados, o camarão carece de muitos dos principais componentes dos mecanismos de resposta imune adaptativa e

inata, impedindo muitos métodos tradicionais de induzir ou melhorar a resistência natural a doenças. Segundo, a maioria dos principais vírus patogênicos causa infecções persistentes de nível muito baixo que podem ocorrer com prevalência moderada a muito alta em populações de camarões aparentemente saudáveis. A maioria dos patógenos do camarão é transmitida verticalmente e a doença é o resultado de uma amplificação viral maciça que segue a exposição a várias formas de estresse ambiental ou fisiológico. Os estressores podem incluir manuseio, desova, baixa qualidade da água ou mudanças bruscas de temperatura ou salinidade. Os vírus de camarão também podem ser transmitidos horizontalmente. Uma vez que as cargas virais são altas e a doença se manifesta, a transmissão horizontal da infecção é acompanhada pela transmissão da doença. Terceiro, os camarões geralmente são infectados simultaneamente ou sequencialmente com vários vírus, ou até diferentes cepas do mesmo vírus. Esse fato apresenta desafios significativos para o diagnóstico, detecção e exclusão de patógenos em sistemas de aquicultura.

[009] A Doença de Necrose Hepatopancreática Aguda (AHND), também conhecida como Síndrome de Mortalidade Precoce (EMS), emergiu como uma das doenças mais devastadoras na aquicultura de camarão. A EMS afetou severamente as indústrias de aquicultura em vários países dos hemisférios leste e oeste, como China, Vietnã, Malásia, Tailândia e México. Como mostra a Figura 1, a Aliança Global da Aquicultura estima que as perdas para o setor de cultura de camarões asiáticos devido à EMS totalizem US \$ 1 bilhão. Em alguns casos, surtos de EMS resultaram em uma perda impressionante de 80% das populações de aquicultura de camarão. A EMS é causada por espécies bacterianas de *Vibrio*, por exemplo, *V. harveyi* e *V. parahaemolyticus*, que podem ser transmitidas por via oral. Essas espécies *Vibrio* colonizam o trato gastrointestinal do camarão e produzem uma toxina que causa destruição e disfunção tecidual do órgão digestivo do camarão conhecido como hepatopâncreas. A EMS afeta tipicamente o camarão pós-larva dentro de 20 a

30 dias após o armazenamento e frequentemente causa até 100% de mortalidade.

[010] Atualmente, não existem métodos disponíveis para tratar a EMS. Estratégias tradicionais para prevenir ou tratar surtos de EMS podem realmente ter o efeito de agravar a propagação da doença. Por exemplo, tentativas de desinfecção total do fundo da lagoa e da água para matar possíveis vetores da EMS podem realmente contribuir para a disseminação epidêmica da doença, ao invés de controlá-la, removendo populações microbianas potencialmente competitivas. Além disso, o uso de desinfetantes não destrói apenas sistemas microbianos maduros; já se demonstrou que esses métodos são ineficazes no tratamento de doenças causadas por *Vibrios* luminescentes (i.e., *V. harveyi* e outras bactérias que estão intimamente relacionadas às bactérias causadoras da EMS).

[011] Outras tentativas foram feitas para criar e isolar populações livres de patógenos EMS para a aquicultura. No entanto, esses esforços são lentos e requerem conhecimentos e capacidades de diagnóstico significativos que são proibitivamente caros, para não mencionar amplamente ineficazes. Aplicações em larga escala de antibióticos têm sido aplicadas à aquicultura de camarão, em particular durante o ciclo de produção, tanto na fase larval quanto no crescimento. Testes de sensibilidade mostraram que as bactérias causadoras da EMS já desenvolveram resistência a toda a gama de antibióticos. Como tal, o uso de antibióticos para controlar a EMS tem sido associado a problemas ambientais e de saúde humana, incluindo resistência bacteriana e persistência da doença no ambiente aquático. O acúmulo de resíduos de antibióticos nos tecidos comestíveis do camarão também pode alterar a flora intestinal humana e causar intoxicação alimentar ou problemas de alergia. Outros métodos, como a aplicação de tratamentos imunoestimulantes ou bacteriófagos para atingir outros tipos de patógenos da aquicultura de camarão, foram tentados em outros

casos com sucesso comercial e prático limitado e seriam igualmente ineficazes contra patógenos causadores da EMS.

[012] Uma solução proposta é a utilização de moléculas baseadas em RNA engenheiradas. Por exemplo, o uso de asRNA como drogas antibacterianas altamente específicas tem sido amplamente explorado nas últimas décadas. A tecnologia de RNA antissentido (asRNA) emprega a produção de uma molécula de RNA que é complementar e hibridiza com um mRNA direcionado. Como resultado da hibridização do asRNA com o mRNA alvo, o mRNA é incapaz de servir como modelo para tradução de proteína, portanto, a interação asRNA-mRNA leva à eliminação ou redução de níveis da proteína codificada de mRNA nas bactérias. Além disso, o mRNA alvo pode ser hidrolisado por RNases, resultando em silenciamento de gene pós-transcricional. Um dos maiores obstáculos para a aplicação prática de asRNA como tratamentos antibacterianos, no entanto, tem sido o modo de produção e distribuição de asRNA para sítios de infecção. O desafio tem sido como produzir e distribuir continuamente quantidades suficientes de asRNA através de um longo período de tempo para silenciar o gene essencial alvo no patógeno a custo muito baixo ou sem custo.

[013] Os problemas acima relacionados ao biocontrole de patógenos EMS em populações de aquicultura de camarão podem representar uma necessidade sentida de uma solução eficaz - e econômica - para a mesma.

[014] Como será discutido em mais detalhes abaixo, a atual tecnologia inventiva supera as limitações dos sistemas tradicionais de controle de patógenos do EMS, enquanto atende aos objetivos de uma estratégia verdadeiramente eficaz de biocontrole do vetor de EMS.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[015] Geralmente, a tecnologia inventiva se refere a novas estratégias para controle de doença em sistemas animais. Especificamente, a invenção pode

compreender novas técnicas, sistemas e métodos para o biocontrole de patógenos em sistemas aquáticos. Em certas modalidades, isso pode ser realizado através da introdução de bactérias geneticamente modificadas em hospedeiros que expressam moléculas específicas que podem sobrerregular os principais genes patogênicos direcionados e / ou interromper as vias moleculares que levam a, por exemplo, maior patogenicidade e / ou formação de biofilme. A tecnologia inventiva pode ainda compreender novos sistemas para o biocontrole de patógenos específicos de virulência em sistemas de aquicultura. Este sistema também pode usar um novo mecanismo de reino cruzado para introduzir micro-organismos engenheirados que podem inativar genes específicos no patógeno usando asRNA que podem interromper a expressão de um ou mais genes de interesse e / ou moléculas específicas que podem inibir a detecção de quorum e / ou a formação de biofilme em populações de patógenos bacterianos.

[016] Um aspecto da tecnologia inventiva pode incluir sistemas, métodos e técnicas para o biocontrole de doenças bacterianas na aquicultura de camarão, introduzindo micro-organismos engenheirados que podem modular a concentração e / ou biodisponibilidade de moléculas sensíveis ao quorum como um novo método para a patogenicidade da EMS. Um aspecto da invenção inclui sistemas, métodos e composições para o tratamento e / ou prevenção de EMS em camarão, através do uso de bactérias entéricas geneticamente engenheiradas que expressam uma ou mais moléculas que reduzem a virulência / aptidão de *Vibrio* sp patogênico no intestino do camarão. Em um aspecto preferido, a invenção envolve gerar bactérias entéricas de camarão geneticamente engenheiradas configuradas para reduzir o sensor de quorum ou moléculas autoindutoras no intestino do camarão para tratar e / ou prevenir a mortalidade de camarão associada à EMS.

[017] Outro aspecto da invenção pode incluir sistemas, métodos e composições para reduzir os níveis de autoindutor 2 (AI-2) no ambiente e, assim, interromper a detecção de quorum patogênico, bem como a produção de biofilmes. Em um

aspecto preferido, a invenção pode incluir a redução nos níveis de moléculas de detecção de quorum bacteriano (QS) que regulam os estados patogênicos do *Vibrio*, que por sua vez podem fazer parte de uma estratégia eficaz de controle de EMS. Por exemplo, o autoindutor 2 (classe AI-2, diéster de furanosil borato) das moléculas de QS pode sobrerregular a patogênese de EMS no *Vibrio*. Aspectos adicionais podem incluir o controle da expressão genética regulada por *Vibrio* QS através do controle de duas classes adicionais de moléculas de QS, incluindo as lactonas homoserinas aciladas (AHL) e a classe de moléculas de QS da classe CAI-1. Como tal, em um aspecto preferido, a invenção inclui criar bactérias geneticamente modificadas que podem ser configuradas para superexpressar o operon *Isr* de *E. coli* em bactérias entéricas capazes de colonizar intestinos de camarão para reduzir os níveis exógenos de AI-2 produzidos por agentes patogênicos ou outras bactérias capazes de QS. Nesse aspecto, a redução nos níveis de AI-2 das moléculas de QS pode reduzir e / ou prevenir a patogênese da EMS no *Vibrio*.

[018] Outro aspecto da invenção pode incluir sistemas, métodos e composições para reduzir os níveis de moléculas autoindutoras de AI-1 no ambiente e, assim, interromper a detecção de quorum patogênico, bem como a produção de biofilmes. Em um aspecto preferido, a invenção inclui criar bactérias entéricas geneticamente modificadas que podem ser configuradas para superexpressar para expressar homoserina lactonases (AHL lactonase) para inativar a classe AHL (Hal-1) de moléculas QS que também podem ativar a expressão de genes de patogenicidade no *Vibrio*.

[019] A presente invenção também se refere à utilização de bactérias doadoras geneticamente modificadas que podem ser configuradas para produzir certos polinucleotídeos de asRNA que podem direcionar para genes bacterianos específicos e/ou seus produtos (RNA, proteínas) em sistemas eucarióticos. Estes polinucleotídeos de asRNA podem inibir ou reduzir a expressão de certos genes e/ou causar comprometimento ou degradação de produtos de genes em

um agente causador de doença. A invenção pode compreender novas técnicas, sistemas e métodos para controlar bactérias patogênicas, por exemplo, espécies *Vibrio* causadoras de EMS.

[020] Um objetivo da atual tecnologia inventiva pode incluir novos sistemas, métodos e composições para a regulação transbiótica da expressão de genes bacterianos em uma bactéria patogênica receptora por asRNA. Uma modalidade da invenção pode incluir a expressão eficaz de altos níveis de asRNA em uma espécie de bactéria doadora abrigada no hospedeiro. Em certas modalidades, esta bactéria doadora pode ser uma espécie de bactéria simbiótica, endossimbiótica e / ou probiótica entérica ou outras espécies geneticamente engenheiradas para expressar um ou mais polinucleotídeos de asRNA heterólogos.

[021] Outro objetivo da presente invenção pode incluir a produção de asRNA heterólogo em uma bactéria doadora que pode ainda ser distribuída para uma bactéria aceitadora, mais especificamente uma bactéria patogênica causadora de EMS. Estes polinucleotídeos de asRNA heterólogo podem direcionar genes específicos e seus produtos de RNA e/ou proteína que podem ser únicos e/ou restritos a um patógeno bacteriano alvo. Tais polinucleotídeos de asRNA heterólogos podem ser totalmente complementares ou conter incompatibilidades em relação aos seus alvos; ambos os aspectos podem induzir a degradação de seus alvos ou prejudicar sua tradução, tornando-os indisponíveis para atingir sua função.

[022] Em ainda outro objetivo da presente invenção pode incluir a supressão de expressão de gene direcionada nas bactérias receptoras, resultando na supressão de populações bacterianas e/ou atividade patogênica das bactérias em um organismo eucariótico hospedeiro.

[023] Outro objetivo da presente invenção pode incluir a geração de um ou mais plasmídeos e/ou cromossomos artificiais bacterianos (BACs) que podem codificar um ou mais polinucleotídeos de asRNA heterólogo. Um objetivo

adicional pode incluir integração de elementos genéticos específicos codificando um ou mais asRNA no genoma de um patógeno. Um objetivo adicional da invenção pode ser produzir construtos genéticos que podem produzir moléculas de RNA não codificadoras, tal como os polinucleotídeos de asRNA heterólogo mencionados acima, por um par de promotor/terminador de gene constitutivo, indutível, heterólogo ou homólogo na cepa de bactéria doadora. Ainda outro objetivo da presente invenção pode incluir a coexpressão de certas proteínas ou outros fatores que podem proteger a molécula de RNA não codificadora de degradação.

[024] Um objetivo adicional da presente invenção pode incluir o desenvolvimento de cepas bacterianas auxotróficas geneticamente modificadas que podem produzir polinucleotídeos de asRNA heterólogo que podem ainda ser distribuídos mais eficientemente para um patógeno alvo via nanotubos.

[025] Outro objetivo da presente invenção pode incluir novas estratégias de biocontrole para vários organismos aquáticos, como camarão. Outro objetivo da presente invenção pode incluir, em uma modalidade preferida, novas estratégias de biocontrole para populações de aquacultura. Nesta modalidade, a tecnologia inventiva inclui vários mecanismos de reino cruzado para a derrubada de genes patógenos essenciais em animais aquáticos cultivados em sistemas de aquacultura. Isto pode ser obtido através da introdução de micro-organismos engenheirados em populações de animais de aquacultura que expressam polinucleotídeos de asRNA heterólogo específicos que podem sobreregular e/ou suprimir genes essenciais de patógenos selecionados.

[026] Em um aspecto preferido, a invenção pode incluir gerar bactérias geneticamente modificadas que podem ser configuradas para expressar um ou mais asRNA direcionando a metilação do DNA em *Vibrios*. Em uma modalidade preferida, a invenção pode incluir gerar bactérias geneticamente modificadas que podem ser configuradas para expressar um ou mais asRNA direcionados ao gene *Vibrio* DNA adenina metilase *dam*. Nesse aspecto, o asRNA é configurado

para suprimir significativamente a expressão de *dam* em *Vibrio harveyi* durante cocultivo ou em sistema hospedeiro-patógeno. Neste aspecto preferido, a invenção pode ainda incluir distribuir asRNA-dam específico de patógeno a um hospedeiro infectado e / ou suscetível por bactérias entéricas configuradas para reduzir a expressão de *bam* em *Vibrio parahaemolyticus* em intestinos de camarão e, portanto, impedir a mortalidade associada à EMS.

[027] Outro objetivo da invenção pode incluir métodos de direcionar múltiplos alvos genéticos específicos de bactérias essenciais para silenciar, bem como inibir estados de patogênese mediados por QS, de modo que seja possível diminuir seletivamente a EMS causando patógenos *Vibrio* em populações de camarões cultivadas em ambientes de aquicultura. Nesta modalidade, a invenção pode incluir gerar alimentos contendo bactérias geneticamente modificadas configuradas para expressar moléculas selecionadas de extinção de quorum que podem inibir a detecção de quorum em populações *Vibrio* e, assim, controlar a EMS. Em outros aspectos, a invenção pode incluir a geração de alimentos contendo bactérias geneticamente modificadas configuradas para expressar asRNAs selecionados que podem direcionar e suprimir um ou mais genes de patógenos *Vibrio*. Numa modalidade, tal alimento tratado pode ser introduzido em uma população suscetível a patógenos ou afetada por patógenos.

[028] Em algum aspecto da invenção, essas moléculas de RNA interferentes, tais como asRNA, e / ou moléculas de extinção de quorum expressas por bactérias geneticamente modificadas, podem atuar como uma vacina para imunizar camarão. Como tal, um objetivo da invenção pode incluir o uso de bactérias geneticamente modificadas para colonizar e expressar moléculas que fornecem imunidade individual ou de rebanho em animais aquáticos dirigidos à EMS, como populações de camarão cultivadas em sistemas de aquicultura.

[029] Outro objetivo da invenção pode ser a geração de cepas bacterianas simbióticas e / ou probióticas geneticamente modificadas que podem expressar

uma ou mais moléculas inibidoras de quorum e / ou moléculas de RNA inibidoras dirigidas à EMS causando *Vibrios*. Em certas modalidades, as bactérias de camarão entéricas ou endossimbióticas, como *Enterobacter* sp., podem ser geneticamente modificadas para expressar uma ou mais moléculas de extinção de quorum e / ou moléculas de RNA inibidoras dirigidas à EMS causando *Vibrios*.

[030] Ainda outras modalidades podem incluir micro-organismos geneticamente modificados que podem incluir construtos genéticos que podem coexpressar ainda mais certas proteínas com atividade enzimática de processamento. Tais proteínas coexpressas podem incluir enzimas que podem inibir e / ou intensificar o processamento pós-tradução e / ou a modificação de moléculas de RNA inibidoras. Outras modalidades semelhantes podem incluir a introdução de micro-organismos em um organismo alvo que pode expressar, ou mesmo superexpressar, vários genes que podem aumentar a mobilização de moléculas de RNA inibidoras e / ou genes que podem ativar genes hospedeiros secundários a jusante que podem direcionar vias patogênicas.

[031] Finalmente, os presentes inventores descrevem modalidades da invenção, incluindo protocolo para alimentação de camarão por uma bactéria geneticamente modificada com deficiência de RNaseIII que expressa moléculas de RNA inibidoras dirigidas à EMS causando *Vibrios*.

[032] Aspectos adicionais da invenção serão evidentes a partir das figuras e descrições detalhadas abaixo.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[033] As figuras anexas, que são incorporadas e fazem parte do relatório descritivo, ilustram uma ou mais modalidades da presente invenção e, juntamente com a descrição, servem para explicar os princípios da invenção. Os desenhos são apenas para o propósito de ilustrar uma ou mais modalidades preferidas da invenção e não serão interpretados como limitando a invenção.

[034] Figura 1: Vias de detecção de quorum bacteriano exemplificativas.

[035] Figura 2: Bactérias de extinção de quorum que expressam a *AidH* lactonase diminuem especificamente a luminescência de *V. harveyi*. (A) O cocultivo com Ag1-p*AidH* diminui a luminescência em peso de *V. harveyi* que responde a todos os autoindutores. (B) O cocultivo com Ag1-p*AidH* diminui fortemente a luminescência de *V. harveyi* 117 que responde apenas à AI-1. (C) O cocultivo com Ag1-p*AidH* não diminui a luminescência de *V. harveyi* 118 que não responde à AI-2.

[036] Figura 3: As bactérias de extinção de quorum que expressam o óperon *Lsr* diminuem especificamente a luminescência de *V. harveyi*. (A) O cocultivo com Ag1-p*Lsr* diminui a luminescência em peso de *V. harveyi* que responde a todos os autoindutores. (B) O cocultivo com Ag1-p*Lsr* diminui fortemente a luminescência de *V. harveyi* 117 que responde apenas à AI-1. (C) O cocultivo com Ag1-p*AidH* diminui fortemente a luminescência de *V. harveyi* 119 que realmente responde apenas à AI-2.

[037] Figura 4: As bactérias de extinção de quorum diminuem especificamente a formação de biofilme por *V. harveyi*. (A) O cocrescimento com AG1-p*AidH* diminui a formação de biofilme apenas por cepas de *V. harveyi* que são sensíveis à lactona AI-1 correspondente. (B) O cocrescimento com AG1-p*Luc* diminui a formação de biofilme apenas por cepas de *V. harveyi* sensíveis à AI-2.

[038] Figura 5: A depleção de AI-1 e AI-2 diminui cumulativamente a luminescência, mas não a formação de biofilme. (A) Efeito do co-cultivo com Ag1-p*AidH*, Ag1-p*Lsr* e Ag1-p*AidH*-p*Lsr* na luminescência de *V. harveyi* de tipo selvagem. (B) As curvas diferenciais de bioluminescência ilustram diferenças temporais na extinção de quorum por Ag1-p*AidH*, Ag1-p*Lsr* e construto duplo AG1-p*AidH*-p*Lsr*. (C) Efeito do cocultivo com Ag1-p*AidH*, AG1-p*Lsr* e AG1-p*AidH*-p*Lsr* no *V. harveyi* de tipo selvagem de formação de biofilme.

[039] Figura 6: Efeito protetor das cepas de *Enterobacter* para extinção de quorum de camarão durante o desafio *Vibrio*. (A-B Ensaio 1), A, taxa de sobrevivência de camarão alimentado com as bactérias Ag1-*Luc*, Ag1-p*Lsr* e Ag1-

p*AidH* . B, Contagem total de mortalidade 12 horas após a infecção. (Experimento C-D) C, taxa de sobrevivência de camarão alimentado com as bactérias Ag1-Luc, Ag1-pLsr, Ag1-p*AidH* e Ag1-pLsr-*AidH* . D, Contagem total de mortalidade às 120 h após a infecção.

[040] Figura 7: Expressão do gene de virulência em *Vibrio parahaemolyticus* a partir de intestinos de camarões alimentados com cepas de extinção de quorum de *Enterobacter* . (A) nível de expressão de Mam7; e (B) nível de expressão de toxinas do tipo Pir.

[041] Figura 8: Efeito protetor de *Enterobacter* expressando asRNA-dam para camarão durante o desafio *Vibrio* . A-B Ensaio 1, A, taxa de sobrevivência de camarão alimentado por Ag1-Luc (controle) ou por Ag1-asRNA-dam. B, Contagem total de mortalidade 5 dias após a infecção. C-D Ensaio 2. C, taxa de sobrevivência de camarão alimentado por Ag1-Luc (controle) ou por Ag1-asRNA-dam. B, Contagem total de mortalidade 5 dias após a infecção.

[042] Figura 9: Expressão do gene de virulência em *Vibrio parahaemolyticus* a partir de intestinos de camarão alimentados por *Enterobacter* expressando asRNA-dam. (A) nível de expressão de Mam7; (B) nível de expressão de toxinas do tipo Pir.

[043] Figura 10: Posição hipotética do promotor mam7 e localização das sequências alvo Dam em montante do gene mam7 em *Vibrio parahaemolyticus*.

[044] Figura 11A-C: Mapas de plasmídeos utilizados neste trabalho. O projeto dos plasmídeos é descrito na seção Material e Métodos. Sequências dos genes utilizados para a clonagem de plasmídeos p*AidH* e pLsr, conforme listado abaixo na seção intitulada LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS.

[045] Figura 12: Esquema do asRNA expresso em uma bactéria geneticamente modificada.

[046] Figura 13: Detecção de quorum em *Vibrio harveyi*. As enzimas LuxM, LuxS e CqsA sintetizam os autoindutores HAI-1, AI-2 e CAI-1, respectivamente. Esses autoindutores são detectados na superfície celular pelas proteínas

receptoras LuxN, LuxP-LuxQ e CqsS, respectivamente. A. Em baixa concentração da molécula de sinal, os receptores se autofosforilam e transferem o fosfato para LuxO via LuxU. A fosforilação ativa o LuxO, que, juntamente com o s54, ativa a produção de pequenos RNAs reguladores (sRNAs). Esses sRNAs, juntamente com o acompanhante Hfq, desestabilizam o mRNA que codifica o regulador de resposta LuxRVh. Portanto, na ausência de autoindutores, a proteína LuxRVh não é produzida. B. Na presença de altas concentrações dos autoindutores, as proteínas receptoras mudam de quinases para fosfatases, o que resulta na desfosforilação de LuxO. LuxO desfosforilado é inativo e, portanto, os sRNAs não são formados e o regulador de resposta LuxRVh é produzido.

[047] Figura 14: Efeitos potenciais da expressão de bloqueio de asRNA do gene *dam*. Diminuição em metilação de região de origem/promotora de DnaA leva à interrupção do ciclo de regulação de replicação de DNA e à inibição da divisão celular *Vibrio*. A repressão da expressão de Dam inibe a formação de biofilme por mecanismos desconhecidos que podem incluir inibição transcricional de promotores de gene específicos, resultando em uma desaceleração do crescimento celular.

MODO(S) PARA REALIZAR A(S) INVENÇÃO(ÕES)

[048] A presente invenção inclui uma variedade de aspectos, que podem ser combinados de diferentes maneiras para descrever geralmente os novos sistemas, métodos e composições relacionados ao controle e tratamento da Doença de Necrose Hepatopancreática Aguda A / K / A Síndrome de Mortalidade Precoce (EMS). As seguintes descrições são fornecidas para listar os elementos e descrever algumas das modalidades da presente invenção. Esses elementos são listados com modalidades iniciais, no entanto, deve-se entender que eles podem ser combinados de qualquer maneira e em qualquer número para criar modalidades adicionais. Os exemplos descritos de maneira diversa e modalidades preferidas não devem ser interpretados para limitar a presente invenção apenas aos sistemas, técnicas e aplicações explicitamente descritas.

Além disso, esta descrição deve ser entendida para apoiar e abranger as descrições e as reivindicações de todas as várias modalidades, sistemas, técnicas, métodos, dispositivos e aplicativos com qualquer número dos elementos divulgados, com cada elemento sozinho e também com todas e quaisquer permutações e combinações de todos os elementos neste ou em qualquer pedido subsequente.

[049] A invenção pode incluir sistemas, métodos e composições para a inibição da detecção de quorum (QS), patogênese mediada por QS e a formação de biofilmes em bactérias patogênicas alvo. (Ver Fig. 1) Geralmente, QS descreve um sistema de estímulos e resposta correlacionado à densidade populacional bacteriana. A detecção de quorum pode permitir que as bactérias produzam e excretem constantemente moléculas de sinalização de baixo peso molecular, geralmente chamadas de autoindutores (AIs), no ambiente circundante. À medida que o número de bactérias aumenta, aumenta também a concentração de AIs. Em um limiar definido da concentração de AI, a população bacteriana pode expressar uma resposta sincronizada e específica de AI - geralmente um fenótipo, como virulência, produção de luz ou formação de biofilme, que é mais eficaz quando implantado por um grupo de células do que por um único bactéria. Tais respostas de detecção de quorum podem intensificar significativamente uma expressão genética de virulência de patógenos bacterianos, além de dificultar a interrupção do crescimento microbiano por meio de antibióticos ou outros meios químicos, como é o caso dos biofilmes bacterianos.

[050] Em uma modalidade, a invenção pode incluir um vetor de expressão isolado, como um plasmídeo configurado para ser expresso em bactérias geneticamente modificadas que podem expressar ainda um ou mais polipeptídeos heterólogos que transportam ativamente AIs do ambiente circundante de volta para as bactérias geneticamente modificadas. Numa modalidade preferida, a invenção pode incluir e um ou mais vetores de expressão isolados, como um plasmídeo configurado para ser expresso em

bactérias que podem expressar ainda mais um operon *Isr* heterólogo, preferencialmente do organismo exemplificativo *E. coli* e / ou *Salmonella typhimurium*. Como detalhado acima, o operon *Isr* codifica um transportador de cassete de ligação a ATP (transportador ABC) e chaperonas associadas que bombeiam ativamente AI-2 em células bacterianas. Ao fazer isso, as concentrações de AI-2 no ambiente circundante são reduzidas, em alguns casos, para concentrações próximas de zero, impedindo a ativação mediada por QS de estados patogênicos em muitas bactérias patogênicas, como *Vibrio*.

[051] A invenção inclui ainda novos sistemas, métodos e composições para reduzir os níveis de AI-2 em uma aquicultura de outros ambientes aquáticos e, assim, reduzir e / ou tratar EMS em camarões. Numa modalidade específica, este novo sistema pode incluir a superexpressão de um operon *Isr* heterólogo em bactérias entéricas no intestino de camarão. Bactérias entéricas exemplificativas podem incluir *Salmonella typhimurium*, bem como *Enterobacter* sp., como Ag1. Numa modalidade, através da superexpressão do operon *Isr*, a AI-2 pode ser ativamente transportada de volta para uma célula bacteriana, de modo que as concentrações de AI-2 no ambiente alvo possam ser suficientemente reduzidas para impedir a ativação de estados patogênicos mediada por QS.

[052] Em outra modalidade, bactérias entéricas como Ag1, podem ser geneticamente modificadas para expressar e / ou superexpressar um operon *Isr* heterólogo a partir do cromossomo bacteriano. Essas bactérias geneticamente modificadas podem ser introduzidas em um camarão ou outra aquicultura ou organismo aquático, por exemplo, através de um alimento com infusão de bactérias ou através da distribuição bacteriana direta para por exemplo, uma população de camarão em uma lagoa ou outro ambiente de aquicultura. Uma vez colonizada permanentemente e / ou transitoriamente no intestino do camarão, as bactérias entéricas geneticamente modificadas podem expressar e / ou superexpressar um operon *Isr* heterólogo que, por sua vez,

produzirá o transportador ABC acima mencionado e as proteínas chaperonas associadas que podem transportar AI-2 ativamente de volta a uma célula bacteriana, de modo que as concentrações nos meios possam ser significativamente reduzidas, impedindo a ativação mediada por QS de estados patogênicos em bactérias patogênicas.

[053] A invenção inclui ainda novos sistemas, métodos e composições para reduzir os níveis de AI-2 em uma aquicultura de outros ambientes aquáticos e, assim, reduzir e / ou tratar EMS em camarões. Em uma modalidade específica, este novo sistema pode incluir a superexpressão de um operon *lsr* heterólogo em bactérias entéricas geneticamente modificadas que podem ser introduzidas no intestino do camarão, por exemplo, através de uma alimentação de camarão infundida por bactérias ou através da distribuição bacteriana direta para, por exemplo, uma população de camarão em uma lagoa ou outro ambiente de aquicultura. Como observado acima, exemplo não limitativo de bactérias entéricas pode incluir *Salmonella typhimurium*, bem como *Enterobacter* sp., como Ag1, ou outras bactérias probióticas que intensificam o crescimento do camarão. O operon *lsr* heterólogo codifica um transportador de cassete de ligação a ATP (transportador ABC) e chaperoninas associadas que transportam ativamente AI-2 para uma célula bacteriana geneticamente modificada, de modo que as concentrações nos meios podem ser significativamente reduzidas, impedindo a ativação mediada por QS de estados patogênicos no EMS causando *Vibrio* que pode ser configurado para responder a moléculas autoindutoras, em particular AI-2. Mais especificamente, os reservatórios extracelulares da molécula QS AI-2 podem ser reduzidos e / ou eliminados, impedindo a formação de ambos os fenótipos QS, como biofilmes, bem como a ativação e expressão mediada por QS dos genes de patogenicidade de EMS em *Vibrio* e outras espécies de patógenos.

[054] Em uma modalidade, uma ou mais cepas geneticamente modificadas de bactérias simbióticas, endossimbióticas e / ou probióticas de camarão podem

conter um ou mais construtos genéticos que podem resultar na superexpressão de um operon *Isr* heterólogo. Nesta modalidade, as bactérias entéricas geneticamente modificadas podem ser introduzidas em uma população alvo de camarão ou camarão de aquicultura e tornar-se parte do microbioma natural do hospedeiro. A superexpressão do operon *Isr* pode causar um aumento no número de transportadores ABC e chaperonas associadas que transportam ativamente a AI-2 gerada por patógenos de EMS, como as várias espécies de *Vibrio* aqui identificadas, na célula entérica geneticamente modificada e, assim, inibem o QS, como bem como a formação de biofilme nessas espécies de patógenos *Vibrio*.

[055] Numa modalidade preferida, bactérias simbióticas, endossimbióticas e / ou probióticas geneticamente modificadas que superexpressam um operon *Isr* heterólogo podem colonizar no intestino ou em outra parte do camarão. Nesta modalidade, uma vez colonizada no hospedeiro, a transmissão vertical das bactérias geneticamente modificadas pode ser passada para a progênie do hospedeiro, replicando naturalmente o QS patogênico e a supressão de biofilme para as gerações subsequentes. Além disso, as bactérias modificadas geneticamente também podem ser transmitidas horizontalmente para a população hospedeira em geral através da distribuição das bactérias modificadas no meio ambiente por derramamento. Tal recurso pode permitir a administração única e / ou periódica das bactérias modificadas no hospedeiro e / ou no ambiente do hospedeiro, gerando uma vantagem comercial, técnica e de custo significativa.

[056] Em outra modalidade, as bactérias colonizadas podem superexpressar um operon *Isr*, tendo se tornado parte do microbioma natural do hospedeiro, podem expressar continuamente o transportador ABC e as chaperonas associadas que transportam ativamente a AI-2 gerada por patógenos de EMS de volta para as bactérias geneticamente modificadas colonizadas, como *Vibrio* através do intestino ou de outras áreas, desde os primeiros estágios larvais até

os adultos, prevenindo a patogênese do EMS mediada por QS ao longo do ciclo de vida do hospedeiro. Como tal, essas bactérias geneticamente modificadas podem atuar como um coletor molecular de moléculas de AI-2. Além disso, como o vetor bacteriano entérico pode ser uma parte já natural do microbioma do hospedeiro, sua presença pode não representar nenhum risco para o organismo, o ambiente ou os consumidores finais.

[057] A tecnologia inventiva pode ainda compreender métodos e técnicas para controlar os níveis e o tempo da expressão do operon *lsr* heterólogo no hospedeiro alvo. Numa modalidade preferida, a expressão do operon *lsr* heterólogo pode estar sob o controle de um promotor indutível ou outro novo interruptor genético. A troca de genes pode ser controlada por uma molécula de troca, que pode ser uma molécula solúvel em água e de grau alimentar que pode ser adicionada ao ambiente do organismo do hospedeiro ou suprimento de alimentos. A presença desta molécula de troca pode ativar a expressão e / ou superexpressão do operon *lsr* heterólogo. A sua ausência pode impedir ou diminuir a expressão do operon *lsr* heterólogo.

[058] Esta modalidade pode ser demonstrada em construtos genéticos que podem incluir outros elementos de regulação de transcrição, como promotores, terminadores, coativadores e correpressores, bem como outros elementos de controle que podem regular a expressão e / ou superexpressão do operon *lsr* heterólogo. Tais sistemas podem permitir o controle do tempo e da quantidade das proteínas de operon *lsr* expressas no sistema. As modalidades adicionais podem incluir construtos genéticos que podem ser induzidos por fatores externos e / ou ambientais adicionais, como a presença de uma proteína ou composto específico, como proteínas relacionadas ao estresse geradas em resposta a um patógeno ou mesmo proteínas e outros compostos precursores gerados por patógenos e semelhantes.

[059] A invenção pode incluir sistemas, métodos e composições para a introdução de bactérias geneticamente modificadas, preferencialmente bactérias

entéricas que expressam um operon *lsr* heterólogo a organismos e / ou populações suscetíveis à EMS, de preferência organismos aquáticos cultivados em ambientes de aquicultura. Nesta modalidade, as bactérias colonizadas podem superexpressar o operon *lsr* e se tornar parte do microbioma natural do hospedeiro, e podem expressar continuamente o transportador ABC e as chaperonas associadas que transportam ativamente AI-2 gerado por patógenos de EMS, como *Vibrio* por meio do intestino ou outras áreas e, assim, fornecendo proteção profilática à população contra a EMS, de preferência a EMS mediada por *Vibrio*.

[060] Em uma modalidade preferida, um operon *lsr* exemplificativo pode ser identificado como SEQ ID NO. 2, ou uma sequência com 70% a 99% de homologia do mesmo. Nesta modalidade, o operon *lsr* pode ser parte de um cassete de expressão e pode ainda ser operavelmente ligado a um promotor.

[061] A invenção pode incluir sistemas, métodos e composições para a inibição da patogenicidade e a formação de biofilmes em bactérias patogênicas alvo através da inibição do QS bacteriano. Numa modalidade preferida, a invenção pode incluir sistemas, métodos e composições para a inibição / inativação das moléculas de autoindutor-1 (AI-1). Nesta modalidade preferida, as bactérias endossimbióticas, simbióticas e / ou probióticas podem ser geneticamente modificadas para expressar e / ou superexpressar uma ou mais homoserina lactonases aciladas heterólogas (AHL lactonase) que inativam as moléculas de AI-1, especificamente moléculas da classe AHL (Hal-1) QS. A expressão dessa AHL lactonase heteróloga pode inibir ainda mais a expressão de genes de patogenicidade em uma ou mais espécies de *Vibrio* causadoras de EMS. Em algumas modalidades, a redução de AHLs pode reduzir os reservatórios bacterianos de *Vibrio* em ambientes de aquicultura ou outros ambientes naturais, como lagoas e lagos que podem atuar como portões de palco para infecções de camarão.

[062] Em uma modalidade, a invenção pode incluir um vetor de expressão isolado, como um plasmídeo configurado para ser expresso em bactérias que podem expressar ainda um ou mais polipeptídeos heterólogos que inibem a produção de QS e / ou biofilme, bem como a expressão de genes de patogenicidade, de preferência através da inibição / inativação de moléculas da classe AHL (Hal-1) QS. Numa modalidade preferida, a invenção pode incluir e um ou mais vetores de expressão isolados, como um plasmídeo configurado para ser expresso em bactérias que podem expressar ainda uma AHL lactonase heteróloga, preferencialmente o gene *aidH* de *Ochrobactrum*.

[063] Como observado acima, as bactérias que expressam AHL lactonase podem reduzir a virulência / aptidão do *Vibrio* sp patogênico no camarão. Como tal, a invenção inclui ainda novos sistemas, métodos e composições para inibir QS, formação de biofilme e patogenicidade / aptidão de espécies de *Vibrio* em uma aquicultura de outros ambientes aquáticos e, assim, reduzir e / ou tratar EMS em camarões. Numa modalidade específica, este novo sistema pode incluir a superexpressão de uma AHL lactonase heteróloga, como a *aidH* em bactérias entéricas no intestino de camarão. Bactérias entéricas exemplificativas podem incluir *Salmonella typhimurium*, bem como *Enterobacter* sp., como Ag1. O gene *aidH* codifica uma proteína hidrolítica que interfere nas funções mediadas por QS através da inativação da classe AHL (Hal-1) de moléculas QS, impedindo assim a ativação mediada por QS de estados patogênicos em bactérias, preferencialmente espécies *Vibrio* causadoras de EMS.

[064] Em outra modalidade, as bactérias entéricas como Ag1, podem ser geneticamente modificadas para expressar e / ou superexpressar um gene *aidH* heterólogo. Esta bactéria geneticamente modificada pode ser introduzida em um camarão ou em outros organismos aquáticos ou de aquicultura, por exemplo, através de alimentos com infusão de bactérias. Uma vez colonizada de forma permanente e / ou transitória no intestino do camarão, as bactérias entéricas geneticamente modificadas podem expressar e / ou superexpressar um gene

aidH heterólogo que, por sua vez, produzirá a inativação de moléculas da classe AHL (Hal-1) QS. mencionadas acima, inibindo assim a ativação mediada por QS de estados patogênicos em bactérias.

[065] A invenção inclui ainda novos sistemas, métodos e composições para reduzir a atividade de AI-1 ativa em uma aquicultura de outros ambientes aquáticos e, assim, reduzir e / ou tratar EMS em camarões. Em uma modalidade específica, este novo sistema pode incluir a superexpressão de um gene *aidH* heterólogo em bactérias entéricas geneticamente modificadas que podem ser introduzidas no intestino do camarão, por exemplo, através de uma alimentação de camarão com infusão de bactérias. Como observado acima, exemplos não limitativos de bactérias entéricas podem incluir *Salmonella typhimurium*, bem como *Enterobacter* sp., como Ag1. O gene *aidH* heterólogo codifica um polipeptídeo que inativa AI-1s no ambiente, o que pode impedir a ativação mediada por QS de estados patogênicos no *Vibrio causador de EMS* que pode ser configurado para responder a moléculas autoindutoras, em particular a AI-1. Mais especificamente, os reservatórios extracelulares da molécula QS AI-1 podem ser reduzidos e / ou inativados, impedindo a formação de ambos os fenótipos QS, como biofilmes, bem como a ativação e expressão mediada por QS dos genes de patogenicidade de EMS em *Vibrio* e outras espécies de patógenos.

[066] Em uma modalidade, uma ou mais cepas geneticamente modificadas de bactérias simbióticas, endossimbióticas e / ou probióticas de camarão podem conter um ou mais construtos genéticos que podem resultar na superexpressão de um gene *aidH* heterólogo. Nesta modalidade, as bactérias entéricas geneticamente modificadas podem ser introduzidas em uma população alvo de camarão ou camarão de aquicultura e tornar-se parte do microbioma natural do hospedeiro. A superexpressão do gene *aidH* pode causar a inativação de mediadores QS da classe AI-1 gerados por patógenos de EMS, como as várias

espécies de *Vibrio* aqui identificadas, inibem o QS, bem como a formação de biofilme nessas espécies de patógenos *Vibrio*.

[067] Numa modalidade preferida, bactérias simbióticas, endossimbióticas e / ou probióticas geneticamente modificadas que superexpressam um gene *aidH* heterólogo podem colonizar no intestino ou em outra parte do camarão. Nesta modalidade, uma vez colonizada no hospedeiro, a transmissão vertical das bactérias geneticamente modificadas pode ser passada para a progênie do hospedeiro, replicando naturalmente o QS patogênico e a supressão de biofilme para as gerações subsequentes. Além disso, as bactérias geneticamente modificadas também podem ser transmitidas horizontalmente para a população hospedeira em geral através da distribuição das bactérias modificadas no meio ambiente como lixo. Tal recurso pode permitir a administração única e / ou periódica das bactérias modificadas no hospedeiro e / ou no ambiente do hospedeiro, gerando uma vantagem comercial, técnica e de custo significativa.

[068] Em outra modalidade, a bactéria colonizada pode superexpressar um gene *aidH* heterólogo, tornando-se parte do microbioma natural do hospedeiro, e pode inibir continuamente a AI-1 gerada por patógenos de EMS, como *Vibrio* através do intestino ou de outras áreas, desde os primeiros estágios larvais até os adultos, prevenindo a patogênese do EMS mediada por QS ao longo do ciclo de vida do hospedeiro. Além disso, como o vetor bacteriano entérico pode ser uma parte já natural do microbioma do hospedeiro, sua presença pode não representar nenhum risco para o organismo, o ambiente ou os consumidores finais.

[069] A tecnologia inventiva pode ainda compreender métodos e técnicas para controlar os níveis e o tempo da expressão do gene *aidH* heterólogo no hospedeiro alvo. Numa modalidade preferida, a expressão do gene *aidH* heterólogo pode estar sob o controle de um promotor indutível ou outro novo interruptor genético. A troca de genes pode ser controlada por uma molécula de troca, que pode ser uma molécula solúvel em água e de grau alimentar que pode

ser adicionada ao ambiente do organismo do hospedeiro ou suprimento de alimentos. A presença desta molécula de troca pode ativar a expressão e / ou superexpressão do gene *aidH*. A sua ausência pode impedir ou diminuir a expressão do gene *aidH* heterólogo.

[070] Esta modalidade pode ser demonstrada em construtos genéticos que podem incluir outros elementos de regulação de transcrição, como promotores, terminadores, coativadores e correpressores, bem como outros elementos de controle que podem regular a expressão e / ou superexpressão de um gene *aidH* heterólogo. Tais sistemas podem permitir o controle do tempo e da quantidade das proteínas de gene *aidH* expressas no sistema. As modalidades adicionais podem incluir construtos genéticos que podem ser induzidos por fatores externos e / ou ambientais adicionais, como a presença de uma proteína ou composto específico, como proteínas relacionadas ao estresse geradas em resposta a um patógeno ou mesmo proteínas e outros compostos precursores gerados por patógenos e semelhantes.

[071] A invenção pode incluir sistemas, métodos e composições para a introdução de bactérias geneticamente modificadas, preferencialmente bactérias entéricas que expressam um gene *aidH* heterólogo a organismos e/ou populações suscetíveis à EMS de preferência camarão cultivado em ambientes de aquicultura. Nesta modalidade, as bactérias colonizadas podem superexpressar o gene *aidH*, tornando-se parte do microbioma natural do hospedeiro, e podem inibir continuamente a AI-1 gerada por patógenos de EMS, como *Vibrio* através do intestino ou de outras áreas e, assim, fornecendo proteção profilática para a população contra a EMS, em particular a EMS mediada por *Vibrio*.

[072] Numa modalidade preferida, uma AHL lactonase heteróloga exemplificativa pode incluir o gene *aidH* de *Ochrobactrum* identificado como SEQ ID NO. 1, ou uma sequência com 70% a 99% de homologia do mesmo. Nesta

modalidade, o *aidH* heterólogo pode ser parte de um cassete de expressão e pode ainda ser operavelmente ligado a um promotor.

[073] A tecnologia inventiva pode compreender sistemas e métodos para controlar a virulência de patógenos bacterianos ou outros patógenos específicos por inativação seletiva de genes patogênicos, essenciais ou outros genes-alvo. Esta inativação genética direcionada pode ser realizada pela expressão e distribuição de moléculas de asRNA heterólogas de uma bactéria doadora a um patógeno hospedeiro alvo. Em uma modalidade preferida, uma ou mais espécies ou cepas bacterianas de doadores podem ser geneticamente engenheiradas para expressar moléculas de asRNA heterólogas que podem atuar para regular e / ou inibir a expressão genética em agentes causadores de doenças alvo, de preferência agentes causadores da doença EMS.

[074] Em certas modalidades, o asRNA pode incluir uma molécula de RNA de fita simples não codificadora que pode exibir uma relação complementar com uma fita de RNA mensageiro específica (mRNA) transcrita de um gene alvo. As modalidades adicionais podem incluir asRNA tendo uma ou mais incompatibilidades em relação ao seu mRNA alvo. Independentemente da homologia entre o mRNA e o asRNA, nesta modalidade, o asRNA pode fisicamente emparelhar e se ligar ao mRNA complementar. Esta ligação complementar pode inibir a tradução de um mRNA complementar por emparelhamento de bases das moléculas de RNA e, desse modo, obstruir fisicamente ou dificultar estereotipicamente o mecanismo de tradução.

[075] Deve-se notar que , ao se referir ao asRNA como complementar, significa que o polinucleotídeo para uso na supressão antissentido pode corresponder a todo ou parte do complemento da sequência que codifica o polipeptídeo alvo, todo ou parte do complemento da região não traduzida 3' e/ou 5' do transcrito do polipeptídeo alvo, ou todo ou parte do complemento da sequência de codificação e das regiões não traduzidas de um transcrito que codifica o polipeptídeo alvo. Uma molécula de ácido nucleico complementar é a que é complementar a um

transcrito de mRNA de toda ou parte de uma molécula de ácido nucleico alvo. Além disso, o polinucleotídeo antissentido pode ser totalmente complementar (isto é, 100% idêntico ao complemento da sequência alvo) ou parcialmente complementar (isto é, menos de 100% idêntico ao complemento da sequência alvo) à sequência alvo.

[076] A supressão antissentido pode ser usada para inibir a expressão de várias proteínas na mesma célula. Além disso, porções dos nucleotídeos antissentido podem ser utilizadas para perturbar a expressão da molécula de ácido nucleico alvo. Geralmente, podem ser usadas sequências antissentido de pelo menos 10 nucleotídeos, 20 nucleotídeos, 50 nucleotídeos, 100 nucleotídeos, 200 nucleotídeos, 300, 500, 550, 500, 550 ou superior, e qualquer quantidade intermediária. A sequência pode ser complementar a qualquer sequência do RNA mensageiro, ou seja, pode ser proximal ao 5'-terminal ou sítio de capeamento, a jusante do sítio de capeamento, entre o sítio de capeamento e o códon de iniciação e pode cobrir todo ou apenas uma porção da região não codificadora, pode ligar a região não codificadora e codificadora, ser complementar à toda ou parte da região codificadora, complementar ao 3'-terminal da região codificadora ou complementar à região não traduzida 3' do mRNA.

[077] A sequência antissentido pode ser complementar a uma sequência única ou uma sequência repetida, de modo a aumentar a probabilidade de ligação. Assim, a sequência antissentido pode estar envolvida com a ligação de uma sequência única, uma única unidade de uma sequência repetitiva ou de uma pluralidade de unidades de uma sequência repetitiva. Os métodos de preparação de moléculas de ácido nucleico antissentido são geralmente conhecidos na técnica.

[078] Como tal, em certas modalidades, a presente invenção pode incluir sistemas, métodos e composições para inibir a expressão de uma molécula de ácido nucleico de um agente causador de doença e, mais preferencialmente, um

agente causador de EMS. Ao se referir à inibição da expressão de um gene alvo, entende-se que a expressão da molécula de ácido nucleico é inibida, interrompida ou de outra forma interferida, de modo que o hospedeiro alvo seja protegido de uma doença. A inibição da expressão de um gene alvo também pode geralmente se referir à tradução da molécula de ácido nucleico sendo inibida, interrompida ou de outra forma interferida com tal que o receptor eucariótico ou o hospedeiro alvo seja protegido de uma doença. A inibição da expressão de um gene alvo também pode significar que a expressão da molécula de ácido nucleico, como um polinucleotídeo de asRNA, inibe, interrompe ou interfere com a expressão ou tradução de um gene essencial em um patógeno de modo que o destinatário eucariótico ou hospedeiro alvo exiba taxas de infecção, taxas de transmissão, cargas de patógenos ou sintomas de doenças mais baixos do que as de um hospedeiro do tipo selvagem (WT).

[079] Como observado anteriormente, em uma modalidade, a invenção pode incluir o uso de asRNA que é complementar a uma molécula de ácido nucleico de um gene alvo em um agente causador de EMS. Em uma modalidade preferida, uma bactéria doadora pode ser geneticamente modificada para expressar um asRNA heterólogo. Esta expressão pode ser parte de um vetor de expressão e pode ser parte de um cassete de expressão e pode ainda ser operavelmente ligada a uma ou mais sequências de controle de expressão. Esta bactéria doadora geneticamente modificada pode ser introduzida em um hospedeiro alvo e expressar o asRNA heterólogo alvo que pode ser exportado da bactéria doadora e absorvido no agente causador de EMS, que nesta modalidade pode ser uma bactéria patogênica. O asRNA heterólogo, sendo distribuído às bactérias *Vibrio* patogênicas receptoras, pode impedir a expressão normal da proteína codificada pela molécula de ácido nucleico alvo. Isso pode resultar na interferência no ciclo de vida do agente causador de EMS, na capacidade de se replicar e / ou na patogenicidade, proporcionando assim um sistema eficaz de distribuição antibacteriana. Nesta modalidade, a bactéria

doadora pode ser uma cepa de bactéria simbiótica que pode persistir no hospedeiro alvo e fornecer expressão contínua de asRNA heterólogo, fornecendo assim produção contínua no alvo hospedeiro para combater o agente causador de EMS. Em modalidades adicionais, a bactéria doadora pode ser uma bactéria probiótica ou do tipo probiótico que pode persistir no hospedeiro alvo e expressar e distribuir asRNA heterólogo a um patógeno bacteriano receptor por um período de tempo limitado. Desta maneira, exposições múltiplas e sequenciais do hospedeiro alvo a um probiótico ou bactéria do tipo probiótico podem efetivamente fornecer asRNA heterólogo, mas não persistem permanentemente no hospedeiro alvo.

[080] Em outra modalidade preferida, uma bactéria doadora geneticamente modificada pode ser introduzida em um hospedeiro alvo que não foi exposto a um agente causador de EMS e pode expressar o asRNA heterólogo direcionado que pode ser exportado da bactéria doadora para o ambiente celular e/ou intracelular do hospedeiro alvo. O asRNA heterólogo, sendo distribuído ao hospedeiro receptor, pode atuar como um tratamento profilático, de modo que quando o agente causador de EMS, como uma bactéria *Vibrio* patogênica, é introduzido no hospedeiro alvo, o asRNA heterólogo impede a expressão normal da proteína codificada pelo molécula de ácido nucleico alvo e pode impedir a capacidade do agente causador de EMS de colonizar ou afetar o hospedeiro alvo. Nesta modalidade, a bactéria doadora pode ser uma cepa de bactéria simbiótica que pode persistir no hospedeiro alvo e fornecer expressão contínua de asRNA heterólogo, fornecendo assim a produção contínua de vacina profilática no hospedeiro conferindo um nível de imunidade ao agente causador de EMS.

[081] As modalidades adicionais podem incluir inativação genética induzida por asRNA de um, ou uma pluralidade de genes alvo. Por exemplo, em uma modalidade preferida, a inativação de genes pode ser direcionada a um ou mais genes de patógenos que são essenciais para virulência, proteínas de

revestimento, atividade metabólica, vias de infecção e / ou produção de energia e semelhantes. Embora fornecido em um modelo exemplificativo, um gene alvo pode incluir um ou mais genes responsáveis pela patogenicidade de uma bactéria ou pela capacidade de causar uma condição de doença no hospedeiro.

[082] Em uma modalidade, a invenção pode incluir a identificação de um gene alvo em um agente causador de EMS. Nesta modalidade preferida, o gene alvo pode incluir um gene essencial de um agente causador de EMS, o que significa que a inibição, interrupção ou interferência na expressão e / ou tradução de um ou mais genes essenciais resulta na redução no número de agentes causadores de EMS, melhoria da patogenicidade do agente causador de EMS, interrupção no ciclo de vida do agente causador de EMS, capacidade de colonizar o hospedeiro eucariótico, evitar uma resposta imune específica ou geral no hospedeiro ou causar um estado de doença.

[083] Em uma modalidade, o asRNA heterólogo, direcionado a uma sequência de ácido nucleico no agente causador de EMS que deve ser expresso ou inibido (molécula de ácido nucleico alvo ou gene alvo), pode expressar, inibir ou competir pelos sítios de ligação com qualquer molécula alvo de ácido nucleico como esta que, quando administrada, resulta em proteção ao hospedeiro eucariótico do agente causador da doença.

[084] De acordo com um aspecto da presente invenção, é fornecido um método para controlar um organismo infectado patogenicamente, o método compreendendo administrar um organismo hospedeiro alvo, que em uma modalidade preferida pode incluir organismos aquáticos, um agente de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que regula especificamente uma expressão de pelo menos um produto genético de patógeno alvo essencial, em que a sobreregular a expressão de pelo menos um produto genético de patógeno alvo essencial no hospedeiro alvo torna o hospedeiro alvo protegido do estado de doença causada por patógeno.

[085] Numa modalidade preferida, esse agente de ácido nucleico pode incluir um polinucleotídeo asRNA identificado como SEQ ID NO. 4, ou um homólogo e / ou ortólogo, ou outra sequência com 70% -99% de homologia do mesmo. As modalidades adicionais podem incluir qualquer ácido nucleico que abranja uma região superior à média da homologia entre os genes alvo essenciais de várias cepas de um patógeno causador de EMS. Uma modalidade preferida pode incluir qualquer ácido nucleico que abranja uma região de homologia superior à média entre os genes alvo essenciais, de várias cepas de um *Vibrio*. No exemplo de um agente causador da doença de *Vibrio* causador de EMS, este pode incluir, como mostrado geralmente abaixo na região que codifica o gene *dam* identificado como SEQ ID NO. 4, entre outros. Como observado em outros lugares, *dam* é um gene essencial em *Vibrio* sp. e está envolvido na regulação da expressão gênica. *Dam* também está envolvido na regulação da via da virulência em muitas bactérias causadoras de EMS.

[086] Em uma modalidade preferida, a invenção pode incluir uma ou mais bactérias Ag1 geneticamente engenheiradas configuradas para distribuir uma ou mais moléculas de asRNA a bactérias patogênicas em um organismo hospedeiro. Numa modalidade preferida, a invenção pode incluir uma ou mais bactérias geneticamente engenheirada configuradas para fornecer uma ou mais moléculas de asRNA identificadas como SEQ ID NO. 3, ou uma sequência com 70% a 99% de homologia, direcionada para inibir a expressão do gene *dam*, identificada como SEQ ID NO. 3, ou uma sequência com 70% a 99% de homologia, em bactérias patogênicas causadoras de EMS em um organismo hospedeiro aquático, como camarão ou outros organismos comumente criados através da aquicultura.

[087] Em outra modalidade preferida, a atual tecnologia inventiva pode estender essa tecnologia a micro-organismos simbióticos que persistem nos tecidos, filhotes e / ou ovos de um hospedeiro durante todo o seu desenvolvimento e na fase adulta. Dessa maneira, os micro-organismos geneticamente modificados podem

produzir e distribuir moléculas de asRNA continuamente aos patógenos alvo como *Vibrio* causador de EMS. Isso pode ser usado para tratar uma condição de doença EMS em um hospedeiro já infectado e / ou imunizar uma população suscetível.

[088] A presente invenção pode ainda incluir um ou mais vetores para inibir a expressão de múltiplos genes patógenos, em que o vetor compreende um, ou uma pluralidade de polinucleotídeos asRNA heterólogos, que podem corresponder a um ou mais genes patógenos selecionados. Esta modalidade pode incluir o uso de um sistema de expressão de plasmídeo. Em algumas modalidades, este plasmídeo pode ter um ou mais cassetes de expressão, incluindo: pelo menos uma cassete de supressão de genes contendo um polinucleotídeo operavelmente ligado a uma(s) sequência(s) de controle de expressão, em que o polinucleotídeo codifica uma molécula de asRNA heteróloga configurada para reduzir a expressão de um gene patogênico alvo, como geralmente descrito aqui.

[089] Uma modalidade preferida da presente invenção inclui um vetor para modular múltiplos genes de patógenos, em que o vetor compreendendo um ou uma pluralidade de asRNAs pode corresponder a um ou mais genes hospedeiros selecionados. Esta modalidade pode incluir o uso de um sistema de expressão de plasmídeo. Em algumas modalidades, este plasmídeo pode ter um ou mais cassetes de expressão, incluindo: pelo menos um cassete de supressão de genes contendo um polinucleotídeo operavelmente ligado a uma(s) sequência(s) de controle de expressão, em que o polinucleotídeo codifica uma molécula de asRNA heteróloga configurada para reduzir a expressão de um gene patogênico alvo, como geralmente descrito aqui.

[090] A presente invenção também inclui um vetor para inibir a expressão do gene do agente causador de EMS em um hospedeiro, em que o vetor compreende pelo menos um cassete de supressão de genes contendo um polinucleotídeo operavelmente ligado a uma sequência de controle de

expressão, em que o polinucleotídeo codifica uma molécula de asRNA que reduz a expressão de um gene patogênico alvo. Em uma modalidade, o polinucleotídeo que codifica o asRNA compreende a sequência nucleotídica da SEQ ID NO. 3. Exemplos de promotores adequados para os cassetes de supressão de genes incluem, entre outros, promotor Pupp, T7, promotor bla, promotor U6, promotor pol II, promotor E11 e promotor CMV e semelhantes. Opcionalmente, cada uma das sequências promotoras dos cassetes promotores de genes e dos cassetes supressores de genes pode ser induzível e / ou específica de tecido.

[091] Em aspectos adicionais, a presente invenção inclui métodos de administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma ou mais bactérias doadoras geneticamente modificadas que expressam um polinucleotídeo de asRNA heterólogo e / ou molécula extintora de quorum, como geralmente descrito acima. Em uma modalidade, esta quantidade terapêuticamente eficaz pode ser a quantidade de bactérias ou a quantidade de um polinucleotídeo de asRNA heterólogo e / ou molécula extintora de quorum por uma bactéria doadora geneticamente modificada que pode ser transportada para fora do doador e captada por um patógeno *Vibrio* alvo para melhorar, reduzir ou eliminar uma condição de doença, preferencialmente EMS, e / ou os referidos extintores de quorum pode inibir a patogenicidade mediada por GQ, respectivamente. Numa modalidade preferida, como asRNA e um ou mais extintores de quorum podem ser coexpressos como geralmente descrito aqui.

[092] Em outra modalidade, esta quantidade terapêuticamente eficaz pode ser a quantidade de bactérias geneticamente modificadas ou a quantidade de um polinucleotídeo de asRNA heterólogo e / ou molécula extintora de quorum expressa por um doador de bactérias geneticamente modificadas que podem ser transportadas para fora do doador, de modo que o hospedeiro tenha maior resistência à infecção por um patógeno *Vibrio* causador de EMS introduzido posteriormente.

[093] Em outra modalidade, esta quantidade terapeuticamente eficaz pode ser a quantidade de bactérias doadoras geneticamente modificadas que podem colonizar ou se tornar endêmica dentro de uma população de hospedeiros alvo por transferência vertical e / ou horizontal.

[094] Em uma modalidade, a presente invenção pode incluir métodos para a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma bactéria geneticamente modificada, configurada para expressar polinucleotídeo de asRNA heterólogo, que pode direcionar um gene alvo essencial no *Vibrio* que está envolvido na metilação de DNA. Numa modalidade preferida, este gene alvo pode incluir a SEQ ID NO. 4, ou uma sequência com 70% a 99% de homologia na mesma.

[095] Numa modalidade, a presente invenção pode incluir métodos para modular a metilação do DNA em um *Vibrio*, ou outros patógenos bacterianos. Nesta modalidade, o método pode incluir a etapa de administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma bactéria geneticamente modificada, configurada para expressar polinucleotídeo de asRNA heterólogo, pode direcionar um gene alvo essencial no *Vibrio* que está envolvido na metilação de DNA. Numa modalidade preferida, este gene alvo pode incluir a SEQ ID NO. 4, ou uma sequência com 70% a 99% de homologia na mesma.

[096] Em uma modalidade, a presente invenção pode incluir métodos de administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma bactéria geneticamente modificada, configurada para expressar polinucleotídeo heterólogo de asRNA, pode direcionar um gene alvo essencial no *Vibrio* que está envolvido na metilação de DNA e, em que o referido asRNA pode ser identificado como SEQ ID NO. 3, ou uma sequência com 70% a 99% de homologia na mesma.

[097] As modalidades alternativas da presente invenção podem incluir um novo método *in vitro* e / ou *in vivo* para selecionar as bactérias simbióticas que podem ser utilizadas em um sistema eficaz de supressão de genes de patógenos. Em

particular, outro objetivo da presente invenção pode incluir um novo método *in vitro* e / ou *in vivo* para selecionar as bactérias hospedeiras simbióticas que podem ser utilizadas em um sistema eficaz de supressão de genes de patógenos. Essas bactérias hospedeiras simbióticas podem não ser patogênicas aos seres humanos e, além disso, têm cultura, transformabilidade, mobilização de plasmídeos e são capazes de secretar ácidos nucleicos alvo, como asRNA e semelhantes, endêmicas ou capazes de se tornar endêmicas nas populações hospedeiras, dispersíveis, por exemplo, por aerossolização, capazes de sobreviver no ambiente e ser consumidas ou absorvidas pelos hospedeiros em todas as fases da vida, preferivelmente.

[098] Em outro aspecto, a presente invenção inclui os métodos para a produção dos vetores da presente invenção. Ainda em outro aspecto, a presente invenção inclui métodos para produzir os micro-organismos transformados ou geneticamente modificados da presente invenção, por exemplo, através da transformação com um plasmídeo recombinante.

[099] Outra modalidade da presente invenção pode incluir uma célula, como um micro-organismo geneticamente modificado, configurado para expressar um agente de ácido nucleico heterólogo, como um asRNA, ou o construto de ácido nucleico, como um plasmídeo, de algumas modalidades da invenção. Em uma modalidade preferida, a presente invenção pode incluir uma bactéria geneticamente modificada, configurada para expressar um polinucleotídeo de asRNA heterólogo e / ou molécula de extinção de quorum.

[0100] Outra modalidade da presente invenção pode incluir uma célula compreendendo o agente de ácido nucleico isolado, como uma molécula de asRNA ou extinção de quorum ou o construto de ácido nucleico, como um plasmídeo, de algumas modalidades da invenção, em que a célula é selecionada do grupo que consiste em um célula bacteriana, célula de algas, bactéria simbiótica e célula de um micro-organismo da superfície da água. De acordo com um aspecto de algumas modalidades da presente invenção, é fornecido um

composto ingerível compreendendo a célula de algumas modalidades da invenção.

[0101] Em outra modalidade preferida, uma espécie ou cepa de bactéria pode ser modificada para produzir um asRNA que pode ser complementar ao mRNA que codifica a DNA adenina metilase (Dam) em *Vibrio*. Essas bactérias modificadas podem incluir cepas ou espécies que fazem parte da flora normal do camarão e / ou simbiótica e / ou endossimbiótica com um hospedeiro alvo, como camarão ou outros organismos aquáticos. Após a introdução, essas bactérias geneticamente modificadas podem ser absorvidas pelo camarão e se tornar parte da flora normal.

[0102] Nesta modalidade, o asRNA identificado como SEQ ID NO. 1, pode ser expresso em uma bactéria doadora, como cepa de *E. coli* ou *Enterobacter* como Ag1, e pode suprimir a expressão *dadam*, ou outro gene essencial em *Vibrio* em um hospedeiro alvo. Em outra modalidade, asRNA-Dam, identificado como SEQ ID NO. 1, expresso em uma bactéria doadora, identificada como SEQ ID NO. 4, pode diminuir a aptidão de *Vibrio* causador de EMS e também gerar um declínio pronunciado na formação ou patogênese do biofilme. A diminuição da aptidão de *Vibrio* pode estar diretamente relacionada à redução da expressão de Dam nas células *Vibrio* receptoras, conforme indicado pelas observações encontradas no Pedido de PCT totalmente incorporado PCT/US18/33976, que:

- 1) o DNA de *Vibrio* é 30% menos metilado quando cocultivado com bactérias que expressam asRNA-Dam;
- 2) a origem de replicação de *Vibrio oriC* e o promotor de *dnaA*, elementos críticos no início da replicação do DNA, eram 2 vezes menos metilados do que nos controles não expostos a bactérias que expressam asRNA-Dam;
- 3) a expressão do gene *Vibrio dam* também diminuiu 2 vezes em relação aos controles;
- 4) a expressão do gene *Vibrio dnaA* diminuiu 3 vezes em relação aos controles;
- 5) a expressão do gene *Vibrio dam* gene pode diminuir 6 vezes quando exposta à *Enterobacter Ag1* que expressa asRNA-Dam no organismo animal modelo. Tais resultados demonstram a capacidade

da presente invenção de controlar a geração de doenças e biofilmes por produção e distribuição direcionadas de asRNA de um doador a uma bactéria receptora em um organismo hospedeiro.

[0103] Como observado anteriormente, a distribuição de asRNA heterólogo e / ou moléculas de extinção de quorum, pode ser realizada através da introdução de micro-organismos doadores específicos a hospedeiros geneticamente modificados, como bactérias entéricas, endofíticas, simbióticas e / ou endossimbióticas. Esses micro-organismos específicos do hospedeiro geneticamente modificados podem incluir: 1) micro-organismos que fazem parte do microbioma bacteriano interno ou externo normal do patógeno alvo; 2) micro-organismos que foram modificados para serem capazes de colonizar um hospedeiro alvo, tecido, célula ou ambiente hospedeiro alvo; 3) micro-organismos que são utilizados como alimento ou fonte de energia pelo hospedeiro alvo; ou 4) micro-organismos que foram modificados para colonizar ou persistir temporariamente no hospedeiro alvo, como no caso de um micro-organismo probiótico ou do tipo probiótico, um animal, planta, tecido, célula ou ambiente hospedeiro específico. Como observado anteriormente, em uma modalidade preferida, a bactéria doadora de asRNA heterólogo pode incluir *E. coli*, bem como a bactéria do gênero *Enterobacter*, como Ag1 como aqui descrito.

[0104] Em uma modalidade preferida, as bactérias dadoras podem ser transformadas com construtos genéticos criados artificialmente, tais como plasmídeos que podem gerar polinucleotídeos de asRNA heterólogo e / ou moléculas de extinção de quorum. Tais plasmídeos podem ser construídos para serem transferíveis para outras bactérias através de conjugação e outros meios que podem permitir a distribuição generalizada do construto, em alguns casos. Em certas modalidades, moléculas de asRNA e / ou moléculas de extinção de quorum podem ser codificadas em plasmídeos e / ou BACs sob o controle de um par promotor / terminador de gene constitutivo, indutível, heterólogo ou homólogo nas bactérias doadoras que distribuem os polinucleotídeos de asRNA

heterólogo e / ou as moléculas de extinção de quorum. Em uma modalidade adicional, os construtos genéticos para a geração de polinucleotídeos de asRNA heterólogo e / ou moléculas de extinção de quorum podem ser integrados no genoma bacteriano da bactéria de distribuição ou hospedeira.

[0105] Em outra modalidade preferida, um ou mais polinucleotídeos de asRNA heterólogo e/ou moléculas de extinção de quorum podem ser distribuídos a um hospedeiro / população animal alvo através de bactérias doadoras geneticamente modificadas que podem colonizar naturalmente o hospedeiro ou ser configuradas para colonizar o hospedeiro. As bactérias doadoras podem então, em uma modalidade preferida, disseminar os construtos genéticos que expressam polinucleotídeos de asRNA heterólogo ou moléculas de extinção de quorum para micro-organismos hospedeiros que de ocorrência natural e / ou bactérias patogênicas no ambiente circundante. Nesta modalidade, uma vez colonizada no hospedeiro alvo, a transmissão vertical das bactérias modificadas pode ser passada para a progênie do hospedeiro, replicando assim naturalmente a resistência bacteriana patogênica às gerações subsequentes. Além disso, as bactérias modificadas também podem ser transmitidas horizontalmente para a população hospedeira em geral através da distribuição das bactérias modificadas no meio ambiente como lixo. Tal característica pode permitir a administração única ou pelo menos periódica das bactérias geneticamente modificadas no hospedeiro e / ou no ambiente do hospedeiro, gerando uma vantagem comercial significativa.

[0106] A tecnologia inventiva pode ainda compreender métodos e técnicas para controlar os níveis e o tempo da expressão de polinucleotídeos de asRNA heterólogo nas bactérias doadoras. Em uma modalidade preferida, a expressão de um ou mais polinucleotídeos de asRNA heterólogo pode estar sob o controle de uma nova troca de genes. Essa troca de genes pode ser controlada por uma molécula de troca, que pode ser uma molécula solúvel em água e de grau alimentar que pode ser adicionada ao ambiente do organismo do hospedeiro ou

a um suprimento de alimentos. A presença desta molécula de troca pode ser ativada, por exemplo produção de asRNA heterólogo. Na sua ausência, a produção de asRNA pode não ocorrer ou apenas ocorrer em níveis desprezíveis.

[0107] As modalidades adicionais da presente invenção podem incluir métodos e sistemas para otimizar a eficácia dos polinucleotídeos de asRNA heterólogos. Em uma modalidade preferida, o asRNA pode ser coexpresso e / ou fundido com proteínas chaperonas para proteger as moléculas de RNA da degradação. As modalidades preferidas adicionais podem incluir a coexpressão e / ou fusão de marcadores / porções de secreção que podem facilitar a secreção e / ou absorção de polinucleotídeos de asRNA heterólogos, aumentando sua eficácia.

[0108] Endoribonucleases, exoribonucleases e degradossomas de RNA bacterianas podem degradar as moléculas de RNA não codificadoras, como asRNA. Em uma modalidade, a tecnologia inventiva pode incluir modificação das bactérias de distribuição previamente identificadas para ter a expressão reduzida ou função ou atividade inativada dessas famílias de proteínas. Esta diminuição ou inativação na expressão e / ou atividade pode inibir ou diminuir a degradação de espécies de RNA não codificadoras de fita simples. Em uma modalidade preferida, as bactérias específicas do hospedeiro previamente identificadas podem ser geneticamente modificadas para expressar eficientemente os polinucleotídeos de asRNA heterólogos em um fundo deficiente em endoribonuclease, exoribonuclease e / ou degradossomas de RNA. Em uma modalidade preferida, uma bactéria doadora pode não ter ou ter a função de RNase III degradada. Nesta modalidade preferida, estes genes de degradação de moléculas de RNA não codificadoras podem ser eliminados por recombinação homóloga ou por outros métodos apropriados.

[0109] Outra modalidade da tecnologia inventiva pode incluir sistemas e métodos para facilitar a superexpressão de genes bacterianos específicos do hospedeiro conhecidos por melhorar a estabilização e / ou mobilização de moléculas de RNA não codificadoras, como asRNA e / ou gRNA, bem como a mobilização e

disseminação de seus construtos genéticos subjacentes, como plasmídeos. Nesta modalidade preferida, um ou mais genes conhecidos por estabilizarem asRNA ou mobilizarem os construtos genéticos, tais como plasmídeos podem ser superexpressos para melhorar a sua vida útil e facilitar o movimento no organismo / célula / tecido hospedeiro.

[0110] Em outra modalidade, as moléculas de RNA não codificadoras, como polinucleotídeos de asRNA heterólogo, podem ser distribuídos por bactérias modificadas e / ou geneticamente modificadas que induzem a formação de conexões intracelulares, especialmente em condições ambientais não ideais ou onde certos nutrientes essenciais estão ausentes no ambiente circundante. Dessa maneira, as bactérias podem formar nanotubos para trocar nutrientes, material genético e outros sinais químicos entre as células conectadas e, assim, ajudar a distribuir funções metabólicas nas comunidades microbianas. Nesta modalidade, as bactérias auxotróficas podem ser geneticamente modificadas para induzir a formação de nanotubos que podem permitir a disseminação direta de asRNA de bactérias doadoras para bactérias alvo ou receptoras. Em outra modalidade, as bactérias auxotróficas podem ser geneticamente modificadas para induzir a formação de nanotubos que podem permitir a disseminação de construtos genéticos que codificam para o asRNA para atingir as bactérias que não possuem o construto genético artificial. Nessa configuração, sob certas condições ambientais ou deficientes em nutrientes, as bactérias de distribuição podem disseminar asRNA e / ou os construtos genéticos, como plasmídeos, que codificam um asRNA para outras bactérias na comunidade. Essa ação pode ajudar a prejudicar a expressão de genes alvo específicos em uma grande população de bactérias patogênicas.

[0111] Nesta modalidade, esses construtos genéticos podem incluir porções de regulação de transcrição, como promotores, terminadores, coativadores e correpressores e elementos de controle semelhantes que podem ser regulados em sistemas procarióticos, e também eucarióticos. Tais sistemas podem permitir

o controle do tipo, tempo e quantidade de polinucleotídeos heterólogos de asRNA, ou outras moléculas de RNA não codificadoras, expressas no sistema. As modalidades adicionais podem incluir construtos genéticos que podem ser induzidos por fatores externos, como a presença de uma proteína ou composto específico dentro de uma célula, como proteínas relacionadas ao estresse geradas em resposta a um patógeno ou mesmo as proteínas e outros compostos precursores gerados por patógenos e semelhantes.

[0112] Como observado anteriormente, em uma modalidade preferida, um ou mais polinucleotídeos de asRNA heterólogos podem ser distribuídos a um hospedeiro/população alvo de camarão através de bactérias geneticamente modificadas que podem naturalmente, ou ser configuradas para, colonizar e / ou ser simbióticas com o camarão. Nesta modalidade, uma vez colonizada no hospedeiro, a transmissão vertical das bactérias modificadas pode ser passada para a progênie do hospedeiro, replicando assim naturalmente a resistência patogênica às gerações subsequentes. Em certas modalidades, as bactérias geneticamente modificadas que expressam um ou mais polinucleotídeos de asRNA heterólogo podem colonizar um camarão ao longo de seu ciclo de vida. Por exemplo, uma bactéria doadora geneticamente modificada que expressa um ou mais polinucleotídeos de asRNA heterólogos pode colonizar um camarão enquanto ele é: um ovo, um nauplius, um protozoário, um mysis, estágio pós-larval ou um adulto. Nesta modalidade, as bactérias colonizadas podem expressar polinucleotídeos de asRNA heterólogos, que podem ser direcionados para serem expressos e transportados da bactéria doadora e absorvidos por uma bactéria patogênica receptora e inibem a expressão ou um ou mais genes essenciais. Além disso, essas bactérias colonizadas, que se tornam permanente e / ou temporariamente parte do microbioma natural do hospedeiro, podem distribuir continuamente os polinucleotídeos de asRNAs heterólogos, em um caso através do intestino, desde os estágios larvais mais antigos até o estágio adulto, fornecendo sobrerregulação de mRNA específico para o patógeno de

genes patógenos essenciais ao longo do ciclo de vida do hospedeiro. Além disso, como o vetor bacteriano doador pode ser uma parte já natural do microbioma do hospedeiro, sua presença pode não representar nenhum risco para o organismo, o ambiente ou os consumidores finais.

[0113] A tecnologia inventiva pode incluir métodos e técnicas para a geração de bactérias específicas do hospedeiro e, em particular, bactérias entéricas ou simbióticas específicas do hospedeiro que podem atuar como um vetor de doador apropriado para polinucleotídeos de asRNA heterólogos e moléculas de extinção de quorum direcionados a patógenos bacterianos que afetam organismos aquáticos. Como um modelo exemplificativo, o camarão pode ser utilizado como hospedeiro alvo. No entanto, como pode ser compreendido por um versado na técnica, esses métodos e técnicas podem ser aplicados a uma variedade de organismos diferentes.

[0114] O termo "aquicultura", conforme usado aqui, inclui o cultivo de organismos aquáticos sob condições controladas.

[0115] O termo "organismo aquático" e / ou "animal aquático", conforme usado aqui, inclui organismos cultivados em água, seja água doce ou salgada. Os organismos / animais aquáticos incluem vertebrados, invertebrados, artrópodes, peixes, moluscos, incluindo camarão (por exemplo, camarão penaeid, *Penaeus esculentus*, *Penaeus setiferus*, *Penaeus stylirostris*, *Penaeus occidentalis*, *Penaeus japonicus*, *Penaeus vannamei*, *Penaeus monodon*, *Penaeus chinensis*, *Penaeus aztecus*, *Penaeus duorarum*, *Penaeus indicus* e *Penaeus merguensis*, *Penaeus californiensis*, *Penaeus semisulcatus*, *Penaeus monodon*, camarão de água salgada, camarão de água doce, etc), caranguejos, ostras, vieiras, amêijoas de camarão, peixe cartilaginoso (por exemplo, pargo, truta, robalo, etc.) robalo, tilápia, peixe-gato, salmonídeos, carpas, peixes-gato, savelhas, peixes-carpa, tambor vermelho, etc.), crustáceos, entre outros. Camarão incluem, camarão criado na aquicultura também.

[0116] O termo "probiótico" refere-se a um micro-organismo, como bactérias, que pode colonizar um hospedeiro e proporcionar um benefício. O termo "probiótico" também refere-se a um micro-organismo, como bactérias, que podem colonizar um hospedeiro por um período de tempo suficiente para desviar uma quantidade terapêutica ou eficaz de um polinucleotídeo de asRNA heterólogo e/ou uma molécula de extinção de quorum. Um probiótico pode incluir bactérias endossimbióticas ou flora natural que pode colonizar permanentemente temporariamente um animal, como um organismo aquático. Os organismos probióticos também podem incluir algas e fungos, como leveduras.

[0117] Exemplos específicos de vetores bacterianos incluem bactérias (por exemplo, cocos e bastonetes), algas filamentosas e detritos. As modalidades específicas de células de vetores bacterianos transformáveis que podem ser endógenas através de todos os ciclos de vida do hospedeiro podem incluir todas as listadas aqui. Modalidades adicionais podem incluir uma ou mais cepas bacterianas adicionais.

[0118] O termo "operon" refere-se a uma unidade composta de genes ligados.

[0119] As moléculas de "extintor de quorum" ou "extinção de quorum" referem-se a moléculas heterólogas ou homólogas que inibem QS e / ou a formação de biofilmes e / ou reduzem a patogenicidade bacteriana.

[0120] A presente invenção pode incluir novos sistemas e métodos para a expressão de gRNA em uma espécie ou cepa bacteriana de doador simbiótico que pode ser utilizada pelo sistema CRISPR / Cas9 para interromper os genes alvo em bactérias patogênicas que expressam genes CRISPR / Cas9, como *dam*, ou genes QS. Geralmente, o CRISPR / Cas9 pode ser usado para gerar um gene alvo nocauteado ou perturbado coexpressando um gRNA específico para o gene a ser direcionado e a endonuclease Cas9. O CRISPR pode consistir em dois componentes: gRNA e uma endonuclease não específica associada ao CRISPR (Cas9). O gRNA pode ser um RNA sintético curto composto por uma sequência de andaime que pode permitir a ligação de Cas9 e um espaçador de

~20 nucleotídeos ou sequência de direcionamento que define o alvo genômico a ser modificado. Em uma modalidade preferida, as bactérias exemplificativas, como bactérias simbióticas e endossimbióticas podem ser geneticamente modificadas para produzir um ou mais gRNAs direcionados à sequência genética de um gene patogênico ou outro gene alvo e que podem se associar à endonuclease Cas9 de ocorrência natural da bactéria alvo. Em outra modalidade preferida, as bactérias exemplares, como as bactérias endofíticas e / ou entéricas, podem ser geneticamente modificadas para produzir um ou mais gRNAs que são direcionados à sequência genética de um gene patogênico ou outro gene alvo, como *dam* em *Vibrio*, e que podem se associar à endonuclease Cas9 de ocorrência natural da bactéria alvo.

[0121] Como utilizado neste documento, o termo "RNA antissentido" ou "asRNA" refere-se a um agente RNAi que é um oligonucleotídeo de fita simples. Em um asRNA típico, a fita simples é complementar a todo ou parte do mRNA alvo. A complementaridade de um asRNA pode ser com qualquer parte do transcrito do gene específico, isto é, na sequência não codificadora 5', na sequência não traduzida 3', nos íntrons ou na sequência codificadora. O asRNA pode ser introduzido em uma célula para inibir a tradução de um mRNA complementar por emparelhamento de bases com ele e obstruir fisicamente a máquina de tradução. O RNA antissentido emparelha a uma sequência alvo de mRNA complementar e a tradução da sequência alvo de mRNA é interrompida como resultado do impedimento estérico seja do acesso ao ribossomo ou da leitura ribossômica. O mecanismo de RNA antissentido é diferente da interferência de RNA (RNAi), um processo relacionado no qual fragmentos de RNA de fita dupla (dsRNA, também chamados de pequenos RNAs interferentes (siRNAs)) desencadeiam o silenciamento de genes mediado cataliticamente, geralmente direcionando o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) para se ligar e degradar o mRNA. O recozimento de uma fita da molécula de asRNA em mRNA ou DNA pode resultar em rápida degradação do RNA duplex, RNA híbrido / DNA duplex

ou RNA duplex semelhante ao tRNA precursor por ribonucleases na célula ou pela clivagem do RNA alvo pelo composto antissentido em si.

[0122] Como aqui utilizado, o *Vibrio* é um gênero de bactérias anaeróbicas facultativas Gram-negativas que possuem uma forma de bastão curvo, com *Vibrio* sp. indicando uma espécie do gênero *Vibrio*. Em algumas modalidades, *Vibrio* sp. pode compreender qualquer uma ou mais das seguintes espécies de *Vibrio* e em todas as combinações possíveis: *adaptatus*, *aerogenes*, *aestivus*, *aestuarianus*, *agarivorans*, *albensis*, *alfacsensis*, *alginolyticus*, *anguillarum*, *areninigrae*, *artabrorum*, *atlanticus*, *atypicus*, *azureus*, *brasiliensis*, *calviensis*, *campbellii*, *casei*, *chagasii*, *cólera*, *cincinnatiensis*, *coralliilyticus*, *crassostreae*, *cyclitrophicus*, *diabolicus*, *diazotrophicus*, *ezurae*, *fischeri*, *fluvialis*, *fortis*, *furnissii*, *gallicus*, *gazous*, *gigantis*, *haliótico*, *harioti*, *hepaticápolis*, *harioti*, *ichthyoenteri*, *indicus*, *kanalobae*, *lentus*, *litoralis*, *logei*, *mediterranei*, *metschnikovii*, *mimicus*, *mytili*, *natriegens*, *navarrensis*, *neonates*, *neptunius*, *nereis*, *nigripulchritudo*, *ordalii*, *orientalis*, *pacinii*, *parahaicolysus*, *pectenicidae*, *pectenicidae*, *pectenicidae rotiferianus*, *ruber*, *rumoiensis*, *salmonicida*, *scophthalmi*, *splendidus*, *superstes*, *tapetis*, *tasmaniensis*, *tubiashii*, *vulnificus*, *wodanis* e *xuii*.

[0123] Como utilizado neste documento, a frase "hospedeiro" ou "hospedeiro alvo" refere-se a um organismo ou população portadora de um patógeno causador de doença ou um organismo ou população suscetível a um patógeno causador de doença. Um "hospedeiro" ou "hospedeiro alvo" pode ainda incluir um organismo ou população capaz de transportar um patógeno causador de doença.

[0124] Como utilizado neste documento, os termos "controle" e / ou "biocontrole" se referem a reduzir e / ou regular a progressão e / ou transmissão de patógenos / doenças.

[0125] Como utilizado neste documento, "vacina" refere-se a composições que resultam em imunizações ativas e passivas. Tanto os polipeptídeos quanto os

polinucleotídeos quanto os seus produtos genéticos expressos são aqui referidos como vacinas. Uma alimentação pode incluir uma bactéria tratada configurada para expressar um polinucleotídeo de RNA heterólogo e / ou uma molécula de extinção de quorum também pode ser uma vacina. A alimentação com ração tratada a um animal pode ser uma vacinação.

[0126] Como utilizado neste documento, a frase "alimento para animais" refere-se ao material de consumo animal introduzido como parte do regime de alimentação ou aplicado diretamente à água no caso de animais aquáticos. Um "alimento tratado" refere-se a um alimento tratado com uma bactéria tratada configurada para expressar polinucleotídeo bacteriano e de moléculas de extinção de quorum, como geralmente descrito aqui. Uma "alimentação" também pode ser um ou um inóculo de lagoa de cultura de camarão / aquicultura.

[0127] O termo "ácido nucleico", conforme usado aqui, refere-se a um polímero de ribonucleotídeos ou desoxirribonucleotídeos. Tipicamente, os polímeros de "ácido nucleico" ou de "agente de ácido nucleico" ocorrem na forma de fita simples ou dupla, mas também são conhecidos por formar estruturas compreendendo três ou mais fitas. O termo "ácido nucleico" inclui polímeros de ácido nucleico de ocorrência natural, bem como ácidos nucleicos compreendendo análogos de nucleotídicos conhecidos ou resíduos ou ligações modificadas da cadeia principal, que são sintéticos, de ocorrência natural e de ocorrência não natural, que têm propriedades de ligação semelhantes às do ácido nucleico de referência e que são metabolizados de maneira semelhante aos nucleotídeos de referência. Análogos exemplificativos incluem, entre outros, fosforotioatos, fosforamidatos, metil fosfonatos, fosfonatos quirometil metil, 2-O-metil ribonucleotídeos e ácidos nucleicos peptídicos (PNAs). "DNA", "RNA", "polinucleotídeos", "sequência de polinucleotídeos", "oligonucleotídeo", "oligonucleotídeo", "nucleotídeo", "ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico", "sequência de ácido nucleico", "fragmento de ácido nucleico" e "fragmento de ácido nucleico isolado" são aqui utilizados indiferentemente.

[0128] O termo "recombinante" quando usado com referência, por exemplo, a uma célula, ou ácido nucleico, proteína ou vetor, indica que a célula, organismo, ácido nucleico, proteína ou vetor foi modificada pela introdução de um ácido nucleico heterólogo ou proteína ou a alteração de um ácido nucleico ou proteína nativo ou a célula é derivada de uma célula assim modificada. Assim, por exemplo, as células recombinantes podem expressar genes que não são encontrados na forma nativa (não recombinante ou do tipo selvagem) da célula ou expressar genes nativos que de outra forma são anormalmente expressos, superexpressos, subexpressos ou não expressos de forma alguma.

[0129] Os termos "geneticamente modificados", "biotransformados", "transgênicos", "transformados", "transformação" e "transfecção" têm significado semelhante a "recombinantes". "Transformação", "transgênico" e "transfecção" se referem à transferência de um polinucleotídeo para o genoma de um organismo hospedeiro ou para uma célula. Essa transferência de polinucleotídeos pode resultar em herança geneticamente estável dos polinucleotídeos ou nos polinucleotídeos que permanecem extracromossômicos (não integrados ao cromossomo da célula). A herança geneticamente estável pode potencialmente exigir que o organismo ou célula transgênica seja submetido, por um período de tempo, a uma ou mais condições que exijam a transcrição de parte ou de todo o polinucleotídeo transferido para que o organismo ou célula transgênica viva e / ou cresça. Os polinucleotídeos que são transformados em uma célula, mas não estão integrados no cromossomo do hospedeiro, permanecem como um vetor de expressão dentro da célula. Pode ser necessário cultivar a célula sob certas condições ambientais ou de crescimento para que o vetor de expressão permaneça na célula ou na progênie da célula. Além disso, para que a expressão ocorra, o organismo ou célula pode precisar ser mantido sob certas condições. Os organismos ou células hospedeiras contendo o polinucleotídeo recombinante podem ser referidos como

organismos ou células “transgênicos” ou “transformados” ou simplesmente como “transformantes”, bem como organismos ou células recombinantes.

[0130] O termo "vetor" refere-se a alguns meios pelos quais DNA, RNA, uma proteína ou polipeptídeo podem ser introduzidos em um hospedeiro. Os polinucleotídeos, proteínas e polipeptídeos que devem ser introduzidos em um hospedeiro podem ser de natureza terapêutica ou profilática; podem codificar ou ser um antígeno; podem ser de natureza regulatória; etc. Existem vários tipos de vetores, incluindo vírus, plasmídeo, bacteriófagos, cosmídeos e bactérias.

[0131] Um "vetor de expressão" é um ácido nucleico capaz de se replicar em uma célula ou organismo hospedeiro selecionado. Um vetor de expressão pode se replicar como uma estrutura autônoma ou, alternativamente, pode integrar-se, no todo ou em parte, aos cromossomos da célula hospedeira ou aos ácidos nucleicos de uma organela ou pode ser usado como uma lançadeira para distribuir DNA estranho às células e assim replicar junto com o genoma da célula hospedeira. Assim, os vetores de expressão são polinucleotídeos capazes de se replicar em uma célula hospedeira, organela ou organismo selecionado, por exemplo, um plasmídeo, vírus, cromossomo artificial, fragmento de ácido nucleico e para os quais certos genes no vetor de expressão (incluindo genes de interesse) são transcritos e traduzidos em um polipeptídeo ou proteína dentro da célula, organela ou organismo; ou qualquer construto adequado conhecido na técnica, que compreende um "cassete de expressão". Por outro lado, como descrito nos exemplos deste documento, um "cassete" é um polinucleotídeo contendo uma seção de um vetor de expressão desta invenção. O uso do cassete auxilia na montagem dos vetores de expressão. Um vetor de expressão é um replicon, como plasmídeo, fago, vírus, vírus quimérico ou cosmídeo, e que contém a sequência polinucleotídica desejada operavelmente ligada à(s) sequência(s) de controle de expressão.

[0132] Uma sequência de polinucleotídeo é "operavelmente ligada" a uma sequência de controle de expressão" (por exemplo, um promotor e,

opcionalmente, um intensificador) quando a sequência de controle de expressão controla e regula a transcrição e / ou tradução dessa sequência de polinucleotídeo. Como utilizado neste documento, a frase "produto genético" refere-se a uma molécula de RNA ou uma proteína. Além disso, o termo "gene" pode às vezes se referir à sequência genética, ao mRNA transcrito e possivelmente modificado desse gene ou à proteína traduzida desse mRNA.

[0133] Os presentes ensinamentos contemplam o direcionamento de homólogos e ortólogos de acordo com as espécies patogênicas selecionadas, por exemplo, espécies de *Vibrio*. Sequências homólogas incluem sequências ortólogas e parálogas. O termo "parálogo" refere-se a duplicações de genes no genoma de uma espécie que leva a genes parálogos. O termo "ortólogo" refere-se a genes homólogos em diferentes organismos devido à relação ancestral. Assim, os ortólogos são contrapartes evolutivas derivadas de um único gene ancestral no último ancestral comum de duas espécies (Koonin EV and Galperin MY (Sequence - Evolution - Function: Computational Approaches in Comparative Genomics. Boston: Kluwer Academic; 2003. Chapter 2, Evolutionary Concept in Genetics and Genomics. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20255/) e, portanto, tem grande probabilidade de ter a mesma função. Como tal, os ortólogos geralmente desempenham um papel semelhante ao das espécies originais de outras espécies.

[0134] A homologia (por exemplo, porcentagem de homologia, identidade de sequência + semelhança de sequência) pode ser determinada usando qualquer software de comparação de homologia que calcule um alinhamento de sequência em pares. Como utilizado neste documento, "identidade de sequência" ou "identidade" no contexto de duas sequências de ácido nucleico ou polipeptídeo inclui referência aos resíduos nas duas sequências que são iguais quando alinhadas. Quando o percentual de identidade de sequência é usado em referência a proteínas reconhece-se que as posições do resíduo que não são idênticas frequentemente diferem por substituições conservativas de

aminoácidos, em que os resíduos de aminoácidos são substituídos por outros resíduos de aminoácidos com propriedades químicas semelhantes (por exemplo, carga ou hidrofobicidade) e, portanto, não alteram as propriedades funcionais da molécula. Onde as sequências diferem nas substituições conservadoras, a identidade percentual da sequência pode ser ajustada para cima para corrigir a natureza conservadora da substituição. As sequências que diferem por tais substituições conservadoras são ditas para terem "similaridade da sequência" ou "similaridade". Os meios para realizar este ajuste são bem conhecidos pelos versados na técnica. Normalmente isso envolve marcar uma substituição conservadora como uma incompatibilidade parcial e não completa, aumentando assim a identidade da sequência percentual. Assim, por exemplo, quando um aminoácido idêntico recebe uma pontuação de 1 e uma substituição não conservadora recebe uma pontuação zero, uma substituição conservadora recebe uma pontuação entre zero e 1. A pontuação das substituições conservadoras é calculada, por exemplo, de acordo com o algoritmo de Henikoff S e Henikoff JG. [Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1992, 89(22): 10915-9].

[0135] De acordo com uma modalidade específica, as sequências de homólogos são pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou mesmo idênticas às sequências (sequências de ácido nucleico ou aminoácido) fornecidas aqui. Sequências homólogas de qualquer uma das SEQ ID Nos 1-4 entre 50% a 99% podem ser incluídas em certas modalidades da presente invenção.

[0136] A expressão de sobrerregulação de um produto genético de patógeno pode ser monitorada, por exemplo, por detecção direta de transcritos de genes (por exemplo, por PCR), por detecção de polipeptídeo(s) codificado(s) pelo gene (por exemplo, por Western blot ou imunoprecipitação), por detecção da atividade biológica de polipeptídeos codificados pelo gene (por exemplo, atividade catalítica, ligação a ligantes e semelhantes) ou por monitoramento de alterações

no hospedeiro (por exemplo, motilidade reduzida do hospedeiro etc.). Adicional ou alternativamente, a expressão da sobreexpressão de um produto genético de patógeno pode ser monitorada medindo os níveis de patógeno (por exemplo, níveis bacterianos etc.) no hospedeiro em comparação com um hospedeiro do tipo selvagem (isto é, controle) não tratado pelos agentes da invenção.

[0137] Como utilizado neste documento, o termo "moléculas de RNA interferentes" ou "RNA interferente" refere-se a um polinucleotídeo de RNA que é capaz de inibir ou "silenciar" a expressão de um gene alvo em um patógeno. Em certas modalidades, uma "molécula de RNA interferente" ou "RNA interferente" pode incluir um asRNA ou asRNA heterólogo. A sequência inibidora de RNA pode ser maior que 90% idêntica ou mesmo 100% idêntica à porção do transcrito do gene alvo. Alternativamente, a região duplex do RNA pode ser definida funcionalmente como uma sequência de nucleotídeo que é capaz de hibridizar com uma porção do transcrito do gene alvo sob condições rigorosas (por exemplo, NaCl 400 mM, PIPES 40 mM pH 6,4, EDTA 1 mM, hibridação em 60 graus C por 12 horas; seguido de lavagem). O comprimento das sequências de nucleotídeos de fita simples complementares ao transcrito do gene alvo pode ser pelo menos cerca de 18, 19, 21, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 491, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 900, 1000 ou mais bases. Em algumas modalidades da invenção, o comprimento da sequência de nucleotídeos de fita dupla é aproximadamente de cerca de 18 a cerca de 530, ou mais, nucleotídeos de comprimento.

[0138] Deve-se notar que o asRNA pode ser definido em termos da sequência de ácido nucleico do DNA que codifica o transcrito do gene alvo e entende-se que uma sequência de asRNA correspondente à sequência de codificação de um gene compreende um complemento de RNA da sequência de codificação do gene ou outra sequência do gene que é transcrita no RNA.

[0139] Por exemplo, para silenciar a expressão de um mRNA de interesse, a síntese do asRNA adequado para uso com algumas modalidades da invenção

pode ser selecionada como se segue. Primeiro, a sequência de mRNA é digitalizada, incluindo o 3'UTR e o 5'UTR. Segundo, a sequência de mRNA é comparada a um banco de dados genômico apropriado usando qualquer software de alinhamento de sequência, como o software BLAST disponível no servidor NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov / BLAST /](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)). As regiões putativas na sequência de mRNA que exibem homologia significativa com outras sequências de codificação são filtradas. As sequências alvo qualificadas são selecionadas como modelos para a síntese de asRNA. As sequências preferidas são as que têm pouca homologia com outros genes do genoma para reduzir um efeito "fora do alvo". Será compreendido que o agente de silenciamento de RNA de algumas modalidades da invenção não precisa se limitar às moléculas contendo apenas RNA, mas abrange ainda nucleotídeos e não nucleotídeos quimicamente modificados.

[0140] De acordo com uma modalidade específica, o vetor para o polinucleotídeo de asRNA heterólogo e / ou moléculas de extinção de quorum, ou doador, é uma bactéria. Em outras modalidades, o doador é uma célula de algas. Várias espécies de algas podem ser usadas de acordo com os ensinamentos da invenção, uma vez que são uma parte significativa da dieta para muitos tipos de hospedeiros que se alimentam oportunisticamente de micro-organismos, bem como de pequenos animais aquáticos, como rotíferos. Exemplos de algas que podem ser usadas de acordo com os presentes ensinamentos incluem, entre outras, algas verde-azuladas e algas verdes. Especificamente, *Actinastrum hantzschii*, *Ankistrodesmus falcatus*, *Ankistrodesmus spiralis*, *Aphanochaete elegans*, *Chlamydomonas sp.*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella variegata*, *Chlorococcum hypnosporum*, *Chodatella tisisisina*, *Closterium acis*, *Closterium acis*, *Cosmarium botrytis*, *Desmidium swartzii*, *Eudorina elegans*, *Gloeocystis gigas*, *Golenkinia minutissima*, *Gonium multicoccum*, *Nannochloris oculata*, *Oocystis marssonii*, *Oocystis minuta*, *Oocystis pusilla*, *Palmella texensis*, *Pandorina simplis*, *Pandorina piedra*,

Paulschulzia gelatinosa, Polyedriopsis spinulosa, Pseudococcomyxa adhaerans, Quadrigula closterioides, Radiococcus nimbatus, Scenedesmus basiliensis, Spirogyra pratensis, Staurostrum gladiosum, Tetraedron bitridens, Trochiscia hystrix, Anabaena catenula, Anabaena spiroides, Chroococcus turgidus, Cylindrospermum licheniforme, Bucapsis sp. (U. Texas No. 1519), Lyngbya spiralis, Microcystis aeruginosa, Nodularia spumigena, Nostoc linckia, Oscillatoria lutea, Phormidiumfaveolarum, Spinilina platensis.

[0141] Em uma modalidade adicional, uma composição incluindo uma bactéria geneticamente modificada configurada para expressar asRNA e moléculas de extinção de quorum pode ser formulada como um grânulo ou pó dispersível em água que pode ainda ser configurado para ser disperso no ambiente. Ainda em uma outra modalidade, as composições da presente invenção também podem compreender um pó umectável, pulverizador, emulsão, coloide, solução aquosa ou orgânica, polvilho, granulado ou concentrado coloidal. As formas secas das composições podem ser formuladas para se dissolver imediatamente após a umedecimento ou, alternativamente, se dissolver de uma maneira controlada, de liberação sustentada ou de outra maneira dependente do tempo. Alternativa ou adicionalmente, a composição pode compreender uma solução aquosa. Tais soluções ou suspensões aquosas podem ser fornecidas como uma solução estoque concentrada que é diluída antes da aplicação ou, alternativamente, como uma solução diluída pronta para aplicação. Tais composições podem ser formuladas de várias maneiras. Elas podem ser empregadas como pós umectáveis, grânulos ou pós, misturando-se com vários materiais inertes, como minerais inorgânicos (derivados de silicone ou silício, filossilicatos, carbonatos, sulfatos, fosfatos e semelhantes) ou materiais botânicos (espigas de milho em pó, cascas de arroz cascas de nozes e semelhantes). As formulações ou composições contendo bactérias geneticamente modificadas podem incluir adjuvantes de adesivo espalhador, agentes estabilizadores, outros aditivos pesticidas ou tensoativos. As formulações líquidas podem ser empregadas como

espumas, suspensões, concentrados emulsionáveis ou semelhantes. Os ingredientes podem incluir agentes teológicos, tensoativos, emulsificantes, dispersantes ou polímeros.

[0142] As composições da invenção, que podem incluir bactérias doadoras simbióticas geneticamente modificadas que expressam polinucleotídeos de RNA heterólogo e/ou uma molécula de extinção de quorum, podem ser usadas para o controle biológico de patógenos em um animal ou outro hospedeiro. Tal pedido compreende administrar a um hospedeiro uma quantidade eficaz da composição que expressa do doador polinucleotídeos de RNA heterólogo e/ou uma molécula de extinção de quorum suficientes que podem ser transportados para fora do doador e absorvidos pelo patógeno alvo, interferindo assim na expressão de um gene essencial alvo e, assim, controlar o patógeno e / ou doença do patógeno causando efeitos no hospedeiro.

[0143] As composições da invenção podem ser usadas para o controle da expressão genética de patógenos e / ou QS e seus efeitos aqui descritos, *in vivo*. Tal aplicação compreende administrar ao hospedeiro alvo, como camarão, uma quantidade eficaz da composição que suprime o patógeno transportado pelo hospedeiro, reduzindo ou eliminando o estado da doença no hospedeiro, além de tornar o patógeno intransferível, por exemplo, a uma população hospedeira. Assim, independentemente do método de aplicação, a quantidade de bactérias doadoras simbióticas geneticamente modificadas que expressam polinucleotídeos de RNA heterólogo e/ou moléculas de extinção de quorum que podem ser aplicados em uma quantidade eficaz para matar ou suprimir um patógeno e / ou suprimir QS ou seus efeitos em um patógeno, variará dependendo de fatores como, por exemplo, o hospedeiro a ser controlado, o tipo de patógeno, em alguns casos a fonte de água a ser tratada, as condições ambientais e o método, taxa e quantidade de aplicação da composição. A concentração da composição que é usada para aplicação ambiental, sistêmica

ou foliar variará amplamente, dependendo da natureza da formulação específica, meios de aplicação, condições ambientais e grau de atividade biocida.

[0144] De acordo com algumas modalidades, o polinucleotídeo de asRNA heterólogo e/ou uma molécula de inibição de quorum é fornecido em quantidades eficazes para reduzir ou suprimir a expressão de pelo menos um produto de gene patogênico e / ou reduzir ou suprimir QS e / ou reduzir ou suprimir a formação de biofilme. Como utilizado neste documento, "uma quantidade supressora" ou "uma quantidade eficaz" ou "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de asRNA que é suficiente para regular (reduzir a expressão do) gene alvo em pelo menos 5%, 10% 20%, 30%, 40%, 50%, ou mais, 60%, 70%, 80%, 90%, ou ainda até 100%. Todas as faixas incluem as faixas estabelecidas especificamente. Como utilizado neste documento, "uma quantidade supressiva" ou "uma quantidade eficaz" ou uma molécula de inibição de quorum refere-se a uma quantidade de uma molécula de inibição de quorum que é suficiente para reduzir a formação de QS e / ou biofilme em um patógeno alvo, preferencialmente um patógeno causador de EMS, em pelo menos 5%, 10% 20%, 30%, 40%, 50% ou mais, digamos 60%, 70%, 80%, 90%, ou até 100%. Todas as faixas incluem as faixas estabelecidas especificamente.

[0145] Como utilizado neste documento, o termo "gene" ou "polinucleotídeo" refere-se a um único nucleotídeo ou um polímero de resíduos de ácido nucleico de qualquer comprimento. O polinucleotídeo pode conter desoxirribonucleotídeos, ribonucleotídeos e / ou seus análogos e pode ser de fita dupla ou de fita simples. Um polinucleotídeo pode compreender ácidos nucleicos modificados (por exemplo, metilados), análogos de ácidos nucleicos ou ácidos nucleicos de ocorrência não natural e pode ser interrompido por resíduos de ácidos não nucleicos. Por exemplo, um polinucleotídeo inclui um gene, um fragmento de gene, cDNA, DNA isolado, mRNA, tRNA, rRNA e RNA isolado de qualquer sequência, polinucleotídeos recombinantes, iniciadores, sondas,

plasmídeos e vetores. Incluídos na definição estão os polímeros de ácido nucleico que foram modificados, seja naturalmente ou por intervenção.

[0146] Como utilizado neste documento, os termos "aproximadamente" ou "cerca de" se referem a $\pm 10\%$. Sempre que uma faixa numérica for aqui indicada, ela deve incluir qualquer número citado (fracionário ou integral) dentro da faixa indicada. As frases "variando / varia entre" um primeiro número indicado e um segundo número indicado e "abrangendo/abrange de" um primeiro número indicado "a" um segundo número indicado são usadas aqui de forma intercambiável e devem incluir o primeiro e o segundo números indicados e todos os numerais fracionários e integrais entre eles.

[0147] Os termos "compreende", "compreendendo", "inclui", "incluindo", "tendo" e seus conjugados significam "incluindo, entre outros." O termo "consistindo em" significa "incluindo e limitado a". O termo "consistindo essencialmente em" significa que a composição, método ou estrutura pode incluir ingredientes, etapas e / ou partes adicionais, mas somente se os ingredientes, etapas e / ou partes adicionais não alterarem materialmente as características básicas e novas da composição, método ou estrutura reivindicada.

[0148] Como utilizado neste documento, a forma singular "uma", "um" e "a/o" inclui referências no plural, a menos que o contexto claramente indique de outra forma. Por exemplo, o termo "um composto" ou "pelo menos um composto" pode incluir uma pluralidade de compostos, incluindo suas misturas.

[0149] Ao longo deste pedido, várias modalidades desta invenção podem ser apresentadas em um formato de faixa. Deve ser compreendido que a descrição em formato de faixa é meramente para conveniência e brevidade e não deve ser interpretada como uma limitação inflexível no escopo da invenção. Consequentemente, a descrição de uma faixa deve ser considerada como tendo divulgado especificamente todas as possíveis subfaixas, bem como valores numéricos individuais nessa faixa. Por exemplo, a descrição de uma faixa, tal como de 1 a 6, deve ser considerada como tendo divulgado especificamente

subfaixas tais como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., bem como números individuais dentro dessa faixa, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Isto se aplica independentemente da amplitude da faixa.

[0150] Como utilizado neste documento, o termo "sistema" e/ou "método" refere-se a modos, meios, técnicas e procedimentos para realizar uma determinada tarefa, incluindo, entre outros, modos, meios, técnicas e procedimentos conhecidos, ou facilmente desenvolvidos a partir de modos, meios, técnicas e procedimentos conhecidos por praticantes das técnicas químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas e médicas. Como utilizado neste documento, o termo "tratamento" inclui revogar, inibir substancialmente, retardar ou reverter a progressão de uma condição, melhorar substancialmente os sintomas clínicos ou estéticos de uma condição ou impedir substancialmente o aparecimento de sintomas clínicos ou estéticos de uma condição.

[0151] Como utilizado neste documento, "simbiótico" ou "simbiontes" geralmente se refere a uma bactéria que é um simbiote de um hospedeiro. Ele também pode incluir bactérias que persistem ao longo do ciclo de vida de um hospedeiro, interna ou externamente, e podem ser passadas horizontalmente para a prole ou óvulos de um hospedeiro. Os simbiontes também podem incluir bactérias que colonizam fora das células do hospedeiro e até mesmo nos tecidos, linfa ou secreções do hospedeiro. Endossimbiontes geralmente se refere a um subgrupo de simbiontes internos.

[0152] Como utilizado neste documento, "transbiótico" refere-se à produção de polinucleotídeos de RNA ou extintores de quorum dentro de bactérias simbióticas ou naturais que vivem dentro do organismo hospedeiro alvo que são projetadas para inibir a expressão dos genes hospedeiros ou patógenos alvo.

[0153] Esta invenção utiliza técnicas de rotina no campo da biologia molecular. Os textos básicos que descrevem os métodos gerais de uso nesta invenção incluem Green e Sambrook, 4ª ed. 2012, Cold Spring Harbor Laboratory; Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1993); and

Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, 1994-current, John Wiley & Sons. Salvo indicação em contrário, os termos técnicos são usados de acordo com o uso convencional. As definições de termos comuns em biologia molecular podem ser encontradas, por exemplo, em Benjamin Lewin, *Genes IX*, publicado por Oxford University Press, 2007 (ISBN 0763740632); Krebs, et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); e Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

[0154] A invenção agora descrita em geral será mais facilmente entendida por referência aos exemplos a seguir, que são incluídos apenas para fins de ilustração de certos aspectos das modalidades da presente invenção. Os exemplos não se destinam a limitar a invenção, como um versado na técnica reconheceria a partir dos ensinamentos anteriores e dos exemplos a seguir que outras técnicas e métodos podem satisfazer as reivindicações e podem ser empregados sem se afastar do escopo da invenção reivindicada. De fato, embora essa invenção tenha sido particularmente mostrada e descrita com referências às modalidades preferenciais da mesma, será compreendido pelo versado na técnica que várias alterações na forma e detalhes podem ser feitas sem se distanciar do escopo da invenção abrangido pelas reivindicações anexas.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Prevenção de EMS com bactérias entéricas que interrompem o projeto de construto de detecção de quorum.

[0155] Para degradar AI-1, os presentes inventores superexpressaram a lactonase, *AidH*, de *Ochrobactrum*. Ao contrário da *B. cereus* AiiA lactonase, a atividade catalítica de *AidH* não requer zinco, que pode estar presente apenas em quantidades limitadas na água do mar e/ou em ambientes de aquicultura artificial. Os presentes inventores colocaram o gene *aidH* sob o controle de um

forte promotor Pupp que está operavelmente em bactérias gram-positivas e gram-negativas. Um cassete de expressão de Pupp*aidH* foi clonado no vetor vaivém pAD43 e em pACYC184. Para absorver AI-2 do ambiente, os presentes inventores clonaram e superexpressaram o operon de *E. coli* lsr. Na tentativa de diminuir a concentração de moléculas de sinal AI-1 e AI-2, os presentes inventores coexpressam ainda os construtos de extinção de AI-1 e AI-2 usando construtos de plasmídeo compatíveis. O projeto do plasmídeo é descrito em Materiais e Métodos. Todos os plasmídeos foram transformados em isolado natural entérico *Enterobacter* sp.

Exemplo 2: O cocultivo de *Vibrio harveyi* com construtos de AG1 que expressam *aidH* leva a uma diminuição na luminescência do *Vibrio*

[0156] Como geralmente mostrado na Figura 1, os presentes inventores demonstraram as propriedades de extinção de quorum das cepas construídas. Nesta modalidade, os presentes inventores realizaram experiências de extinção de luminescência com uma matriz de cepas de *V. harveyi* que respondem diferencialmente a AI-1 e AI-2. Para este ensaio, os construtos de AG1 de extinção de quorum foram cocultivados com cepas *Vibrio* que emitem luminescência durante 12-16 horas em placas de 96 poços com fundo transparente. Construtos de controle que expressam genes neutros (por exemplo, AG1-pOX ou AG1-pLuc) foram usados como cepas de controle em experimentos paralelos. Durante o crescimento bacteriano, tanto a luminescência quanto a densidade óptica da cultura foram monitoradas. Como observado pelos presentes inventores, a luminescência das cepas de *Vibrio* é acentuadamente aumentada na fase inicial de crescimento estacionário, manifestando a detecção de quorum bacteriano.

[0157] Novamente, como mostrado na Figura 2, um construto bacteriano AI-1, AG1 que expressa o gene da *aidH* demonstrou a capacidade de extinguir tanto a luminescência de *V. harveyi* de tipo selvagem 116 (Fig. 2A) e, ainda mais proeminente, a luminescência da cepa de *V. harveyi* 117 mutante que

respondem apenas à AI-1 (Fig. 2B). No entanto, não foi observada extinção da luminescência quando os presentes inventores cocultivaram as bactérias geneticamente modificadas com uma cepa de *V. harveyi* 118 que responde exclusivamente à AI-2 (Fig. 2C). Construtos bacterianos que expressam luciferase como gene neutro (pLuc) foram usados como controle. O efeito proeminente de extinção de luminescência do cocultivo de *Vibriocom* AG1-p*AidH* demonstra que as novas cepas bacterianas geneticamente engenheiradas são extintores de quorum eficientes, conforme indicado por uma redução na bioluminescência.

Exemplo 3: O cocultivo de *Vibrio harveyi* com construtos de AG1 que expressam *Isr* leva a uma diminuição na luminescência do *Vibrio*

[0158] Os presentes inventores demonstraram a seguir que a superexpressão do operon *Isr* em Ag1 leva à extinção do quorum. Nesta modalidade, os presentes inventores realizaram experiências análogas, como geralmente descrito acima, utilizando um construto Ag1 – pLsr. Como construto de controle, foi utilizada a cepa Ag1-pOX contendo um plasmídeo sem nenhum inserto. Como geralmente mostrado na Figura 3, AI-2, AG1-pLsr extingue a bioluminescência de *V. harveyi* 116 de tipo selvagem em uma extensão semelhante à Ag1-p*AidH* (Fig. 3A). No entanto, houve efeito insignificante na bioluminescência de *V. harveyi* 117 (responsável apenas pela AI-1) (Fig. 3B). Em contraste, a bioluminescência da cepa *Vibrio* 119, que responde apenas à AI-2, foi visivelmente extinta pelo cocultivo com Ag1-pLsr (Fig.3C). Assim, os presentes inventores confirmaram que os novos construtos bacterianos geneticamente modificadas reduziram a detecção de quorum de *Vibrio*, específica e eficientemente.

Exemplo 4: O co-cultivo de *Vibrio harveyi* com construtos de Ag1 de extinção de quorum leva a uma aptidão de *Vibrio* reduzida e a uma formação de biofilme reduzida.

[0159] Como descrito acima, a formação de biofilme é um importante traço patogênico de muitas bactérias. A fim de estabelecer mecanismos

antipatogênicos dos construtos de extinção de quorum projetados, os presentes inventores estudaram seu efeito na formação de biofilme por *V. harveyi*. Como mostrado abaixo, os presentes inventores demonstraram que o AG1 sozinho não produziu quase nenhum biofilme durante enquanto o cocultivo de AG1 com cepas de *V. harveyi* resulta em camada detectável de biofilme. Como geralmente mostrado na Fig. 4A, a eliminação de AI-1 do meio bacteriano por AG1-p*AidH* leva à diminuição da formação de biofilme por todas as cepas de *Vibrio* que respondem à AI-1 (por exemplo, 116 e 118), mas não pela cepa mutante 117 que não responde à AI-1. Os presentes inventores demonstraram ainda que AG1-pLsr, que extingue as moléculas de AI-2, é capaz de diminuir a formação de biofilme em todas as cepas sensíveis à AI-2 (por exemplo, tipo selvagem 116 e sua variante mutante 119). No entanto, o cocultivo com AG1-pLsr não teve efeito negativo na formação de biofilme por *V. harveyi* 118, que responde apenas à AI-1. Assim, usando o patógeno oportunista *V. harveyi* como um organismo modelo exemplificativo, os presentes inventores mostram que, em certa modalidade, os construtos de extinção de quorum da novidade são capazes de diminuir a formação de biofilme de maneira eficiente e específica. (Fig.4)

Exemplo 5: A co-expressão de *aidH* e *lsr* em Ag1 leva à luminescência de *Vibrio* reduzida, mas não diminui a formação de biofilme.

[0160] Em uma modalidade da invenção, os presentes inventores demonstraram que construtos bacterianos que expressam fatores individuais de extinção de quorum (por exemplo, *lsr* ou *aidH*) exibem efeitos semelhantes, mas parciais, na luminescência e na formação de biofilme. Foi raciocinado que a coexpressão de dois inibidores de quorum juntos pode levar a um resultado aditivo. Assim, os presentes inventores clonaram e expressaram o gene *aidH* sob controle do mesmo promotor forte de *pupp* no vetor de plasmídeo compatível pACYC184 que pode coexistir com os tipos de plasmídeos pOX em células bacterianas. Os plasmídeos pLsr (pOX) e p*AidH* (pLuc) foram introduzidos nas células AG1.

Como geralmente mostrado na figura 5, embora pACYC184-*AidH* possua números de cópias menores em comparação com o plasmídeo pAD-*AidH*, produziu proteína *AidH* suficiente para extinguir a luminescência de *Vibrio* de forma eficiente (Fig5. A, B) e para reduzir a formação de biofilme (Fig. 5 C). Embora tenha sido observado qualquer efeito da coexpressão de pLSR e p*AidH* na formação de biofilme, um efeito cumulativo na bioluminescência de *Vibrio* foi demonstrado nos dados. É importante ressaltar que a coexpressão de dois construtos de extinção de quorum permite que as modalidades da presente invenção abranjam diferentes fases de crescimento populacional de bactérias.

Exemplo 6: Desafio de alimentação de camarão / *Vibrio parahaemolyticus*

·

[0161] Para determinar se a interrupção da detecção de quorum em bactérias entéricas fornece proteção ao camarão contra o *Vibrio* sp. Patogênico e se reduz a mortalidade associada a EMS, os presentes inventores realizaram ensaios com EMS de camarão usando *Vibrio parahaemolyticus* como patógeno exemplificativo. Nesta modalidade, para estabelecer uma população de bactérias que inibem o quorum no intestino do camarão, o camarão foi alimentado pela *Enterobacter* expressando várias moléculas de inibição do quorum codificadas por plasmídeo ou asRNA-dam por 5 dias antes do desafio com *Vibrio*.

[0162] Para confirmar que as bactérias Ag1 são capazes de sobreviver e persistir no intestino de camarão, foram realizadas experiências preliminares de colonização. As Ag1 foram transformadas pelo plasmídeo pGFPuv (Clontech) que codifica a proteína GFP fluorescente. Os camarões foram alimentados com alimentos com Ag1-pGFPuv por 10 dias e a presença de Ag1 foi detectada nos dias 5 e 10 por análise de intestinos de camarão sob microscópio fluorescente (fluorescência de GFP detectada nos intestinos) e por um método de contagem de placas (colônias Ag1 foram identificadas por fluorescência de GFP) usando intestinos isolados de camarão. Após 5 dias de alimentação de Ag1, o título

bacteriano no intestino do camarão foi de $\sim 2,8E +06$ ufc / g e aumentou levemente no dia 10 (Ver a Tabela 1 abaixo). Nesta modalidade, no dia 5 após a alimentação das bactérias geneticamente modificadas ao camarão, os presentes inventores iniciaram os desafios com *Vibrio*.

Exemplo 7: Contagem de mortalidade induzida por EMS.

[0163] Neste exemplo, foram realizados dois ensaios independentes de desafio EMS. Como geralmente mostrado na figura 6, no ensaio 1, a infecção por *Vibrio* parecia ser aguda e produziu mortalidade rápida em todos os grupos testados; 100% dos camarões do grupo de controle morreram 12-24h após o desafio com o *Vibrio*. No entanto, o desenvolvimento da infecção foi retardado em camarões alimentados com bactérias Ag-*AidH1p* (mortalidade de 37% dentro de 12 horas após a infecção versus mortalidade de 68% no grupo controle) e 20% do grupo Ag-*AidH1p* sobreviveram ao experimento de 5 dias, enquanto nenhum camarão do grupo de controle sobreviveu. (Fig 6 A-B)

[0164] As condições de infecção foram otimizadas para o segundo ensaio de camarão de extinção de quorum. A dose de infecção foi reduzida em 10x e etapas adicionais de lavagem foram adicionadas para eliminar o acúmulo de toxinas bacterianas na cultura *Vibrio* antes do desafio. Neste estudo, a infecção se desenvolveu mais lentamente e a mortalidade total no dia 5 após a infecção atingiu 55% no grupo de controle alimentado apenas com Ag1-Luc. Sob essas condições, todas as cepas de extinção de quorum forneceram ao camarão algum nível de proteção. Para o grupo com melhor desempenho, Ag-*AidH1p*, a mortalidade total após 5 dias após a infecção foi de 25% vs 55% para o grupo de controle. Os camarões alimentados com Ag-1pLsr e Ag-*AidH1p-lsr* tiveram taxas de mortalidade de 31% e 34%, respectivamente. (Fig 6 C-D)

Exemplo 8: Redução de genes de virulência de expressão em *Vibrio* de intestinos de cepas de extinção de quorum *Enterobacter* alimentadas com camarão Ag1-p*AidH*, Ag1-pLsr e Ag1-pLsr-p*AidH*.

[0165] Como geralmente descrito acima, para muitas bactérias patogênicas, a detecção de quorum é uma parte importante da regulação da virulência e está envolvida na regulação da expressão dos genes da virulência. Como tal, os presentes inventores selecionaram dois fatores separados de virulência do *Vibrio parahaemolyticus*, nomeadamente Mam7 e PirA, como marcadores para o estado de patogenicidade do *Vibrio* nesta modalidade preferida. Mam7 é uma proteína de adesão que se liga à fibronectina e é fundamental para a ligação inicial do *Vibrio* às células hospedeiras durante o estágio inicial da infecção. PirA é uma proteína citotóxica envolvida no desenvolvimento de EMS.

[0166] Como geralmente mostrado na figura 7, os camarões vivos e mortos foram coletados no Ensaio 2, 48 horas após a infecção, e os níveis de expressão de Mam7 e Ap4 foram avaliados por qPCR no mRNA extraído do intestino de camarão. A expressão de Mam7 foi reduzida em cerca de 2 vezes em *Vibrio* a partir de intestinos de camarão alimentados com todas as cepas de *Enterobacter* que extinguem quorum. Os níveis de expressão de Mam7 em *Vibrio* de intestinos de camarão morto foram aproximadamente os mesmos que no camarão vivo do grupo controle, indicando que o mRNA não foi degradado no camarão morto. (Ver Fig. 7A.) A expressão da toxina PirA mRNA também foi reduzida no *Vibrio* obtido de camarões alimentados com todas as cepas bacterianas de extinção de quorum, com a maior redução observada em camarões alimentados com bactérias Ag1-p*AidH*. Perceptível, este grupo de camarões teve taxas de sobrevivência superiores em comparação com todos os outros grupos. O nível de expressão de pirA no *Vibrio* a partir de intestinos de camarão morto foi quase 10 vezes elevado em comparação com todos os camarões sobreviventes (ver Fig.7B).

Exemplo 9: Prevenção de EMS inoculando camarão com bactérias entéricas de camarão que expressam genes *Vibrio* que direcionam asRNA.

[0167] Como descrito acima, em uma modalidade, a tecnologia de convite inclui novos métodos, sistemas e composições para a regulação da expressão de

genes alvo em bactérias por asRNA produzido em outra bactéria que direciona um gene de interesse expresso pelas bactérias receptoras. Por exemplo, em uma modalidade, a invenção pode incluir redução na expressão de *dam* em *Vibrio* cocultivado com *Enterobacter* Ag1 expressando asRNA-dam. Em *Vibrio*, a metilação de DNA dependente de *dam* está envolvida na regulação das vias de patogenicidade; portanto, a redução no nível de expressão de *dam* deve levar à diminuição da virulência do *Vibrio*. Em uma modalidade potencial desta estratégia de asRNA, os camarões foram alimentados por Ag1 expressando asRNA-dam e depois desafiados por *Vibrio parahaemolyticus*.

Exemplo 10: Contagem de mortalidade induzida por EMS.

[0168] Neste exemplo, foram realizados dois ensaios independentes de desafio. Como geralmente mostrado na figura 8, em ambos os ensaios, o camarão alimentado com *Enterobacter* expressando asRNA-dam (Ag1-asRNA-dam) teve mortalidade reduzida em comparação ao grupo controle. Em um ensaio de desafio mostrado na figura 8 A-B, os camarões foram alimentados com Ag1 configurada para expressar uma proteína inespecífica (Ag1-Luc) como controle. Neste exemplo, a redução no efeito da mortalidade foi moderada, com 43% de mortalidade em camarões alimentados por Ag1-asRNA-dam vs 59% de mortalidade no grupo controle. (Ver Fig.8) Em um segundo ensaio mostrado na figura 8 C-D, a taxa de mortalidade de camarões alimentados com Ag1-asRNA-dam foi reduzida em mais de 2 vezes em comparação com os camarões alimentados por Ag1-Luc. A mortalidade no dia 5 após a infecção foi de 24% vs 55% para o grupo controle. (Fig.8 C-D) As diferenças nos resultados entre o primeiro e o segundo ensaios podem ser explicadas pelo fato de que, no segundo ensaio a cultura de culturas de *Vibrio* foi lavada 3X antes de adicionar as bactérias ao alimento dos camarões, o que potencialmente reduz o acúmulo de toxinas bacterianas no alimento.

Exemplo 11: Redução da expressão de genes de virulência em *Vibrio*, obtida a partir de *Enterobacter* alimentado com camarão, expressando asRNA direcionando a expressão do gene *dam* de *Vibrio*.

[0169] Neste exemplo, os níveis de expressão dos genes de virulência de *Vibrio parahaemolyticus* *mam7* e *pirA* foram avaliados por qPCR no RNA extraído de intestinos de camarão vivo e morto coletados no Ensaio 2 às 48 h após o desafio com *Vibrio*. A expressão de ambos os genes de virulência foi drasticamente reduzida no *Vibrio* obtido de intestinos de camarão alimentados com Ag1-asRNA-dam. A expressão do gene *mam7* foi reduzida 3,5 vezes e a expressão de *pirA* foi reduzida ~ 10 vezes neste grupo. (Fig. 9)

Exemplo 12: A expressão de Mam7 pode ser regulada por metilação de DNA dependente de Dam.

[0170] Significativamente, a análise qPCR indicou redução na expressão de *mam7* em *Vibrio* em camarões alimentados com Ag1-asRNA-dam, indicando que a expressão de *mam7* pode ser regulada por metilação de DNA dependente de dam. A regulação do gene Mam7, incluindo o promotor e / ou outros elementos reguladores de ação cis / trans, não foi previamente identificada. Para verificar a possibilidade de regulação dependente de Dam de expressão de *mam7* os presentes inventores analisaram a montante do gene *mam7* (VP1611) com o software Softberry (<http://www.softberry.com/>) para predizer a posição e composição do promotor de *mam7*. Como mostrado na Figura 10, um potencial promotor de gene foi encontrado na posição 288 pb a montante do códon de iniciação de *mam7*. Foram encontradas quatro potenciais sequências alvo de metilação de Dam DNA metilase (GATC) na área do promotor, com uma delas sobrepondo o elemento promotor -10. Esta composição promotora predita sugere fortemente regulação dependente de Dam da expressão genética de *mam7*.

Exemplo 13: Utilizando bactérias entéricas de camarão engenheiradas para expressar moléculas perturbadoras de detecção de quorum ou asRNAs direcionando o silenciamento de genes essenciais/ e / ou de virulência no *Vibrio*.

[0171] Os presentes inventores descrevem aqui sistemas, métodos e composições para o uso de bactérias engenheiradas geneticamente, mais especificamente bactérias entéricas de camarão projetadas para expressar moléculas perturbadoras de detecção de quorum e / ou asRNAs direcionando o silenciamento de genes essenciais / e / ou de virulência para proteger o camarão do desenvolvimento de infecção de *Vibrio* e reduzir a mortalidade associada à EMS. Foi demonstrado ainda que o *Vibrio* de intestinos de camarão alimentados com bactérias de extinção de quorum e / ou bactérias que expressam asRNAs reduziu a expressão dos genes de virulência *mam7* e *pirA*. Tomados em conjunto, esses resultados demonstram certas modalidades da tecnologia inventiva atual que usam bactérias entéricas engenheiradas como uma plataforma eficaz para proteção de camarão contra infecção por patógenos.

Exemplo 14: Material e Métodos.

Projeto e construção de cepas e plasmídeos

[0172] Todas as cepas e plasmídeos usados nesta invenção estão listados na Tabela 2. Para criar cepas bioativas, os plasmídeos descritos abaixo foram transformados em células *Enterobacter* eletro-competentes. As descrições dos plasmídeos são as seguintes: (a) gene pAidH – *aidH* de *Ochrobactrum* sp. (Mei *et al.*, 2010) foi otimizado por códon para expressão de *Enterobacter* usando o traje do programa Vector NT. O gene otimizado por códon foi suplementado com o sítio de ligação ao ribossomo e foi encomendado como fragmento de DNA via IDTDNA. A PCR adicional foi realizada usando os oligonucleotídeos pAD-lact-for e pAD-lact-rev (Tabela 3). Para a clonagem, foi utilizado o kit NEBuilder® HiFi DNA Assembly (NEB) para montar as sequências genéticas amplificadas e o plasmídeo pAD43 linearizado (Fig. 10 A); (b) pLuc - foi usado como um plasmídeo de controle que codifica o gene neutro. Foi feito como descrito acima,

mas o gene da luciferase foi usado em vez de *aidH*; (c) *pAidH'*, *pLuc'*. O vetor *pACYC184* foi utilizado para criar o vetor compatível com *pAD* / *pSF* que expressa *aidH* (Luc) Para amplificar os genes com os correspondentes sítios de ligação do promotor, terminador e ribossomo, foi realizada a PCR adicional usando os oligonucleotídeos *pACYC-for* e *pACYC-rev*. Finalmente, o produto de PCR foi clonado no plasmídeo *pACYC184* linearizado com *EcoRV* usando o kit *NEBuilder® HiFi DNA Assembly* (NEB). O mapa de plasmídeo é mostrado na Fig. 10

[0173] Plasmídeos produzidos por GENESCRIP: (a) *pLsr* - contém o operon *E. coli lsr* expresso sob o controle do promotor *lacUV* no vetor de plasmídeo de cópia múltipla *pSF-OXB19* (Sigma). O mapa de plasmídeo é mostrado na Fig. 10; (b) projeto estabilizador de RNA de terminação emparelhados (PT) de *p(asDam)* e *p(asGFP)A* para produzir RNA antissentido (asRNA) foi utilizado para criar cassetes que expressam asRNA. Fragmentos de alcance GC invertidos de flanqueamento de 38 pb de comprimento foram adicionados em ambas as extremidades da sequência de asRNA específica, formando uma estrutura em gancho de cabelo com a alça de asRNA na extremidade. O terminador *rnnB* (terminador do gene *rnnB E.coli*) foi colocado após uma sequência de conector de 207 pb de comprimento no final do cassete que expressa asRNA e o cassete foi clonado para o plasmídeo *pAD-43-25* sob o controle do promotor *P_{upp}*.

Crescimento bacteriano

[0174] Utilizou-se meio LBS para o crescimento de bactérias (10 g / L de Bacto-Triptona, 5 g / L de extrato de levedura, 20 g / L de NaCl, 50 mM de Tris-HCl pH 7,5). Quando necessário, antibióticos foram utilizados nas seguintes concentrações: carbenicilina 50 µg / ml, ampicilina 100 µg / ml, cloranfenicol 25 µg / ml.

Ensaio de biofilme

[0175] Cepas de *Vibrio harveyi* e *Enterobacter* Ag1 foram cultivadas durante a noite em meio LBS, diluídas para OD₆₀₀ 0,2 - 0,4 e misturadas com *Vibrio* sp. em uma razão de *Vibrio*/Ag1 a 5/1. Em seguida, 150 µl da cultura mista foram adicionados aos poços de uma placa de 96 poços (3 experimentos independentes com 8 replicações técnicas em cada experimento foram analisados para cada tratamento) e incubados sem agitação a 28° C por 24h. Após a incubação, os biofilmes bacterianos foram corados com violeta de cristal de acordo com o protocolo descrito por O'Toole (O'Toole, 2011) e a absorbância foi medida no leitor de placas Tecan a 550 nm.

Ensaio de bioluminescência

[0176] As cepas *Vibrio* e *Enterobacter* Ag1 (extintores de quorum) foram cultivadas durante a noite em meio LBS, diluídas para OD_{600nm} de 0,1 - 0,2 e foram misturadas na razão de 1:1 em uma placa de cultura de tecidos preta de 96 poços com fundo claro. As placas foram cobertas por filme transparente respirável ao ar. Culturas mistas foram cultivadas a 28 °C por 12 h em um leitor de placas Sinergy H4 com aeração periódica. As medições de luminescência e OD_{600nm} foram realizadas a cada 20 minutos. 8 curvas paralelas tomadas para cada condição experimental; 2 experimentos independentes foram realizados; curvas médias são mostradas.

qRT-PCR

[0177] A expressão relativa do gene nas células *Vibrio* foi medida por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Os RNAs totais foram isolados usando um kit de RNA bacteriano Omega E.Z.N.A. A amplificação por PCR em tempo real foi realizada usando um sistema QPCR Mx3000P (Agilent technologies). Utilizou-se um kit RT-qPCR universal de uma etapa Luna® (NEB) para realizar uma etapa de RT-PCR. A concentração de oligonucleotídeos e as condições de ciclização utilizadas estavam de acordo com as recomendações do fabricante. Os genes e os iniciadores específicos de genes estão listados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. Menos que 25 ng de RNA bacteriano total foram utilizados

em cada reação. Os níveis de expressão relativa dos transcritos específicos foram calculados usando o nível de expressão de mRNA de *gyrB* como referência interna para normalização.

Análises de dados

[0178] As médias e erros padrão da média (SEM) foram calculados a partir de pelo menos três experimentos independentes. Todos os outros dados foram analisados pelo teste Anova com SigmaPlot. A significância das diferenças entre os grupos experimentais foi aceita com um valor de $P < 0,05$.

Desafio Vibrio de Camarão

[0179] Bactérias: *Enterobacter* sp. Ag1 foi transformada com plasmídeos indicados na Tabela 2. As bactérias foram cultivadas durante a noite em LB com o antibiótico correspondente e, em seguida, centrifugadas e misturadas em alimentos comerciais de camarão (Zeigler PL 40) a uma concentração de $1E + 10$ CFU / g de ração e refrigerados. A ração preparada foi fornecida com um grama de camarão com 10% de peso corporal, dividida em três refeições por dia.

[0180] Alimentação de camarão: Camarão SPF (Shrimp Improvement System, Islamorada, FL) 1 g de peso foram mantidos em aquários de 7 galões ($n = 12$). Os camarões foram distribuídos aleatoriamente nos grupos de tratamentos: camarão alimentado com comida comercial com Ag1-Luc (ns), camarão alimentado com comida comercial com Ag1-pLsr; camarão alimentado com comida comercial com Ag1-p*AidH*; camarão alimentado com comida comercial com Ag1-p*AidH* e camarão alimentado com comida comercial com Ag1-pLsr-*AidH*. As bactérias foram fornecidas ao camarão por 5 dias antes do desafio com *Vibrio* e durante o curso do desafio através de ração.

[0181] Desafio EMS: Um isolado EMS + *V. parahaemolyticus* foi cultivado em Caldo de Soja Tríplico (TSB) + NaCl a + 2%, cultivado durante a noite, centrifugado, enxaguado 3 vezes e suspenso em Caldo de Soja Tríplico (TSB). A suspensão foi levada a uma concentração de 10^{10} CFU/ml. Um ml da suspensão preparada foi misturado com um grama de ração para camarão

(Zeigler PL 40) e deixado de molho na ração por 15 minutos. Os camarões foram alimentados com 5% do seu peso corporal.

[0182] Contagem de mortalidade induzida por EMS: A contagem de mortalidade foi realizada no dia 2-5 após o desafio de *Vibrio* . Foram analisadas 4-6 repetições biológicas (tanques separados) para camarões de todos os grupos de tratamento.

TABELAS

Tabela 1: Carga de fluorescência no intestino de camarão alimentado por Ag1 que expressa GFP.

Grupo	Carga bacteriana fluorescente, 5 dias, ufc / g	Carga bacteriana fluorescente, 10 dias, ufc / g
camarão alimentado com Ag1-GFP	2.8E++06	7.7E+07
camarão alimentado com comida comercial	0	0

Tabela 2: Cepas bacterianas e plasmídeos.

Cepas	Genótipo	Origem
<i>Vibrio harveyi</i> 116	WT	Cepa do tipo ATCC BAA-1116, BB120
<i>Vibrio harveyi</i> 117	<i>luxN::tn5Kan</i>	ATCC BAA-1117, BB170
<i>Vibrio harveyi</i> 118	<i>luxPQ::tn5Kan</i>	ATCC BAA-1118, BB886
<i>Vibrio harveyi</i> 119	<i>luxM::tn5Kan</i>	ATCC BAA-1119, BB152
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> Ag1	<i>pirA</i> isolado WT positivo da lagoa de camarão infectada <i>Enterobacter</i> sp.	HBOI, Florida Obtido no laboratório NMSU, Xu, isolado de

Ag1-asDam	Ag1 (pAD Dam) Ap ^R , asRNA para <i>Vibrio dam</i> sob <i>P_{upp}</i> clonado em pAD43-25	<i>Aedes gambiae</i> no intestino médio Plasmídeo produzido por GENESCRIPIT transformado em Ag1
Ag1-asGFP	Ag1 (pAD GFP) Ap ^R , asRNA para <i>gfp</i> sob <i>P_{upp}</i> clonado em pAD43-25	Plasmídeo produzido por GENESCRIPIT transformado em Ag1
Ag1-pLsr	Ag1 transformada com pLsr	Ag1 transformada com pLsr. Esta invenção
Ag1-pAidH	Ag1 (pAD pAidH) Ap ^R	Esta invenção
Ag1-pAidH	Ag1 (pACYC184 pAidH) Cm ^R ,	Esta invenção
Ag1-pOX	Ag1 transformada com pSF-OXB19	Esta invenção
Ag1-pAidH/pLsr	Ag1 transformada com pAidH e pLsr	Esta invenção
Ag1-pGFPuv	Ag1 transformada com pGFPuv	Esta invenção
Plasmídeo	Descrição	Origem
pAD43-25	Gram-positivo - vetor de vaivém de <i>E. coli</i> expressando <i>gfp</i> sob <i>P_{upp}</i> , Ap ^R	(Dunn & Handelsman, 1999)
pSF-OXB19	Vetor de clonagem geral, Ap ^R	Sigma
pLsr	Operon de <i>E. coli lsr</i> expresso sob o promotor bacteriano de força média Ap ^R	Esta invenção
pAidH	<i>aidH</i> lactonase sob <i>P_{upp}</i> clonada em pAD43-25, Ap ^R	Esta invenção

pAidH	aidH lactonase sob P _{upp} clonada em pACYC184, Cm ^R	Esta invenção
pLuc	luciferase sob P _{upp} clonada em pAD43-25, Ap ^R	Esta invenção
pGFPuv	Vetor de E.coli expressando gfpuv sob promotor lac	Clontech

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para clonagem de lactonase.

Oligo	Sequência
pAD lact-for	GGGAAAACGTATGTATTTGATCCTGCTTATCGATCTAGAGAAA GA
pAD lact-rev	CAAGTTAAGGGATGCAGTTTACACGAACGAAAATCGCCATTCC CC
pACYC -for	TGCCGGGCCTCTTGCGGGATGATTGAAGAAGACTGCCGAG
pACYC -rev	ATGCTGTCGGAATGGACGATATCCGCTTACAGACAAGCTG

Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados na análise de qPCR.

Nome	Sequência
Vp-mam7-for	GCTTAGAAAGCATGAGCGCC
Vp-mam7-rev	TGCCACGGTACATGATTGGT
Vp-gyrB-for	CGAGCATGCGCTAAGTGTTG
Vp-gyrB-rev	TAACGCTGACGGCTTAGACC
Vp-Ap4-for	ATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC
Vp-Ap4-rev	TTGAGAATACGGGACGTGGG

Tabela 5: Genes utilizados na análise de qPCR

Gene	Localização do cromossomo	Função	Ref
<i>gyrB</i>	1: 11353-13770	Subunidade B da DNA girase	
<i>mam7</i>	1: 1708552-1711200	Adesina	(Krachler <i>et al.</i> , 2011)
<i>pirA</i>	plasmídeo	Toxina da síndrome de mortalidade precoce	(Lee <i>et al.</i> , 2015)

REFERÊNCIAS

As seguintes referências são aqui incorporadas na sua totalidade por referência:

- [1] Dunn, A. K. & J. Handelsman, (1999) A vector for promoter trapping in *Bacillus cereus*. *Gene* 226: 297-305.
- [2] Krachler, A. M., H. Ham & K. Orth, (2011) Outer membrane adhesion factor multivalent adhesion molecule 7 initiates host cell binding during infection by gram-negative pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 11614-11619.
- [3] Lee, C. T., I. T. Chen, Y. T. Yang, T. P. Ko, Y. T. Huang, J. Y. Huang, M. F. Huang, S. J. Lin, C. Y. Chen, S. S. Lin, D. V. Lightner, H. C. Wang, A. H. Wang, L. I. Hor & C. F. Lo, (2015) The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 10798-10803.
- [4] Mei, G. Y., X. X. Yan, A. Turak, Z. Q. Luo & L. Q. Zhang, (2010) *AidH*, an alpha/beta-hydrolase fold family member from an *Ochrobactrum* sp. strain, is a novel N-acylhomoserine lactonase. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 4933-4942.
- [5] O'Toole, G. A., (2011) Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp*.
- [6] Ruwandeepika H. A., Karunasagar I., Bossier P., Defoirdt T. (2015). Expression and quorum sensing regulation of type III secretion system genes of *Vibrio harveyi* during infection of gnotobiotic brine shrimp. *PLoS One* 10:e0143935. 10.1371/journal.pone.0143935.
- [7] Soonthornchai W, Chaiyapechara S, Jarayabhand P, Söderhäll K, Jiravanichpaisal P (2015) Interaction of *Vibrio* spp. with the Inner Surface of the Digestive Tract of *Penaeus monodon*. *PLoS ONE* 10(8): e0135783. doi:10.1371/journal.pone.0135783.
- [8] Thammasorn, T., Jitrakorn, S., Charoonart, P. et al. *Aquacult Int* (2017) Probiotic bacteria (*Lactobacillus plantarum*) expressing specific double-stranded

RNA and its potential for controlling shrimp viral and bacterial diseases. 25: 1679. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0144-z>.

[9] Defoirdt T, Boon N, Sorgeloos P, Verstraete W and Bossier P (2008) Quorum sensing and quorum quenching in *Vibrio harveyi*: lessons learned from *in vivo* work. *The ISME Journal* 2: 19–26.

[10] De Schryver P, Defoirdt T, Sorgeloos P (2014) Early Mortality Syndrome Outbreaks: A Microbial Management Issue in Shrimp Farming? *PLoS Pathog* 10(4): e1003919. doi:10.1371/journal.ppat.1003919.

[11] Nguyen DV, Christiaens O, Bossier P and Smagghe G (2016) RNA interference in shrimp and potential applications in aquaculture. *Reviews in Aquaculture* (2016) 0: 1–12. doi: 10.1111/raq.12187.

[12] Rajamani S, Teplitski M, Kumar A, Krediet C, Sayre RT and Bauer WD (2011) AHL lactonase (AiiA) inactivation of quorum sensing agonists produced by *Chlamydomonas reinhardtii* and characterization of aiiA transgenic algae. *J. Phycol.* 47:1219-1227.

[13] Rajamani S and Sayre RT (2017) FRET-based biosensors for the detection and quantification of AI-2 class quorum sensing compounds. In: *Molecular Methods in Quorum Sensing*. Eds. Livia Leoni and Giordano Rampioni. Springer.

[14] Taga ME, Semmelhack JL and Bassler BL (2001) The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology* 42: 777–793.

[15] Soonthornchai W, Chaiyapechara S, Jarayabhand P, Söderhäll K, Jiravanichpaisal P (2015) Interaction of *Vibrio* spp. with the Inner Surface of the Digestive Tract of *Penaeus monodon*. *PLoS ONE* 10(8): e0135783. doi:10.1371/journal.pone.0135783.

[16] Kobayashi, M. & Brummett, R. 2014. Disease management in aquaculture. In: *Forum for Agricultural Risk Management in Development*.

Yadav, M. K., Y. Y. Go, S. W. Chae & J. J. Song, (2015) The Small Molecule DAM Inhibitor, Pyrimidinedione, Disrupts *Streptococcus pneumoniae* Biofilm Growth In Vitro. *PLoS One* 10: e0139238.

[17] Berenstein, D., K. Olesen, C. Speck & O. Skovgaard, (2002) Genetic organization of the *Vibrio harveyi* DnaA gene region and analysis of the function of the *V. harveyi* DnaA protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184: 2533-2538.

[18] Collier, J., H. H. McAdams & L. Shapiro, (2007) A DNA methylation ratchet governs progression through a bacterial cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17111-17116.

[19] Hoynes-O'Connor, A. S. asRNA-Dam alignment to dam mRNA. & T. S. Moon, (2016) Development of Design Rules for Reliable Antisense RNA Behavior in *E. coli*. *ACS Synth Biol* 5: 1441-1454.

[20] Julio, S. M., D. M. Heithoff, D. Provenzano, K. E. Klose, R. L. Sinsheimer, D. A. Low & M. J. Mahan, (2001) DNA Adenine Methylase Is Essential for Viability and Plays a Role in the Pathogenesis of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Vibrio cholerae*. *Infection and immunity* 69: 7610-7615.

[21] Nakashima, N., T. Tamura & L. Good, (2006) Paired termini stabilize antisense RNAs and enhance conditional gene silencing in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 34: e138.

[22] O'Toole, G. A., (2011) Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp*.

[23] Val, M. E., S. P. Kennedy, A. J. Soler-Bistue, V. Barbe, C. Bouchier, M. Ducos-Galand, O.

[24] Skovgaard & D. Mazel, (2014) Fuse or die: how to survive the loss of Dam in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 91: 665-678.

[25] Martínez Cruz, Patricia et al. "Use of Probiotics in Aquaculture." ISRN Microbiology 2012 (2012).

[26] Ma, D.; Hu, Y.; Wang, J.; Ye, S. & Li, A. (2006). Effects of antibacterial use in aquaculture on biogeochemical processes in marine sediment. *The Science of the Total Environment*, vol. 367, No.1, pp.273-277.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS**SEQ ID NO. 1****DNA*****aidH* (lactonase gene)*****Ochrobactrum***

ATGACAATTAATTATCATGAATTGGAAACCAGTCACGGTCGTATCGCAGTC
CGTGAGTCAGAAGGGGAAGGTGCGCCGCTGCTGATGATACATGGTAATAG
CAGTTCCGGGGCGATTTTTGCGCCACAGCTTGAGGGGGAAATAGGAAAGA
AATGGCGTGTCATTGCCCCAGATCTGCCGGGACATGGAAAGAGCACGGAC
GCAATCGACCCGGACCGCTCTTACAGCATGGAAGGCTACGCTGATGCCAT
GACAGAGGTTATGCAACAACCTCGGTATTGCAGATGCGGTGGTATTCGGCT
GGAGCCTTGGAGGTCATATTGGCATAGAAATGATCGCGCGTTACCCAGAA
ATGCGTGGTTTAATGATTACGGGCACCCCTCCGGTTGCACGGGAAGAAGT
AGGACAAGGCTTTAAGAGTGGTCCAGATATGGCGCTTGCAGGTCAAGAAA
TTTTTTCAGAACGGGATGTTGAGTCTTACGCTCGGAGTACGTGCGGAGAA
CCTTTTGAAGCTAGTCTTTTGGACATCGTAGCACGGACTGACGGGCGGGC
TAGACGCATTATGTTTCGAAAAATTTGGGAGTGGAACCTGGCGGTAACCAAC
GGGACATCGTTGCTGAAGCACAATTACCTATTGCCGTAGTGAATGGGCGG
GATGAACCATTTGTGCGAGTTGGACTTCGTTAGCAAAGTTAAATTTGGAAAC
CTCTGGGAAGGTAAACTCATGTAATCGACAATGCGGGACATGCTCCTTTC
CGGGAAGCTCCAGCTGAGTTCGATGCATATCTCGCCCGCTTCATACGTGA
TTGTACGCAGTAA

SEQ ID NO. 2**DNA*****Isr operon******E. coli***

ATGCAAACGAGTGATACCCGCGCGTTACCGCTACTTTGCGCCCGCTCGGT
TTATAAACAGTATTCAGGGGTCAATGTCCTGAAAGGCATCGATTTTACGTT

GCATCAGGGGGAGGTCCACGCCCTGCTCGGCGGCAATGGTGCCGGTAAA
TCGACGTTAATGAAGATTATTGCCGGTATTACCCCTGCTGATAGCGGTACG
CTGGAGATTGAGGGCAACAACACTACGTCAGATTAACGCCAGTTCATGCTCAT
CAGCTGGGTATTTATCTCGTTCCCCAGGAACCGCTGCTTTTTCCCAAGCCTG
TCGATAAAAGAAAACATCCTGTTTGGGCTGGCAAAAAAACAGCTCTCCATG
CAGAAAATGAAGAACTTGCTGGCGGCGCTGGGCTGCCAGTTTGATCTGCA
TAGTCTGGCAGGATCGCTGGATGTCGCCGATCGCCAAATGGTGGAATCC
TCCGCGGGCTGATGCGCGACTCGCGGATTCTGATCCTCGATGAACCTACC
GCCTCGCTTACCCCTGCGGAAACCGAACGCTTGTTTAGTCGCTTGCAAGA
GCTGCTTGCTACTGGCGTGGGTATTGTTTTTATCTCGCATAAGCTGCCGGA
AATTCGCCAGATTGCCGATCGAATTAGCGTGATGCGCGACGGAACCATCG
CCTTAAGCGGCAAAACCAGCGAACTGTCTACCGACGACATTATTCAGGCC
ATCACCCCAGCGGTACGGGAAAATCGCTCTCTGCCAGCCAAAATTATG
GCTGGAGTTACCTGGTAACCGCCCACAACATGCCGCCGGAACGCCGGTG
CTGACACTGGAAAATCTGACCGGCGAAGGTTTCAGGAATGTCAGCCTGAC
GCTCAATGCCGGAGAAATTCTGGGCCTGGCTGGGCTGGTGGGGGCCGGA
CGCACAGAACTGGCCGAGACGCTCTATGGTCTGCGTACTTTGCGTGGCGG
ACGCATTATGCTGAATGGTAAAGAGATCAATAAATTATCCACTGGAGAACG
TTTACTGCGCGGTCTGGTTTATCTGCCGGAAGATCGCCAGTCATCCGGAC
TGAATCTCGATGCTTCGCTGGCCTGGAACGTCTGCGCCCTTACTCATAACC
TTCGTGGATTCTGGGCGAAAACCGCGAAAGATAATGCCACCCTGGAACGT
TATCGTCGGGCGCTGAATATTAATTCAACCAACCGGAACAAGCTGCACG
GACATTATCCGGTGGCAACCAGCAAAAAATCCTCATTGCCAAATGCTTGGA
AGCTTCGCCGCAAGTATTGATTGTCGATGAGCCGACGCGCGGCGTGGATG
TCTCGGCCCGTAATGATATCTACCAGCTGTTGCGCAGCATCGCCGCACAA
AATGTGGCTGTGCTGCTTATCTCCTCCGACCTGGAAGAGATCGAACTGAT
GGCAGATCGTGTGTATGTGATGCATCAGGGCGAAATTACCCACTCTGCAC
TGACCGAGCGCGATATTAATGTGAGACTATTATGCGCGTTGCCTTCGGC
GATAGTCAGCGTCAGGAGGCGTCATGCTGAAGTTTATTCAGAACAACCGT

GAAATCACGGCACTGCTGGCGGTGGTGCTGCTGTTTGTATTACCCGGTTT
TCTCGACCGCCAGTATTTAAGTGTGCAAACGCTGACCATGGTTTATAGCAG
CGCGCAAATCCTGATCCTGCTGGCAATGGGCGCGACGCTGGTAATGCTTA
CGCGCAATATTGATGTTTCAGTGGGTTTCGATTACCGGAATGTGCGCGGTG
CTGTTGGGGATGTTACTGAACGCAGGATATTCACTACCTGTTGCTTGTGTC
GCGACTTTACTGCTTGGTTTGCTCGCGGGATTTTTCAACGGTGTCTGGTC
GCGTGGCTAAAGATCCCTGCCATTGTTGCCACCCTTGGCACGTTAGGGTT
GTACAGAGGCATCATGTTGCTGTGGACTGGCGGCAAATGGATTGAAGGGT
TACCCGCCGAACCTGAAACAGCTCTCCGCCCCGCTGCTGCTTGGCGTTTCA
GCAATTGGTTGGTTGACGATAATTCTGGTGGCATTATGGCCTGGCTGCTG
GCAAAGACGGCGTTTGGACGCAGTTTTTATGCCACGGGCGATAATTTACA
GGGCGCTCGTCAACTGGGCGTTCGTACTGAAGCCATTTCGATTGTGGCAT
TTTCGTTGAACGGCTGCATGGCGGCACTGGCGGGAATTGTGTTTGCTTCG
CAGATTGGTTTTATCCCAACCAGACCGGTACCGGGCTGGAGATGAAAGC
AATTGCAGCCTGCGTGCTGGGCGGCATTAGTTTGCTCGGTGGTTCCGGTG
CGATCATTGGTGCGGTACTIONCGGCGCATGGTTCCTGACGCAGATCGATAGC
GTACTGGTGCTGTTGCGCATTCCGGCATGGTGGAAATGATTTTATCGCGGG
TCTGGTTCTGCTGGCGGTGCTGGTGTGTTGATGGACGCCTGCGTTGTGCGC
TGGAACGTAATCTACGGCGGCAAAAATATGCCCGCTTTATGACGCCACCG
CCATCCGTAAACCCGCTTCGTCAGGTAAAAACGGGAGGCCGCATAATG
CGTATTCGCTACGGTTGGGAACTGGCTCTTGCCGCACTGCTCGTTATTGA
GATTGTCGCATTTGGTGCAATTAACCCGCGAATGTTAGATCTCAATATGTT
GCTGTTCAGCACCAAGTGACTTTATCTGCATTGGCATTGTCGCCCTACCGCT
AACGATGGTGATTGTCAGTGGCGGGATCGATATTTGTTTGGTTTCGACCAT
CGGCCTCTGCGCCATTGCATTGGGCGTACTGTTTCAAAGTGGTGTGCCGA
TGCCGCTGGCGATACTCCTGACCTTACTGCTCGGCGCATTGTGCGGGCTG
ATCAACGCCGGATTAATTATCTATACCAAAGTTAACCCGCTGGTGATTACG
CTTGGCACGCTGTATCTGTTTGCCGGAAGCGCTCTGCTGCTTTCCGGTAT
GGCCGGAGCGACGGGGTACGAAGGTATTGGTGGATTCCCGATGGCGTTT

ACAGATTTTCGCTAACCTGGATGTGCTGGGACTCCCCGTTCCGCTGATTATC
TTCTGATATGTCTCCTCGTTTTCTGGCTCTGGCTGCATAAAACCCATGCC
GGACGTAATGTGTTTTTATTGGGCAAAGCCCGCGCGTGGCGCTTTATAG
CGCGATTCCAGTTAACCGTACCTTATGTGCGCTCTATGCCATGACGGGGC
TGGCGTCTGCGGTGCGCGCTGTGCTGCTGGTATCGTATTTTGGTTCAGCA
CGTTCCGATCTCGGTGCGTCGTTTCTGATGCCCGCCATCACCGCCGTGGT
GCTTGGCGGGGCCAATATTTATGGTGGTTCCGGTTCATTATCGGCACCG
CCATTGCGGTTTTATTAGTGGGATATTTGCAACAAGGTTTGCAAATGGCAG
GAGTGCCAAATCAGGTGTCCAGCGCCCTTTCCGGTGGCGCTACTTATCGTC
GTTGTTCGTAGGTTCGTTCCGTTAGCCTGCATCGCCAGCAAATTAAGAGTG
GCTGGCGCGTGGGGCCAATAACCCATTGCCATAAAGGATATCTTCATGAC
ACTTCATCGCTTTAAGAAAATCGCCTTACTTAGCGCTCTTGGCATTGCCGC
AATCTCTATGAATGTGCAGGCCGCAGAGCGTATTGCATTTATTCCCAA
GGTTGGCGTGGGATTTTTTACCAGCGGTGGCAACGGCGCACAACAAGCG
GGTAAAGAGCTGGGCGTTGATGTGACCTACGACGGGCCGACAGAACCCA
GTGTTTCTGGTCAGGTACAGTTGATTAATAACTTCGTCAATCAAGGTTATAA
CGCCATTATCGTTTCTGCGGTTTCGCCTGATGGCTTGTGTCCGGCACTGAA
ACGCGCCATGCAACGTGGTGTGAGAGTGCTGACCTGGGACTCTGATACTA
AACCGGAGTGCCGCTCTTACTACATTAATCAGGGAACGCCCGCCAGTTA
GGAGGTATGTTGGTGGATATGGCGGCGCGTCAGGTGAATAAAGACAAAGC
CAAAGTCGCGTTTTTCTACTCAAGCCCCACCGTTACGGACCAAACAGTG
GGTGAAAGAAGCGAAAGCGAAAATCGCCAAAGAGCATCCAGGCTGGGAAA
TTGTCACTACGCAGTTTGGCTATAACGATGCCACTAAATCGTTACAAACCG
CAGAAGGAATATTAAGCGTATAGCGATCTCGACGCCATTATCGCCCC
GATGCCAACGCCCTGCCCGCTGCCGCACAAGCCGCAGAAAATTGAAAAA
TGACAAAGTAGCGATTGTCGGATTCAGTACGCCAAATGTGATGCGCCCCGT
ATGTAGAGCGCGGCACGGTGAAGAATTTGGCCTGTGGGATGTGGTTCAG
CAAGGCAAATTTAGTGTATGTCGCGGATGCATTATTGAAAAAAGGATCA
ATGAAAACGGGCGACAAGCTGGATATCAAGGGCGTAGGTCAGGTTGAAGT

CTCGCCAAACAGCGTTCAGGGCTATGACTACGAAGCGGATGGTAATGGCA
TCGTACTGTTACCGGAGCGCGTGATATTCAACAAAGAGAATATCGGCAAAT
ACGATTTCTGATGTGCATTAACCGGAGTAAGTTATGGCAGATTTAGA
CGATATTAAGATGGTAAAGATTTTCGTACCGATCAACCGCAAAAAAATATC
CCTTTTACCCTGAAAGGTTGCGGTGCGCTGGATTGGGGAATGCAGTCACG
CTTATCGCGGATATTTAATCCGAAAACGGGTAAAACCGTGATGCTGGCTTT
TGACCATGGTTATTTTCAGGGACCGACTACCGGACTTGAACGCATTGATAT
AAATATCGCCCCGCTGTTTGAACATGCCGATGTATTAATGTGTACGCGCGG
CATTTTGCAGCGTAGTTCCCCCTGCGACCAATAGGCCGGTGGTACTGC
GGGCGTCAGGTGCGAACTCTATTCTGGCGGAATTAAGTAATGAAGCCGTG
GCGTTATCGATGGATGACGCCGTGCGCCTGAACAGTTGCGCGGTGGCGG
CGCAGGTTTATATCGGCAGCGAATATGAACATCAGTCGATCAAAAATATTA
TTCAGCTGGTTGATGCCGGAATGAAAGTGGGAATGCCGACCATGGCCGTG
ACTGGCGTGGGCAAAGATATGGTGCGCGATCAGCGTTATTTCTCGCTCGC
GACTCGAATCGCCGCTGAAATGGGGGCGCAAATTATCAAACCTATTATGT
CGAAAAAGGTTTTTGAACGGATTGTTGCCGGATGTCCGGTACCCATTGTTAT
TGCTGGCGGTAAAAAATTACCGGAGCGCGAGGCGCTGGAAATGTGCTGG
CAGGCTATCGATCAGGGCGCTTCTGGTGTGGATATGGGGCGTAATATTTT
CCAGTCTGACCATCCGGTGGCGATGATGAAAGCCGTACAGGCGGTGGTTC
ACCATAACGAAACGGCTGATCGGGCATATGAACTCTATCTGAGTGAAAAAC
AGTAACTGCGGATCTAAGGAGAAGAATTATGCACGTCACACTGGTTGAAAT
TAACGTTTCATGAAGACAAGGTTGACGAGTTTATCGAAGTTTTTTCGCCAGAA
CCACCTGGGCTCTGTACAGGAAGAAGGCAATTTGCGCTTCGATGTCTTAC
AGGACCCGGAAGTGAATTCGCGCTTTTATATCTACGAAGCCTATAAAGATG
AAGACGCAGTGGCGTTCATAAAACCACGCCCCACTACAAAACCTGTGTC
GCGAAACTGGAATCTTTAATGACCGGGCCGCGTAAAAAACGTCTGTTCAAT
GGTTTGATGCCGTGAATCTACCTCGAGGTTTATGGCTCGACTCTTTACCCT
TTCAGAATCAAAGTACTACCTGATGGCGCTGGATGCAGGCACCGGAAGTA
TTCGGGCTGTGATATTCGACCTGGAAGGCAATCAAATAGCAGTGGGACAG

GCGGAGTGGCGGCATCTGGCAGTACCGGACGTTCCCTGGTTCTATGGAATT
TGATCTCAACAAAACTGGCAACTGGCGTGTGAGTGTATGCGCCAGGCGC
TGCACAACGCCGGCATAGCCCCGGAGTATATCGCTGCCGTTTCGGCATGT
TCGATGCGTGAAGGCATTGTTTTATATAATAATGAAGGAGCCCCGATCTGG
GCCTGCGCCAATGTGGATGCCAGAGCGGCACGCGAAGTTAGCGAACTTAA
AGA ACTGCACAACAATACCTTTGAAAACGAAGTTTATCGCGCGACCGGACA
AACACTGGCTTTAAGTGCCATCCCCAGATTACTTTGGCTGGCGCACCATCG
TTCCGATATTTACCGTCAGGCATCAACCATCACCATGATCAGCGACTGGCT
GGCCTATATGCTCAGCGGCGAACTGGCGGTGGATCCCTCTAACGCTGGCA
CCACGGGACTTCTTGATCTAACCACCCGTGACTGGAAACCTGCATTGCTG
GATATGGCTGGCCTACGTGCCGATATTCTTTCTCCTGTCAAAGAAACCGGC
ACATTGCTGGGCGTGGTAAGTTCACAAGCGGCGGAACTCTGCGGTCTGAA
GGCGGGCACTCCGGTGGTCGTTGGAGGAGGCGACGTGCAGCTTGGTTGC
CTTGGGTTAGGCGTTGTGCGTCCGGCACAAACCGCGGTTCTTGGCGGCA
CATTCTGGCAGCAAGTTGTAAATTTAGCCGCGCCGGTGACAGACCCAGAA
ATGAACGTGCGCGTTAATCCTCATGTTATTCCTGGCATGGTACAAGCTGAA
TCTATAAGCTTTTTTACCGGACTCACCATGCGCTGGTTCCGCGATGCTTTC
TGTGCCGAAGAAAACTGATTGCCGAACGTTTAGGCATCGACACCTATACG
CTGCTGGAAGAGATGGCCAGTCGGGTGCCGCTGGGTGCGTGGGGCGTAA
TGCCGATCTTCTCCGACAGAATGCGCTTTAAAACCTGGTATCACGCTGCGC
CTTCCTTTATTA ACTTGTCCATTGACCCGGATAAATGTAACAAAGCGACATT
GTTCCGTGCGCTGGAAGAAAATGCGGCGATTGTATCAGCGTGTA ACTTGC
AGCAAATTGCTGATTTCTCGAATATTCATCCTTCATCGTTAGTCTTTGCAGG
CGGAGGTTCAA AAGGAAATTATGGAGTCAAATTCTCGCTGATGTCTCGG
GATTACCCGTCAATATTCCGGTGGTCAAAGAAGCCACTGCATTAGGATGTG
CCATTGCAGCTGGCGTCCGGTGCCGGAATTTTTTTCATCAATGGCAGAAACC
GGAGAACGCCTGGTTCGCTGGGAACGGACGCACACACCAGACCCGGAAA
AGCATGAACTTTATCAGGATTCACGCGATAAGTGGCAGGCAGTTTATCAGG

ATCAGCTGGGGCTGGTTGATCATGGACTGACGACGTCGTTATGGAAAGCG
CCTGGGTTATAG

SEQ ID NO. 3

asRNA

anti-sense RNA sequence targeting expression of dam gene in *Vibrio*

UAAUUCAACAAGAAUUGGGACAACUCCAGUGAAAAGUUCUUCUCCUUUA
CUCAU

SEQ ID NO. 4

DNA

dam gene

Vibrio sp.

ATGAAAAAGCAACGAGCCTTTCTTAAGTGGGCAGGAGGCAAATACGGTCT
GGTTGAAGACATCCAACGTCATTTACCACCGGCTCGAAAGCTAGTTGAACC
CTTTGTTGGTGCTGGCTCGGTTTTTCTAAATACCGACTATGACCACTATCTA
CTGGCGGATATTAACCCCGACCTGATTAATCTCTATAACTTACTAAAAGAG
CGTCCTGAAGAGTACATCTCAGAAGCGAAGCGCTGGTTTGTTCAGAGAA
CAATCGCAAAGAAGCGTACTTGAATATTCGCGCCGAGTTTAATAAACGGA
TGACGTGATGTACCGCTCGTTGGCGTTCCTATACATGAACCGCTTTGGCTT
TAATGGCTTATGTCGTTATAACAAAAAAGGCGGCTTTAATGTCCCGTTTGG
TTCTTACAAAAAGCCTTATTTCCCAGAAGCGGAGCTAGAATTCTTTGCTGAA
AAAGCCAAGAAAGCGACGTTTCGTATGTGAAGGTTACCCAGAAACGTTTCAG
TCGAGCGCGTAAAGGCAGCGTGGTTTATTGCGATCCACCGTACGCACCGT
TGTCGAACACGGCGAACTTTACCTCTTATGCTGGCAACGGCTTTACGCTG
GATGATCAAGCTGCATTGGCTGATATTGCAGAGAAAGCCGCAACTGAACG

TGGTATCCCTGTTCTGATCTCAAACCATGACACGACATTAACGCGTCGCCT
TTATCATGGTGCGGAGCTTAATGTCGTAAAAGTGAAGCGAACCATCAGTCG
TAATGGCAGTGGTCGTAATAAAGTTGACGAGTTGCTGGCGCTATTTTCGTGC
ACCTGACGCGGACAAATCTGACTCTTAA

REIVINDICAÇÕES

1. Bactéria geneticamente modificada configurada para o biocontrole da Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS), caracterizada pelo fato de que compreende:

- uma bactéria doadora geneticamente modificada que pode ser introduzida em um hospedeiro alvo e expressar pelo menos um polinucleotídeo de RNA antissentido heterólogo (asRNA) configurada para ser transportada para fora das referidas bactérias doadoras geneticamente modificadas e ser absorvida por um patógeno causador de EMS do referido hospedeiro alvo e inibir a expressão de pelo menos um gene essencial no referido patógeno causador de EMS.

2. Bactéria geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o referido patógeno causador de EMS compreende uma espécie de *Vibrio*.

3. Bactéria geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o referido gene essencial compreende um gene responsável por metilação de DNA.

4. Bactéria geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o referido gene responsável por metilação de DNA compreende um gene DNA adenina metilase (*dam*).

5. Bactéria geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que o referido gene *dam* compreende SEQ ID NO. 4, ou uma sequência tendo aproximadamente 75% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 4.

6. Bactéria geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que o referido asRNA heterólogo compreende um asRNA heterólogo configurado para inibir expressão de um gene DNA adenina metilase (*dam*) ou um homólogo do mesmo.

7. Bactéria geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o referido asRNA heterólogo configurado para inibir expressão de um gene DNA adenina metilase (*dam*) compreende um asRNA heterólogo identificado como SEQ ID NO. 3, ou uma sequência tendo aproximadamente 85% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 3.

8. Bactéria geneticamente modificada, de acordo com reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que as referidas bactérias doadoras geneticamente modificadas compreendem um microrganismo doador geneticamente modificado selecionado do grupo que consiste em: uma bactéria doadora geneticamente modificada simbiótica, uma bactéria doadora geneticamente modificada probiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada simbiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada endossimbiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada entérica de camarão, Ag1, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter*, *E. coli*, uma alga doadora geneticamente modificada e uma bactéria doadora geneticamente modificada autotrófica.

9. Bactéria geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que o referido hospedeiro alvo é um organismo aquático.

10. Bactéria geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o referido organismo aquático é um camarão e/ou camarão criado em aquacultura.

11. Bactéria geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a referida bactéria doadora geneticamente modificada compreende uma alimentação ou um inóculo de lagoa de cultura de camarão tendo a referida bactéria doadora geneticamente modificada como um ingrediente.

12. Bactéria geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a referida bactéria doadora geneticamente

modificada expressando um asRNA heterólogo identificado como SEQ ID NO. 3, ou uma sequência tendo aproximadamente 85% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 3, é transmitida a uma progênie de camarão por transmissão vertical.

13. Bactéria geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a referida bactéria doadora geneticamente modificada expressando um asRNA heterólogo identificado como SEQ ID NO. 3, ou uma sequência tendo aproximadamente 85% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 3, é transmitida a uma população de camarão por transmissão horizontal.

14. Bactéria geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a referida bactéria doadora geneticamente modificada expressando um asRNA heterólogo identificado como SEQ ID NO. 3, ou uma sequência tendo aproximadamente 85% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 3, em que a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz da referida bactéria doadora geneticamente modificada resulta em uma redução na mortalidade devido ao EMS causada por uma ou mais espécies *Vibrio*.

15. Bactéria geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a referida bactéria doadora geneticamente modificada expressando um asRNA heterólogo identificado como SEQ ID NO. 3, ou uma sequência tendo aproximadamente 85% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 3, em que a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz da referida bactéria doadora geneticamente modificada resulta em uma redução na formação de biofilmes ou na expressão de genes de patogênese, incluindo aqueles envolvidos na produção de toxina por um ou mais *Vibrio* causadores de EMS.

16. Bactéria geneticamente modificada, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a referida bactéria doadora geneticamente

modificada expressando um asRNA heterólogo identificado como SEQ ID NO. 3, ou uma sequência tendo aproximadamente 85% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 3, em que a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz da referida bactéria doadora geneticamente modificada resulta em uma redução na patogenicidade de um ou mais *Vibrio* causadores de EMS.

17. Composto ingerível de organismo aquático para o biocontrole de bactérias patogênicas, caracterizado pelo fato de que compreende:

- um alimento tratado ou inóculo líquido para um organismo aquático infectado e/ou suscetível a EMS tendo uma bactéria doadora geneticamente modificada que pode ser introduzida em um hospedeiro alvo através do referido alimento tratado ou por transmissão pela água e expressar ainda pelo menos um polinucleotídeo de RNA antissentido heterólogo (asRNA) configurado para ser transportado para fora da referida bactéria doadora geneticamente modificada e absorvido por um patógeno causador de EMS do referido hospedeiro alvo e para inibir a expressão de pelo menos um gene essencial no referido patógeno causador de EMS.

18. Composto ingerível de organismo aquático, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o referido patógeno causador de EMS compreende uma espécie de *Vibrio*.

19. Composto ingerível de organismo aquático, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o referido gene essencial compreende um gene responsável por metilação de DNA.

20. Composto ingerível de organismo aquático, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o referido gene responsável por metilação de DNA compreende um gene DNA adenina metilase (*dam*).

21. Composto ingerível de organismo aquático, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o referido gene *dam* compreende SEQ ID NO. 4, ou uma sequência tendo aproximadamente 75% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 4.

22. Composto ingerível de organismo aquático, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o referido asRNA heterólogo compreende um asRNA heterólogo configurado para inibir expressão de um gene DNA adenina metilase (*dam*) ou um homólogo do mesmo.

23. Composto ingerível de organismo aquático, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o referido asRNA heterólogo configurado para inibir expressão de um gene DNA adenina metilase (*dam*) compreende um asRNA heterólogo identificado como SEQ ID NO. 3, ou uma sequência tendo aproximadamente 85% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 3.

24. Composto ingerível de organismo aquático, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias doadoras geneticamente modificadas compreendem um microrganismo doador geneticamente modificado selecionado do grupo que consiste em: uma bactéria doadora geneticamente modificada simbiótica, uma bactéria doadora geneticamente modificada probiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada simbiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada endossimbiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada entérica de camarão, Ag1, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter*, *E. coli*, uma alga doadora geneticamente modificada e uma bactéria doadora geneticamente modificada autotrófica.

25. Composto ingerível de organismo aquático, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o referido hospedeiro alvo é um organismo aquático.

26. Composto ingerível de organismo aquático, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o referido organismo aquático é um camarão.

27. Composto ingerível por organismo aquático, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o referido camarão compreende camarão criado em aquacultura.

28. Composto ingerível de organismo aquático, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a referida bactéria doadora geneticamente modificada expressando um asRNA heterólogo identificado como SEQ ID NO. 3, ou uma sequência tendo aproximadamente 85% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 3, é transmitida a uma progênie de camarão por transmissão vertical.

29. Composto ingerível de organismo aquático, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a referida bactéria doadora geneticamente modificada expressando um asRNA heterólogo identificado como SEQ ID NO. 3, ou uma sequência tendo aproximadamente 85% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 3, é transmitida a uma população de camarão por transmissão horizontal.

30. Composto ingerível de organismo aquático, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a referida bactéria doadora geneticamente modificada expressando um asRNA heterólogo identificado como SEQ ID NO. 3, ou uma sequência tendo aproximadamente 85% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 3, em que a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz da referida bactéria doadora geneticamente modificada resulta em uma redução na mortalidade devido ao EMS causada por uma ou mais espécies *Vibrio*.

31. Composto ingerível de organismo aquático, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a referida bactéria doadora geneticamente modificada expressando um asRNA heterólogo identificado como SEQ ID NO. 3, ou uma sequência tendo aproximadamente 85% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 3, em que a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz da referida bactéria doadora geneticamente modificada

resulta em uma redução na formação de biofilmes ou na expressão de genes de patogênese, incluindo aqueles envolvidos na produção de toxina por um ou mais *Vibrio* causadores de EMS.

32. Composto ingerível de organismo aquático, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a referida bactéria doadora geneticamente modificada expressando um asRNA heterólogo identificado como SEQ ID NO. 3, ou uma sequência tendo aproximadamente 85% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 3, em que a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz da referida bactéria doadora geneticamente modificada resulta em uma redução na patogenicidade de um ou mais *Vibrio* causadores de EMS.

33. Método para tratar Síndrome da Mortalidade Precoce (SGA) em um organismo, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

- gerar uma bactéria doadora geneticamente modificada configurada para expressar um polinucleotídeo de asRNA heterólogo que é complementar ao mRNA de um ou mais genes de metilação de DNA de um patógeno bacteriano causador de EMS;
- introduzir a referida bactéria doadora geneticamente modificada em um hospedeiro alvo que está infectado por e/ou suscetível a infecção pelo referido patógeno bacteriano causador de EMS;
- expressar o referido polinucleotídeo de asRNA heterólogo que é complementar aos referidos um ou mais genes de metilação de DNA do referido patógeno bacteriano causador de EMS;
- transportar o referido polinucleotídeo de asRNA heterólogo para fora da referida bactéria doadora geneticamente modificada;
- introduzir o referido polinucleotídeo de asRNA heterólogo no referido patógeno bacteriano causador de EMS, em que o referido patógeno

bacteriano causador de EMS absorve o referido polinucleotídeo de asRNA heterólogo; e

- inibir expressão dos referidos um ou mais genes de metilação de DNA do referido patógeno bacteriano causador de EMS, causando uma redução de metilação de DNA no referido patógeno bacteriano causador de EMS.

34. Método, de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o referido patógeno bacteriano causador de EMS compreende uma espécie de *Vibrio*.

35. Método, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o referido gene de metilação de DNA compreende um gene de DNA adenina metilase (*dam*).

36. Método, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o referido gene *dam* compreende SEQ ID NO. 4, ou uma sequência tendo aproximadamente 75% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 4.

37. Método, de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o referido asRNA heterólogo compreende um asRNA heterólogo configurado para inibir expressão de um gene DNA adenina metilase (*dam*), ou um homólogo do mesmo.

38. Método, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que o referido asRNA heterólogo configurado para inibir expressão do gene DNA adenina metilase (*dam*) compreende um asRNA heterólogo identificado como SEQ ID NO. 3, ou uma sequência tendo aproximadamente 85% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 3.

39. Método, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias doadoras geneticamente modificadas compreendem um microrganismo doador geneticamente modificado selecionado do grupo que consiste em: uma bactéria doadora geneticamente modificada simbiótica, uma bactéria doadora geneticamente modificada

probiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada simbiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada endossimbiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada entérica de camarão, Ag1, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter*, *E. coli*, uma alga doadora geneticamente modificada e uma bactéria doadora geneticamente modificada autotrófica.

40. Método, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que o referido hospedeiro alvo é um organismo aquático.

41. Método, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o referido organismo aquático é um camarão.

42. Método, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que o referido camarão compreende camarão criado em aquacultura.

43. Método, de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que a referida bactéria doadora geneticamente modificada expressando um asRNA heterólogo identificado como SEQ ID NO. 3, ou uma sequência tendo aproximadamente 85% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 3, é transmitida a uma progênie de camarão por transmissão vertical.

44. Método, de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que a referida bactéria doadora geneticamente modificada expressando um asRNA heterólogo identificado como SEQ ID NO. 3, ou uma sequência tendo aproximadamente 85% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 3, é transmitida a uma população de camarão por transmissão horizontal.

45. Método, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que introduzir as referidas bactérias doadoras geneticamente modificadas em um hospedeiro alvo compreende a etapa de introduzir em um camarão das referidas bactérias doadoras geneticamente modificadas expressando uma quantidade terapeuticamente eficaz do referido asRNA heterólogo identificado como SEQ ID NO. 3, ou uma sequência tendo aproximadamente 85% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 3, em que a administração da referida quantidade

terapeuticamente eficaz do referido asRNA heterólogo resulta em uma redução na mortalidade devido a EMS causada por um ou mais *Vibrio* causadores de EMS.

46. Método, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que introduzir as referidas bactérias doadoras geneticamente modificadas em um hospedeiro alvo compreende a etapa de introduzir em um camarão das referidas bactérias doadoras geneticamente modificadas expressando uma quantidade terapêuticamente eficaz do referido asRNA heterólogo identificado como SEQ ID NO. 3, ou uma sequência tendo aproximadamente 85% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 3, em que a administração da referida quantidade terapêuticamente eficaz do referido asRNA heterólogo resulta em uma redução em biofilmes ou na expressão de genes de patogênese, incluindo aqueles envolvidos em produção de toxina causada por um ou mais *Vibrio* causadores de EMS.

47. Método, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que introduzir as referidas bactérias doadoras geneticamente modificadas em um hospedeiro alvo compreende a etapa de introduzir em um camarão das referidas bactérias doadoras geneticamente modificadas expressando uma quantidade terapêuticamente eficaz do referido asRNA heterólogo identificado como SEQ ID NO. 3, ou uma sequência tendo aproximadamente 85% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 3, em que a administração da referida quantidade terapêuticamente eficaz do referido asRNA heterólogo resulta em uma redução na patogenicidade de um ou mais *Vibrio* causadores de EMS.

48. Método para interromper detecção de quórum (QS) em bactérias patogênicas, caracterizado pelo fato de que compreende:

- transformar uma bactéria para gerar uma bactéria geneticamente modificada configurada para expressar pelo menos um sistema de extinção de quórum heterólogo configurado para remover moléculas autoindutoras-2 (AI-2)

exógenas do ambiente e transportá-las para as referidas bactérias geneticamente modificadas;

- introduzir as referidas bactérias geneticamente modificadas em um organismo ou ambiente infectado com patogênico capaz de QS e/ou em um organismo ou ambiente que é suscetível à colonização por bactérias patogênicas capazes de QS; e

- expressar a referida pelo menos uma molécula de sistema de extinção de quórum heterólogo em que os níveis de moléculas AI-2 exógenas no ambiente são reduzidos a um nível em que a expressão regulada de molécula QS de traços/genes de patogênese pelas referidas bactérias patogênicas é reduzida e/ou inibida.

49. Método, de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que o referido organismo compreende um organismo aquático.

50. Método, de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o referido organismo aquático compreende um camarão.

51. Método, de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que o referido camarão compreende camarão criado em aquicultura.

52. Método, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias patogênicas compreendem uma bactéria patogênica causadora de Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS).

53. Método, de acordo com a reivindicação 52, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias causadoras da Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS) compreende uma espécie de *Vibrio*.

54. Método, de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar pelo menos uma molécula de extinção de quórum heteróloga configurada para remover moléculas de AI-2 exógenas do ambiente e transportá-las para as referidas bactérias geneticamente modificadas compreende a etapa de expressar um óperon *l_{sr}* operacionalmente ligado a um promotor que é configurado para expressar pelo menos um transportador de

cassete de ligação a ATP (transportador ABC) e pelo menos uma proteína chaperona que bombeia ativamente a molécula AI-2 autoindutora exógena do ambiente para a referida célula bacteriana transformada.

55. Método, de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo fato de que o óperon *Isr* heterólogo é identificado como SEQ ID NO. 2, ou uma sequência tendo aproximadamente 75% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 2.

56. Método, de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que o referido promotor compreende um promotor constitutivo e/ou indutível.

57. Método, de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias geneticamente modificadas compreendem uma bactéria geneticamente modificada selecionada do grupo que consiste em: uma bactéria doadora geneticamente modificada entérica, uma bactéria doadora geneticamente modificada simbiótica, uma bactéria doadora geneticamente modificada probiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada simbiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada endossimbiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada entérica de camarão, *Ag1*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter*, e *E. coli*, ou outras bactérias simbióticas.

58. Método, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de introduzir as referidas bactérias geneticamente modificadas em um organismo ou ambiente compreende a etapa de introduzir um alimento tratado ou inóculo líquido tendo as referidas bactérias geneticamente modificadas como um ingrediente para camarão e/ou ambiente de aquacultura.

59. Método, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de introduzir as referidas bactérias geneticamente modificadas em um organismo ou ambiente compreende a etapa de introduzir

as referidas bactérias geneticamente modificadas diretamente a um camarão e/ou ambiente de aquacultura.

60. Método, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de transmitir as referidas bactérias geneticamente modificadas configuradas para expressar um óperon *lsr* heterólogo para uma população de camarão por transferência vertical e/ou horizontal.

61. Método, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar o referido óperon *lsr* heterólogo em que os níveis de moléculas AI-2 exógenas no ambiente são reduzidos a um nível em que expressão regulada de molécula QS de traços/genes de patogênese pelas referidas bactérias patogênicas são reduzidos e/ou inibidos compreende a etapa de expressar o referido óperon *lsr* heterólogo em que os níveis de moléculas AI-2 exógenas no ambiente são reduzidos a um nível em que a formação de biofilme ou expressão de genes de patogênese, incluindo aqueles envolvidos na produção de toxinas pelas referidas bactérias patogênicas, é reduzida e ou inibida.

62. Método, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar o referido óperon *lsr* heterólogo em que os níveis de moléculas AI-2 exógenas no ambiente são reduzidos a um nível em que a expressão regulada de molécula QS de traços/genes de patogênese pelas referidas bactérias patogênicas é reduzida e/ou inibida compreende a etapa de expressar o referido óperon *lsr* heterólogo em que os níveis de moléculas AI-2 exógenas no ambiente são reduzidos a um nível em que a patogenicidade mediada por QS das referidas bactérias patogênicas é reduzida e/ou inibida.

63. Método, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar o referido óperon *lsr* heterólogo , em que os níveis de moléculas AI-2 exógenas no ambiente são reduzidos a um nível em que a expressão regulada de molécula QS de traços/genes de patogênese pelas

referidas bactérias patogênicas é reduzida e/ou inibida compreende a etapa de expressar o referido óperon *Isr* heterólogo em que os níveis de moléculas AI-2 exógenas no ambiente são reduzidos a um nível em que a EMS causada por *Vibrio* é tratada e/ou prevenida.

64. Método, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar o referido óperon *Isr* heterólogo em que os níveis de moléculas AI-2 exógenas no ambiente são reduzidos a um nível em que a expressão regulada de molécula QS de traços/genes de patogênese pelas referidas bactérias patogênicas é reduzida e/ou inibida compreende a etapa de expressar o referido óperon *Isr* heterólogo em que os níveis de moléculas AI-2 exógenas no ambiente são reduzidos a um nível em que a mortalidade do referido hospedeiro alvo devido a EMS causada por uma ou mais espécies *Vibrio* é reduzida.

65. Composto ingerível de organismo aquático para o biocontrole de bactérias patogênicas, caracterizado pelo fato de que compreende:

- um alimento tratado ou inóculo líquido para um hospedeiro alvo infectado e/ou suscetível a bactéria patogênica tendo uma bactéria doadora geneticamente modificada tendo um ácido nucleico heterólogo que pode ser introduzido em um hospedeiro alvo através do referido alimento tratado ou por transmissão de água e ainda em que o referido ácido nucleico heterólogo codifica pelo menos uma molécula de extinção de quórum heteróloga configurada para remover moléculas autoindutoras-2 (AI-2) exógenas do ambiente e transportá-la para as referidas bactérias geneticamente modificadas, resultando na redução e/ou inibição de detecção de quórum (QS) na referida bactéria patogênica.

66. Composto, de acordo com a reivindicação 65, caracterizado pelo fato de que o referido hospedeiro alvo compreende um organismo aquático.

67. Composto, de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que o referido organismo aquático compreende um camarão.

68. Composto, de acordo com a reivindicação 67, caracterizado pelo fato de que o referido camarão compreende camarão criado em aquacultura.

69. Composto, de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias patogênicas compreendem uma bactéria patogênica causadora de Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS).

70. Composto, de acordo com a reivindicação 69, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias causadoras da Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS) compreende uma espécie de *Vibrio*.

71. Composto, de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico heterólogo compreende um óperon *Isr* operavelmente ligado a um promotor que é configurado para expressar pelo menos um transportador de cassete de ligação a ATP (transportador ABC) e pelo menos uma proteína chaperona que bombeia ativamente a molécula autoindutora AI-2 exógena do ambiente para a referida célula bacteriana geneticamente modificada.

72. Composto, de acordo com a reivindicação 71, caracterizado pelo fato de que o óperon *Isr* é identificado como SEQ ID NO. 2, ou uma sequência tendo aproximadamente 75% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 2.

73. Composto, de acordo com a reivindicação 72, caracterizado pelo fato de que o referido promotor compreende um promotor constitutivo e/ou indutível.

74. Composto, de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias geneticamente modificadas compreendem uma bactéria geneticamente modificada selecionada do grupo que consiste em: uma bactéria doadora geneticamente modificada entérica, uma bactéria doadora geneticamente modificada simbiótica, uma bactéria doadora geneticamente modificada probiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada simbiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada endossimbiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente

modificada entérica de camarão, Ag1, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter*, e *E. coli*, ou outras bactérias simbióticas

75. Composto, de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias geneticamente modificadas configuradas para expressar o referido óperon *Isr* heterólogo podem ser transmitidas através de transferência vertical e/ou horizontal.

76. Composto, de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias geneticamente modificadas configuradas para expressar o referido óperon *Isr* heterólogo compreendem uma bactéria geneticamente modificada configurada para expressar o referido óperon *Isr* heterólogo em que os referidos níveis de moléculas AI-2 exógenas no ambiente são reduzidos a um nível onde a formação de biofilme ou expressão de genes de patogênese, incluindo aqueles envolvidos na produção de toxina pelas referidas bactérias patogênicas, é reduzida e ou inibida.

77. Composto, de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias geneticamente modificadas configuradas para expressar o referido óperon *Isr* heterólogo compreendem uma bactéria geneticamente modificada configurada para expressar o referido óperon *Isr* heterólogo em que os referidos níveis de moléculas AI-2 exógenas no ambiente são reduzidos a um nível onde a patogenicidade mediada por QS das referidas bactérias patogênicas é reduzida e ou inibida.

78. Composto, de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias geneticamente modificadas configuradas para expressar o referido óperon *Isr* compreendem uma bactéria geneticamente modificada configurada para expressar o referido óperon *Isr* heterólogo em que os referido níveis de moléculas AI-2 exógenas no ambiente são reduzidos a um nível onde a EMS causada por *Vibrio* é tratada e/ou impedida.

79. Composto, de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias geneticamente modificadas configuradas para

expressar o referido óperon *lsr* compreendem uma bactéria geneticamente modificada configurada para expressar o referido óperon *lsr* heterólogo em que os referido níveis de moléculas AI-2 exógenas no ambiente são reduzidos a um nível onde a mortalidade do referido hospedeiro alvo devida a EMS causada por um ou mais *Vibrio* é reduzida.

80. Método para interromper detecção de quórum (QS) em bactérias patogênicas, caracterizado pelo fato de que compreende:

- transformar uma bactéria para gerar uma bactéria geneticamente modificada configurada para expressar pelo menos uma molécula de extinção de quórum heteróloga configurada para inibir uma ou mais moléculas autoindutoras-1 (AI-1) exógenas;

- introduzir as referidas bactérias geneticamente modificadas em um organismo ou ambiente infectado com patogênico capaz de QS e/ou em um organismo ou ambiente que é suscetível à colonização por bactérias patogênicas capazes de QS; e

- expressar a referida pelo menos uma molécula de extinção de quórum heteróloga em que os níveis de moléculas AI-1 exógenas no ambiente são inibidos até um nível em que a expressão regulada de molécula QS de traços/genes de patogênese pelas referidas bactérias patogênicas é reduzida e/ou inibida.

81. Método, de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que o referido organismo compreende um organismo aquático.

82. Método, de acordo com a reivindicação 81, caracterizado pelo fato de que o referido organismo aquático compreende um camarão.

83. Método, de acordo com a reivindicação 82, caracterizado pelo fato de que o referido camarão compreende camarão criado em aquacultura.

84. Método, de acordo com a reivindicação 83, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias patogênicas compreendem uma bactéria patogênica causadora de Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS).

85. Método, de acordo com a reivindicação 84, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias causadoras da Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS) compreende uma espécie de *Vibrio*.

86. Método, de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar pelo menos uma molécula de extinção de quórum heteróloga configurada para uma ou mais moléculas AI-1 exógenas compreende a etapa de expressar uma lactonase homoserina (AHL lactonase) configurada para inativar moléculas de AI-1 exógenas.

87. Método, de acordo com a reivindicação 86, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressão de uma AHL lactonase configurada para inativar moléculas AI-1 exógenas compreende a etapa de expressar uma AHL lactonase configurada para inativar moléculas QS de classe AHL exógenas.

88. Método, de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que as referidas moléculas QS classe AHL exógenas compreendem Hal-1 exógena.

89. Método, de acordo com a reivindicação 88, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar uma AHL lactonase configurada para inativar moléculas AI-1 exógenas compreende a etapa de expressar um gene *aidH* heterólogo.

90. Método, de acordo com a reivindicação 86, caracterizado pelo fato de que o referido gene *aidH* heterólogo é identificado como SEQ ID NO. 1, ou uma sequência tendo aproximadamente 75% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 2.

91. Método, de acordo com a reivindicação 90, caracterizado pelo fato de que o referido promotor compreende um promotor constitutivo e/ou indutível.

92. Método, de acordo com a reivindicação 90, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias geneticamente modificadas compreendem uma bactéria geneticamente modificada selecionada do grupo que consiste em: uma bactéria doadora geneticamente modificada entérica, uma bactéria doadora

geneticamente modificada simbiótica, uma bactéria doadora geneticamente modificada probiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada simbiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada endossimbiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada entérica de camarão, Ag1, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter*, e *E. coli*, ou outras bactérias simbióticas.

93. Método, de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de introduzir as referidas bactérias geneticamente modificadas em um organismo ou ambiente compreende a etapa de introduzir um alimento tratado ou inóculo líquido tendo as referidas bactérias geneticamente modificadas como um ingrediente para camarão e/ou ambiente de aquacultura.

94. Método, de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de introduzir as referidas bactérias geneticamente modificadas em um organismo ou ambiente compreende a etapa de introduzir as referidas bactérias geneticamente modificadas diretamente a um camarão e/ou ambiente de aquacultura.

95. Método, de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de transmitir as referidas bactérias geneticamente modificadas configuradas para expressar um *aidH* heterólogo para uma população de camarão por transferência vertical e/ou horizontal.

96. Método, de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar o referido *aidH* heterólogo compreende expressar um *aidH* heterólogo de modo que os níveis de moléculas AI-1 exógenas no ambiente sejam inibidos até um nível em que a formação de biofilme ou expressão de genes de patogênese, incluindo aqueles envolvidos na produção de toxinas pelas referidas bactérias patogênicas é reduzida e/ou inibida.

97. Método, de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar o referido *aidH* heterólogo compreende expressar um *aidH* heterólogo de modo que os níveis de moléculas AI-1 exógenas no ambiente sejam inibidos até um nível em que a patogenicidade mediada por QS das referidas bactérias patogênicas é reduzida e ou inibida.

98. Método, de acordo com a reivindicação 92, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar o referido *aidH* heterólogo compreende expressar um *aidH* heterólogo de modo que os níveis de moléculas AI-1 exógenas no ambiente sejam inibidos até um nível em que a EMS causada por *Vibrio* é tratada e/ou prevenida.

99. Método, de acordo com a reivindicação 98, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar o referido *aidH* heterólogo compreende expressar um *aidH* heterólogo de modo que os níveis de moléculas AI-1 exógenas no ambiente sejam inibidos até um nível em que a mortalidade do referido hospedeiro alvo devido a EMS causada por uma ou mais espécies *Vibrio* é reduzida.

100. Composto ingerível de organismo aquático para o biocontrole de bactérias patogênicas, caracterizado pelo fato de que compreende:

- um alimento tratado ou inóculo líquido para um hospedeiro alvo infectado e/ou suscetível a bactéria patogênica tendo uma bactéria doadora geneticamente modificada tendo um ácido nucleico heterólogo que pode ser introduzido em um hospedeiro alvo através do referido alimento tratado ou por transmissão de água e ainda em que o referido ácido nucleico heterólogo codifica pelo menos uma molécula de extinção de quórum heteróloga configurada para inibir moléculas autoindutoras 1 (AI-1) exógenas resultando na redução e/ou inibição detecção de quórum (QS) na referida bactéria patogênica.

101. Composto, de acordo com a reivindicação 100, caracterizado pelo fato de que o referido hospedeiro alvo compreende um organismo aquático.

102. Composto, de acordo com a reivindicação 101, caracterizado pelo fato de que o referido organismo aquático compreende um camarão.

103. Composto, de acordo com a reivindicação 102, caracterizado pelo fato de que o referido camarão compreende camarão criado em aquacultura.

104. Composto, de acordo com a reivindicação 103, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias patogênicas compreendem uma bactéria patogênica causadora de Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS).

105. Composto, de acordo com a reivindicação 104, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias causadoras da Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS) compreende uma espécie de *Vibrio*.

106. Composto, de acordo com a reivindicação 105, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar pelo menos uma molécula de extinção de quórum heteróloga configurada para uma ou mais moléculas AI-1 exógenas compreende a etapa de expressar uma lactonase homoserina (AHL lactonase) configurada para inativar moléculas de AI-1 exógenas .

107. Composto, de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressão de uma AHL lactonase configurada para inativar moléculas AI-1 exógenas compreende a etapa de expressar uma AHL lactonase configurada para inativar moléculas QS de classe AHL exógenas.

108. Composto, de acordo com a reivindicação 107, caracterizado pelo fato de que as referidas moléculas QS de classe AHL exógenas compreendem Hal-1 exógena.

109. Composto, de acordo com a reivindicação 108, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar uma AHL lactonase configurada para inativar moléculas AI-1 exógenas compreende a etapa de expressar um gene *aidH* heterólogo.

110. Composto, de acordo com a reivindicação 106, caracterizado pelo fato de que o referido gene *aidH* heterólogo é identificado como SEQ ID NO. 1,

ou uma sequência tendo aproximadamente 75% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 2.

111. Composto, de acordo com a reivindicação 110, caracterizado pelo fato de que o referido promotor compreende um promotor constitutivo e/ou indutível.

112. Composto, de acordo com a reivindicação 110, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias geneticamente modificadas compreendem uma bactéria geneticamente modificada selecionada do grupo que consiste em: uma bactéria doadora geneticamente modificada entérica, uma bactéria doadora geneticamente modificada simbiótica, uma bactéria doadora geneticamente modificada probiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada simbiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada endossimbiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada entérica de camarão, Ag1, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter*, e *E. coli*, ou outras bactérias simbióticas.

113. Composto, de acordo com a reivindicação 112, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias geneticamente modificadas configuradas para expressar o referido *aidH* heterólogo podem ser transmitidas através de transferência vertical e/ou horizontal.

114. Composto, de acordo com a reivindicação 112, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias geneticamente modificadas configuradas para expressar um referido *aidH* heterólogo compreendem uma bactéria geneticamente modificada configurada para expressar o referido *aidH* em que os referidos níveis de moléculas AI-1 são inibidos até um nível onde a formação de biofilme ou expressão de genes de patogênese, incluindo aqueles envolvidos na produção de toxina pelas referidas bactérias patogênicas, é reduzida e ou inibida.

115. Composto, de acordo com a reivindicação 112, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias geneticamente modificadas configuradas para

expressar o referido *aidH* compreendem uma bactéria geneticamente modificada configurada para expressar o referido *aidH* heterólogo em que os referidos níveis de AI-1 exógena são inibidos até um nível onde a patogenicidade mediada por QS das referidas bactérias patogênicas é reduzida e ou inibida.

116. Composto, de acordo com a reivindicação 112, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias geneticamente modificadas configuradas para expressar um referido *aidH* heterólogo compreendem uma bactéria geneticamente modificada configurada para expressar um referido *aidH* heterólogo em que os referidos níveis de AI-1 exógena são inibidos até um nível em que a EMS causada por *Vibrio* é tratada e/ou impedida.

117. Composto, de acordo com a reivindicação 112, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias geneticamente modificadas configuradas para expressar o referido *aidH* heterólogo compreendem uma bactéria geneticamente modificada configurada para expressar um referido *aidH* heterólogo em que os referidos níveis de AI-1 exógenas são inibidos até um nível onde a mortalidade do referido hospedeiro alvo devida a EMS causada por um ou mais *Vibrio* é reduzida.

118. Método para interromper detecção de quórum (QS) em bactérias patogênicas, caracterizado pelo fato de que compreende:

- transformar uma bactéria para gerar uma bactéria geneticamente modificada configurada para expressar uma primeira molécula de extinção de quórum heteróloga configurada para inibir uma ou mais moléculas autoindutoras-1 (AI-1) exógenas;
- transformar uma bactéria para gerar uma bactéria geneticamente modificada configurada para expressar uma segunda molécula de extinção de quórum heteróloga configurado para remover moléculas autoindutoras-2 (AI-2) exógenas do ambiente e transportá-las para as referidas bactérias geneticamente modificadas;

- introduzir as referidas bactérias geneticamente modificadas em um organismo ou ambiente infectado com patógeno capaz de QS e/ou em um organismo ou ambiente que é suscetível à colonização por bactérias patogênicas capazes de QS;

- expressar as referidas primeira e segunda moléculas de extinção de quórum heterólogas em que os níveis de moléculas AI-2 e AI02 exógenas no ambiente são reduzidos e/ou inibidos até um nível em que a expressão regulada de molécula QS de traços/genes de patogênese pelas referidas bactérias patogênicas é interrompida.

119. Método, de acordo com a reivindicação 118, caracterizado pelo fato de que o referido hospedeiro alvo compreende um organismo aquático.

120. Método, de acordo com a reivindicação 119, caracterizado pelo fato de que o referido organismo aquático compreende um camarão.

121. Método, de acordo com a reivindicação 120, caracterizado pelo fato de que o referido camarão compreende camarão criado em aquacultura.

122. Método, de acordo com a reivindicação 121, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias patogênicas compreendem uma bactéria patogênica causadora de Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS).

123. Método, de acordo com a reivindicação 122, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias causadoras da Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS) compreende uma espécie de *Vibrio*.

124. Método, de acordo com a reivindicação 123, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar pelo menos uma molécula de extinção de quórum heteróloga configurada para remover moléculas de AI-2 exógenas do ambiente e transportá-las para as referidas bactérias geneticamente modificadas compreende a etapa de expressar um óperon *l_{sr}* operavelmente ligado a um promotor que é configurado para expressar pelo menos um transportador de cassete de ligação a ATP (transportador ABC) e pelo menos uma proteína

chaperona que bombeia ativamente a molécula AI-2 autoindutora exógena do ambiente para a referida célula bacteriana transformada.

125. Método, de acordo com a reivindicação 124, caracterizado pelo fato de que o referido óperon *lsr* é identificado como SEQ ID NO. 2, ou uma sequência tendo aproximadamente 75% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 2.

126. Método, de acordo com a reivindicação 123, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar pelo menos uma molécula de extinção de quórum heteróloga configurada para uma ou mais moléculas AI-1 exógenas compreende a etapa de expressar uma lactonase homoserina (AHL lactonase) configurada para inativar moléculas de AI-1 exógenas .

127. Método, de acordo com a reivindicação 126, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressão de uma AHL lactonase configurada para inativar moléculas AI-1 exógenas compreende a etapa de expressar uma AHL lactonase configurada para inativar moléculas QS de classe AHL exógenas .

128. Método, de acordo com a reivindicação 127, caracterizado pelo fato de que as referidas moléculas QS classe AHL exógenas compreendem Hal-1 exógena.

129. Método, de acordo com a reivindicação 128, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar uma AHL lactonase configurada para inativar moléculas AI-1 exógenas compreende a etapa de expressar um gene *aidH* heterólogo.

130. Método, de acordo com a reivindicação 129, caracterizado pelo fato de que o referido gene *aidH* é identificado como SEQ ID NO. 1, ou uma sequência tendo aproximadamente 75% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 1.

131. Método, de acordo com as reivindicações 125 e 129, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias geneticamente modificadas compreendem uma bactéria geneticamente modificada selecionada do grupo que consiste em: uma bactéria doadora geneticamente modificada entérica, uma

bactéria doadora geneticamente modificada simbiótica, uma bactéria doadora geneticamente modificada probiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada simbiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada endossimbiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada entérica de camarão, Ag1, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter*, e *E. coli*, ou outras bactérias simbióticas.

132. Método, de acordo com a reivindicação 131, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de introduzir as referidas bactérias geneticamente modificadas em um organismo ou ambiente compreende a etapa de introduzir um alimento tratado ou inóculo líquido tendo as referidas bactérias geneticamente modificadas como um ingrediente para camarão e/ou ambiente de aquacultura.

133. Método, de acordo com a reivindicação 131, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de introduzir as referidas bactérias geneticamente modificadas em um organismo ou ambiente compreende a etapa de introduzir as referidas bactérias geneticamente modificadas diretamente a um camarão e/ou ambiente de aquacultura.

134. Método, de acordo com a reivindicação 131, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de transmissão das referidas bactérias geneticamente modificadas configuradas para expressar a primeira e a segunda moléculas de extinção de quórum heterólogas para uma população de camarão por transferência vertical e/ou horizontal.

135. Método, de acordo com a reivindicação 131, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar as referidas primeira e segunda moléculas de extinção de quórum heterólogas compreende expressar a primeira e a segunda moléculas de extinção de quórum heterólogas de modo que os níveis de moléculas AI-1 e AI-2 exógenas no ambiente sejam reduzidos e/ou inibidos até um nível em que a formação de biofilme ou expressão de genes de

patogênese, incluindo aqueles envolvidos na produção de toxinas pelas referidas bactérias patogênicas, é reduzida e/ou inibida.

136. Método, de acordo com a reivindicação 131, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar as referidas primeira e segunda moléculas de extinção de quórum heterólogas compreende expressar a primeira e a segunda moléculas de extinção de quórum heterólogas de modo que os níveis de moléculas AI-1 e AI-2 exógenas no ambiente sejam reduzidos e/ou inibidos até um nível em que a patogenicidade mediada por QS das referidas bactérias patogênicas é reduzida e/ou inibida.

137. Método, de acordo com a reivindicação 131, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar as referidas primeira e segunda moléculas de extinção de quórum heterólogas compreende expressar a primeira e a segunda moléculas de extinção de quórum heterólogas de modo que os níveis de moléculas AI-1 e AI-2 exógenas no ambiente sejam reduzidos e/ou inibidos até um nível em que a EMS causada por *Vibrio* seja tratada e/ou prevenida.

138. Método, de acordo com a reivindicação 131, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar as referidas primeira e segunda moléculas de extinção de quórum heterólogas compreende expressar a primeira e a segunda moléculas de extinção de quórum heterólogas de modo que os níveis de moléculas AI-1 e AI-2 exógenas no ambiente sejam reduzidos e/ou inibidos até um nível em que a mortalidade do referido hospedeiro alvo devida a EMS causada por uma ou mais espécies *Vibrio* seja reduzida.

139. Método para tratar Síndrome da Mortalidade Precoce (SGA) em um organismo, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

- gerar uma bactéria doadora geneticamente modificada configurada para expressar um ou mais dos seguintes:
 - um polinucleotídeo de asRNA heterólogo que é complementar ao mRNA de um ou mais genes de metilação de DNA de um patógeno bacteriano causador de EMS; e/ou

- um sistema de extinção de quórum compreendendo ainda:
- uma primeira molécula de extinção de quórum heteróloga configurada para inibir uma ou mais moléculas autoindutoras-1 (AI-1) exógenas; e/ou
- uma segunda molécula de extinção de quórum heteróloga configurada para remover moléculas autoindutoras-2 (AI-2) exógenas do ambiente e transportá-las para as referidas bactérias doadoras geneticamente modificadas;
- introduzir a referida bactéria doadora geneticamente modificada em um hospedeiro alvo que está infectado por e/ou suscetível a infecção pelo referido patógeno bacteriano causador de EMS.

140. Método, de acordo com a reivindicação 139, caracterizado pelo fato de que o referido hospedeiro alvo é um organismo aquático.

141. Método, de acordo com a reivindicação 140, caracterizado pelo fato de que o referido organismo aquático é um camarão.

142. Método, de acordo com a reivindicação 141, caracterizado pelo fato de que o referido camarão compreende camarão criado em aquacultura.

143. Método, de acordo com a reivindicação 141, caracterizado pelo fato de que o referido patógeno causador de EMS compreende uma espécie *Vibrio*.

144. Método, de acordo com a reivindicação 143, caracterizado pelo fato de que o referido gene de metilação de DNA compreende um gene de DNA adenina metilase (*dam*).

145. Método, de acordo com a reivindicação 144, caracterizado pelo fato de que o referido gene *dam* compreende SEQ ID NO. 4, ou uma sequência tendo aproximadamente 75% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 4.

146. Método, de acordo com a reivindicação 3145, caracterizado pelo fato de que o referido asRNA heterólogo compreende um asRNA heterólogo configurado para inibir expressão de um gene DNA adenina metilase (*dam*), ou um homólogo do mesmo.

147. Método, de acordo com a reivindicação 146, caracterizado pelo fato de que o referido asRNA heterólogo configurado para inibir expressão do gene DNA adenina metilase (*dam*) compreende um asRNA heterólogo identificado como SEQ ID NO. 3, ou uma sequência tendo aproximadamente 85% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 3.

148. Método, de acordo com a reivindicação 143, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar pelo menos uma molécula de extinção de quórum heteróloga configurada para remover moléculas de AI-2 exógenas do ambiente e transportá-las para as referidas bactérias doadoras geneticamente modificadas compreende a etapa de expressar um óperon *Isr* operavelmente ligado a um promotor que é configurado para expressar pelo menos um transportador de cassete de ligação a ATP (transportador ABC) e pelo menos uma proteína chaperona que bombeia ativamente a molécula AI-2 autoindutora exógena do ambiente para a referida célula bacteriana transformada.

149. Método, de acordo com a reivindicação 148, caracterizado pelo fato de que o referido óperon *Isr* é identificado como SEQ ID NO. 2, ou uma sequência tendo aproximadamente 75% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 2.

150. Método, de acordo com a reivindicação 143, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar pelo menos uma molécula de extinção de quórum heteróloga configurada para uma ou mais moléculas AI-1 exógenas compreende a etapa de expressar uma lactonases homoserina (AHL lactonase) configurada para inativar moléculas de AI-1 exógenas .

151. Método, de acordo com a reivindicação 150, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressão de uma AHL lactonase configurada para inativar moléculas AI-1 exógenas compreende a etapa de expressar uma AHL lactonase configurada para inativar moléculas QS de classe AHL exógenas .

152. Método, de acordo com a reivindicação 151, caracterizado pelo fato de que as referidas moléculas QS classe AHL exógenas compreendem Hal-1 exógena.

153. Método, de acordo com a reivindicação 152, caracterizado pelo fato de que a referida etapa de expressar uma AHL lactonase configurada para inativar moléculas AI-1 exógenas compreende a etapa de expressar um gene *aidH* heterólogo.

154. Método, de acordo com a reivindicação 153, caracterizado pelo fato de que o referido gene *aidH* heterólogo é identificado como SEQ ID NO. 1, ou uma sequência tendo aproximadamente 75% ou mais de homologia com SEQ ID NO. 2.

155. Método, de acordo com qualquer reivindicação acima, caracterizado pelo fato de que as referidas bactérias doadoras geneticamente modificadas compreendem um microrganismo doador geneticamente modificado selecionado do grupo que consiste em: uma bactéria doadora geneticamente modificada simbiótica, uma bactéria doadora geneticamente modificada probiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada simbiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada endossimbiótica de camarão, uma bactéria doadora geneticamente modificada entérica de camarão, Ag1, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter*, *E. coli*, uma alga doadora geneticamente modificada, ou outras bactérias simbióticas .

156. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações acima, caracterizado pelo fato de que compreende ainda fornecer uma quantidade terapêuticamente eficaz das referidas bactérias doadoras geneticamente modificadas a um hospedeiro alvo , em que quantidade terapêuticamente eficaz resulta em uma redução na mortalidade devido a EMS causada por um ou mais *Vibrio* causadores de EMS.

157. Método, de acordo com qualquer reivindicação acima, caracterizado pelo fato de que compreende ainda fornecer uma quantidade terapêuticamente eficaz das referidas bactérias doadoras geneticamente modificadas a um hospedeiro alvo , em que quantidade terapêuticamente eficaz

resulta em uma redução em biofilmes ou na expressão de genes de patogênese, incluindo aqueles envolvidos na produção de toxinas causada por um ou mais *Vibrio* causadores de EMS.

158. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações acima, caracterizado pelo fato de que compreende ainda fornecer uma quantidade terapêuticamente eficaz das referidas bactérias doadoras geneticamente modificadas a um hospedeiro alvo, em que quantidade terapêuticamente eficaz resulta em uma redução na patogenicidade um ou mais *Vibrio* causadores de EMS.

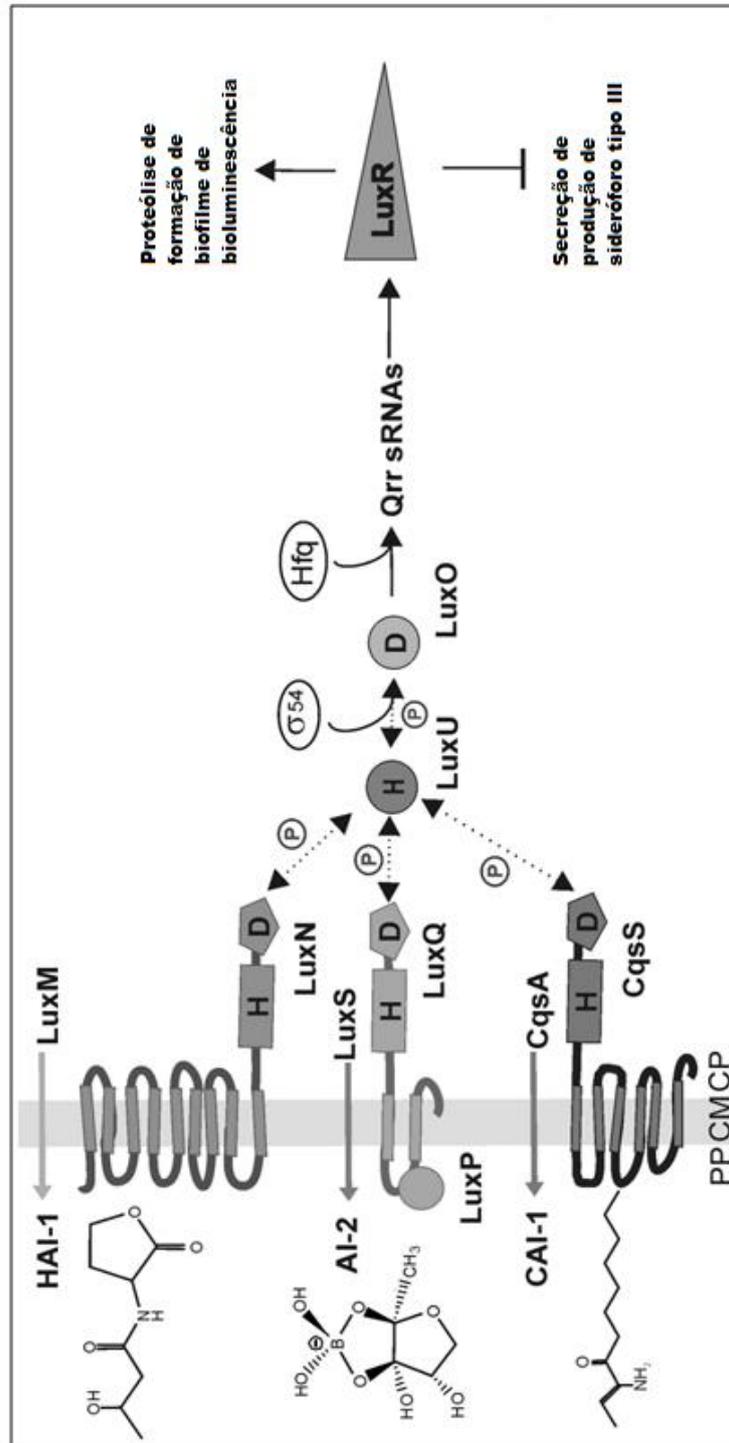
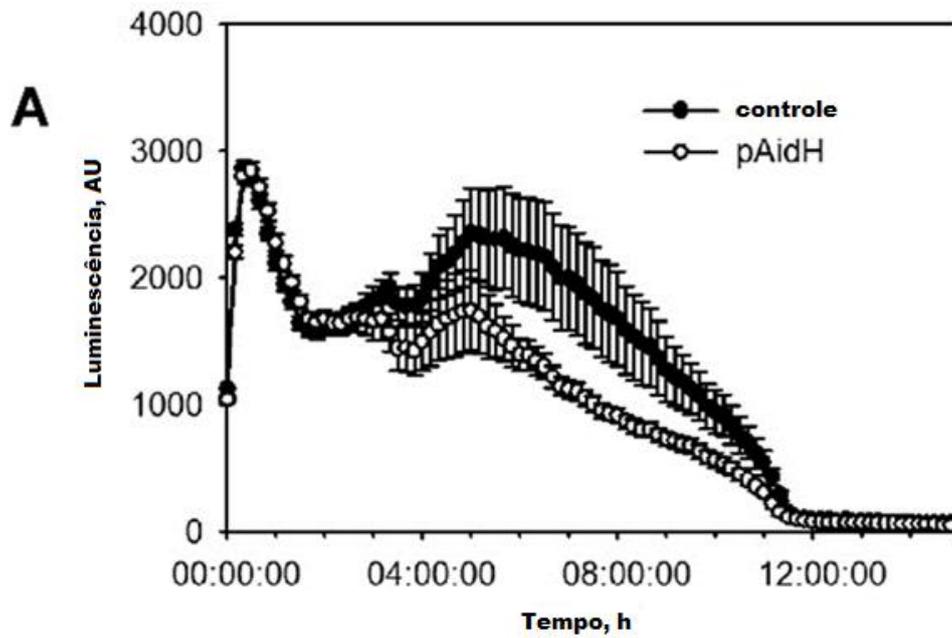


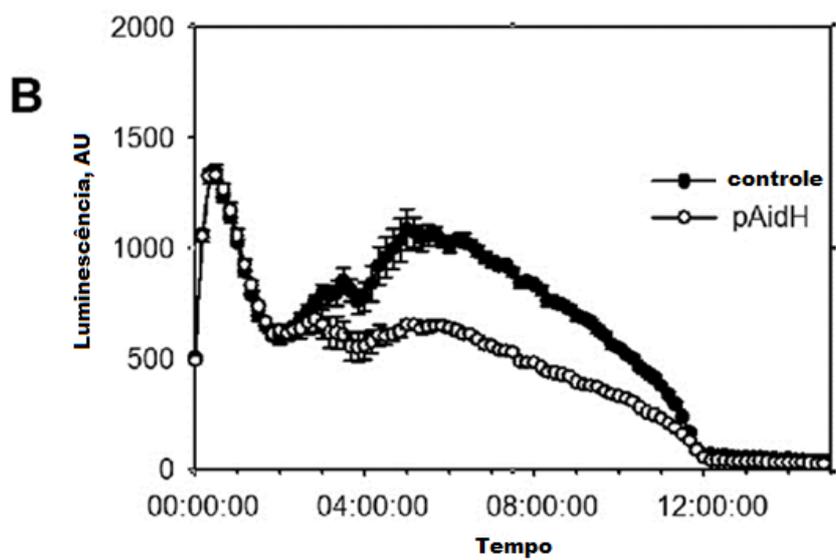
FIGURA 1

V. harveyi 116
responde à AI-1, AI-2



V. harveyi 117
(responde à AI-1)

FIGURA 2A



V. harveyi 118
(responde à AI-2)

FIGURA 2B

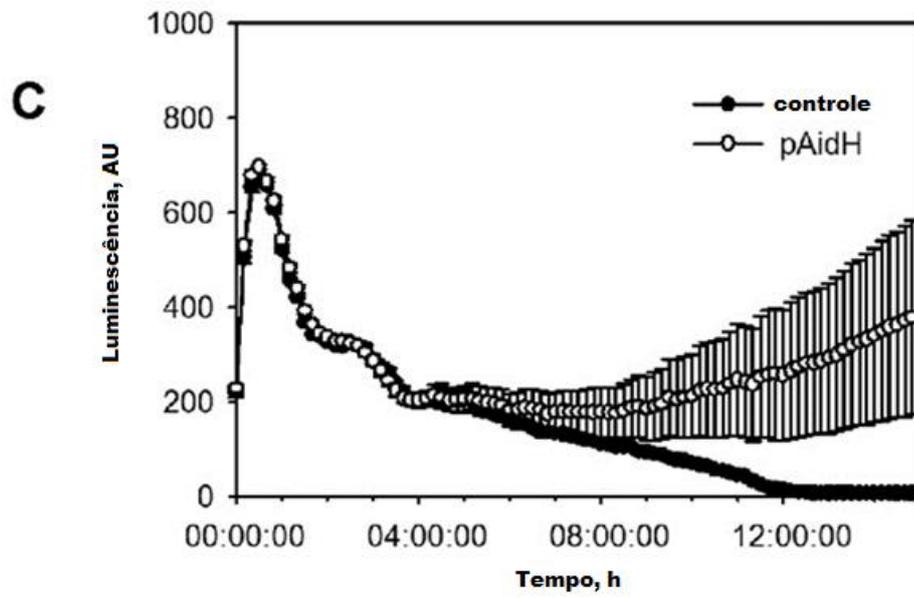


FIGURA 2C

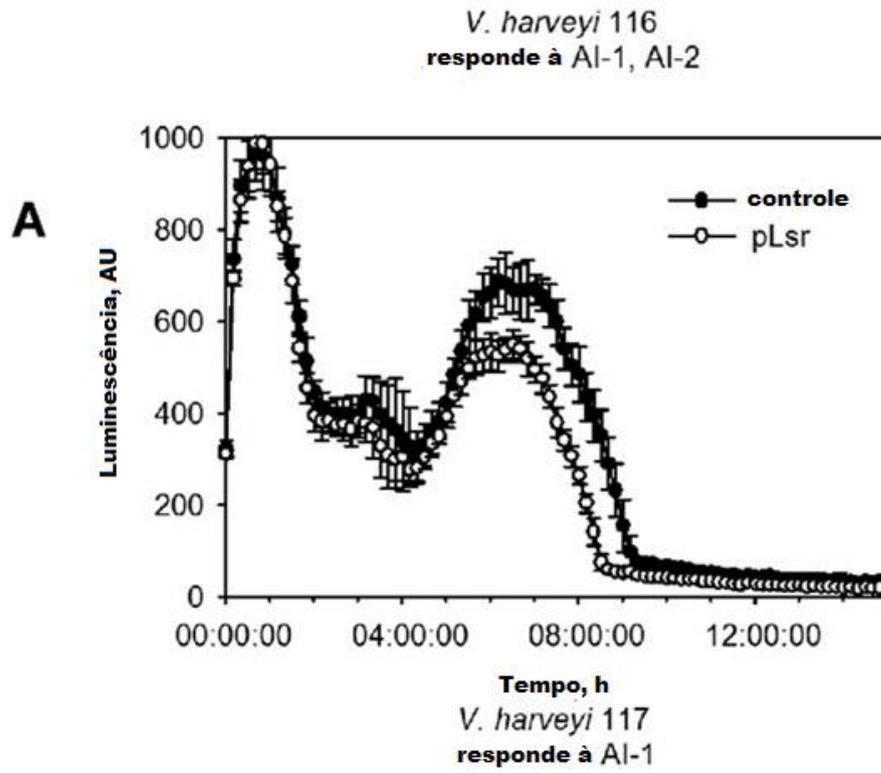
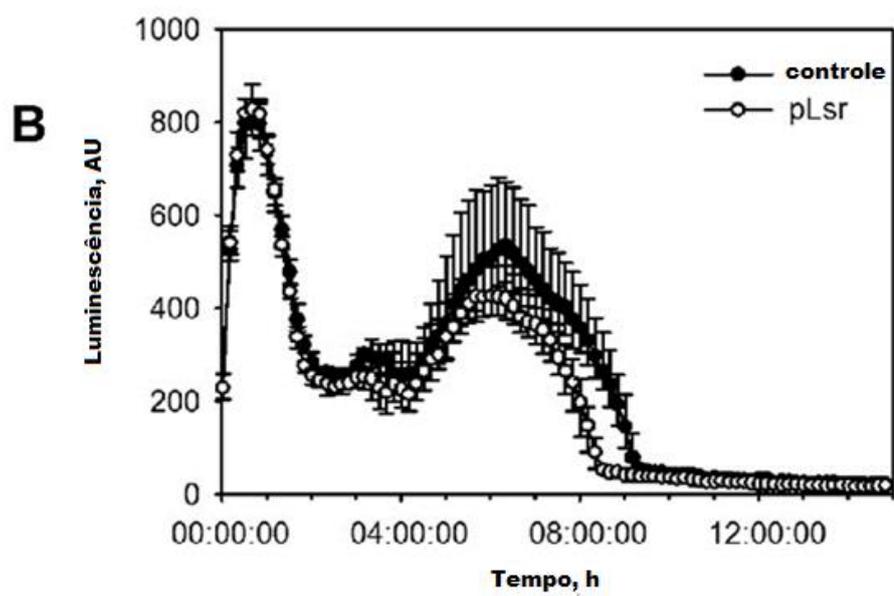


FIGURA 3A



V. harveyi 119
responde à AI-2

FIGURA 3B

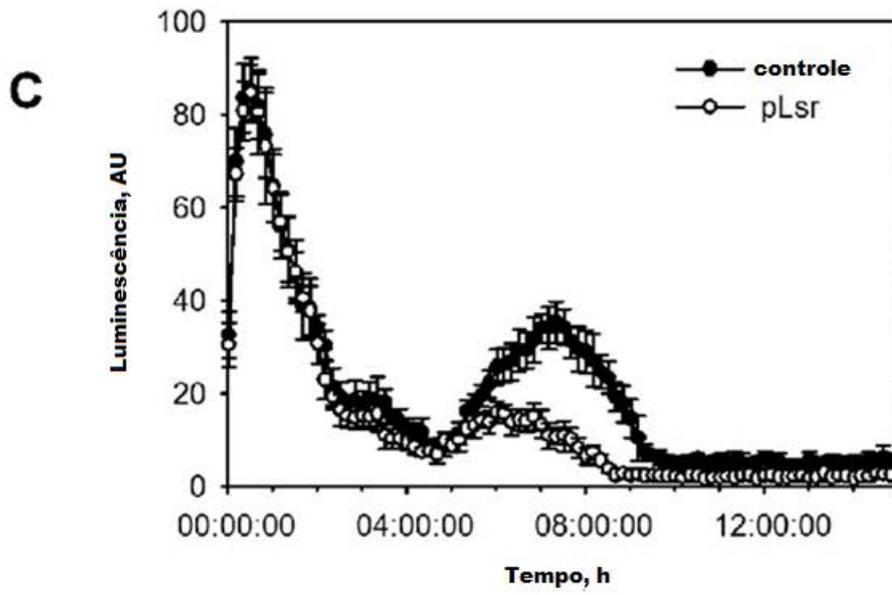


FIGURA 3C

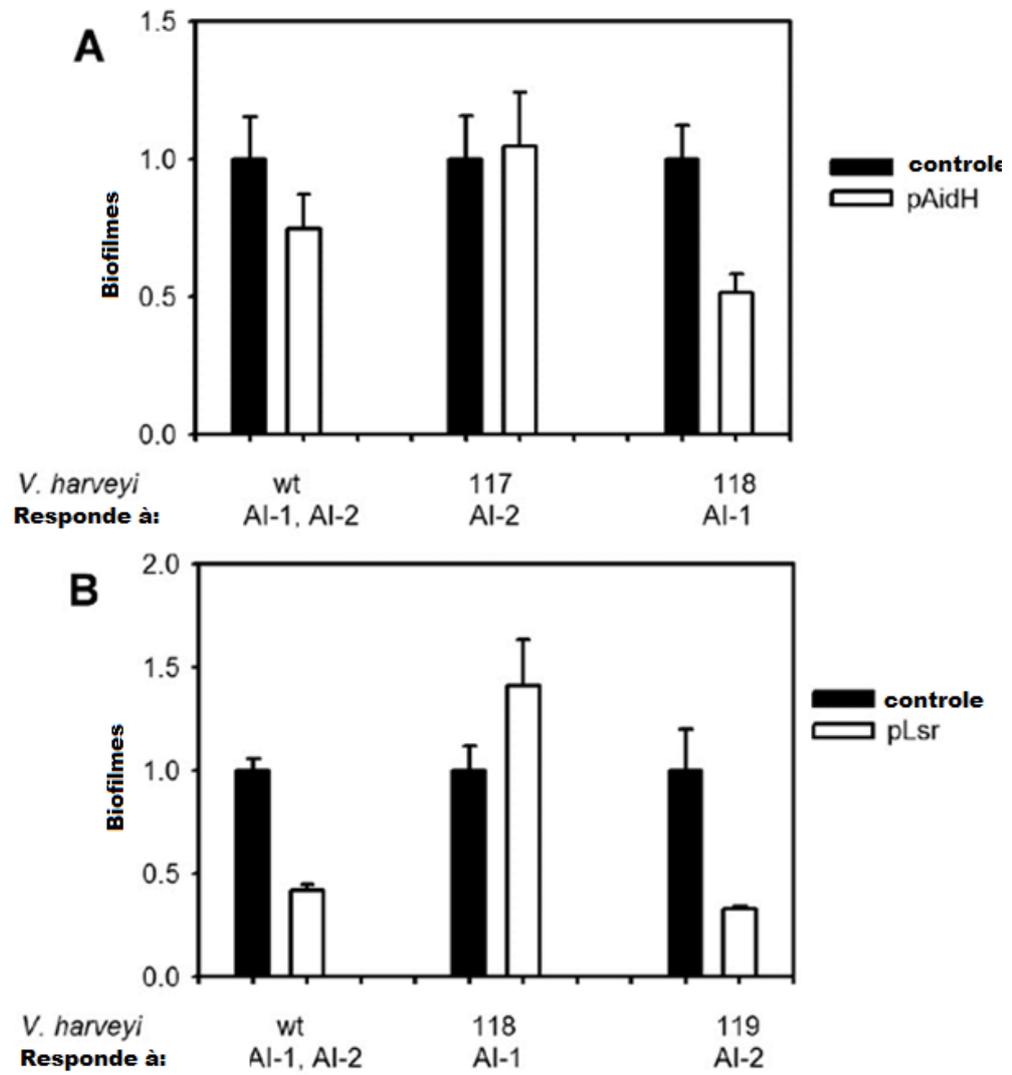


FIGURA 4

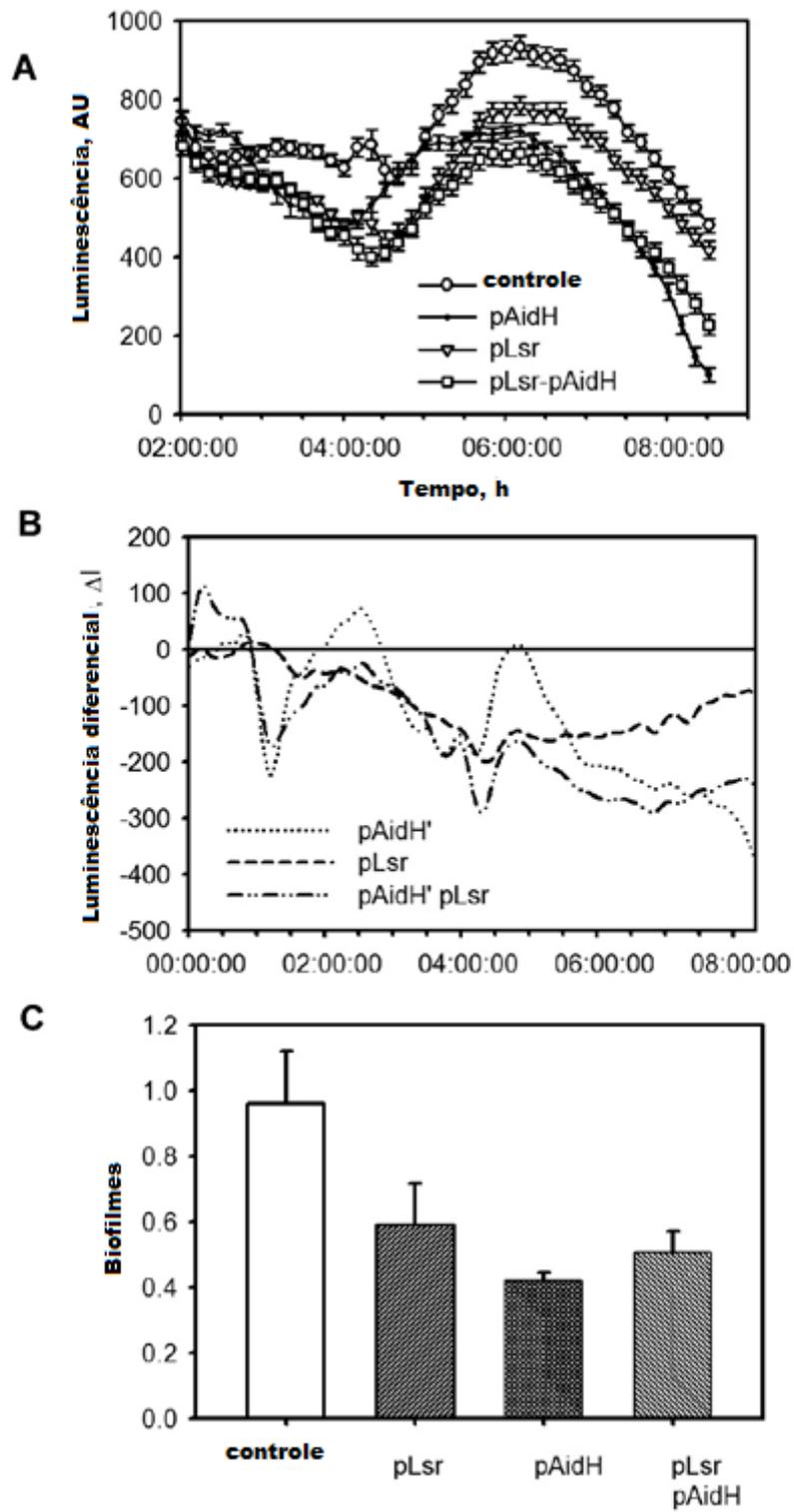


FIGURA 5

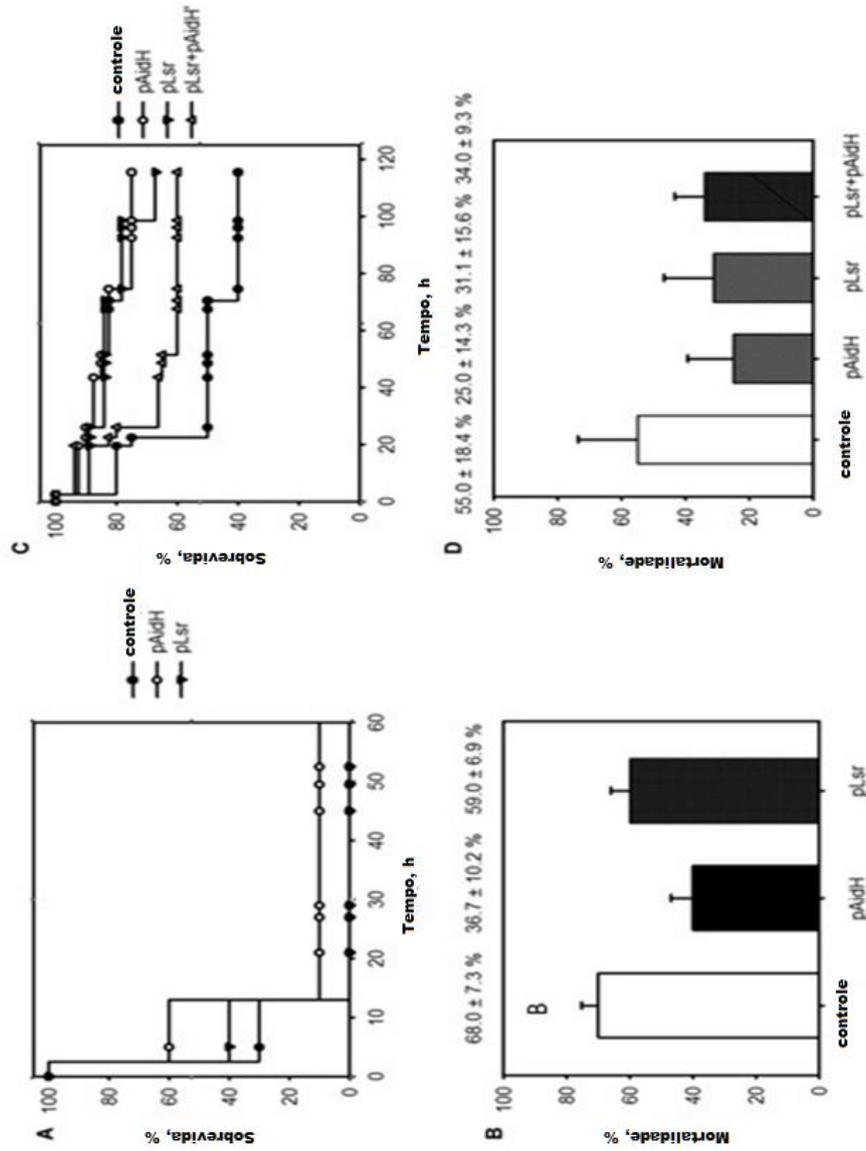


FIGURA 9

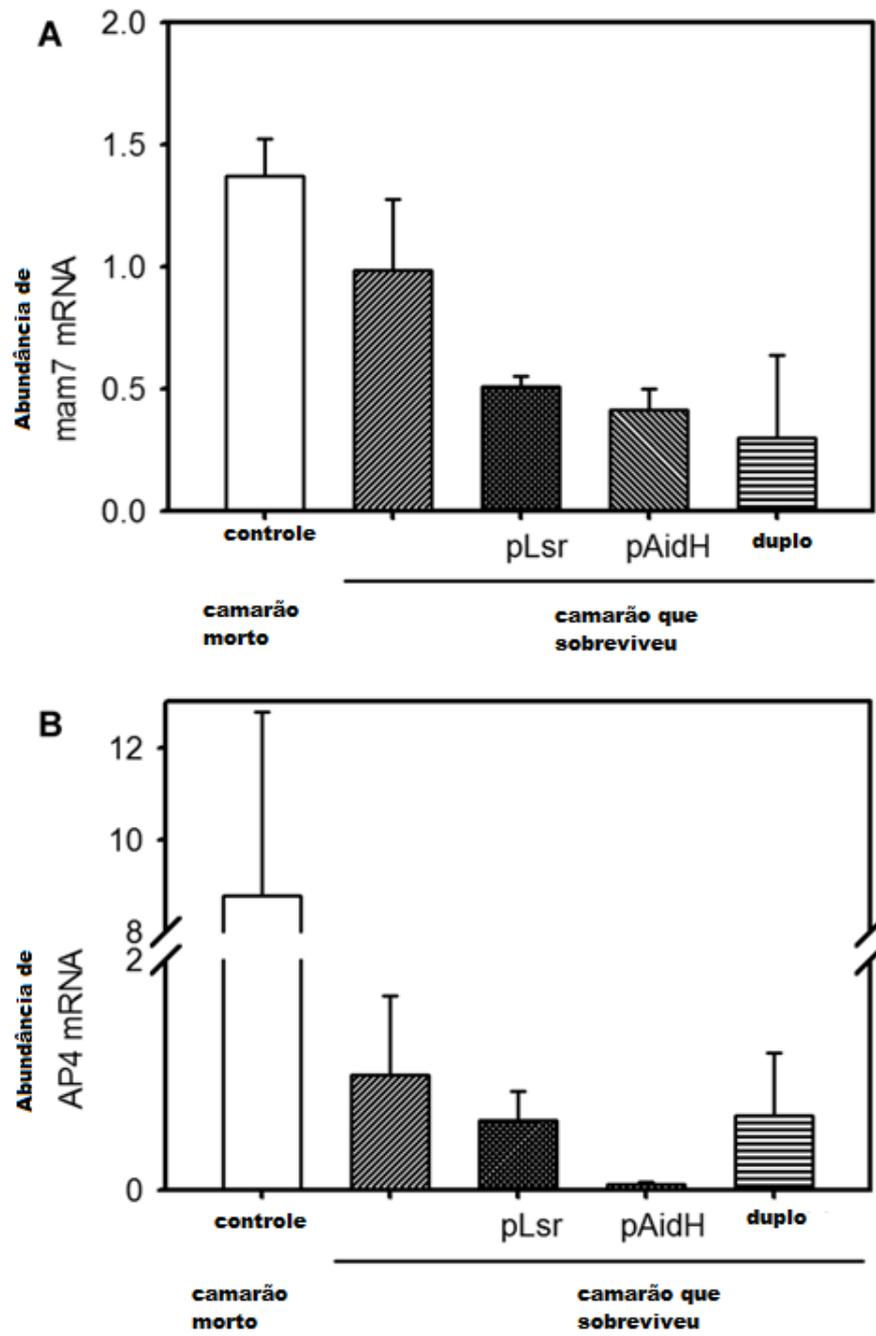


FIGURA 7

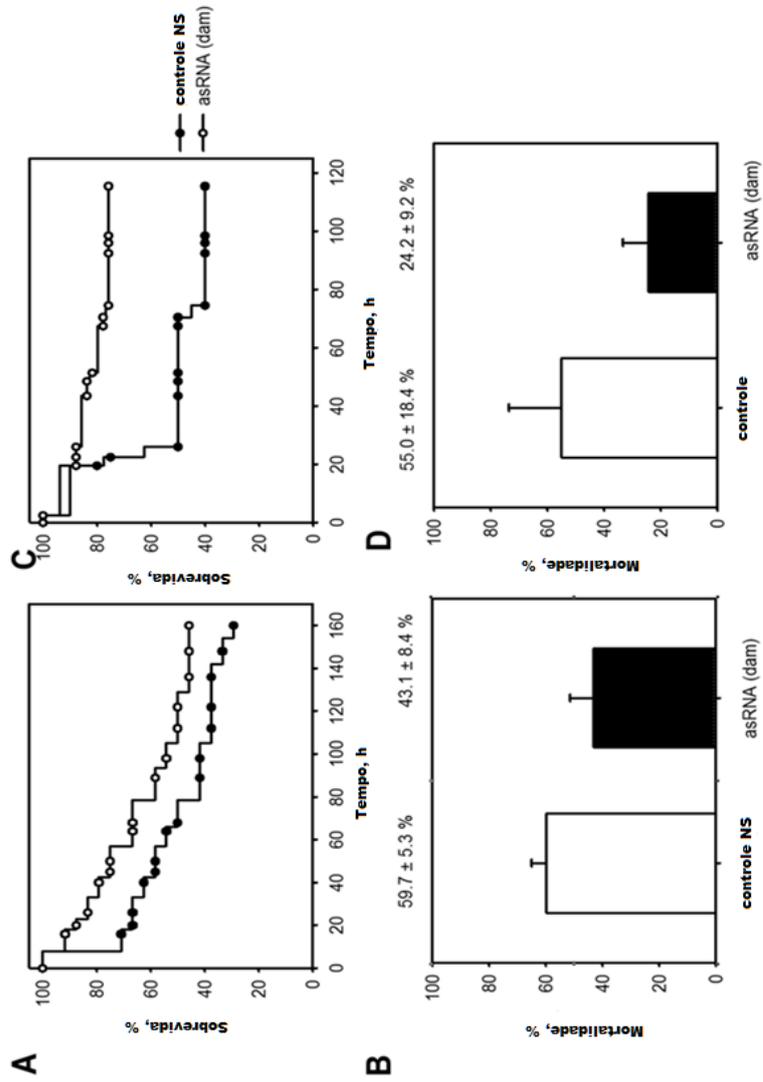


FIGURA 8

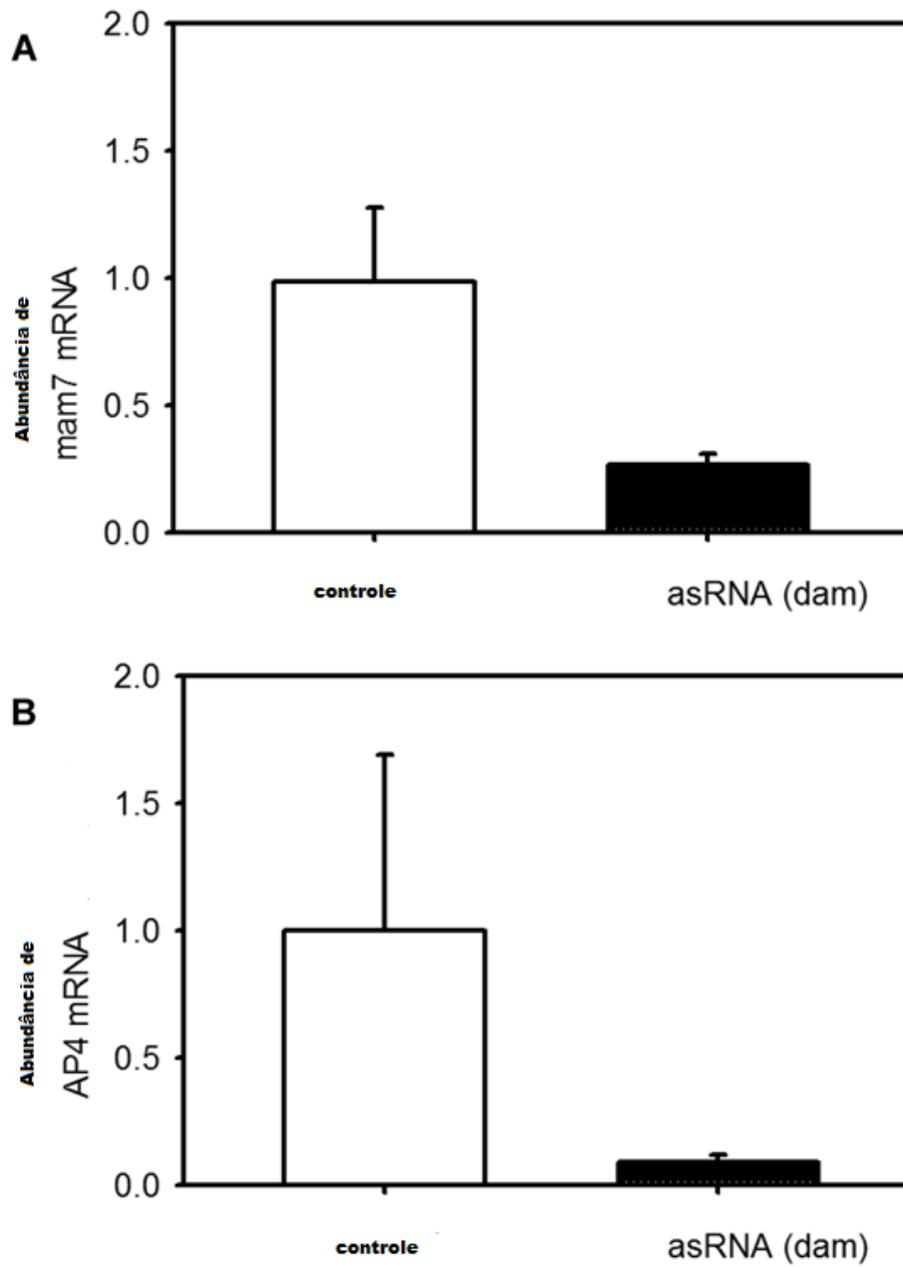


FIGURA 9

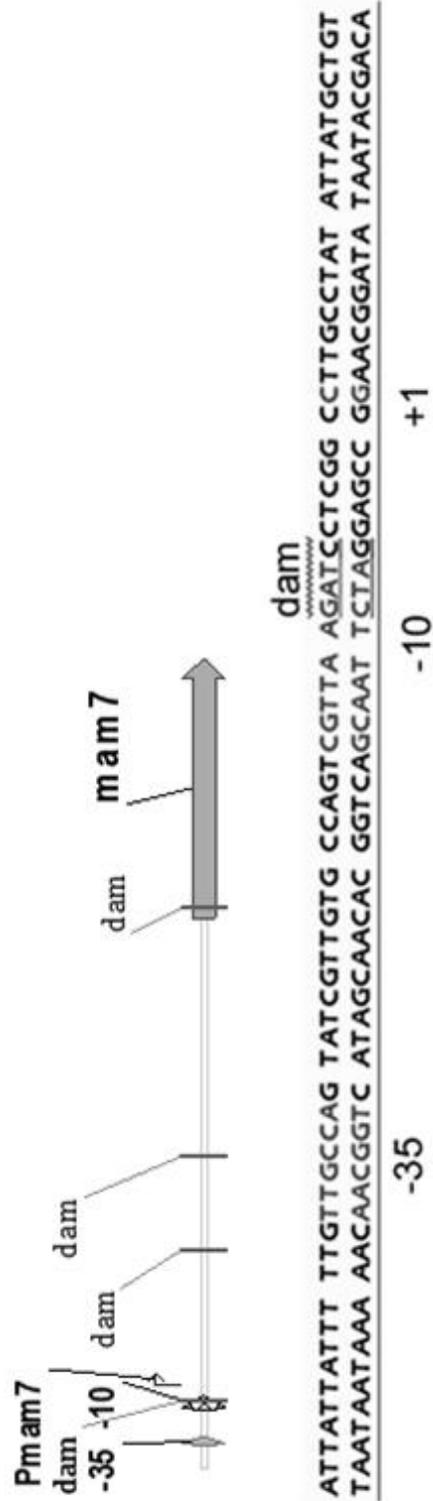


FIGURA 10

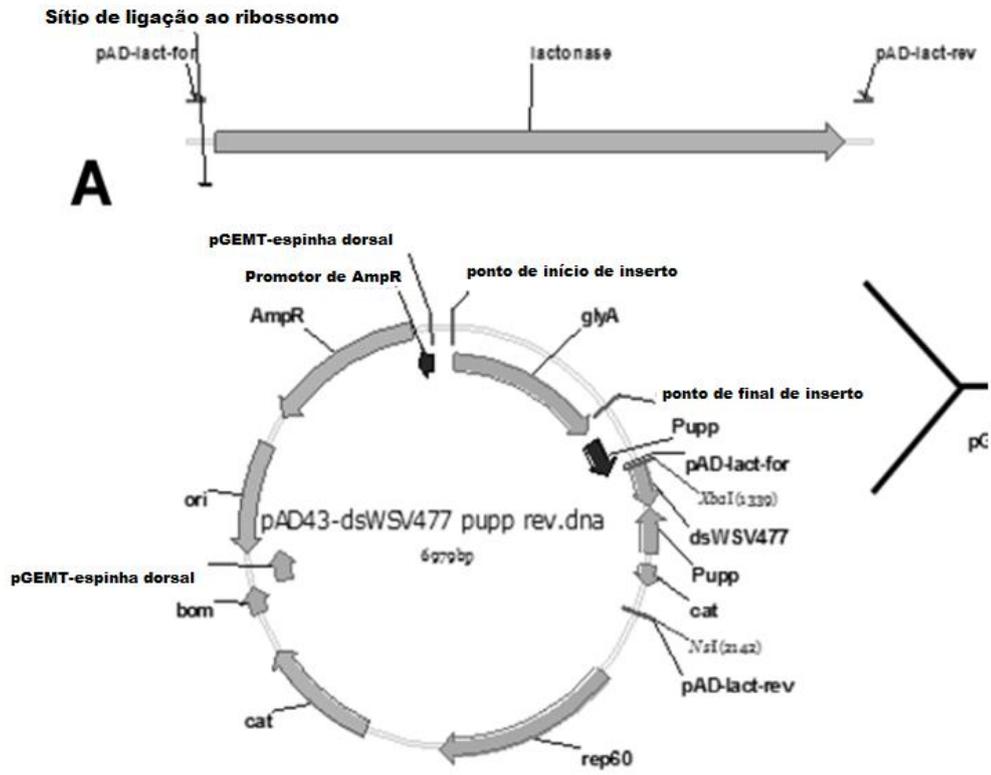


FIGURA 11A

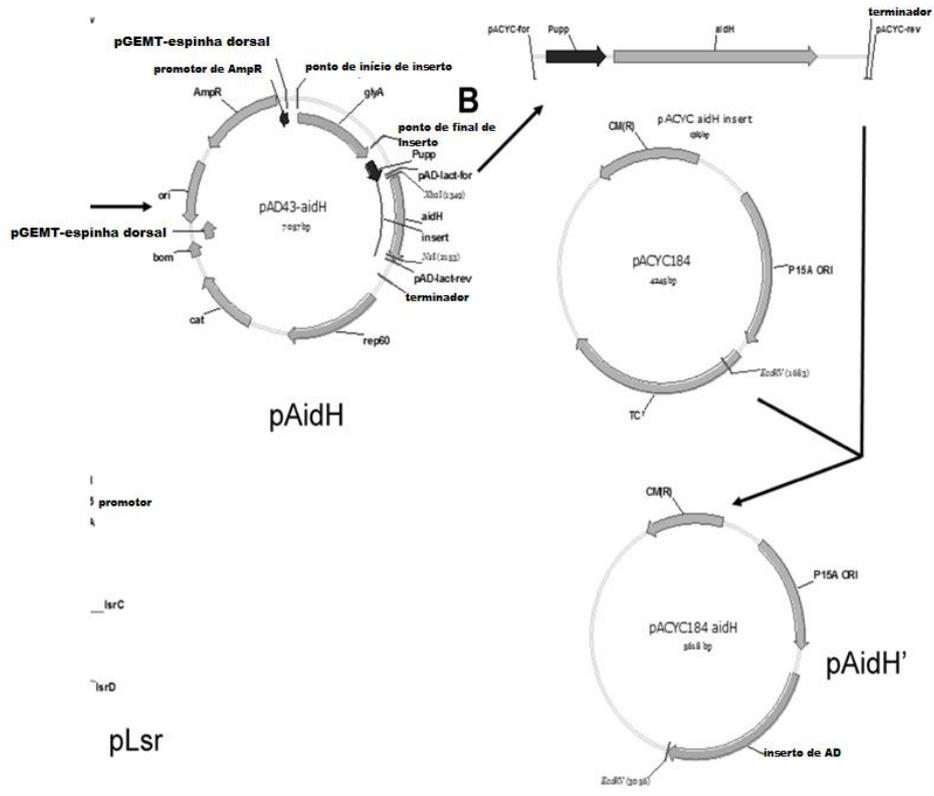
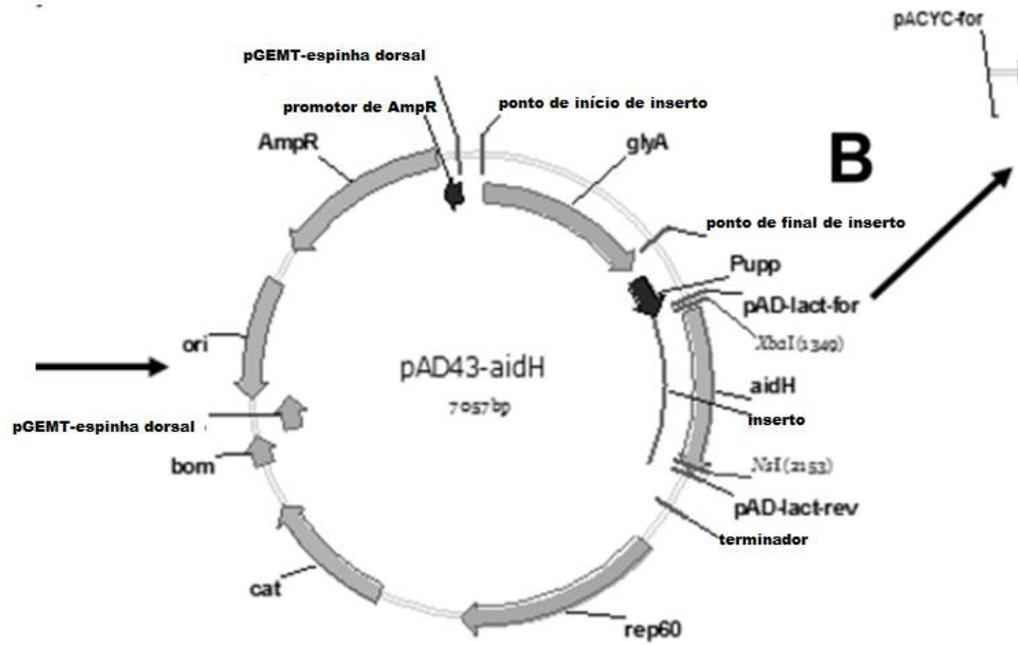


FIGURA 11B



pAidH

FIGURA 11-B-1

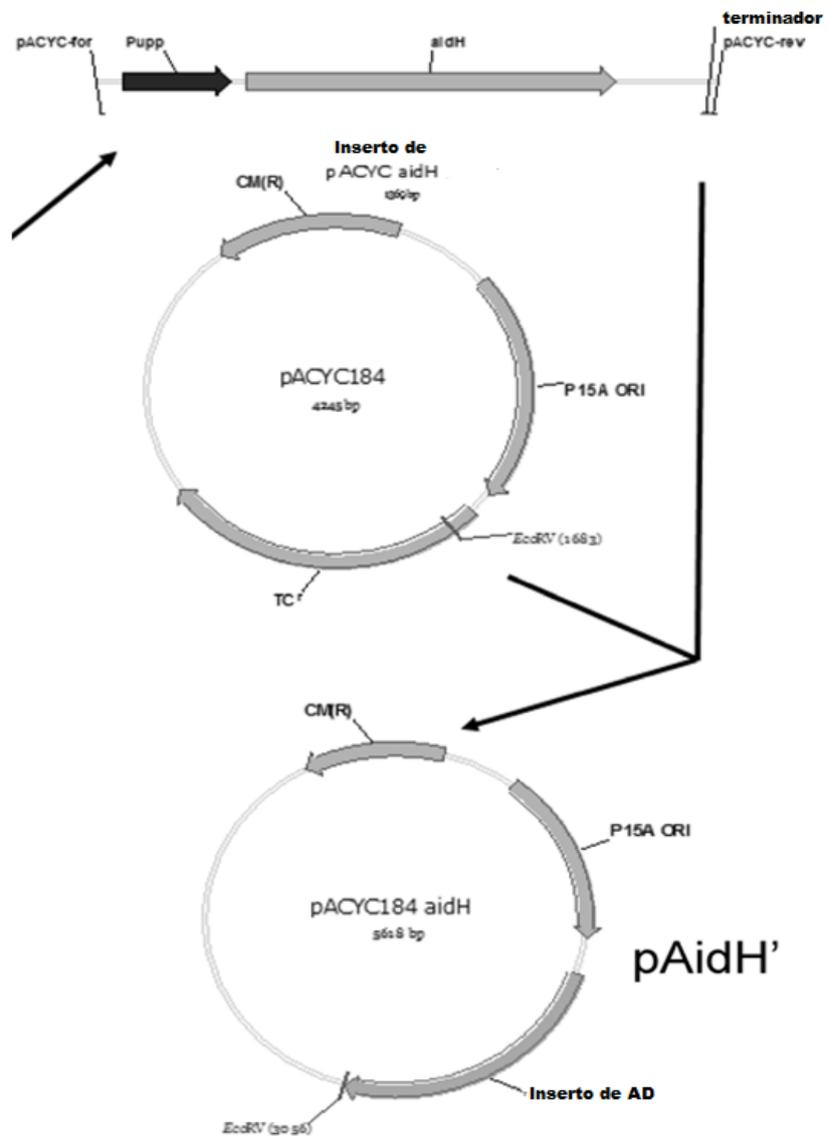


FIGURA 11-B-2

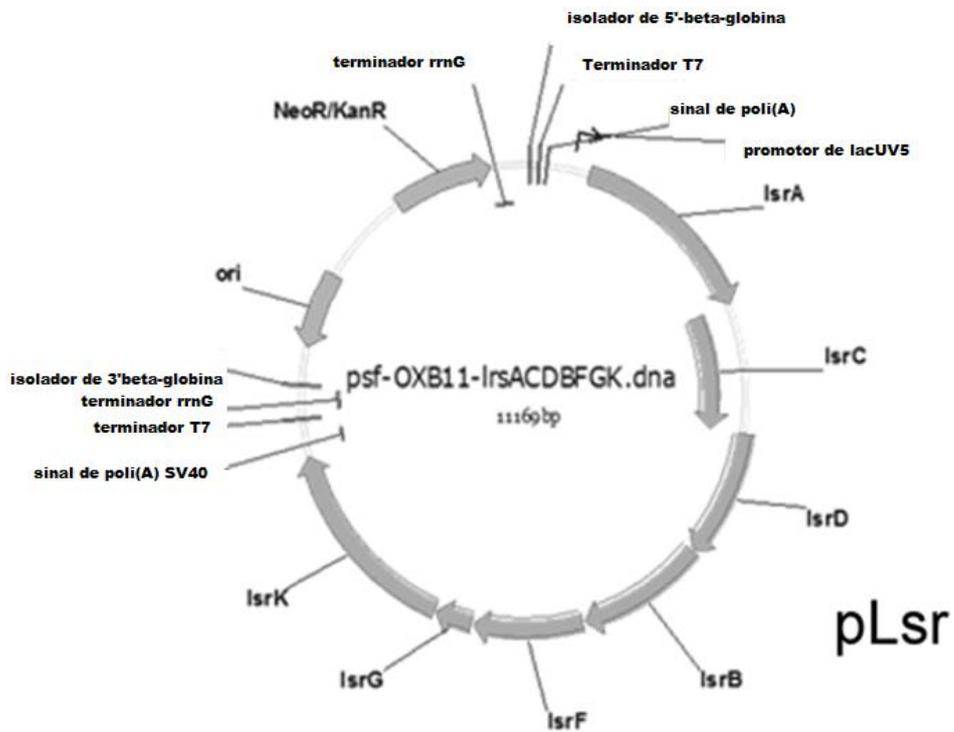


FIGURA 11C

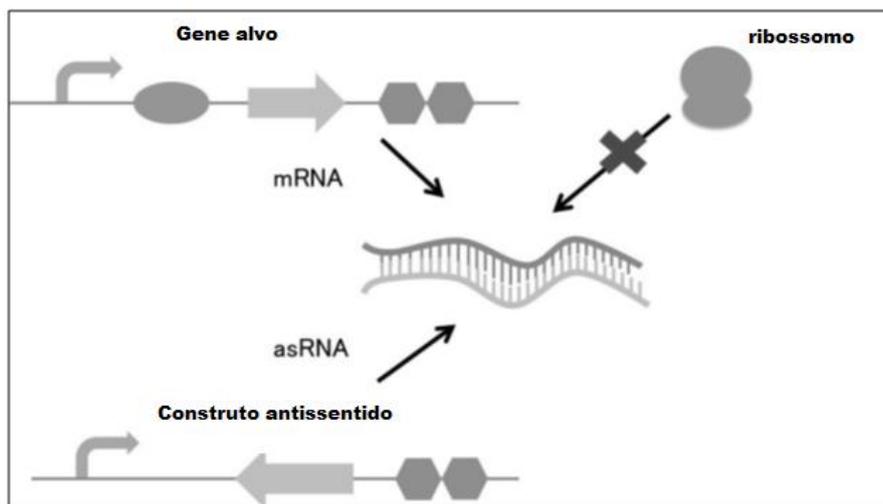


FIGURA 12

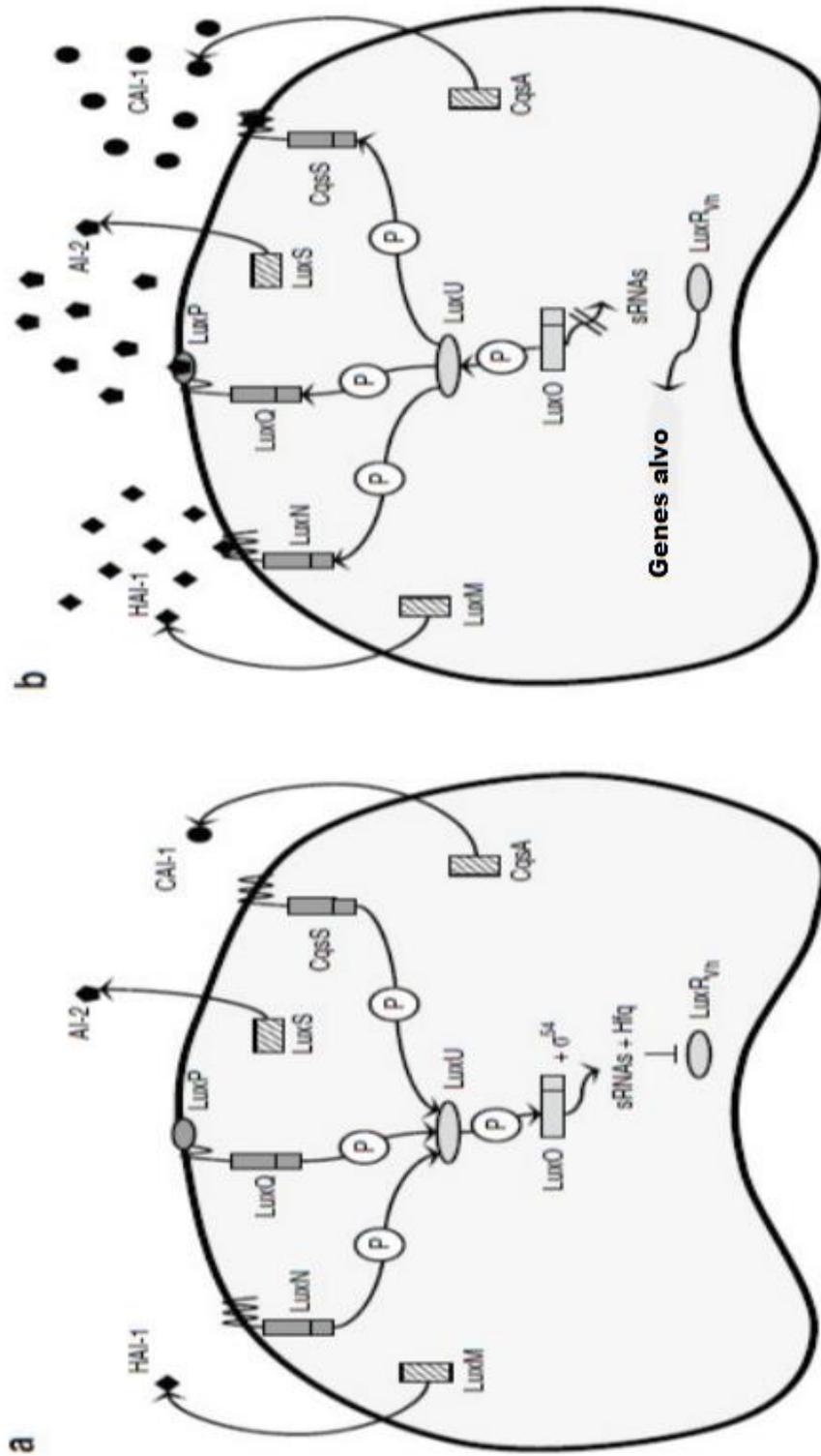


FIGURA 13

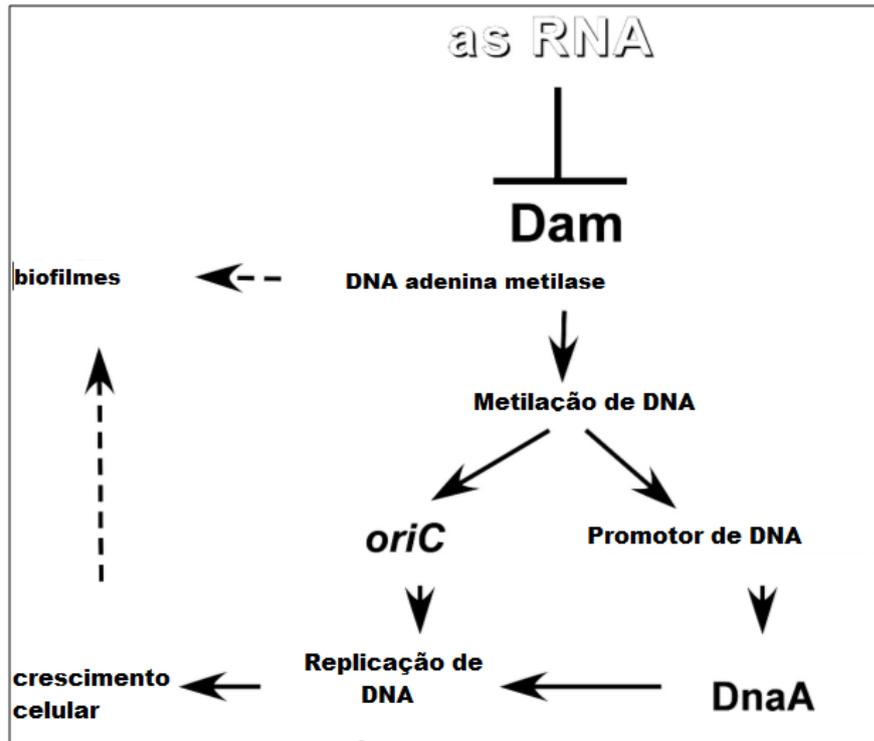


FIGURA 14

RESUMO

**SISTEMAS E MÉTODOS PARA O CONTROLE DE DOENÇA DE NECROSE
HEPATOPANCREÁTICA AGUDA**

Geralmente, a tecnologia inventiva se refere a novas estratégias para controle de doença em sistemas animais. Especificamente, a tecnologia inventiva se refere a novos métodos, sistemas e composições para o biocontrole de patógenos em sistemas aquáticos. Especificamente, a invenção pode compreender novas técnicas, sistemas e métodos para o biocontrole de patógenos transmissores de doenças que afetam camarão em sistemas de aquacultura.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 1_Listagem de Sequências.txt
- Data de Geração do Código: 02/04/2020
- Hora de Geração do Código: 13:18:38
- Código de Controle:
 - Campo 1: B3704460E77EEAFC
 - Campo 2: 85CD7F687A856796