

Microbiologia

DESVENDANDO O VIROMA GLOBAL DE ABELHAS UTILIZANDO UMA ABORDAGEM BASEADA EM PEQUENOS RNAS

Juliana Nicolas Armache¹

João Paulo Pereira de Almeida¹

João Trindade Marques^{1,2}

Eric Guimarães Rocha Aguiar³

1. Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Laboratório de RNAi, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte/MG, Brasil

2. Instituto de Biologia Molecular e Celular, UPR9022/CNRS, U1257/INSERM, 67084 13 Estrasburgo, France.

3. Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Biotecnologia e Genética, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus/BA, Brasil

Resumo

O desaparecimento das abelhas, problema que tem sido reportado nos últimos anos, afeta diretamente a agricultura e a manutenção de diversidade de plantas, impactando também na economia mundial. Vários fatores estão ligados a esse problema, dentre eles a incidência de doenças nas colônias, causadas principalmente por vírus. Os vírus, por serem muito diversos e por necessitarem de condições muito específicas para se replicarem, apresentam inúmeros obstáculos metodológicos que prejudicam seu estudo. Desenvolvemos em nosso laboratório uma ferramenta computacional de identificação viral que parte da análise de dados de sequenciamento de pequenos RNAs, e que permite identificar não só vírus já conhecidos como também vírus inéditos na literatura. Com isso, analisamos 24 bibliotecas de pequenos RNAs de abelhas originadas de diferentes países com o objetivo de identificar e caracterizar as sequências virais presentes nessas amostras, além de investigar a distribuição global dos vírus encontrados.

Palavras-chave: Vírus; Metagenômica; Imunologia

Apoio financeiro: UFMG; FAPEMIG; CNPq; CAPES

Trabalho selecionado para a JNIC: Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Introdução

As atividades humanas desestabilizam cada vez mais os ecossistemas do planeta, causando danos incalculáveis e, muitas vezes, irreparáveis na biodiversidade. No campo da florística, as consequências disso já são observadas a nível global, gerando uma perda significativa de plantas nativas e impactando na agricultura. Um dos fatores que contribui para este cenário é a diminuição do número de agentes polinizadores circulantes, principalmente insetos, devido ao uso crescente de pesticidas. Entre os insetos, as abelhas são consideradas as principais polinizadoras, pois possuem uma distribuição global e polinizam um amplo espectro de plantas. Além de serem sensíveis a pesticidas, elas também são suscetíveis a infecções virais, e tais fatores combinados levaram a uma diminuição de abelhas circulantes ao redor do planeta, problema que ficou conhecido como Distúrbio do Colapso das Colônias (DCC). Avaliar os vírus que circulam nas abelhas é essencial para o desenvolvimento de novas estratégias para controle e prevenção de infecções relacionadas ou potencialmente associadas ao DCC. Neste trabalho, utilizamos uma abordagem que consiste na análise de bibliotecas de pequenos RNAs de abelhas em busca de genomas virais. Essa estratégia, descrita primeiramente por OBBARD et al. (2009) e WU et al. (2010) e aplicada em outros organismos, parte do

princípio de que a principal via antiviral dos invertebrados é a via de RNA de interferência (PARO et al., 2015). Essa via é responsável por detectar sequências virais na célula hospedeira e degradá-los em fragmentos de 18 a 35 nucleotídeos, de forma que a replicação do vírus seja interrompida (AGUIAR et al., 2016). Em decorrência da atuação dessa via, a porção de pequenos RNAs encontrados nas células de invertebrados é naturalmente enriquecida para sequências virais, o que permite o uso desses dados para a montagem *in silico* de genomas virais. Em 2015, nosso grupo encontrou uma vantagem inédita no uso dessa estratégia que permite que espécies virais, até então desconhecidas, sejam detectadas por meio da análise do perfil de tamanho dos pequenos RNAs e da composição nucleotídica dos mesmos. Dessa forma, nosso objetivo nesse projeto foi avaliar a diversidade de vírus em bibliotecas de abelhas coletadas em várias regiões do mundo.

Metodologia

Sessenta bibliotecas de *Apis mellifera*, *Apis cerana* e *Bombus terrestris* foram obtidas do repositório Sequence Read Archive (SRA), do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Primeiro, foi feito um pré-processamento das bibliotecas utilizando o programa TrimGalore (KRUEGER, 2012) para a remoção de sequências de adaptadores e filtragem de leituras com baixa qualidade. Posteriormente, as leituras mapeadas aos genomas de referência das abelhas e de bactérias foram excluídas da análise. As leituras restantes, não mapeadas, foram submetidas a uma montagem *de novo* utilizando os montadores metaSPAdes (NURK et al., 2017) e Velvet (ZERBINO & BIRNEY, 2008). As sequências contíguas resultantes da montagem (*contigs*) foram caracterizadas por meio de uma análise de similaridade de sequências utilizando a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). Utilizando *scripts* próprios, os *contigs* montados foram caracterizados ainda com base na análise de distribuição de tamanho e de nucleotídeos de seus RNAs, de forma que fosse possível diferenciar os *contigs* derivados de Sequências Virais Endógenas (EVEs) daqueles derivados de vírus circulantes. Essa caracterização foi feita inclusive para os *contigs* que não apresentaram similaridade com nenhuma sequência depositada no NCBI. Os *contigs* que apresentaram assinatura de pequenos RNAs consistentes com pequenos RNAs interferentes (siRNAs) e que apresentaram janelas abertas de leitura contínuas (ORF) foram selecionados para análises posteriores para verificar a possibilidade destas sequências pertencerem a vírus ainda desconhecidos, como descrito por AGUIAR et al. (2016). Todas as análises computacionais foram feitas utilizando o servidor do Laboratório de RNA de interferência da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), coordenado pelo Professor João Trindade Marques.

Resultados e Discussão

As bibliotecas de pequenos RNAs de abelhas analisadas nesse estudo foram obtidas de diferentes tecidos e de espécies distintas, fatores que influenciaram no número de *contigs* montados em cada análise e no número de vírus encontrados para cada biblioteca. De forma geral, é possível inferir que o tipo de amostra sequenciada influencia na detecção viral, pois quanto mais abrangente for a amostra no quesito de sua composição tecidual, melhor para se estudar o viroma, pois facilita a detecção de vírus que possuem diferentes tropismos. Além disso, o número total de leituras e a procedência do RNA sequenciado também influencia, sendo que as amostras derivadas de mais de um indivíduo possuem uma maior amostragem dos vírus que estão infectando as abelhas de determinada região.

Das 60 bibliotecas analisadas, 40 delas apresentaram *contigs* virais cuja presença não havia sido reportada pelos nos estudos de origem das bibliotecas. Além disso, a maioria destes *contigs* apresentou o perfil de pequenos RNAs condizente com a classe dos siRNAs, o que evidencia que estes vírus estão se replicando nas abelhas e gerando nelas uma resposta imune. Em algumas das bibliotecas analisadas, foram encontrados também *contigs* montados que não apresentaram similaridade de sequência com vírus já conhecidos, mas cujo perfil de pequenos RNAs também indica a presença de siRNAs. Nesse caso, é possível inferir que tais sequências são oriundas de vírus novos, ou seja, vírus ainda ausentes ou sem indivíduos correlatos nos bancos de dados públicos.

A abordagem baseada na análise de bibliotecas de pequenos RNAs para detecção do viroma das três espécies de abelhas se mostrou eficaz pois foi capaz de identificar não só vírus que já eram descritos e vírus que eram esperados (presentes nas colônias devido à infecção artificial), como também vírus não esperados e/ou não caracterizados, como é o caso dos *Hubei partiti-like virus 34* e *51*, que foram preditos por SHI e seus colaboradores (2016) e encontrados em bibliotecas de *A. mellifera* coletadas na China e no Reino Unido. Em grande parte das bibliotecas analisadas, foi encontrada mais de uma espécie viral infectando as abelhas, o que pode significar a ocorrência de coinfeções virais nesses insetos. Os resultados obtidos aqui permitiram também uma avaliação da distribuição global dos vírus encontrados e uma análise da circulação desses vírus entre as três espécies de abelhas analisadas.

Conclusões

Nesse estudo analisamos 60 bibliotecas públicas de pequenos RNAs de *A. mellifera*, *A. cerana* e *B. terrestris*, cujas amostras foram obtidas de diferentes partes do mundo. Como esperado, foram detectados vírus que haviam sido inseridos artificialmente, como é o caso do *Deformed Wing virus* (DWV). Vírus já conhecidos cuja presença não era esperada nas bibliotecas de utilizadas também foram identificados. Adicionalmente, foram encontrados outros vírus ainda não caracterizados, como é o caso dos *Hubei partiti-like virus 34* e *51*. Com a análise dos perfis de pequenos RNAs dos *contigs* montados e detecção da assinatura de siRNAs foi possível identificar sequências que poderiam pertencer a novos vírus capazes de infectar abelhas, mas que não apresentaram similaridade com sequências já depositados no NCBI, sendo essa uma das maiores vantagens dessa estratégia. Nosso estudo mostra que o emprego da análise de viroma baseada em pequenos RNAs foi sensível à detecção de vírus já conhecidos e potenciais vírus novos. Estudar o viroma de abelhas é importante, para o estabelecimento de bases mais sólidas para a compreensão das causas do DCC associadas a infecções virais e impulsiona a busca por novas estratégias capazes de amenizar os impactos desse problema.

Referências bibliográficas

OBBARD, Darren J.; GORDON, Karl H.J.; BUCK, Amy H.; *et al.* The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1513, p. 99–115, 2009.

WU, Qingfa; LUO, Yingjun; LU, Rui; *et al.* Virus discovery by deep sequencing and assembly of virus-derived small silencing RNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 4, p. 1606–1611, 2010.

PARO, Simona; IMLER, Jean-Luc; MEIGNIN, Carine. Sensing viral RNAs by Dicer/RIG-I like ATPases across species. **Current opinion in immunology**, v. 0, p. 106–113, 2015.

AGUIAR, Eric Roberto Guimarães Rocha; OLMO, Roenick Proveti; MARQUES, João Trindade. Virus-derived small RNAs: molecular footprints of host–pathogen interactions. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 7, n. 6, p. 824–837, 2016.

KRUEGER, Felix. (2012) A wrapper tool around Cutadapt and FastQC to consistently apply quality and adapter trimming to FastQ files, with some extra functionality for MspI-digested RRBS-type (Reduced Representation Bisulfite-Seq) libraries. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/>. Acesso em: 29 out. 2019.

NURK, Sergey; MELESHKO, Dmitry; KOROBAYNIKOV, Anton; *et al.* metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. **Genome Research**, v. 27, n. 5, p. 824–834, 2017.

ZERBINO, Daniel R.; BIRNEY, Ewan. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, v. 18, n. 5, p. 821–829, 2008.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.

SHI, Mang; LIN, Xian-Dan; TIAN, Jun-Hua; *et al.* Redefining the invertebrate RNA virosphere. **Nature**, v. 540, n. 7634, p. 539–543, 2016.