

## SUPLEMENTO ALIMENTAR CONTENDO miRNAs PARA O AUMENTO DA TOLERÂNCIA DE PEIXES EM BAIXAS TEMPERATURAS

NYELSON DA SILVA NONATO<sup>1</sup>, AMANDA WEEGE DA SILVEIRA MARTINS<sup>2</sup>;  
LUCAS PETITEMBERTE DE SOUZA<sup>2</sup>; EDUARDO BIERHALS BLODORN<sup>2</sup>;  
WILLIAM BORGES DOMINGUES<sup>2</sup>; VINICIUS FARIAS CAMPOS<sup>3</sup>

*Universidade Federal de Pelotas: Laboratório de Genômica Estrutural –  
[nyelsonnonato@gmail.com](mailto:nyelsonnonato@gmail.com)*

*Universidade Federal de Pelotas: Laboratório de Genômica Estrutural –  
[amandaweege98@gmail.com](mailto:amandaweege98@gmail.com)*

*Universidade Federal de Pelotas: Laboratório de Genômica Estrutural –  
[lucasouza.contato@gmail.com](mailto:lucasouza.contato@gmail.com)*

*Universidade Federal de Pelotas: Laboratório de Genômica Estrutural –  
[edu.bblodorn@gmail.com](mailto:edu.bblodorn@gmail.com)*

*Universidade Federal de Pelotas: Laboratório de Genômica Estrutural –  
[williamwwe@yahoo.com.br](mailto:williamwwe@yahoo.com.br)*

*Universidade Federal de Pelotas: Laboratório de Genômica Estrutural –  
[fariascampos@gmail.com](mailto:fariascampos@gmail.com)*

### 1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é uma das atividades mais antigas e importantes, sendo a produção de organismos aquáticos documentada desde o tempo imperial chinês, gerando proteína (animal, alga) para consumo alimentar, além de outros produtos de valor agregado, como substâncias emulsificantes e couro. Com o aumento das demandas de proteína animal para consumo, o cultivo de peixes foi sendo modernizado e ampliado, além do cultivo em tanques de terra, a utilização de tanques-rede demonstraram redução da oferta de ração sem afetar a produção do pescado. Segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization*) a aquicultura é responsável por 52% do pescado consumido, demonstrando assim a importância deste segmento na alimentação humana (VALENTI et al., 2021). Observando os dados dos últimos três anos (2020, 2021 e 2022), podemos constatar o importante crescimento da piscicultura brasileira, sendo em 2019 produzido um total de 799.560 toneladas de peixe (↑4,9%), em 2020 cerca de 802.930 toneladas (↑5.93%) e em 2021 atingiu 841.005 toneladas, com receita de cerca de R\$8 bi e crescimento de 4,7% (Panorama da Aquicultura, 2023).

Fatores ambientais como salinidade e temperatura, ligadas aos períodos sazonais de cada região, são atualmente os grandes limitantes da piscicultura, principalmente de espécies que estão fora de sua faixa de tolerância ideal. Os animais ficam mais susceptíveis a infecções microbianas, enfraquecimento do sistema imunológico e pressão homeostática, levando ao aumento da mortalidade.

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é considerada um animal pecilotérmico, oriundo de regiões tropicais e subtropicais de águas quentes (26°C e 28°C) e sua reprodução está diretamente ligada à temperatura (±24°C). Quando abaixo de 20°C, o animal passa a um estágio de estresse, já demonstrando redução da movimentação e de hábitos alimentares e indo à óbito em temperaturas entre 11 e 17°C, acarretando maiores custos e perdas de produção em períodos mais frios (inverno), em regiões mais distantes da linha do equador (REBOUÇAS et al. 2020). Após o cultivo de tilápias em diferentes períodos (verão/inverno), foi observado uma redução de ±20% no peso médio dos animais durante o inverno, enquanto os peixes cultivados no verão apresentam melhores desempenhos (média de 460,40 g).

Tratando-se de adaptações sazonais em regiões subtropicais, o inverno (baixa da temperatura) é responsável por grandes perdas econômicas na região sul do Brasil, assim como em países que apresentam um inverno mais rigoroso, regiões de clima temperado e subtropical, logo, é de grande importância a utilização e desenvolvimento de técnicas e produtos eficazes na adaptação e manutenção da produtividade de organismos oriundos da aquicultura em períodos frios.

A qualidade da alimentação fornecida é significativamente importante no cultivo de qualquer organismo, favorecendo a manutenção do seu desenvolvimento (crescimento, reprodução), e reduzindo efeitos metabólicos indesejáveis e infecções. A alimentação é responsável por grande parte dos gastos da produção em aquicultura, sendo fornecida em quantidades e concentrações pré-estabelecidas, em tilápias foi observado que a proporção ideal de carboidratos e os lipídios na dieta de 1,95 é adequada, favorecendo o crescimento e à saúde do animal (XIE et al., 2017).

Além dos contribuintes oriundos da alimentação, os processos fisiológicos e metabólicos podem ser controlados por mecanismos endógenos, categorizados como mecanismos epigenéticos, dentre os quais, destacam-se os microRNAs (miRNAs), que são moléculas de ácido ribonucleico (RNA) medindo 18-22 nucleotídeos não codificantes com atividade de regulação pós-transcricional da expressão gênica (CAMPOS et al., 2011). Por seu caráter modulador de fenótipos fisiológicos e natureza pleiotrópica, essas moléculas estão sendo estudadas para diferentes aplicações e dentre diferentes espécies e reinos (YU et al., 2021).

Levando em consideração os impactos causados durante o inverno na produção de *O. niloticus* no Sul e Sudeste do Brasil, junto da possibilidade da utilização de bactérias recombinantes que expressam miRNAs, o presente trabalho teve como objetivo o desenho e confecção de uma construção de DNA sintético recombinante contendo sequência suficiente e necessária para a síntese de miRNAs artificiais, seguido da transformação de cepa procariota, e desenvolvimento de um suplemento alimentar contendo a biomassa do procarioto para o aumento da tolerância de peixes a baixas temperaturas.

## 2. METODOLOGIA

Esta metodologia foi concebida e submetida a um processo de patenteamento junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI).

Antes de prosseguir com o processo de patenteamento, conduzimos uma pesquisa de prioridade em várias bases de patentes, incluindo o INPI, Google Patents, USPTO, WIPO, Espacenet e Portal Capes.

Para o desenvolvimento do suplemento alimentar contendo miRNAs artificiais expressos por procariotos recombinantes, realizou-se inicialmente a prospecção de miRNAs relacionados ao frio na literatura (*in silico*), após escolha e filtragem dos miRNAs de interesse, utilizando linguagem Python e o programa “vscode” foi avaliado a probabilidade de ligação nos mRNA alvos. Tendo essas informações, seguiu-se com o desenho dos miRNAs artificiais no programa “AmirRNA”, algumas informações foram necessárias para a máquina poder realizar o designer da molécula. Primeiro foi realizado a identificação dos genes que miRNA artificiais interagem pelo “Ensembl”, assim como a sequência dos mRNAs extraída do NCBI. Após a inserção das informações pertinentes o programa gerou os novos miRNA sintéticos. A molécula de DNA recombinante foi desenhada através do programa “UGENE”, sendo a estrutura composta por sítios de enzimas de restrição e a sequência nucleotídica dos miRNAs artificiais.

O método inclui o desenho e confecção de uma construção de DNA sintético recombinante contendo sequência suficiente e necessária para a síntese das moléculas maduras, seguido da transformação de cepa procariota para produção em pequena, média ou larga escala dos miRNA artificiais de interesses. Após a inativação térmica da biomassa microbiana, é realizado o processo de mistura da ração com um adesivo graxo para peixes, finalizando o processo com a secagem do material, para posterior armazenamento adequado, comercialização e utilização na piscicultura.

A notificação de invenção e o documento da patente de invenção foram submetidas ao Escritório de Propriedade Intelectual, Transferência de Tecnologia e Empreendedorismo da UFPEL, a qual posteriormente realizou a confirmação do depósito sob o número de protocolo BR1020230121683, junto ao INPI.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a elaboração, a etapa de busca nos bancos de patentes, diversas patentes foram encontradas com termos de buscas distintos utilizados (Quadro 1). Entretanto, constatou-se que os resultados encontrados se diferem da presente invenção, pois apresentam sequências maduras do miRNA-34 inseridas no vetor comercial LITMUS 38i, além dos miRNAs expressos em *Escherichia coli* serem aplicados para diferentes contextos.

Foi possível desenhar um painel contendo 20 sequências de DNA sintético recombinante, cada uma envolvendo a modulação de uma determinada via metabólica. Logo, o conjunto de sequências recombinantes, possibilitou o depósito de uma patente de invenção baseada no desenho dos miRNA artificiais, clonagem e expressão em *E. coli*, assim como os métodos de confecção da ração. A aplicação de um suplemento alimentar contendo miRNAs artificiais caracteriza-se por apresentar uma solução biotecnológica frente a problemática da produção de peixes em períodos e regiões geográficas de baixa temperatura, diferenciando-se de outros métodos por ser de administração oral e sazonal, característica que corrobora sua produção e aplicação comercial.

O resultado da produção da patente BR1020230121683 teve o intuito de proteger os métodos propostos e a possibilidade de transferência da tecnologia a empresas no ramo da biotecnologia e até instituições internacionais.

Termos de buscas		Resultados da busca					
		INPI	WIPO	USPTO	Google Patents	Espacenet	Portal Capes
1 termo	Suplemento alimentar	146	342	152.712	14.691	230.917	1.273
	Ração	912	21.306	148.247	24.026	301.542	20.549
	miRNA	24	1.286	45.781	248.248	38.868	152.227
	Expressão Heteróloga	32	6.280	200.845	7.645	147.726	33
2 termos	Suplemento alimentar; miRNA	0	119	4.896	206	2.456	0
	Ração; peixe	6	2.282	10.221	2.311	10.624	788
	miRNA; Frio	0	116	26.908	8.153	17.926	4
	Expressão Heteróloga; miRNA	0	183	16.177	807	10.880	0
3 termos	Suplemento alimentar; miRNA; E. coli	0	92	65	146	1.342	0
	Ração; peixe; miRNA	0	16	530	61	292	0
	miRNA; Frio; Tilápia	0	0	0	7	106	0

Expressão Heteróloga; miRNA; E. coli	0	140	33	469	5.878	0
---	---	-----	----	-----	-------	---

Quadro 1. Número de documentos encontrados na busca de anterioridade.

#### 4. CONCLUSÕES

A invenção possui aplicação clara para aumento da tolerância ao frio, sendo utilizado na composição de suplemento alimentar miRNAs-específico para modulação da fisiologia do animal frente aos estresses, assim como nos métodos e todas as etapas de produção do suplemento, contendo tempo de secagem, mistura e concentração de células biorreatores. Dessa forma, aponta-se para as sequências de DNA recombinante e a produção do suplemento alimentar como um processo de caráter inovativo com potencial de transferência desta biotecnologia para agências, órgãos, entidades e empresas que cultivam peixes em regiões de frio intenso sazonal.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMPOS, V. F. et al. MicroRNAs e seu papel no desenvolvimento embrionário. **Ciência Rural**, v. 41, p. 85-93, 2011.

CUI, Y.; WAN, H.; ZHANG, X. miRNA in food simultaneously controls animal viral disease and human tumorigenesis. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, 23, 995-1006. 2021.

VALENTI, W. C. et al. Aquicultura no Brasil: passado, presente e futuro. **Aquaculture Reports**, v. 19, p. 100611, 2021.

Panorama da Aquicultura. **Peixe BR lançou seu sétimo Anuário com dados da produção de 2022**. Rio de Janeiro, 27 fev. 2023. Acessado em 15 ago. 2023. Online. Disponível em: <<https://panoramadaaquicultura.com.br/peixe-br-lancou-seu-setimo-anuario-com-dados-da-producao-de-2022/>>

REBOUÇAS, P. M. et al. Influence of thermal oscillation on pisciculture water. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology**, v. 2, n. 2, p. 35-42, 2020.

YU, Y. et al. MicroRNAs: The novel mediators for nutrient-modulating biological functions. **Trends in Food Science & Technology**, 2021.

XIE, D. et al. Effects of dietary carbohydrate and lipid levels on growth and hepatic lipid deposition of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 479, p. 696-703, 2017.