

"AGENTE DO ÁCIDO NUCLEICO
ISOLADO, CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, ÁCIDO NUCLEICO
ISOLADO, COMPOSIÇÃO INGERÍVEL PELAS ABELHAS, E MÉTODO PARA
REDUZIR A SUSCEPTIBILIDADE DE UMA ABELHA À INFECÇÃO POR
5 NOSEMA"

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção está relacionada a
composições e métodos para reduzir a susceptibilidade à
infecção por *Nosema* spp em abelhas e, mais
10 particularmente, ao uso de uma composição para
redução da expressão do gene mitossoma da *Nosema*
para prevenção e tratamento da *Nosema* spp em abelhas
melíferas.

HISTÓRICO

15 A importância das abelhas
melíferas e outros insetos polinizantes para a economia
global ultrapassa em longe sua contribuição em termos de
produção de mel. O Departamento de Agricultura dos Estados
Unidos (USDA) estima que um terço do que consumimos em nossa
20 dieta depende de uma abelha melífera polinizar aquele
alimento. A contribuição total da polinização em termos de
valor agregado às safras de frutas excede \$15 bilhões por
ano, com consequência potencial direta de \$75 bilhões de
dólares.

25 *Microsporidia* são fungos
basais e parasitas intracelulares obrigatórios de outros
eucariotas caracterizados pela extrema redução genômica e
celular. Duas espécies descritas de *microsporidia*, *Nosema apis* e

Nosema ceranae, causam uma doença disseminada e destrutiva em abelhas adultas. A Nosema está disseminada no mundo e tem sido observado que a patogenia da nosemose, juntamente com sua elevada carga viral, são os melhores previsores de colônias fracas e em colapso. Na Europa, a síndrome do desaparecimento de colônias tem sido diretamente atribuída à Nosema ceranae, e o risco de despovoamento da colônia é seis vezes mais alto em colônias infectadas pela N. ceranae do que nas não-infectadas. Recentemente, foi demonstrado que a infecção natural por Nosema ceranae pode causar o súbito colapso das colônias de abelhas.

A transmissão da Nosema nas colônias é principalmente através da rota fecal-oral na qual os patógenos são disseminados pelas hospedeiras doentes para hospedeiras não-infectadas através da ingestão de esporos nucleados de Nosema do material fecal das abelhas infectadas. Os esporos geminam dentro do intestino médio e liberam tubos polares que transferem seu esporoplasma para as células epiteliais do intestino médio. Dentro da célula, o esporoplasma cresce formando um plasmódio multinucleado, ou "meronte", replicando para gerar mais esporos, geralmente chegando a milhões por abelha infectada.

Protocolo Anti-Nosema Atual: Fumagilina

A Fumagilina é um antibiótico derivado do fungo *Aspergillus fumigates*. É um agente antiangiogênico que liga e inibe de maneira covalente e seletiva, a metionina aminopeptidase, MetAP-2 e vem sendo utilizado há muitos anos para tratar microsporidiose causada

pelo Nosema em abelhas melíferas. A substância é amplamente utilizada nos Estados Unidos onde apicultores banham as colmeias em uma solução de sacarose contendo Fumagilina. Contudo, a Fumagilina não mata os esporos de Nosema e sua
5 potência deteriora rapidamente após a aplicação, resultando em um efeito anti-Nosema apenas parcial e temporário, pois surgem constantemente novas abelhas na colônia e é necessário realizar a reaplicação várias vezes ao ano. Na verdade, as diferenças entre as colônias tratadas e não
10 tratadas desaparecem vários meses após o tratamento, com várias etiologias diferentes.

- a) Colônias infectadas por Nosema naturalmente se recuperam durante o verão
- b) a fumagilina perde sua eficácia ou
- 15 c) a fumagilina se esgota dos depósitos de mel da colônia

Em humanos, a Fumagilina foi utilizada há mais de 40 anos para o tratamento de amebíase intestinal e é eficiente quando usada topicamente. Contudo, um estudo recente demonstrou que a Fumagilina provocou
20 sérios efeitos colaterais tóxicos (neutropenia e trombocitopenia) em pacientes que foram tratados para microsporidose causada por *Enterocytozoon bieneusi*.

Deve-se considerar a possibilidade de que o Nosema, multiplicando-se aos milhões
25 no intestino de cada abelha, eventualmente desenvolverá resistência à Fumagilina, como provou a experiência com outros antibióticos que foram aplicados de modo abundante. Assim sendo, uma possível resistência do Nosema à Fumagilina

faz com que muitos apicultores ao redor do mundo fiquem compreensivelmente preocupados com seu uso disseminado para prevenção da infecção por Nosema. Devido a estas e outras preocupações, o uso da Fumagilina para tratar Nosema em abelhas já foi proibido na Europa.

Nosema e a Genética dos Microsporídios

Foram publicados até hoje os genomas de vários microsporídios, incluindo o *Encephalitozoon cuniculi* (*E. cuniculi*) humano. A análise da sequência do *E. cuniculi* revelou um genoma muito pequeno e compacto de 2,9-megabase, compreendendo quase 2000 genes. Devido à sua extrema redução, o genoma do *E. cuniculi* não tem a maior parte dos íntrons e espaçadores intergênicos geralmente encontrados nos genomas eucarióticos. A maioria dos genes também é mais curta do que seus homólogos correspondentes. Além disso, uma análise em profundidade dos genes previstos demonstrou ausência de genes de algumas rotas biossintéticas e metabólicas, enquanto outras rotas incluíam um número relativamente limitado de genes. Estudos recentes usando informações de sequenciamento revelaram alguns detalhes da evolução e metabolismo dos microsporídios, tais como homólogos de transportador ADP/ATP bacteriano, supostamente importantes no metabolismo de energia do *E. cuniculi*.

25 Sendo um parasita obrigatório, o *E. cuniculi*, e microsporídios em geral, dependem do hospedeiro para prover suas necessidades energéticas e metabólicas. As rotas de compensação e suas funções ainda

são pouco compreendidas.

Durante muitos anos, os microsporídios foram considerados como não tendo mitocôndria e, conseqüentemente, sugerindo que tenham evoluído antes do aparecimento da mitocôndria eucariótica. O *Nosema* não possui a cadeia de transporte de elétrons e o ciclo de Krebs, contudo, recentemente foi identificada uma organela altamente reduzida, extremamente reduzida tanto em tamanho como em complexidade bioquímica, chamada mitossoma, uma provável relíquia de uma mitocôndria primitiva. Até hoje, apenas 20 proteínas mitossômicas foram identificadas, diferente da mitocôndria do levedo que contém cerca de 1000 proteínas.

Recentemente, foi publicado um esboço da sequência do genoma do *Nosema ceranae*, possibilitando maior análise das homologias proteicas e revelando uma homologia significativa, embora de diversidade distinta do genoma do *E. cuniculi* e apenas alguns genes ortólogos aos do *S. cerevisiae*.

Organismos simbióticos intracelulares usam proteínas da família de transportador mitocondrial (MCF) a fim de adquirir várias substâncias, incluindo ATP, da célula do hospedeiro, para prover energia para o transporte de proteína e outras atividades mitossômicas necessárias. Contudo, como os genomas de microsporídios aparentemente perderam todos os genes das proteínas MCF, não se sabe como o mitossoma do parasita adquire o ATP necessário para sua função. Vários parasitas

intracelulares bacterianos, tais como Rickettsia, possuem um transportador de nucleotídeo que é utilizado para importar ATP da sua célula hospedeira eucariótica. Homólogos desses genes foram identificados no genoma do E. cuniculi, contudo, o uso desses transportadores de nucleotídeo tipo bacteriano para adquirir ATP de uma célula eucariótica é desconhecido em um parasita eucariótico. Não existem homólogos dessas proteínas em espécies vertebradas ou invertebradas sequenciadas até hoje.

10 Silenciamento Gênico em Invertebrados

O processo de silenciamento gênico pós-transcricional é mais provavelmente um mecanismo de defesa celular utilizado para evitar a expressão de genes estrangeiros, que se acredita serem partilhados nos reinos.

15 A presença de dsRNAs longos nas células estimula a atividade de uma enzima de ribonuclease III chamada Dicer, que está envolvida no processamento de dsRNA em pedaços curtos conhecidos como RNAs interferentes curtos (siRNAs). Estes geralmente têm um comprimento de cerca de 21 até cerca de 23
20 nucleotídeos e compreendem cerca de 19 duplos de pares básicos. A resposta de RNAi também inclui um complexo de endonuclease, geralmente chamado de complexo silenciador induzido por RNA (RISC), que intermedia a clivagem de RNA de cadeia simples que possui complementaridade de sequência com
25 a cadeia antissenso do duplex siRNA. Em alguns organismos, um estágio de amplificação pode seguir o estágio de iniciação de silenciamento gênico, envolvendo uma Polimerase de RNA dependente de RNA (RdRP), que pode subsequentemente

levar à degradação de RNAs fora da região de homologia de dsRNA inicial. Foi demonstrado que em algumas espécies a interferência mediada pelo RNAi se espalha a partir do local inicial da aplicação de dsRNA, produzindo fenótipos de interferência em todo o animal injetado. Em alguns invertebrados, incluindo abelhas melíferas, foi identificado um gene defectivo de interferência sistêmica (SID) que codifica uma proteína transmembrana importante para a rota do RNAi sistêmico. Aparentemente, essas proteínas tipo SID1 canalizam os dsRNAs entre as células, ativando um mecanismo de disseminação sistêmica do sinal de silenciamento. Contudo, um homólogo RdRP de invertebrado ainda não foi descrito. Recentemente, o silenciamento gênico por meio da alimentação de dsRNA viral vem se mostrando eficiente no combate da infecção IAPV em abelhas melíferas (PCT IL2008/001440).

Os microsporídios foram classificados como Fungos, que demonstraram um repertório evolucionário diverso de proteínas silenciadoras. Alguns destes são diferentes dos homólogos silenciadores dos vertebrados. No *Trypanosoma brucei* foi identificado um homólogo tipo DICER. Homólogos RISC também foram descritos e transcrições relacionadas a RNAi foram identificadas em eucariotas parasíticos simples, tais como *Giardia* e *Trichomonas*. Contudo, a função dessas enzimas e de seus produtos não está clara. Além disso, embora as enzimas DICER e RISC tenham sido detectadas em algumas espécies de *Trypanosomes*, outros *Trypanosomes* foram identificados como

RNAi-negativos, de modo compatível com a observação de que muitos parasitas eucarióticos são geneticamente heterogêneos onde as rotas de RNAi estão envolvidas (Ullu et al., 2004).

O silenciamento gênico de RNAi em parasitas eucarióticos intracelulares foi demonstrado tanto para proteínas hospedeiras suspeitas de funções críticas no ciclo de vida dos parasitas (como em *T. cruzi*), como em formas de vida livre, tais como as formas extracelulares de *Plasmodium* e *T. brucei* que podem ser cultivadas in vitro. Em oposição aos vários estudos com parasitas virais, até hoje não foi demonstrado o silenciamento gênico endógeno em formas intracelulares de parasitas eucarióticos. Além da necessidade de atravessar pelo menos uma membrana de permeabilidade e composição indefinidas do parasita, outros obstáculos à metodologia de RNAi eficiente para formas intracelulares de parasitas eucarióticos incluem a heterogeneidade das rotas de RNAi em eucariotas menores, parasíticos, pouco entendimento da função dessas rotas e os conhecimentos limitados do metabolismo do parasita e, portanto, dificuldade na seleção eficiente de alvos para o silenciamento dos genes do parasita.

Existe, portanto, necessidade e seria muito desejável ter métodos para silenciamento gênico eficiente do *Nosema*, a fim de evitar e tratar infecção causada por *Nosema* em abelhas melíferas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com um aspecto de

alguns modos de realização da presente invenção, é previsto um agente de ácido nucléico isolado, compreendendo uma expressão de regulação descendente de sequência de ácido nucléico de um produto gênico de um parasita de Nosema.

5 De acordo com outro aspecto de alguns modos de realização da presente invenção, é prevista uma construção de ácido nucléico, compreendendo um agente de ácido nucléico isolado compreendendo uma expressão de regulação descendente de sequência de ácido nucléico de um
10 produto gênico de um parasita de Nosema.

De acordo com outro aspecto de alguns modos de realização da presente invenção, é prevista uma composição ingerível pela abelha, compreendendo um
~~agente de ácido nucléico isolado, compreendendo uma~~
15 expressão de regulação descendente da sequência de ácido nucléico de um produto gênico de um parasita de Nosema.

De acordo com algumas configurações da invenção, a composição ingerível pela abelha está na forma sólida.

20 De acordo com algumas configurações da invenção, a composição ingerível pela abelha está na forma líquida.

De acordo com algumas configurações da invenção, a composição ingerível pela
25 abelha compreende proteína.

De acordo com algumas configurações da invenção, a proteína é na forma de pólen e/ou bolos de soja.

De acordo com algumas configurações da invenção, o líquido é uma solução de sacarose e uma solução de xarope de milho.

De acordo com algumas
5 configurações da invenção, o líquido compreende ainda um carboidrato ou complemento de açúcar.

De acordo ainda com outro aspecto de algumas configurações da presente invenção, é previsto um método para reduzir a suscetibilidade de uma
10 abelha a infecção causada por Nosema, compreendendo alimentar a abelha com uma quantidade eficiente de um agente de ácido nucléico isolado, compreendendo uma expressão de regulação descendente da sequência de ácido nucléico de um
~~produto génico de um parasita do Nosema, reduzindo, desse~~
15 modo, a suscetibilidade da abelha a infecção por Nosema.

De acordo ainda com outro aspecto de algumas configurações da presente invenção, é previsto um método para reduzir a suscetibilidade de uma abelha a infecção por Nosema, compreendendo alimentar a
20 abelha com uma quantidade eficiente de um agente de ácido nucléico, compreendendo a regulação descendente da expressão de sequências de ácido nucléico de pelo menos uma proteína de transportador ATP/ADP de Nosema, ou homólogo da mesma e pelo menos uma proteína mitossômica de Nosema, reduzindo,
25 desse modo, a suscetibilidade de dita abelha a infecção por Nosema.

De acordo ainda com outro aspecto de algumas configurações da presente invenção, é

previsto um método para reduzir a suscetibilidade de abelhas melíferas a infecção por Nosema, o método compreendendo alimentar a colmeia de abelhas com uma quantidade eficiente de um agente de ácido nucléico ribonucléico de cadeia dupla (dsRNA), tal RNA de cadeia dupla compreendendo pelo menos 5 uma sequência complementar a pelo menos 21 nucleotídeos de mRNA específico de Nosema e capaz de induzir a degradação do mRNA específico de Nosema.

De acordo com algumas 10 configurações da invenção, o produto génico é um mRNA que codifica um polipeptídeo de Nosema.

De acordo com algumas configurações da invenção, o agente é selecionado do grupo que consiste de um dsRNA, um RNA antissenso e uma ribozima.

15 De acordo com algumas configurações da invenção, o dsRNA é selecionado do grupo que consiste de siRNA, shRNA e miRNA.

De acordo com algumas configurações da invenção, a sequência de ácido nucléico tem 20 um comprimento maior que 15 pares de base.

De acordo com algumas configurações da invenção, a sequência de ácido nucléico tem um comprimento de 19 a 25 pares de base.

De acordo com algumas 25 configurações da invenção, a sequência de ácido nucléico tem um comprimento maior que 30 pares de base.

De acordo com algumas configurações da invenção, o parasita do Nosema é o N.

cerana ou *N. apis*.

De acordo com algumas configurações da invenção, o parasita do *Nosema* é o *N. cerana* e o produto gênico é um mRNA que codifica uma
5 proteína mitossômica do *Nosema*.

De acordo com algumas configurações da invenção, a proteína mitossômica do *Nosema* é selecionada do grupo que consiste de TOM70, TIM22, TOM40, Imp2, Hsp70 mitocondrial, proteínas transportadoras ATM1-
10 ABC, Frataxin, Ferredoxina, ERV1, ferredoxina, NADPH oxidoreductase [FNR], subunidade α de piruvato desidrogenase, subunidade β de piruvato desidrogenase, glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial (mtG3PDH), dismutase de
superóxido contendo manganês (MnSOD), DNAJ (Hsp70
15 interagente), Centro de Ferro-Enxofre ISU1, Cisteína desulfurase Nsf1, NAR1 e RLI1.

De acordo com algumas configurações da invenção, a sequência de ácido nucléico é complementar a uma sequência conforme definido em qualquer
20 das SEQ ID NOs: 55-252698.

De acordo com algumas configurações da invenção, o parasita do *Nosema* é o *N. cerana* e o produto gênico é um mRNA que codifica uma
25 proteína transportadora de ATP/ADP do *Nosema* ou homóloga desta.

De acordo com algumas configurações da invenção, a proteína transportadora de ATP/ADP ou homóloga da mesma é selecionada do grupo que

consiste de proteínas codificadas por SEQ ID NOs: 44, 45, 46 e 47.

De acordo com algumas configurações da presente invenção, o agente de ácido nucléico isolado compreende pelo menos duas sequências de ácido nucléico de regulação descendente de expressão de um produto gênico de um parasita do Nosema. As pelo menos duas sequências de ácido nucléico podem ser contíguas ou não contíguas entre si.

10 De acordo com algumas configurações da invenção, as sequências de ácido nucléico realizam a regulação descendente da expressão de pelo menos duas proteínas mitossômicas do Nosema.

De acordo com algumas configurações da invenção, as sequências de ácido nucléico realizam a regulação descendente da expressão de pelo menos uma proteína transportadora de ATP/ADP do Nosema ou homóloga da mesma e pelo menos uma proteína mitossômica do Nosema.

20 De acordo com algumas configurações da invenção, as sequências de ácido nucléico compreendem pelo menos uma sequência de ácido nucléico complementar à sequência definida em SEQ ID NO: 59 e pelo menos uma sequência de ácido nucléico complementar a uma sequência definida em de SEQ ID NOs: 57 e 58.

25 De acordo com algumas configurações da invenção, as sequências de ácido nucléico compreendem uma pluralidade de sequências dotadas de pelo menos uma sequência de ácido nucléico complementar a uma

sequência definida em cada SEQ ID NO: 59, 55, 56, 57 e 58 .

De acordo com algumas configurações da invenção, o inseto é uma abelha, uma abelha forrageira ou abelha de colmeia.

5 De acordo com algumas configurações da invenção, a infecção por Nosema é uma infecção causada por Nosema cerana ou Nosema apis.

De acordo com algumas configurações da invenção, a infecção é uma infecção causada
10 por Nosema cerana e alimentar a quantidade eficiente do agente de ácido nucléico reduz a mortalidade causada pela infecção.

De acordo com algumas configurações da invenção, o agente de ácido nucléico

----- 15 compreende uma sequência de ácido nucléico selecionada complementar a qualquer das sequências definidas no grupo que consiste de SEQ ID NOs: 55-252698.

De acordo com algumas configurações da invenção, o agente de ácido nucléico
20 compreende uma pluralidade de sequências de ácido nucléico complementares a qualquer das sequências definidas em cada um dos grupos que consistem de SEQ ID NOs: 57, 58 e 59.

De acordo com algumas configurações da invenção, a alimentação compreende fornecer
25 à abelha uma composição líquida ingerível pela abelha.

De acordo com algumas configurações da invenção, a alimentação compreende fornecer uma composição sólida ingerível pela abelha.

A menos que definido de outro modo, todos os termos técnicos e/ou científicos aqui utilizados possuem o mesmo significado pelos quais são geralmente compreendidos por um técnico no assunto ao qual a
5 invenção pertence. Embora métodos e materiais semelhantes ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser utilizados na prática ou no teste dos modos de realização da invenção, são descritos abaixo exemplos de métodos e/ou materiais. Em caso de conflito, prevalece o relatório da patente, incluindo
10 definições. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são ilustrativos somente e não se destinam a ser necessariamente limitantes.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Algumas configurações da
----- 15 invenção são aqui descritas, a título de exemplo somente, com referência aos desenhos e imagens anexos. Com referência específica agora aos desenhos e imagens em detalhe, destaca-se que os detalhes são ilustrados a título de exemplo e com a finalidade de discussão ilustrativa dos modos de
20 realização da invenção. A esse respeito, o relatório tomado em conjunto com os desenhos e imagens, torna evidente para os técnicos no assunto como os modos de realização da invenção podem ser colocados em prática.

Nos desenhos:

25 a figura 1 é um alinhamento das sequências de proteína de transporte de ATP E. cuniculi ATP e os homólogos encontrados no N. cerana;

a figura 2 é um gráfico ilustrando a melhor sobrevida de

abelhas alimentadas com dsRNA de homólogos de proteína de transporte de ATP/ADP do *N. cerana*. O eixo Y representa o número de abelhas sobreviventes contado por minicolmeia, em cada ponto no tempo e o eixo X representa o número de dias a partir da inoculação com *N. cerana*. N=6 minicolmeias por tratamento;

a figura 3 é um histograma ilustrando níveis reduzidos de esporos de *Nosema* em abelhas encontradas mortas depois de alimentar as colmeias e caixas com dsRNA de homólogos de proteína de transporte de ATP/ADP do *N. cerana*. As abelhas mortas que sucumbiram à infecção por *Nosema* nos experimentos na caixa e minicolmeia foram recolhidas do dia 7

ao dia 15 pós-infecção e os esporos preparados para contagem em um hemacitômetro conforme aqui descrito. Abelhas não infectadas (não foram detectados esporos de *Nosema*) foram excluídas das amostras. O eixo Y é o número médio de esporos por 16 quadrados. N= 75 amostras. Observe que a alimentação com dsRNA de homólogos de proteína de transporte de ATP/ADP do *N. cerana* resultou em uma contagem de esporos maior que três vezes o número menor nas abelhas mortas, infectadas, em comparação aos controles não tratados;

a figura 4 é um histograma ilustrando a redução do apetite em abelhas alimentadas com dsRNA de homólogos de proteína de transporte de ATP/ADP do *N. cerana*.

Apetite, expresso como a tendência de resposta positiva no experimento de Reflexo de Extensão de Proboscídeo (PER) foi consistentemente maior entre as abelhas de controle infectadas, não tratadas (Nosema + Sacarose somente) do que nas abelhas alimentadas com dsRNA de homólogos de proteína de transporte de ATP/ADP do *N. cerana*. N= 1000 respostas totais. Observe que o limiar aumentado da resposta PER em abelhas alimentadas com dsRNA de homólogos de proteína de transporte de ATP/ADP do *N. cerana* é mais claramente evidente em baixas (<1%) concentrações de sacarose, indicando estresse metabólico menor nas abelhas tratadas;

a figura 5 é um histograma ilustrando o silenciamento específico da expressão gênica do *Nosema* pelo dsRNA de homólogos de proteína de transporte de ATP/ADP do *N. cerana*. Níveis de expressão gênica de homólogo de proteína de transportador de ATP/ADP do *Nosema* NC123 em abelhas alimentadas com dsRNA específico para *Nosema* foram testados por PCR em tempo real, normalizados em relação à expressão gênica de tubulina do *Nosema* e expressos em relação à expressão NC 123 em abelhas infectadas por *Nosema* alimentadas com sacarose somente (sem tratamento), que receberam um valor de 1. Títulos de Coluna da esquerda para a direita: Sem tratamento, Tratamento NC006

(alimentadas com dsRNA de proteína NC006),
Tratamento NC123 (alimentadas com dsRNA de
proteína NC123), Tratamento NC6+Nc123
(alimentadas com dsRNA de NC006 e dsRNA de
5 proteína Nc123 combinadas), Tratamento R.N.
(alimentadas com dsRNA de proteína NC006, dsRNA
de proteína Nc123, dsRNA de proteína Nc014 e
dsRNA de proteína Nc017 combinados) e Dia 0 (não
infectadas). Observe a redução significativa do
10 número de transcrição, somente entre as abelhas
alimentadas com dsRNA no qual estava presente o
dsRNA de homólogo específico de NC123;

a figura 6 é um histograma ilustrando a maior sobrevida de
abelhas alimentadas com dsRNA de proteínas
15 mitossômicas e não mitossômicas do *N. cerana*. A
porcentagem média das abelhas em uma minicolmeia
sobreviventes no dia 14 após a infecção por
Nosema é indicada para abelhas alimentadas com
dsRNA específico para *Nosema* de homólogos de
20 proteína relacionados a energia mitossômicos e
não mitossômicos. Títulos de coluna, começando da
segunda a partir da esquerda: Sem tratamento,
infectadas, NC6 (alimentadas com dsRNA de
proteína NC006 de *Nosema*), Tratamento NC123
25 (alimentadas com dsRNA de proteína NC123 de
Nosema), NC17 (alimentadas com dsRNA de proteína
Nc017 de *Nosema*), TOM70 (alimentadas com dsRNA de
proteína Nc014 de *Nosema*), REN+TOM70 (alimentadas

com dsRNA de proteína NC006 de Nosema, dsRNA de
proteína Nc123, dsRNA de proteína Nc014, dsRNA de
proteína Nc017 e dsRNA de proteína TOM70
combinadas) e REN (alimentadas com dsRNA de
5 proteína NC006, dsRNA de proteína Nc123, dsRNA de
proteína Nc014 e dsRNA de proteína Nc017
combinadas). Observe o aumento significativo da
sobrevida por meio da alimentação de algumas,
porém não todas, com dsRNA específico de Nosema
10 (por exemplo, nc014, nc017 e TOM70) e o efeito
sinérgico da alimentação de nc006, nc123, nc014,
nc017 e TOM70 dsRNA combinados;

a figura 7 é um gráfico ilustrando a maior sobrevivida de
abelhas alimentadas com dsRNA de proteínas

15 mitossômicas e não mitossômicas de *N. cerana*,
como porcentual de abelhas sobreviventes após a
infecção, expresso ao longo de toda a duração do
experimento. Legenda: Sem tratamento, infectadas
(▪), NC6 (alimentadas com dsRNA de proteína NC006
20 de Nosema)(▲), Tratamento NC123 (alimentadas com
dsRNA de proteína NC123 de Nosema)(■), NC14
(alimentadas com dsRNA proteína Nc014 de
Nosema)(□x), NC17 (alimentadas com dsRNA de
proteína Nc017 de Nosema)(●), TOM70 (alimentadas
25 com dsRNA de proteína Nc014 de Nosema)(▨),
REN+TOM70 (alimentadas com uma combinação de
dsRNA de proteína NC006 de Nosema, dsRNA de
proteína Nc123, dsRNA de proteína Nc014, dsRNA de

proteína Nc017 e dsRNA de proteína TOM70) (▼) e REN (alimentadas com uma combinação de dsRNA de proteína NC006, dsRNA de proteína Nc123, dsRNA de proteína Nc014 e dsRNA de proteína Nc017) (-).

5 Observe a taxa de sobrevivência consistentemente superior entre as abelhas alimentadas com uma combinação de nc006, nc123, nc014, nc017 e TOM70 dsRNA (▼);

a figura 8 é um gráfico ilustrando a maior sobrevivência de abelhas alimentadas com dsRNA de uma combinação de proteínas mitossômicas e não mitossômicas de N. cerana, como porcentual de abelhas sobreviventes, após a infecção, expressa ao longo de toda a duração do experimento. Foi observada

15 mortalidade significativamente reduzida em minicolmeias de abelhas alimentadas com uma combinação de dsRNA de proteína Nc014 de Nosema cerana, proteína Nc017 e proteína TOM70 (TOM70+NC14+NC17, ◆), comparadas às abelhas não tratadas (S.O., ■);

20 a figura 9 é uma fotomicrografia ilustrando a alta contagem de esporos de Nosema característica de abelhas sobreviventes alimentadas com uma combinação de dsRNA de proteína Nc014 de Nosema cerana, proteína Nc017 e proteína TOM70, 21 dias após a

25 infecção;

a figura 10 é uma fotomicrografia ilustrando a ausência de esporos de Nosema nas abelhas de controle não

tratadas, sobreviventes alimentadas com sacarose
somente, 21 dias após a infecção; e
a figura 11 é um gráfico ilustrando a maior sobrevivência de
abelhas alimentadas com dsRNA de proteínas
mitossômicas e não mitossômicas de *N. cerana*,
como porcentual de abelhas sobreviventes depois
da infecção, expressa ao longo de toda a duração
do experimento. Legenda: Sem tratamento, não
infectadas (Tratamento A), Sem tratamento,
infectadas (Tratamento B) e alimentação com
combinação de dsRNA de proteína NC006 de *Nosema*,
dsRNA de proteína NC123, dsRNA de proteína Nc014,
dsRNA de proteína Nc017 e dsRNA de proteína TOM70
(Tratamento C). Observe a taxa de sobrevivência
consistentemente superior entre as abelhas
alimentadas com uma combinação de nc006, nc123,
nc014, nc017 e TOM70 dsRNA (Tratamento C).

DESCRIÇÃO DAS CONFIGURAÇÕES DA INVENÇÃO

A presente invenção, em algumas
configurações, se refere a métodos e composições para
reduzir a suscetibilidade de abelhas a infecção por *Nosema*
e/ou redução da gravidade das infecções por *Nosema* por meio
da alimentação com dsRNA específico para *Nosema*.

Antes de explicar em detalhes
pelo menos uma configuração da invenção, deve-se entender
que a invenção não está necessariamente limitada em sua
aplicação aos detalhes definidos na descrição que se segue
ou exemplificada pelos Exemplos. A invenção é passível de

outras configurações ou de ser praticada ou realizada de várias maneiras.

Durante a colocação da presente invenção em prática, os inventores demonstraram que a ingestão por uma abelha de composições contendo uma ou mais moléculas de dsRNA, nas quais pelo menos um segmento da molécula de dsRNA corresponde a um segmento substancialmente idêntico de RNA de proteína mitossômica do Nosema e/ou um ou mais homólogos do transportador de ATP/ADP não mitossômicos resultará em menor incidência e gravidade de uma infecção causada por Nosema e sobrevida muito maior das abelhas e da colônia como um todo. Esses resultados indicam que a molécula de polinucleotídeo, DNA ou RNA, oriunda de uma proteína mitossômica de Nosema e/ou pelo menos uma sequência adicional de homólogos de proteína de transportador de ATP/ADP não mitossômicas pode ser usada para desenvolver um agente de ácido nucléico ou construção de ácido nucléico de acordo com os métodos da presente invenção para produzir uma ou mais sequência de RNA que podem constituir uma molécula de dsRNA disponível para ingestão pelas abelhas quando fornecida por meio da alimentação. Durante a prática, foi mostrado que as colônias de abelhas expostas ao dsRNA específico de proteína mitossômica de Nosema em sua alimentação resistiram à infecção por Nosema com maior sobrevida (veja figuras 2, 6-8 e 11) e menor incidência de abelhas infectadas de modo fatal do que nas colônias não tratadas (ver figuras 3 e 8-10) e que o dsRNA específico da proteína mitossômica do Nosema fornecido juntamente com o

dsRNA de homólogo de proteína do transportador de ATP/ADP não mitossômico foi sinérgico em seu efeito protetor.

Assim sendo, de acordo com uma configuração da presente invenção, é previsto um método para
5 reduzir a suscetibilidade de uma abelha à infecção por Nosema, compreendendo alimentar a abelha com uma quantidade eficiente de um agente de ácido nucléico isolado, compreendendo a regulação descendente de sequência de ácido nucléico de um produto gênico do Nosema, ou construção de
10 ácido nucléico compreendendo a sequência de ácido nucléico, reduzindo, desse modo, a suscetibilidade da abelha a infecção por Nosema.

Conforme aqui utilizado, o termo "abelha" é definido como qualquer um dos vários
15 insetos alados, com corpos peludos, geralmente com ferrões da superfamília Apoidea da ordem Hymenoptera, incluindo tanto a espécie solitária como a social e caracterizados por possuírem partes da boca para sugar e mastigar para reunir néctar e pólen. Exemplos de espécies de abelhas incluem,
20 entre outros, Apis, Bombus, Trigona, Osmia e similares. Em uma configuração, as abelhas incluem, entre outras, abelhas grandes (Bombus terrestres) e abelhas melíferas (Apis melífera).

Conforme aqui utilizado, o
25 termo "colônia" é definido como uma população de dúzias até geralmente várias dezenas de milhares de abelhas melíferas que cooperam na construção do ninho, coleta de alimento e construção da ninhada. Uma colônia geralmente tem uma única

rainha, o restante das abelhas sendo "operárias" (fêmeas) ou "zangões" (machos). A estrutura social da colônia é mantida pela rainha e pelas operárias e depende de um sistema eficiente de comunicação. A divisão do trabalho dentro da

5 casta operária depende, basicamente, da idade da abelha, mas varia com as necessidades da colônia. A reprodução e a força da colônia dependem da rainha, da quantidade de depósitos de alimento e do tamanho da força operária. As abelhas melíferas também podem ser subdivididas em categorias de

10 "abelhas de colmeia", geralmente na primeira parte da vida das operárias, durante a qual a "abelha de colmeia" desempenha tarefas dentro da colmeia e a "abelha forrageira" durante a última parte da vida da abelha, na qual a

"forrageira" localiza e recolhe pólen e néctar fora da

15 colmeia e leva o néctar ou pólen para dentro da colmeia para consumo e armazenagem.

Conforme aqui utilizado, o termo "tolerância" é definido como a capacidade de uma abelha ou colônia de abelhas resistir e/ou suportar a

20 infestação por e/ou a proliferação de um patógeno de Nosema, incluindo, entre outros, grau de infecção, gravidade dos sintomas, infectividade de outros indivíduos (contágio) e similares. A tolerância pode ser avaliada, por exemplo, monitorando a longevidade/expectativa de vida da abelha,

25 infectividade, presença de sintomas, tais como, entre outros, apetite, vitalidade, alcance de voo, etc., presença de organismos patogênicos, ou curso de tempo de uma doença em uma população depois de um estímulo com patógeno de

Nosema.

Conforme aqui utilizado, o termo "susctibilidade" é definido como a capacidade de uma abelha ou colônia de abelhas ser infestada ou infectada e/ou suportar a proliferação de um patógeno de Nosema, incluindo, entre outros, grau de infecção, gravidade dos sintomas, infectividade de outros indivíduos (contágio) e similares. A suscetibilidade pode ser avaliada, por exemplo, monitorando a infectividade, presença de sintomas, tais como, entre outros, apetite, vitalidade, alcance de voo, etc., presença de organismos patogênicos, mortalidade ou curso de tempo de uma doença em uma abelha individual ou população de abelhas depois de um estímulo com patógeno de Nosema.

Conforme aqui utilizado, o termo "Nosema" é definido como qualquer organismo de um gênero (o tipo da família Nosematidae) de protozoários microsporídios que inclui vários parasitas, especialmente os que provocam doença em abelhas ou colônias de abelhas. O Nosema que causa infecção em abelha inclui, entre outros, *N. cerana* e *N. apis*. A infecção de abelhas ou colônias de abelhas com o parasita do Nosema é comumente conhecida como Nosemose. Deve-se observar que os mecanismos de silenciamento gênico aqui descritos podem ser eficientes para combater espécies de microsporídios que infectam outros hospedeiros além de abelhas, com exemplos incluindo, entre outros, bicho-da-seda e humanos. Contudo, devido à heterogeneidade das rotas de RNAi e metabólicas em microsporídios e, tendo em vista do papel crítico das rotas

de RNAi endógeno do parasita individual para silenciamento gênico eficiente, pode ser necessária a identificação dos genes-alvo candidatos eficientes em cada caso.

Conforme aqui utilizado, o termo "mitossoma" é definido como uma organela tipo mitocôndria de membrana de ligação dupla de Microsporídios altamente reduzidos tanto da perspectiva de tamanho físico como da complexidade bioquímica. As proteínas mitossômicas, entre outras, proteína e proteínas de importação de metabólito (TOM70, TIM22, TOM40, Imp2, Hsp70 mitocondrial e proteínas transportadoras ATM1-ABC), proteínas envolvidas na montagem e exportação ISC (frataxin, ferredoxina, ISCU, ISCS, ERV1 e ferredoxina, NADPH oxido-reductase [FNR], subunidades de piruvato desidrogenase, PDH α e - β , glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial (mtG3PDH) e dismutase de superóxido contendo manganês (MnSOD).

Conforme aqui utilizado, o termo "proteína transportadora de ATP/ADP" se refere a uma proteína cuja função é transferir ATP e/ou ADP através das membranas. Os homólogos de proteínas transportadoras de ATP/ADP de microsporídios para proteínas transportadoras de ATP/ADP de outras espécies foram identificadas no *E. cuniculi* e *N. cerana* (ver acima e figura 1). Conforme aqui utilizado, o termo proteínas transportadoras de ATP/ADP "putativas", "ortólogos de proteína transportadora de ATP/ADP" ou "homólogos de proteína transportadora de ATP/ADP" se referem a proteínas, ou polipeptídeos codificados putativos de sequências de polinucleotídeos que

possuem identidade de aminoácido significativa ou semelhança com proteínas transportadoras de ATP/ADP conhecidas de outras espécies e/ou que possuem sequências de consenso comuns às proteínas transportadoras de ATP/ADP conhecidas.

5 Exemplos de proteínas transportadoras de ATP/ADP do *Nosema*, ou homólogos de proteínas transportadoras de ATP/ADP são nc123 (SEQ ID NO:19), nc006 (SEQ ID NO:22), nc014 (SEQ ID NO:21) e nc017 (SEQ ID NO:20).

Conforme aqui utilizados, os
10 termos "doença de abelha" ou "doença de colônia de abelhas" são definidos como alterações indesejáveis no comportamento, fisiologia, morfologia, capacidade reprodutiva, valor econômico, viabilidade, produção de mel, capacidade de polinização, resistência a infecção e/ou infestação de uma
15 abelha, uma população de abelhas e/ou colônia de abelhas, direta ou indiretamente resultantes de contato com um parasita do *Nosema* ou abelha infectada por *Nosema* ou outro organismo.

Um esboço do genoma do *N. cerana* foi fornecido em Cornman et al., 2009 Plos Pathogen.

Durante a colocação da presente invenção em prática, os inventores demonstraram que fornecer dsRNA mitossômico específico do *Nosema*, isoladamente ou em combinação com dsRNA adicional específico para homólogos de
25 proteína transportadora de ATP/ADP do *Nosema* não mitossômico na alimentação de abelhas expostas ao *Nosema* reduziu substancialmente a incidência e os níveis de sequências de *Nosema* detectadas nas abelhas (ver figura 5). Assim sendo,

Nosema desejado ou RNA do Nosema (por exemplo, menor proliferação de um parasita do Nosema, menor virulência de um parasita do Nosema, etc.). Pode-se verificar que as alterações no andamento, gravidade, duração, etc. de uma
5 infecção por Nosema podem ser monitoradas em alguns casos via observação do hospedeiro e/ou colônia de hospedeiros, bem como pela observação direta do parasita. Essa observação direta pode ser útil em casos em que a virulência do nosema em relação ao genótipo da abelha seja alta. Conforme aqui
10 utilizada, a regulação descendente pode ser transitória, por exemplo, pela duração da presença de um agente de regulação descendente, ou permanente, resultando na redução da expressão gênica de Nosema ou RNA pela vida útil do organismo e/ou suas futuras gerações.

15 A regulação descendente dos polipeptídeos mitossômicos ou não mitossômicos do Nosema pode ser efetuada no nível genômico e/ou de transcrição usando uma variedade de moléculas que interferem na transcrição e/ou tradução (por exemplo, agentes
20 silenciadores de RNA, Ribozima, DNazima e antissenso). Tratamento e prevenção de infecções virais com dsRNA foram descritos pela publicação WO/2003/004649 de Tenllado et al. e pedido de patente PCT IL2008/001440 de Paldi et al.. O uso de dsRNA em insetos está descrito no Pedido de Patente
25 Norte-Americano 2007 0250947, Pedido de Patente Norte-Americano 2006 0272049, Pedidos PCT WO 2007/080127 e WO 2007/080126, Pedido de Patente Norte-Americano 20030150017, Pedido de patente PCT WO 02/14472, Pedido de Patente Norte-

Americano 20030154508, Pedido de patente PCT WO 2004/005485, Pedido de patente PCT WO 99/32619 e Pedido de Patente Norte-Americano N° 6.326.193.

A seguir é fornecida uma lista
5 de agentes capazes de realizar a regulação descendente do nível de expressão e/ou atividade de polipeptídeos mitossômicos do Nosema.

A regulação descendente de polipeptídeos mitossômicos e não mitossômicos do Nosema pode
10 ser realizada por silenciamento de RNA. Conforme aqui utilizada, a frase "silenciamento de RNA" refere-se a um grupo de mecanismos reguladores [por exemplo, interferência de RNA (RNAi), silenciamento gênico transcricional (TGS),
silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), exclusão,
15 cossupressão e repressão translacional] mediados por moléculas de RNA resultam na inibição ou "silenciamento" da expressão de um gene de codificação de proteína correspondente ou sequência de RNA mitossômico do Nosema. O silenciamento de RNA foi observado em muitos tipos de
20 organismos, inclusive plantas, animais e fungos.

Conforme aqui utilizado, o termo "agente de silenciamento de RNA" se refere a um RNA que é capaz de inibir ou "silenciar" a expressão de um gene-alvo. Em certas configurações, o agente de silenciamento de
25 RNA é capaz de evitar o processamento completo (por exemplo, a tradução e/ou expressão completa) de uma molécula de mRNA através de um mecanismo de silenciamento pós-transcricional. Os agentes de silenciamento de RNA incluem moléculas de RNA

não codificadoras, por exemplo duplos de RNA compreendendo pares de cadeias, bem como RNAs precursores a partir dos quais esses pequenos RNAs não codificados podem ser gerados. Exemplos de agentes silenciadores de RNA incluem dsRNAs, 5 tais como siRNAs, miRNAs e shRNAs. Em uma configuração, o agente silenciador de RNA é capaz de induzir interferência de RNA. Em outra configuração, o agente silenciador de RNA é capaz de mediar a repressão translacional.

Interferência de RNA

10 normalmente se refere ao processo de silenciamento gênico pós-transcricional específico da sequência em animais mediado por RNAs interferentes curtos (siRNAs). O processo correspondente em plantas é geralmente chamado de silenciamento gênico pós-transcricional ou silenciamento de 15 RNA e também é chamado de exclusão em fungos. O processo de silenciamento gênico pós-transcricional é considerado um mecanismo de defesa celular de preservação evolutiva utilizado para evitar a expressão de genes estrangeiros e é geralmente partilhado por diversas flora e filos. Essa 20 proteção da expressão de genes estranhos pode ter evoluído em resposta à produção de RNAs de cadeia dupla (dsRNAs) oriundos da infecção viral ou da integração aleatória de elementos transposon no genoma de um hospedeiro via resposta celular que destrói especificamente o RNA homólogo de cadeia 25 simples ou RNA genômico viral.

A presença de dsRNAs longos em células estimula a atividade de uma enzima de ribonuclease III chamada dicer. O dicer está envolvido no processamento

do dsRNA em pequenas moléculas de dsRNA conhecidas como RNAs interferentes curtos (siRNAs). Esses RNAs interferentes curtos, oriundos da atividade do dicer, geralmente têm um comprimento de cerca de 21 até cerca de 23 nucleotídeos e 5 compreendem cerca de 19 duplos de pares básicos. A resposta de RNAi também inclui um complexo de endonuclease, geralmente chamado de complexo silenciador induzido por RNA (RISC), que realiza a clivagem de RNA de cadeia simples dotado de sequência complementar à cadeia antissenso do 10 siRNA duplo. A clivagem do RNA-alvo ocorre no meio da região complementar à cadeia de sentido negativo do siRNA duplo.

Conseqüentemente, a presente invenção contempla o uso de dsRNA para a regulação descendente da expressão de proteína de mRNA.

15 De acordo com uma configuração, o dsRNA é maior que 30 bp. O uso de dsRNAs longos pode oferecer várias vantagens porque a célula pode selecionar a melhor sequência de silenciamento minorando a necessidade de testar numerosos siRNAs; os dsRNAs longos permitem que as 20 bibliotecas de silenciamento tenham menor complexidade do que o necessário para siRNAs.

Em uma configuração da presente invenção, o dsRNA tem mais de 30 pares básicos e é selecionado do grupo complementar a uma sequência definida 25 em SEQ ID NOs: 55-59. Em outra configuração da presente invenção, o dsRNA tem mais de 30 pares básicos e compreende pelo menos duas sequências complementares a uma sequência selecionada do grupo definido em SEQ ID NOs: 55-59. Ainda em

outra configuração, o dsRNA compreende a sequência complementar à sequência definida em de SEQ ID NO: 59 e uma sequência definida em pelo menos um de SEQ ID NOS: 57 e 58. Em uma configuração da presente invenção, o dsRNA compreende 5 pelo menos duas sequências de regulação descendente de expressão de um gene-alvo do Nosema, na qual pelo menos duas sequências podem ser contíguas ou não contíguas entre si.

Outro método de regulação descendente de proteínas mitossômicas e não mitossômicas do 10 Nosema é pela introdução de RNAs inibitórios pequenos (siRNAs).

O termo "siRNA" se refere a pequenos duplos de RNA inibitórios (geralmente entre os pares básicos 18-30, entre 19 e 25 pares básicos) que 15 induzem a rota de interferência de RNA (RNAi). Geralmente, os siRNAs são quimicamente sintetizados como 21mers com uma região dupla 19 bp central e protuberâncias 2-base 3'-simétricas nos terminais, embora tenha sido recentemente descrito que duplos de RNA quimicamente sintetizados com 25- 20 30 de comprimento básico podem ter cerca de 100 vezes maior potência em comparação aos 21mers na mesma localização. A potência maior observada obtida usando RNAs mais longos na ativação do RNAi parece, na teoria, resultar do fornecimento ao Dicer de um substrato (27mer) em vez de um produto 25 (21mer) e isso parece melhorar a taxa ou eficiência de entrada do duplo siRNA no RISC.

Verificou-se que a posição da protuberância 3'- influencia a potência de um siRNA e duplos

assimétricos dotados de uma protuberância 3'- na cadeia antissenso são geralmente mais potentes do que os com protuberância 3'- na cadeia senso (Rose et al., 2005). Isso pode ser atribuído ao carregamento da cadeia assimétrica no RISC, como os padrões de eficácia opostos são observados ao visar a transcrição antissenso.

As cadeias de um RNA interferente de cadeia dupla (por exemplo, um siRNA) podem ser conectadas para formar uma estrutura hairpin ou stem-loop (por exemplo, um shRNA). Assim sendo, como mencionado, o agente de silenciamento de RNA da presente invenção também pode ser um RNA hairpin curto (shRNA).

O termo "shRNA", conforme aqui utilizado, se refere a um agente de RNA dotado de uma estrutura stem-loop, compreendendo uma primeira e segunda região de sequência complementar, o grau de complementaridade e orientação das regiões sendo suficientes tal que o pareamento básico ocorra entre as regiões, a primeira e a segunda regiões sendo unidas por uma região de loop, o loop resultando da falta de pareamento básico entre nucleotídeos (ou análogos de nucleotídeos) dentro da região do loop. O número de nucleotídeos no loop é um número entre e incluindo 3 a 23, ou 5 a 15, ou 7 a 13, ou 4 a 9, ou 9 a 11. Alguns dos nucleotídeos no loop podem estar envolvidos em interações de pares básicos com outros nucleotídeos no loop. Exemplos de sequências de oligonucleotídeos que podem ser utilizados para formar o loop incluem 5'-UUCAAGAGA-3' (Brummelkamp, T. R. et al., (2002) Science 296: 550) e 5'-

UUUGUGUAG-3' (Castanotto, D. et al. (2002) RNA 8:1454). Será reconhecido por um técnico no assunto que o oligonucleotídeo de cadeia simples resultante forma uma estrutura stem-loop ou hairpin compreendendo uma região de cadeia dupla capaz de
5 interagir com o maquinário de RNAi.

De acordo com outra configuração, o agente silenciador de RNA pode ser um miRNA. Os miRNAs são RNAs pequenos constituídos de genes que codificam transcrições primárias de vários tamanhos. Eles
10 foram identificados tanto nos animais como nas plantas. A transcrição primária (chamada de "pri-miRNA") é processada por meio de várias etapas nucleolíticas até um miRNA precursor mais curto, ou "pré-miRNA." O pré-miRNA está presente em forma dobrada para que o miRNA (maduro) final
15 esteja presente como duplo, as duas cadeias sendo chamadas de miRNA (a cadeia que eventualmente constitui o par básico com o alvo). O pré-miRNA é um substrato para uma forma de dicer que retira o miRNA duplo do precursor, depois do qual, de modo semelhante aos siRNAs, o duplo pode ser colocado no
20 complexo RISC. Foi demonstrado que os miRNAs podem ser expressos transgênicamente e ser eficientes por meio da expressão de uma forma de precursor, em vez da forma primária inteira (Parizotto et al., (2004) Genes & Development 18:2237-2242 e Guo et al (2005) Plant Cell
25 17:1376-1386).

De modo diferente, os siRNAs, miRNAs se agregam a sequências de transcrição com complementaridade apenas parcial (Zeng et al., 2002, Molec.

Cell 9:1327-1333) e reprimem a tradução sem afetar os níveis de RNA em estado estável (Lee et al., 1993, Cell 75:843-854; Wightman et al., 1993, Cell 75:855-862). Tanto miRNAs como siRNAs são processados pelo Dicer e associam-se a componentes do complexo de silenciamento induzido por RNA (Hutvagner et al., 2001, Science 293:834-838; Grishok et al., 2001, Cell 106: 23-34; Ketting et al., 2001, Genes Dev. 15:2654-2659; Williams et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:6889-6894; Hammond et al., 2001, Science 293:1146-1150; Murlatos et al., 2002, Genes Dev. 16:720-728). Um relatório (Hutvagner et al., 2002, Scienceexpress 297:2056-2060) levanta a hipótese de que a regulação gênica através da rota miRNA versus a rota siRNA é determinada unicamente pelo grau de complementaridade da transcrição-alvo.

15 Especula-se que siRNAs com identidade apenas parcial ao mRNA-alvo funcionam na repressão translacional, semelhante a um miRNA, em vez de ativar a degradação de RNA.

De acordo com uma configuração da invenção, o agente de ácido nucléico é capaz de provocar a clivagem e/ou degradação de uma sequência de polinucleotídeos-alvo mitossômicos e/ou não mitossômicos do Nosema. Conforme aqui utilizadas, as expressões "alvo" ou "sequência de polinucleotídeos-alvo" se referem a qualquer sequência presente em uma célula do Nosema, seja uma sequência que ocorra naturalmente ou uma sequência heteróloga presente devido a uma infecção patogênica intracelular ou extracelular ou doença (por exemplo, Nosemose), no qual a sequência de polinucleotídeos

20

25

mitossômicos ou não mitossômicos do Nosema tem uma função que se deseja reduzir ou inibir. A sequência-alvo do Nosema pode ser uma sequência de codificação, ou seja, ela é traduzida para expressar uma proteína ou um fragmento funcional da mesma. Alternativamente, a sequência-alvo pode ser não codificadora, mas pode ter uma função reguladora, ou pode não ter nenhuma função conhecida. Conforme aqui descrito, uma sequência de polinucleotídeos-alvo é uma sequência de polinucleotídeos mitossômicos do Nosema necessária para proteínas envolvidas na transferência de energia, tal como a dos homólogos do transportador de ATP mitossômico do Nosema ou proteínas de importação de metabólitos, combinações das mesmas, isoladamente ou em combinação com sequências de polinucleotídeos visando proteínas não mitossômicas do Nosema, tais como homólogos não mitossômicos transportadores de ATP/ADP. O termo "gene" se destina a incluir qualquer sequência-alvo destinada a ser "silenciada", seja ou não transcrita e/ou traduzida, incluindo sequências reguladoras, tais como promotores, acentuassomos e outras sequências não codificadoras.

Em uma configuração da presente invenção, a síntese de agentes silenciadores de RNA adequados para uso com a presente invenção pode ser efetuada conforme segue. Primeiro, o mRNA de polipeptídeo de Nosema ou outra sequência-alvo é escaneado a jusante do codão de início AUG para sequências de dinucleotídeos AA. A ocorrência de cada AA e os nucleotídeos 3' adjacentes 19 é registrada como locais-alvo de siRNA em potencial. De

preferência, os locais-alvo de siRNA são selecionados a partir da fase de leitura aberta, porque as regiões não traduzidas (UTRs) são mais ricas em locais de ligação de proteína reguladora. Proteínas de ligação UTR e/ou complexos de iniciação de tradução podem interferir na ligação do complexo de endonuclease siRNA [Tuschl ChemBiochem. 2:239-245]. Verifica-se, no entanto, que siRNAs direcionados a regiões não traduzidas também podem ser eficientes, como demonstrado para GAPDH em que siRNA direcionado para 5' UTR mediou cerca de 90% de diminuição de GAPDH mRNA celular e aboliu completamente o nível de proteína (ver Biblioteca Técnica Ambion 91/912 no site da Ambion).

Segundo, os locais-alvo em potencial são comparados a um banco de dados genômico apropriado (por exemplo, humano, camundongo, rato, inseto, etc.) usando qualquer software de alinhamento de sequências, como por exemplo, o software BLAST disponível no servidor NCBI da NIH. Supostos locais-alvo que demonstram homologia significativa para outras sequências de codificação são filtrados. Por exemplo, locais-alvo do hospedeiro (por exemplo, abelha) podem ser filtrados dessa maneira.

As sequências-alvo qualificadas são selecionadas como modelo para síntese de siRNA. As sequências preferidas são as que incluem baixo teor de G/C, pois provaram ser mais eficientes na mediação do silenciamento gênico, em comparação às que têm teor de G/C superior a 55%. De preferência, são selecionados vários locais-alvo por todo o comprimento do gene-alvo ou sequência

para avaliação. Para melhor avaliação dos siRNAs selecionados, de preferência, é utilizado em conjunto um controle negativo. De preferência, o siRNA de controle negativo inclui a mesma composição de nucleotídeos dos siRNAs mas não possui homologia significativa para genoma. Assim sendo, de preferência é usada uma sequência de nucleotídeos misturados do siRNA, desde que não demonstre nenhuma homologia significativa perante sequências gênicas do hospedeiro, ou sequências-alvo do *Nosema* não relevantes.

Por exemplo, um siRNA do *Nosema* adequado pode ser um siRNA específico do *Nosema* correspondendo a sequências do *Nosema cerana* SEQ ID NOS: 27, 47 e 46. siRNAs do *Nosema* adequados adicionais podem ser projetados de acordo com sequências de qualquer *Nosema*, por exemplo, incluindo, entre outros, *Nosema apis*, *Nosema bombi*, *Nosema bombycis*, *Nosema antheraeae*, *E. cuniculi* e similares. De acordo com uma configuração específica, as sequências-alvo mitossômicas do *Nosema* são homólogas do transportador de ADP/ATP 123 e/ou proteína de transporte de metabólitos mitossômicos TOM 70 e qualquer ou todos os homólogos de transportador de ADP/ATP não mitossômicos, Nc 006, Nc 014 e Nc 017. Sequências primer para produzir agentes de ácido nucléico para silenciar esses genes são detalhadas na Tabela 1.

Tabela 1: Sequências de dsRNA específicas de *Nosema* para selecionar homólogos de transportador de ATP/ADP e

TOM70 e sequências primer usadas para fazê-los

Nome do Primer HOMÓLOGO DE PROTEÍNA DE TRANSPORTADOR DE ADP/ATP	Sequência (SEQ ID NO)
NA7001 T7 Nc006 F	CTAATACGACTCACTATAGGGAGACAGCTAACGAGCCCGTTTC (SEQ ID NO:1)
NA7002 T7 Nc006 R	CTAATACGACTCACTATAGGGAGACCATAGTAATCCATCCACTAC (SEQ ID NO:2)
NA7003 T7 Nc123 F	CTAATACGACTCACTATAGGGAGACTGGTCTTTAACGAATGGAC (SEQ ID NO:3)
NA7004 T7 Nc123 R	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTGGGCACGCTATGGCAAC (SEQ ID NO:4)
NA7005 T7 Nc014 F	CTAATACGACTCACTATAGGGAGACTCCTGGACAGTCCGCTAG (SEQ ID NO:5)
NA7006 T7 Nc014 R	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAATCAGTTGACGGTAAACGG (SEQ ID NO:6)
NA7007 T7 Nc017 F	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCTTGATGGGCTTATCTCC (SEQ ID NO:7)
NA7008 T7 Nc017 R	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCAATGCGATTTCACGG (SEQ ID NO:8)
PROTEINA TOM-70	
NT7009 T7 TOM70 F	CTAATACGACTCACTATAGGGAGACTGAATGTTACAAGCAGATGGG (SEQ ID NO:9)
NT7015 TOM70 R	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAACCAGGAGTATCTGGATGAC (SEQ ID NO:10)

*Observação: As sequências específicas do Nosema estão em fonte normal.

siRNAs de Nosema adequados
5 adicionais podem ser projetados de acordo com sequências de
qualquer sequência do Nosema, por exemplo, as sequências
aqui detalhadas, incluindo, entre outras, TOM70 (por exemplo,
SEQ ID NOS:60-11687), TIM22, TOM40 (por exemplo, SEQ ID NOS: 11688-
19103), Imp2, Hsp70 mitocondrial (por exemplo, SEQ ID NOS: 19104-
10 34511), proteínas transportadoras de ATM1-ABC (por exemplo, SEQ ID
NOS: 34512-80411), Frataxin, Ferredoxina, ERV1 (por exemplo, SEQ ID
NOS: 80412-84803), ferredoxina, NADPH oxido-redutase [FNR] (por
exemplo, SEQ ID NOS:84804-94911, 94912-108140), subunidade α
piruvato desidrogenase (por exemplo, SEQ ID NOS: 108141-116852),
15 subunidade β piruvato desidrogenase (por exemplo, SEQ ID NOS:
116853-125294), glicerol-3-fosfato desidrogenase
mitocondrial (mtG3PDH) (por exemplo, SEQ ID NOS: 125295-

140999), dismutase de superóxido contendo manganês (MnSOD) (por exemplo, SEQ ID NOs: 141000-146687), DNAJ (Hsp70 interagente) (por exemplo, SEQ ID NOs: 146688-157505), Centro de Ferro-Enxofre ISU1, Cisteína desulfurase Nsf1 (por exemplo, SEQ ID NOs: 157506-169079), NAR1 (por exemplo, SEQ ID NOs: 169080-178790), RLI1 (por exemplo, SEQ ID NOs: 178791-195062), NC006 (por exemplo, SEQ ID NOs: 195063-209633, NC123 (por exemplo, SEQ ID NOs: 209634-224609), NC014 (por exemplo, SEQ ID NOs: 224610-239747) e NC017 (por exemplo, SEQ ID NOs: 239748-252698) (ver Tabela 2 abaixo).

10 Tabela 2: Proteínas do *Nosema* adequadas para visar com dsRNA

	Encephalitozoon GenBank (proteína)	<i>Nosema</i> GenBank (proteína)	<i>Nosema</i> GenBank (DNA)/ coordenadas	SEQ ID NO:
TOM70		EEQ82075.1	ACOL01000120 / 8001-9314	SEQ ID NO:27
TIM22	CAD25556.1	-		
TOM40	CAD25408.1	EEQ82411.1	ACOL01000061 / 14217-15062	SEQ ID NO:28
Imp2				
Hsp70 mitocondrial	NP_586360	EEQ81757	ACOL01000228.1 / 4051-5784	SEQ ID NO:29
ATM1-ABC proteínas transportadoras	CAD26030	EEQ82581.1	ACOL01000042 / 1310-3019	SEQ ID NO:30
		EEQ82586.1	ACOL01000042 / 8786-10507	SEQ ID NO:31
		EEQ82587.1	ACOL01000042 / 10905-12638	SEQ ID NO:32
Frataxin	XP_965969	-		
Ferredoxina	NP_585988.1	-		
ERV1	CAD25469	EEQ82883	ACOL01000016 / 5063-5572	SEQ ID NO:33
ferredoxina NADPH oxido- reductase [FNR]	CAD27143	EEQ81930	ACOL01000159 / 6191-7324	SEQ ID NO:34
		EEQ83026	ACOL01000006 / 2688-4190	SEQ ID NO:35

Subunidades piruvato desidrogenase, PDHa e- β	CAD27078	EEQ82465	ACOL01000055 / 12839-13828	SEQ ID NO:36
	CAD25304	EEQ81634	ACOL01000316 / 888-1847	SEQ ID NO:37
glicerol-3-fosfato desidrogenase mitocondrial (mtG3PDH)	CAD25806	EEQ82606	ACOL01000039 / 538-2304	SEQ ID NO:38
dismutase de superóxido contendo manganês (MnSOD)	CAD26018	EEQ82623	ACOL01000038 / 17225-17878	SEQ ID NO:39
DNAJ (Hsp70 interagente)	Q8SRK0	EEQ82425	ACOL01000059 / 6412-7635	SEQ ID NO:40
Centro Ferro- Enxofre ISU1	Q8SSM2	-		
Cisteína desulfurase Nsf1	Q8SQS2	EEQ82825	ACOL01000020 / 5924-7231	SEQ ID NO:41
Proteínas citossólicas Fe/S críticas				
NAR1	NP_597440.1	EEQ82578	ACOL01000043 / 12613-13713	SEQ ID NO:42
RLI1		EEQ83099	ACOL01000003 / 27828-29657	SEQ ID NO:43
Homólogos Transportadores de ATP/ADP				
Nc006		EEQ83030.1	ACOL01000006 / 9068-10708	SEQ ID NO:44
Nc123		EEQ82057.1	ACOL01000123 / 4795-6480	SEQ ID NO:45
Nc014		EEQ82913.1	ACOL01000014 / 4714-6417	SEQ ID NO:46
Nc017		EEQ82872.1	ACOL01000017 / 9811-11271	SEQ ID NO:47

Verifica-se que as sequências de dsRNA visam transcrições de RNA complementares às sequências de DNA do gene-alvo que são expressas no parasita (transcritas no RNA) e que a complementação real que ocorre

nos caminhos de RNAi ocorre depois da redução do dsRNA a fragmentos menores pelas enzimas RNAi.

Múltiplas sequências de Nosema podem ser projetadas para incluir sequências adequadas para
5 produzir siRNAs eficientes contra mais de uma espécie de Nosema. Esses múltiplos dsRNA de Nosema podem ser da variedade longa ou curta e também podem ser combinados com sequências correspondentes a diversas classes de patógenos (por exemplo, sequências virais e/ou bacterianas e/ou
10 fúngicas, etc.). Além disso, podem ser projetadas múltiplas sequências para incluir duas ou mais sequências de dsRNA do mesmo parasita de Nosema.

Deve-se verificar que o agente silenciador de RNA da presente invenção não precisa ficar
15 limitado àquelas moléculas contendo RNA somente, mas abrange ainda nucleotídeos e não nucleotídeos quimicamente modificados.

Em algumas configurações, o agente silenciador de RNA aqui previsto pode ser
20 funcionalmente associado a um peptídeo de penetração celular. Conforme aqui utilizado, um "peptídeo de penetração celular" é um peptídeo que compreende uma sequência de aminoácido curta (cerca de 12-30 resíduos) ou motivo funcional que confere as propriedades de translocação
25 independente de energia (i.e. não endocitótica) associadas ao transporte de complexo permeável pela membrana por meio do plasma e/ou membranas nucleares de uma célula. O peptídeo de penetração celular utilizado no complexo permeável da

membrana da presente invenção compreende, de preferência, pelo menos um resíduo de cisteína não funcional, o qual é livre ou derivatizado para formar um enlace de dissulfeto com um ácido ribonucleico de cadeia dupla que foi modificado para essa ligação. Motivos de aminoácidos representativos que conferem essas propriedades estão relacionados na patente norte-americana n.º 6.348.185, cujo conteúdo é expressamente aqui incorporado por referência. Os peptídeos de penetração celular da presente invenção incluem, de preferência, entre outros, penetratin, transportan, pIsl, TAT(48-60), pVEC, MTS e MAP.

Outro agente capaz de regular de modo descendente o polipeptídeo do Nosema é uma molécula DNazima capaz de clivar especificamente uma transcrição de mRNA ou sequência de DNA do polipeptídeo do Nosema. DNazimas são polinucleotídeos de cadeia simples capazes de clivar sequências-alvo tanto de cadeia simples como de cadeia dupla (Breaker, R.R. e Joyce, G. Chemistry and Biology 1995;2:655; Santoro, S.W. & Joyce, G.F. Proc. Natl, Acad. Sci. USA 1997;94:4262) Foi proposto um modelo geral (o modelo "10-23") para DNazima. DNazimas "10-23" possuem um domínio catalítico de 15 deoxirribonucleotídeos, flanqueados por dois domínios de reconhecimento de substrato de sete a nove desoxirribonucleotídeos cada. Esse tipo de DNazima pode clivar eficientemente seu RNA de substrato nas junções purina:pirimidina (Santoro, S.W. & Joyce, G.F. Proc. Natl, Acad. Sci. USA 199; para rev de DNazimas ver Khachigian, LM [Curr Opin Mol Ther 4:119-21 (2002)]).

Exemplos de construção e amplificação de DNazimas sintéticas, fabricadas, reconhecendo locais de clivagem-alvo de cadeia simples e dupla foram descritos na Patente norte-americana nº 5 6.326.174 de Joyce et al.

A regulação descendente de polipeptídeos do Nosema ou clivagem de RNA do Nosema também pode ser efetuada utilizando um polinucleotídeo antissenso capaz de hibridizar especificamente com uma transcrição de mRNA codificando o polipeptídeo do Nosema ou sequência-alvo de RNA do Nosema. 10

O projeto de moléculas antissenso que pode ser utilizado para a regulação descendente eficiente de um polipeptídeo do Nosema deve ser efetuado enquanto se consideram dois aspectos importantes para abordagem antissenso. O primeiro aspecto é a aplicação do oligonucleotídeo no citoplasma das células apropriadas, enquanto o segundo aspecto é o projeto de um oligonucleotídeo que liga especificamente o mRNA designado ou sequência-alvo de RNA dentro das células de maneira a inibir sua tradução. 15 20

Uma série de estratégias de aplicação que podem ser utilizadas para fornecer eficientemente os oligonucleotídeos em uma ampla variedade de tipos de células foi descrita [ver, por exemplo, Luft J Mol Med 76: 75-6 (1998); Kronenwett et al. Blood 91: 852-62 (1998); Rajur et al. Bioconjug Chem 8: 935-40 (1997); Lavigne et al. Biochem Biophys Res Commun 237: 566-71 (1997) 25

e Aoki et al. (1997) Biochem Biophys Res Commun 231: 540-5 (1997)]. Vários métodos para projetar e prever a eficiência de oligonucleotídeos específicos usando um sistema in vitro também foram publicados (Matveeva et al., Nature 5 Biotechnology 16: 1374 - 1375 (1998)].

Por exemplo, um oligonucleotídeo antissenso adequado direcionado contra mRNA do Nosema seria das sequências complementares às sequências definidas em SEQ ID NOs: 27, 46 e 47.

10 Assim sendo, o consenso atual é que desenvolvimentos recentes no campo da tecnologia antissenso que, conforme descrito acima, levaram à geração de algoritmos de projeto antissenso altamente precisos e a uma ampla variedade de sistemas de aplicação de
15 oligonucleotídeos possibilitam que um técnico comum projete e implemente métodos antissenso adequados para a regulação descendente da expressão de sequências conhecidas sem ter que recorrer a um experimento indevido de tentativa e erro.

Outro agente capaz de regular
20 de modo descendente o polipeptídeo do Nosema é uma molécula ribozima capaz de clivar especificamente uma transcrição de mRNA que codifica um polipeptídeo de Nosema. As ribozimas estão sendo cada vez mais usadas para inibição da expressão gênica específica de sequência pela clivagem de proteínas de
25 codificação de mRNAs de interesse [Welch et al., Curr Opin Biotechnol. 9:486-96 (1998)]. As ribozimas foram identificadas em insetos (Webb et al., Science 2009;326:953), e utilizadas eficientemente para

silenciamento gênico em insetos (Lee et al., FASEB J 2001;15:2390-400).

Um método adicional de regulagem da expressão de um gene de polipeptídeo de Nosema em células é via oligonucleotídeos formadores de tríplex (TFOs). Estudos recentes demonstraram que TFOs podem ser projetados para reconhecer e ligar-se a regiões de polipurina/polipirimidina em DNA de hélice de cadeia simples de maneira específica para a sequência. Essas regras de reconhecimento são descritas por Maher III, L. J., et al., Science, 1989;245:725-730; Moser, H. E., et al., Science, 1987;238:645-630; Beal, P. A., et al., Science, 1992;251:1360-1363; Cooney, M., et al., Science, 1988;241:456-459; e Hogan, M. E., et al., Publicação EP 375408. Uma descrição detalhada do projeto, síntese e administração de TFOs eficientes pode ser encontrada nos Pedidos de Patente norte-americanos n^{os}. 2003 017068 e 2003 0096980 de Froehler et al., e 2002 0128218 e 2002 0123476 de Emanuele et al., e Patente norte-americana n^o. 5,721,138 de Lawn.

RNA, dsRNA, siRNA, ou miRNA da presente invenção podem ser produzidos quimicamente ou enzimaticamente por meio de reações manuais ou automáticas ou in vivo em um organismo. O RNA também pode ser produzido por síntese orgânica parcial ou total. Qualquer ribonucleotídeo modificado pode ser introduzido por síntese enzimática in vitro ou orgânica. O RNA pode ser sintetizado por polimerase de RNA celular ou polimerase de RNA

bacteriofágico (por exemplo, T3, T7, SP6). Caso sintetizado quimicamente ou por síntese enzimática in vitro, o RNA pode ser purificado antes de alimentar ou formulado em um transportador aceitável e fornecido às abelhas na forma de líquido, sólido ou semissólido. Por exemplo, o RNA pode ser purificado a partir de uma mistura por extração com solvente ou resina, precipitação, eletroforese, cromatografia ou uma combinação destes. Alternativamente, o RNA pode ser utilizado sem, ou com purificação mínima para evitar perdas devidas ao processamento da amostra. O RNA pode ser secado para armazenagem ou dissolvido em solução aquosa. A solução pode conter tampões ou sais para promover a têmpera e/ou estabilização das cadeias duplas.

Deve-se verificar que outros mecanismos além do dsRNA para visar homólogos do transportador de ATP/ADP de *Nosema*, ou outras proteínas mitossômicas ou não mitossômicas podem bloquear eficientemente a expressão gênica no parasita e, portanto, reduzir potencialmente os níveis de *Nosema*, a gravidade dos sintomas e o contágio nas abelhas hospedeiras. Quaisquer moléculas capazes de atravessar a membrana das células epiteliais das mucosas da abelha e capazes de romper a expressão ou atividade mitossômica (por exemplo, homólogo de ATP/ADP mitossômico ou TOM) ou não mitossômica (por exemplo, homólogo de ATP/ADP não mitossômico) podem potencialmente entrar no parasita do *Nosema* no estágio intracelular e reduzir os níveis de infecção e gravidade dos sintomas em abelhas hospedeiras infectadas. Exemplos dessas drogas são

pequenas moléculas, peptídeos, enzimas que interagem com os transportadores de ATP-ADP, tais como enzimas de quinase ou fosfatase.

Para transcrição de um transgene in vivo ou de um cassete de expressão, pode ser utilizada uma região reguladora (por exemplo, promotor, acentuassomo, silenciador, líder, íntron e poliadenilação) para modular a transcrição da cadeia de RNA (ou cadeias). Portanto, em uma configuração, é prevista uma construção de ácido nucléico compreendendo o agente de ácido nucléico. A construção de ácido nucléico pode ter sequências de polinucleotídeos construídas para facilitar a transcrição das moléculas de RNA da presente invenção que são ligadas de maneira operável a uma ou mais sequências de promotores funcionais em uma célula de hospedeiro. As sequências de polinucleotídeos podem ser colocadas sob controle de um promotor endógeno normalmente presente no genoma do hospedeiro. As sequências de polinucleotídeos da presente invenção, sob controle de uma sequência de promotor operacionalmente ligado pode ainda ser flanqueada por sequências adicionais que influenciam vantajosamente sua transcrição e/ou estabilidade de uma transcrição resultante. Essas sequências estão geralmente localizadas a montante do promotor e/ou a jusante da ponta 3' da construção da expressão. O termo "ligado de maneira operacional", quando utilizado na referência a uma sequência reguladora e uma sequência de nucleotídeos estruturais, significa que a sequência reguladora provoca a expressão regulada da

sequência dos nucleotídeos estruturais ligados. "Sequências reguladoras" ou "elementos de controle" se referem a sequências de nucleotídeos localizadas a montante, dentro ou a jusante de uma sequência de nucleotídeos estruturais e que
5 influenciam o tempo e nível ou quantidade de transcrição, processamento ou estabilidade de RNA, ou tradução da sequência de nucleotídeos estruturais associados. As sequências reguladoras podem incluir promotores, sequências de líderes de tradução, íntrons, acentuassomos, estruturas
10 stem-loop, sequências de ligação de repressor, sequências de terminação, sequências de pausa, sequências de reconhecimento de poliadenilação e similares.

O agente de ácido nucléico pode ser aplicado nas abelhas de várias maneiras. Conforme aqui
15 detalhado, a alimentação das abelhas é prática comum entre apicultores para suprir as necessidades nutricionais e, também, por exemplo, as necessidades suplementares. Geralmente as abelhas se alimentam de mel e pólen, mas sabe-se que ingerem alimentos não naturais também. As abelhas
20 podem ser alimentadas com várias coisas, incluindo, entre outras, Wheast (um levedo lácteo cultivado no queijo cottage), farinha de soja, levedura (por exemplo, levedura de cerveja, levedura de tórula) e produtos de levedo fornecidos isoladamente ou em combinação e farinha de soja
25 na forma de uma mistura seca ou bolo úmido dentro da colmeia ou como mistura seca em alimentadores abertos fora da colmeia. Também é útil utilizar açúcar ou xarope de açúcar. A adição de 10 a 12 por cento de pólen em um suplemento dado

às abelhas melhora a palatabilidade. O acréscimo de 25 a 30 por cento de pólen melhora a qualidade e a quantidade de nutrientes essenciais para as abelhas manterem sua atividade vital.

5 Cana ou açúcar de beterraba, xarope de milho isomerizado e xarope de açúcar tipo 50 são substitutos satisfatórios do mel na dieta natural das abelhas. Os dois últimos podem ser fornecidos às abelhas apenas na forma líquida.

10 O alimento líquido pode ser fornecido às abelhas dentro da colmeia, por exemplo, por qualquer dos seguintes métodos: balde de topo aberto, favos dentro da câmara de choca, alimentador com quadro de ~~divisão, alimentador boardman, etc.~~ O açúcar seco pode ser

15 fornecido colocando uma libra ou duas na tampa interna invertida. Sempre deve haver abastecimento de água para as abelhas. Em uma configuração, são consideradas painelas ou bandejas nas quais estão presentes apoios flutuantes, tais como lascas de madeira, rolhas ou esponja plástica.

20 Descrições detalhadas do alimento suplementar para abelhas podem ser encontradas, por exemplo, na publicação USDA de Standifer et al., 1977, intitulada "Supplemental Feeding of Honey Bee Colonies" (USDA, Boletim de Informação de Agricultura N° 413).

25 Verifica-se que a dose e o regime de tratamento do agente de ácido nucléico específico de Nosema podem ser melhorados pelo usuário individual de acordo com as subespécies hospedeiras, condições climáticas,

estágio no ciclo de vida do hospedeiro e/ou parasita, condições ambientais do hospedeiro, etc. Por exemplo, o agente de ácido nucléico pode ser fornecido às abelhas constantemente, durante toda a existência das colmeias, ou
5 de acordo com um cronograma predeterminado de alimentação.

Todas as abelhas em uma colmeia são potencialmente suscetíveis às infecções causadas por Nosema aqui detalhadas. Assim sendo, de acordo com algumas configurações, as abelhas podem ser abelhas forrageiras,
10 abelhas de colmeia e similares.

Também está previsto um método para reduzir a suscetibilidade de uma abelha a uma doença provocada por Nosema, o método incluindo alimentar a abelha com uma quantidade eficiente de ácido nucléico ou construção
15 de ácido nucléico compreendendo um agente de ácido nucléico que realiza a regulação descendente da expressão de um polipeptídeo mitossômico e/ou não mitossômico do Nosema e/ou provocar a clivagem e/ou degradação de um RNA mitossômico ou não mitossômico do Nosema. Métodos para reduzir a
20 suscetibilidade de uma colônia de abelhas ou colmeia a infecção por Nosema ou epidemia através da alimentação de oligonucleotídeos e/ou polinucleotídeos são contemplados. Assim sendo, em algumas configurações, a presente invenção pode ser utilizada para beneficiar qualquer número de
25 abelhas, desde algumas na colmeia, até a população inteira de abelhas dentro da colmeia e sua área circundante. Verifica-se que, além da alimentação com oligonucleotídeos e/ou polinucleotídeos para reduzir a infecção e infestação

por Nosema, a aplicação de medidas sanitárias adequadas (por exemplo, não reaproveitar colmeias infestadas) pode aumentar a eficiência do tratamento e prevenção de infecções.

5 Durante a validade de uma patente que resultar deste pedido muitos métodos relevantes para regulação descendente de proteínas do Nosema devem ser desenvolvidos e o escopo do termo "regulação descendente de proteína do Nosema" ou "regulação descendente de polipeptídeo do Nosema" deve incluir todas essas novas
10 tecnologias, a priori.

Conforme aqui utilizado, o termo "ao redor de" se refere a $\pm 10\%$.

Os termos "compreende", "compreendendo", "inclui", "incluindo", "tendo" e seus
15 conjugados significam "incluindo, entre outros". Este termo abrange os termos "consistindo de" e "consistindo essencialmente de".

A frase "consistindo essencialmente de" significa que a composição ou método pode
20 incluir ingredientes e/ou etapas adicionais, mas apenas se os ingredientes e/ou etapas adicionais não alterarem substancialmente as características básicas e novas da composição ou método reivindicado.

Conforme aqui utilizado, a
25 forma singular "um/a" e "o/a" incluem referências ao plural a menos que o contexto indique claramente o contrário. Por exemplo, o termo "um composto" ou "pelo menos um composto" pode incluir uma pluralidade de compostos,

incluindo misturas dos mesmos.

Ao longo de todo este pedido, vários modos de realização desta invenção podem ser apresentados em forma de intervalo. Deve-se compreender que a descrição em forma de intervalo é meramente para fins de conveniência e concisão e não deve ser interpretada como uma limitação inflexível do escopo da invenção. Consequentemente, a descrição de um intervalo deve ser considerada como tendo especificamente descrito todos os subintervalos possíveis, bem como valores numéricos individuais dentro daquele intervalo. Por exemplo, a descrição de um intervalo como de 1 a 6 deve ser considerada como especificamente descrito subintervalos tais como 1 a 3, 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., bem como números individuais dentro daquele intervalo, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 e 6. Isso se aplica independente da amplitude do intervalo.

Sempre que um intervalo numérico for aqui indicado, ele pretende incluir qualquer numeral citado (fracionária ou integral) dentro do intervalo indicado. As frases "variando/varia entre" um primeiro número indicado e um segundo número indicado e "variando/varia a partir de" um primeiro número indicado "até" um segundo número indicado são utilizadas aqui de modo trocável e se destinam a incluir o primeiro e o segundo números indicados e todos os números de fração e integrais entre eles.

Conforme aqui utilizado, o

termo "método" se refere a maneiras, meios, técnicas e procedimentos para realizar uma dada tarefa, incluindo, entre outros, aquelas maneiras, meios, técnicas e procedimentos conhecidos ou prontamente desenvolvidos a
5 partir de maneiras, meios, técnicas e procedimentos conhecidos pelos praticantes das artes químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas e médicas.

Conforme aqui mostrado, o termo "tratar" inclui abolir, substancialmente inibir, diminuir a
10 velocidade ou inverter o progresso de uma condição, substancialmente melhorando os sintomas clínicos ou estéticos de uma condição ou impedindo substancialmente o aparecimento de sintomas clínicos ou estéticos de uma condição.

15 Observa-se que certas características da invenção, que, para fins de clareza, são descritas no contexto de modos de realização separados, também podem ser previstas em combinação em uma configuração única. De maneira inversa, várias características da
20 invenção que são, para fins de concisão, descritas no contexto de um único modo de realização, também podem ser previstas separadamente ou em qualquer subcombinação adequada ou conforme adequado em qualquer outra configuração da invenção descrita. Certas características descritas no
25 contexto de vários modos de realização não devem ser consideradas características essenciais desses modos de realização, a menos que o modo de realização não funcione sem esses elementos.

Vários modos de realização e aspectos da presente invenção, conforme descritos acima e reivindicados nas reivindicações abaixo, encontram apoio experimental nos seguintes exemplos.

5 EXEMPLOS

Agora é feita referência aos seguintes exemplos que juntamente com as descrições acima, ilustram algumas configurações da invenção sem limitação.

Materiais e Métodos

10 PROTOCOLO DA CAIXA PLÁSTICA

Regime Experimental

As abelhas foram introduzidas em caixas (30-35 abelhas em cada caixa) no dia de estudo 0 e colocadas em uma sala mantida em temperatura constante de 25
15 °C, 70% de umidade relativa e ciclo de 12 horas de luz/escuro.

Abelhas enfermeiras foram coletadas da entrada de uma colônia de abelhas que foi anteriormente verificada e na qual não foi detectado N.
20 cerana nas abelhas forrageiras mais velhas. As abelhas foram colocadas no frio por vários minutos para reduzir a atividade. Subsequentemente, 30-35 abelhas foram transferidas para cada caixa. As abelhas foram observadas durante os 2 primeiros dias para determinar a estabilidade
25 nas caixas (ou seja, sem alterações visíveis da população). No dia do estudo 3, foi iniciada a alimentação diária dos grupos de tratamento. Foram acrescentadas as quantidades indicadas de todos os componentes do tratamento em uma

solução de 66% de açúcar. Todas as caixas foram então monitoradas para verificar a sobrevivência das abelhas por até mais 21 dias.

As caixas foram então alocadas aleatoriamente e igualmente para cada grupo de tratamento.

As abelhas nas caixas foram alimentadas com um xarope de sacarose via tubo capilar selado na extremidade superior, evitando assim que escorresse e possibilitando o fornecimento de alimento conforme a demanda. Um tubo capilar de alimentação foi colocado em cada caixa.

Aclimação e critérios de inclusão

As capilaridades de alimentação foram cheias com 1,5 mililitro da solução de 66% de sacarose (w/v) e colocadas nas caixas (uma em cada caixa). As abelhas foram então deixadas em um período de aclimação por 2 dias. Durante o período de aclimação - quaisquer abelhas mortas no processo de coleta inicial foram substituídas por abelhas novas. No final dos 2 dias, apenas as caixas nas quais as abelhas melíferas consumiram a solução de sacarose foram incluídas no experimento.

Grupos de Tratamento

Infectedas não tratadas (controle): Alimentadas com solução de 66% w/v de sacarose, então infectadas com *Nosema Cerana* norte-americana (>100.000 por abelha), no dia do estudo 5. As abelhas foram subsequentemente alimentadas com 50 microlitros por abelha de solução de 66% de sacarose por mais 12-14 dias.

Grupo de Tratamento (todas as quatro sequências de dsRNA de transportador de ATP/ADP): Alimentadas com solução regular de 66% w/v de sacarose, então infectadas com *Nosema Cerana* norte-americana (>100.000 por abelha), 10 dias ou 3 dias após a aclimatação. As abelhas foram subsequentemente alimentadas com 50 microlitros por abelha de solução de 66% de sacarose por mais 12-14 dias, contendo 20ug/ml de cada um dos 4 dsRNA de sequência do transportador de ATP/ADP de *Nosema* (complementares às sequências definidas em SEQ ID NOs. 55-58)

Métodos de avaliação

Inspeção Visual - Taxa de Sobrevivência no final do experimento

15 Após a administração das soluções de tratamento nas caixas de abelhas no dia do estudo 3, todos os dias as abelhas em cada caixa forem inspecionadas visualmente e contado o número de abelhas mortas em cada caixa.

20 Níveis de Apetite- Resposta de Extensão de Proboscídeo

As abelhas infectadas com *Nosema* mostraram maior nível de apetite que é tipificado por uma maior resposta ao açúcar. Especificamente, as abelhas infectadas com *Nosema* mostraram nível limite menor de resposta ao açúcar em um ensaio de Reflexo de Extensão de Proboscídeo.

No final do sistema de alimentação nas caixas ou minicolmeias, as abelhas foram

colocadas por 5 minutos em um freezer, capturadas individualmente e colocadas individualmente em um tubo de vidro e resfriadas em gelo até que ficassem imóveis. Então foram amarradas em um canudo plástico com 4,5 cm de comprimento com uma pequena tira de fita no tórax. O teste começou 45 minutos após a última abelha ser amarrada para que as abelhas se aclimassem e 24 abelhas foram testadas de cada vez. A antena da abelha amarrada foi tocada com uma gota de sacarose e a resposta de extensão de proboscídeo [resposta é extensão completa de proboscídeo - uma Resposta de Extensão de Proboscídeo (PER)] - registrada. Cada abelha é testada para PER com uma série de concentração de 0,1%, 0,3%, 1%, 3%, 10%, e 30% de solução de sacarose por peso. Entre cada duas concentrações sucessivas, as antenas foram tocadas com água para controlar a possível sensibilização causada pela estimulação repetida.

Números de esporos de Nosema

Todos os dias, todas as abelhas mortas eram retiradas de cada caixa, agrupadas de acordo com o tratamento e a contagem de esporos totais de nosema foi feita com 100 microlitros de água por abelha esmagada. As contagens de nosema foram realizadas essencialmente conforme descrito anteriormente por Cantwell et al: Em resumo, os abdomens das abelhas foram triturados em um pilão de vidro, misturados vigorosamente com 1,5-2,0 ml de água e amostrados (10 μ l) em um hemacitômetro para contagem. O número total de Nosema no microscópico foi contado para 16 pequenos quadrados (ou um quadrado grande). O número médio de esporos

número de cópia arbitrária de mRNA arbitrário de um gene constitutivo de *Nosema ceranae* (por exemplo, tubulina ou actina). Valores de erro médio e padrão foram calculados para cada amostra e conjuntos de repetições, de acordo com o
5 projeto experimental.

Os valores de cada tratamento foram caracterizados como a expressão relativa do tratamento de controle no dia do estudo 0 e receberam o nível de expressão de 100%. Valores de erro médio e padrão foram
10 calculados para cada amostra e conjuntos de repetições, de acordo com o projeto experimental e análise estatística padrão. Os fragmentos desejados foram transcritos de maneira inversa e amplificados a partir de RNA isolado de abelhas infectadas por *Nosema*. Os plasmídeos pLUG foram gerados
15 usando o kit de vetor de clonagem pLUG(R)-Multi TA da iNTRON Biotechnology (Gyeonggi-do, Coreia), de acordo com o protocolo do fabricante. Os fragmentos amplificados de RT foram ligados a plasmídeos e os plasmídeos ligados transformados em células competentes de *E. coli* Top 10,
20 usando transformação por choque térmico. As células competentes Top10 foram incubadas em placas de ágar LB contendo 200ug/ml de Ampicilina e reagente de seleção azul/branco. As colônias que cresceram e tiveram resultado positivo no teste de presença do inserto usando amplificação
25 de PCR com o primer adiante do inserto desejado e primer para trás do plasmídeo pLUG. Colônias com resultado positivo foram cultivadas em meio LB suplementado com 200ug/ml de ampicilina. Os plasmídeos pLUG foram purificados das células

top10 E.Coli usando o mini conjunto de plasmídeo de alta velocidade IBI (IBI Scientific, IOWA, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante.

Protocolo de PCR em tempo real

- 5 1. Extração de RNA do estômago de pelo menos 3 abelhas usando peqGOLD Trifast, (Peqlab, Delaware, EUA)
2. 8ul da amostra de RNA foram removidos e diluídos em um volume total de 10ul, para tratamento DNase I, 30 min
10 a 37°C. (o restante foi guardado a -70°C para uso futuro).
3. 2ul do RNA para tratamento DNase foram diluídos em 1:5 e utilizados como modelo para reação RT PCR.
4. Foi utilizado o KIT AB HIGH CAPACITY cDNA RT 200RXN + 2
15 x RNase INHIBITOR (Applied Biosystems, California, EUA, cat:4374966). O cDNA foi diluído em 1:5 até um volume final de 100ml usando o Nuclease Free ddH2O e guardado até o uso a -20°C.
5. Durante a reação qPCR foi utilizado AB POWER SYBR GREEN
20 PCR MIX 5ML (Applied Biosystems, California, EUA cat: 4367659) de acordo com o seguinte protocolo:

Componente	Conc.Final	Volume (µl)
Power SYBR Green PCR Master Mix (2X)	1x	7.5
Primer Adiante (10uM)	500nm	0.5
Primer Para Trás (10uM)	500nm	0.5
Modelo	1-100ng	2
Água		4.5
Total		15

Primers

NOME	Alvo	Orientação	Sequência (SEQ ID NO)
B90111	Actina da Abelha	Adiante	AGGAATGGAAGCTTGCGGTA (SEQ ID NO: 11)
B90121	Actina da Abelha	Para trás	AATTTTCATGGTGGATGGTGC (SEQ ID NO: 12)
Ntub7025	Tubulina do Nosema C.	Adiante	AGAACCAGGAACGATGGAGA (SEQ ID NO: 13)
Ntub7026	Tubulina do Nosema C.	Para trás	TCCTTGCAAACAATCTGCAC (SEQ ID NO: 14)
NA70011	Nc006 F	Adiante	CACCTGAAAACAACCTACCTAC (SEQ ID NO: 15)
NA70021	Nc006 R	Para trás	GTATCTTGCCCTTACCATCAC (SEQ ID NO: 16)
NA70031a	Nc123 F	Adiante	GGaAAAGATGAGAATATGGAAGAAG (SEQ ID NO: 17)
NA70041b	Nc123 R	Para trás	CCAGTTACCCTTGTTGTGTAGG (SEQ ID NO: 18)

Todas as reações foram realizadas de acordo com um protocolo térmico que consiste de 5 minutos a 95°C, então 40 ciclos do protocolo de quatro etapas consistindo de 94 °C 20 segundos, 60°C 30 segundos, 5 72°C 1 minuto e 78°C 20 segundos. A fluorescência foi monitorada repetidas vezes durante a etapa de 78°C, a fim de reduzir a fluorescência dos artefatos de primer.

EXPERIMENTOS EM MINICOLMEIA

As abelhas foram introduzidas em minicolmeias (300 abelhas em cada colmeia) no dia do estudo 0.

As abelhas enfermeiras foram recolhidas de dentro da colônia de abelhas que foi anteriormente verificada e constatado não ter *N.cerana*. As abelhas foram transferidas para cada minicolmeia contendo uma rainha em uma gaiola, aproximadamente 300 abelhas em cada minicolmeia, 15 5 gramas de bolo de proteína e 5 gramas de bala.

As abelhas foram observadas durante os 2 primeiros dias para determinar a estabilidade nas minicolmeias (ou seja, sem alterações drásticas na população). No dia 3 do estudo, foi iniciada a alimentação 20

diária com xarope de sacarose de acordo com os grupos de tratamento.

1. Infectadas não tratadas: As abelhas foram alimentadas com 15 ml por colmeia (50 μ l por abelha) por dia com
5 solução de 66% de sacarose.
2. Grupo de tratamento. As abelhas foram alimentadas com 15 ml por colmeia (50 μ l por abelha) por dia com solução de 66% de sacarose suplementada com dsRNA mitossômico e/ou não mitossômico de Nosema.

10 Todas as minicolmeias foram monitoradas até que tivesse início a colocação de ovos pela rainha. Apenas as colmeias que aceitaram a nova rainha, fizeram os tratamentos com xarope e nas quais a rainha havia iniciado a postura de ovos foram incluídas no experimento.

15 As caixas de minicolmeias são colocadas em uma sala mantida a uma temperatura constante de 30°C e em escuridão constante. O xarope de sacarose com ou sem tratamento é alimentado via prato Petri colocado no fundo da minicolmeia.

20 Após a administração das soluções de tratamento nas minicolmeias de abelhas no dia do estudo 3, todos os dias as abelhas em cada caixa foram inspecionadas visualmente para assegurar a estabilidade do sistema. Em todas as minicolmeias, as rainhas colocaram ovos
25 conforme necessário para os critérios de inclusão. No dia 10, quando as abelhas foram infectadas com *Nosema cerana* (aproximadamente 100.000 esporos por abelha), uma vez ao dia foram tiradas fotografias para registrar a sobrevida em

ambos os lados de cada favo. O número de abelhas em cada minicolmeia foi calculado contando as abelhas na tela de ambos os lados do favo simples na minicolmeia.

Efeito Diferencial de sequências de dsRNA do transportador de ATP/ADP nos níveis de transcrição gênica de PCR em tempo real

Verificou-se que as abelhas enfermeiras coletadas de uma colmeia não apresentavam *N. cerana*. Configuração conforme descrito acima.

10 Foram definidos cinco grupos de tratamento, três colmeias de 30 abelhas por grupo, num total de 90 abelhas por grupo. Foi incluído um total de 15 minicolmeias. A alocação para os grupos de tratamento foi feita arbitrariamente no dia 0. A alimentação diária foi com 15 50 microlitros por abelha de solução de 66% w/v de sacarose com 1 micrograma por abelha cada dsRNA de transportadores de ATP/ADP. A infecção com *Nosema* foi iniciada no dia 3. Os cinco grupos de tratamento eram:

1. Controle, Não tratadas, Infectadas
- 20 2. Infectadas+ NC006 dsRNA (complementar à SEQ ID NO:55) somente
3. Infectadas+NC123 dsRNA (complementar à SEQ ID NO: 56) somente
4. Infectadas+NC006 dsRNA +NC123 dsRNA (complementar à SEQ ID NO: e complementar à SEQ ID NO: 56)
- 25 5. Infectadas + dsRNA de cada um dos quatro transportadores de N.C. de ATP/ADP (complementar a cada SEQ ID NOs: 55-58)

As caixas plásticas foram colocadas em uma sala mantida a uma temperatura constante de 25°C, 70% de Umidade Relativa e ciclo de 12 horas de luz/escuridão. A alimentação foi conforme descrito para o protocolo da Caixa de Abelhas acima.

As abelhas vivas foram coletadas no dia 0 e no dia 13 após a infecção. De cada caixa, as abelhas foram reunidas em grupos de 3 abelhas (grupos de 3x3 por colmeia, num total de 9 amostras de cada tratamento) e RNA foi extraído separadamente para cada grupo, conforme descrito acima.

Exemplo 1: Homólogos do genoma do *Nosema ceranae* das proteínas do transportador de ATP/ADP encontradas no *Encephalitozoon cuniculi*

O genoma *N. cerana* foi publicado. A Figura 1 mostra um alinhamento de sequência entre as proteínas mitossômicas e não mitossômicas de transportador de ATP encontradas no *Encephalitozoon cuniculi* e quatro homólogos identificados no *N. cerana*;

Exemplo 2: dsRNA visando homólogos de transportador de ATP/ADP mitossômicos e não mitossômicos do *Nosema* reduz as contagens de esporos de *Nosema* e a mortalidade causada por infecção.

Considerando que o *Nosema* raramente reduz a expectativa de vida das abelhas enfermeiras em experimentos na caixa devido à alimentação das abelhas ad-libitum (não mostrada), os indicadores de expectativa de vida reduzida são obtidos melhor em um

ambiente de colmeia. Em nossos experimentos na caixa, não foi observada diferença na expectativa de vida das forrageiras dentro do período de tempo do experimento. Quando a expectativa de vida das abelhas foi avaliada no ambiente de minicolmeia mais natural (figura 2), ficou claramente evidente que as abelhas em colmeias não tratadas sucumbem mais cedo à infecção por *Nosema* em relação às abelhas de colmeias alimentadas com dsRNA visando 4 homólogos de transportador de ATP/ADP mitossômicos e não mitossômicos de *Nosema* (NC123, NC006, NC014 e NC017).

A fim de determinar a eficiência da alimentação de dsRNA na prevenção de infecção causada por *Nosema*, foram determinados níveis de parasita em abelhas mortas de amostras infectadas por *Nosema*. Em todos os experimentos com caixa e minicolmeia dos 7 dias pós-infecção até 15 dias pós-infecção (as abelhas nas quais não foram detectados parasitas no microscópio foram excluídas), a contagem de níveis de parasitas mostrou claramente que as abelhas alimentadas com dsRNA dos 4 homólogos de transportador de ATP/ADP de *Nosema cerana* tiveram uma contagem três vezes menor em comparação aos controles não tratados (figura 3) (N=75 amostras $p < 0.0001$).

Exemplo 3: dsRNA visando homólogos de transportador de ATP/ADP mitossômicos e não mitossômicos do *Nosema* reduz o apetite (Resposta de Extensão de Proboscídeo) de abelhas infectadas com *Nosema cerana*

Para determinar se a alimentação com dsRNA específico para ATP/ADP mitossômico e

não mitossômico do *N. cerana* reduz o estresse energético em abelhas após infecção por *N. cerana*, o Reflexo de Extensão de Proboscídeo (PER), um indicador de apetite, foi testado em abelhas tratadas e de controle.

5 O estresse metabólico após infecção por *N. cerana* em abelhas se manifesta em maior resposta a concentrações de sacarose muito baixas, com PER em baixa (<1%) a sacarose sendo mensuravelmente aumentada nas abelhas infectadas. A Figura 4 mostra que a alimentação
10 com dsRNA específico para ATP/ADP mitossômicos e não mitossômicos de *N. cerana* aumenta o limite de resposta das abelhas tratadas, em comparação ao das abelhas não tratadas. Embora em concentração de sacarose mais alta (10-30%) e em
médica concentração de sacarose (1-3%) a diferença
15 discernível não fosse estatisticamente significativa, em concentrações menores (0,1-0,3%), a diferença de resposta foi significativa ($p < 0.03$ N respostas=330), indicando menor estresse metabólico (por exemplo, apetite) nas abelhas alimentadas com dsRNA específico de ortólogo de
20 transportador de ATP/ADP mitossômico e não mitossômico de *N. cerana*. Embora não se deseje ficar limitado a uma única hipótese, uma explicação seria que o silenciamento dos homólogos de transporte de ATP/ADP mitossômicos e não mitossômicos de *N. cerana* possui um efeito direto sobre o
25 esgotamento de energia provocado pela infecção por *N. cerana* (total de respostas=1000).

Além disso, quando as contagens de *Nosema* foram realizadas para abelhas tratadas e de

controle que participaram do bioensaio (PER), não foi distinguida diferença significativa nos níveis de infestação de abelhas por parasitas nos diferentes grupos (resultados não mostrados). Embora não se deseje ficar limitado a uma única hipótese, uma explicação seria que o tratamento das abelhas com dsRNA específico de Nosema não só age para eliminar a infestação por parasita, como enfraquece a virulência e/ou carga metabólica da infecção por parasita, aumentando a sobrevivência até mesmo entre as abelhas infectadas. Isso também é confirmado pela observação de que nos experimentos em minicolmeia, controles não tratados, verificou-se que a população de abelhas caiu em mais de um terço após a infecção com Nosema e nenhuma das abelhas vivas tinha Nosema aparente. Sem ficar limitado a uma explicação, isso pode se dever à mortalidade mais rápida das abelhas infectadas.

Exemplo 4: dsRNA visando homólogos de transportador de ATP/ADP mitossômicos e não mitossômicos do Nosema reduz eficientemente os níveis de transcrição dos homólogos de transportador de ATP/ADP visados

A fim de determinar se a alimentação das abelhas com dsRNA de homólogos de transportador de ATP/ADP mitossômicos e não mitossômicos de Nosema resulta em um efeito específico sobre a expressão dos genes visados e não em uma alteração generalizada do metabolismo e/ou expressão gênica do Nosema, os níveis de transcrição de genes visados específicos em abelhas infectadas foram avaliados por PCR em tempo Real e

padronizados contra a expressão gênica constituinte (tubulina de *Nosema*).

A Figura 5 ilustra o efeito da alimentação de abelhas com dsRNA de homólogos de transportador de ATP/ADP mitossômicos e não mitossômicos de *Nosema* sobre os níveis de transcrição das proteínas mitossômicas específicas de *Nosema* (Nc123, SEQ ID NO: 19). A alimentação com dsRNA de homólogos de transportador de ATP/ADP mitossômicos de *Nosema* Nc006 ("tratamento NC006") não reduziu a expressão de homólogo de transportador de ATP/ADP mitossômico e não mitossômico Nc123. Alimentar as abelhas com dsRNA de homólogo de transportador de ATP/ADP mitossômico de *Nosema* Nc123 (complementar à sequência definida em SEQ ID NO: 56) isoladamente ("Tratamento NC123"), ou em combinação com um (Tratamento "NC6+NC123) ou mais ("Tratamento R.N.") outros homólogos de transportador de ATP/ADP mitossômicos e não mitossômicos de *Nosema* (Nc006 complementar à sequência definida em SEQ ID NO: 55, Nc014, complementar à sequência definida em SEQ ID NO: 57 e Nc017, complementar à sequência definida em SEQ ID NO: 58) resultou consistentemente em silenciamento específico de 60-70% da expressão gênica Nc123 de homólogo de transportador de ATP/ADP mitossômico de *Nosema*. Assim sendo, o silenciamento de genes de *Nosema* alimentando as abelhas com dsRNA de proteínas mitossômicas e não mitossômicas de *Nosema* resulta em silenciamento eficiente e específico da transcrição da expressão gênica de *Nosema*-alvo.

Exemplo 5: Aumento sinérgico de sobrevivência após infecção por *Nosema* alimentando com dsRNA visando proteínas mitossômicas e não mitossômicas de *Nosema*

A fim de determinar o efeito do silenciamento de homólogos individuais mitossômicos e não mitossômicos de *Nosema* relacionados à energia com dsRNA sobre a resistência da abelha a infecção por *Nosema*, foi monitorada a sobrevivência das abelhas em minicolmeias depois de alimentadas com uma variedade de dsRNAs de homólogos mitossômicos e não mitossômicos de *Nosema* relacionados a energia.

A Figura 6 ilustra que a alimentação dsRNA de alguns, porém nem todos os homólogos mitossômicos e não mitossômicos de *Nosema* relacionados a energia testados resultou em uma melhora significativa da sobrevivência das abelhas tratadas após infecção com *Nosema* [ver, por exemplo, "nc14" (complementar à sequência definida em SEQ ID NO: 57) e "tom70" (complementar à sequência definida em SEQ ID NO: 59) comparado a "nc17" (complementar à sequência definida em SEQ ID NO: 58) ou "nc123" (complementar à sequência definida em SEQ ID NO: 56)]. Alimentar as abelhas com dsRNA combinado de mais de um ortólogo relacionado a energia mitossômico e não mitossômico de *Nosema* também nem sempre foi igualmente eficiente - dsRNA de homólogos de transportador de ATP/ADP mitossômicos e não mitossômicos de *Nosema* combinados e o ortólogo TOM-70 mitossômico ("REN+tom70") foi significativamente mais eficiente em melhorar a sobrevivência do que os homólogos de

transportador de ATP/ADP mitossômicos e não mitossômicos de Nosema sozinhos ("REN"). A Figura 7 ilustra a maior sobrevida de abelhas alimentadas com dsRNA de homólogos de transportador de ATP/ADP mitossômicos e não mitossômicos de 5 Nosema combinados e ortólogo TOM-70 mitossômico ("REN+tom70") foi significativa para a duração inteira do estudo.

Alimentar as abelhas com uma combinação de dsRNA de homólogos de transportador de ATP/ADP não mitossômicos de Nosema nc014 e nc017 e o ortólogo TOM-70 10 mitossômico foi eficiente no aumento da sobrevida em experimentos na minicolmeia (figura 8). Embora a população de abelhas alimentadas com sacarose apenas ("S.O.") tenha caído mais de um terço no dia 20 após a infecção, a 15 sobrevida das abelhas alimentadas com a combinação de dsRNA para homólogos de transportador de ATP/ADP de Nosema nc014 e nc017 com dsRNA para Nosema TOM-70 ("TOM 70+NC14+NC17") permaneceu alta ao longo de toda a duração do estudo.

As contagens de esporos de 20 abelhas vivas tratadas com dsRNA combinado para homólogos de transportador de ATP/ADP de Nosema nc014 e nc017 com dsRNA para TOM-70 ("TOM 70+NC14+NC17") (figura 9) e abelhas de controle vivas ("S.O.") (figura 10) levadas ao término do estudo de minicolmeia (dia 20) indicam quase ausência de 25 infecção por Nosema nas abelhas de controle vivas, enquanto altos níveis de infecção por Nosema foram detectados nas abelhas vivas alimentadas com dsRNA. Embora não se queira ficar limitado a uma única hipótese, isso pode ser explicado

pelo fenômeno de alta suscetibilidade à mortalidade por infecção de *Nosema* nas abelhas não tratadas, deixando apenas as abelhas não infectadas vivas nas colmeias, enquanto nas abelhas alimentadas com dsRNA de *nosema* melhorou a resistên-
5 cência aos efeitos da infecção por parasita resultando em menor mortalidade e maior sobrevivência entre as abelhas infectadas.

A resistên-
cência das abelhas a infecção por *Nosema* também foi testada alimentando com
10 dsRNAs de homólogos mitossômicos e não mitossômicos de *Nosema* relacionados a energia antes da infecção com parasita e monitoramento da sobrevivência das abelhas no protocolo da caixa (alimentação contínua) após a infecção. A Figura 11
ilustra a sobrevivência superior, mais de 2 semanas, das abelhas
15 alimentadas com dsRNA de homólogos de transportador de ATP/ADP mitossômicos e não mitossômicos de *Nosema* combinados (nc123, nc006, nc014 e nc017) e o ortólogo mitossômico TOM-70 (REN+TOM 70, "Tratamento C"), comparadas às abelhas infectadas ("Tratamento B") e, mesmo nas abelhas não
20 infectadas ("Tratamento A"), as abelhas alimentadas com sacarose somente.

Assim sendo, os resultados aqui incluídos indicam claramente que o silenciamento gênico ao alimentar as abelhas com dsRNA de algumas, porém nem todas
25 as proteínas mitossômicas e não mitossômicas de *Nosema* associadas ao metabolismo de energia, tal como transportador de ATP/ADP e homólogos de TOM-70, pode reduzir eficientemente a infecção e a virulência por *Nosema*,

aumentando a sobrevida geral e aumentando especificamente a sobrevida das abelhas infectadas por Nosema. Embora a invenção tenha sido descrita em conjunto com modos de realização específicos da mesma, é evidente que muitas alternativas, modificações e variações ficarão claras para os técnicos no assunto. Conseqüentemente, pretende-se abranger todas essas alternativas, modificações e variações que se enquadram no espírito e amplo escopo das reivindicações anexas.

10 Todas as publicações, patentes e pedidos de patente mencionadas neste relatório são aqui incorporadas em sua integralidade por referência, como se cada publicação, patente ou pedido de patente individual fosse específica e individualmente indicada para ser aqui
15 incorporada por referência. Além disso, a menção ou identificação de qualquer referência neste pedido não deve ser interpretada como admissão de que essa referência está disponível como anterioridade à presente invenção. Quando utilizados títulos em determinados trechos, os mesmos não
20 devem ser interpretados necessariamente como limitação.

Referências Citadas

- Akiyoshi et al.,, 2009 PloS Patholog;5:1000261
Burri et al., 2006 PNAS;103:15916-20
Chen et al., 2009 Genome Biol Evol. 2009:165-75
25 Cornman, R.S. et al.,, 2009, PLoS Pathogens5(6)
Gill and Fast, 2007 BMC Mol. Biol;8:24
Katinka et al.,, 2001 Nature;414:450-53
Malhota et al., 2002 Mol Microbiol. 45:1245-54

- Maori et al., 2009 Insect Mol Biol 18:5-60
- Mayack and Daug 2009 J. Invertebr Pathol. 100(3):185-8
- Nakayashiki, et al., 2006 Mol Evol 63:127-135
- Peyretaillade et al.,, 1998, NAR;26:3513-20
- 5 Price and Gatehouse 2008. Trends in Biotechnology 26:393-400
- Siomi H and Siomi M 2009. Nature 457:396-404
- Slamovits et al., 2004 Curr Biol;14:891-96.
- Taylor et al., 2008 Biochem J. 409:563-69
- Tsaousis et al., Nature 453, 553-556;
- 10 Ulla et al., 2004 Cellular Microb. 6:509-19
- vanEngelsdorp et al., PLoS Aug 2009
- Williams et al.,, 2008 BMC Genomics ;9:200.

Legenda da Figura

Figura 11

- 15 A) Efeitos do dsRNA contendo transportadores TOM70 e 4ATP na longevidade da abelha.

REIVINDICAÇÕES

1. "AGENTE DO ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO", caracterizado por compreender uma sequência de que desregula a expressão de um produto gênico de um parasita
5 Nosema.

2. "AGENTE DO ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido dsRNA ser selecionado a partir de um grupo consistido de siRNA, shRNA e miRNA.

10 3. "CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO", caracterizada por compreender uma sequência de ácido nucleico que codifica o agente do ácido nucleico isolado, de acordo com a reivindicação 1

15 4. "AGENTE DO ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a referida sequência de ácido nucleico ter mais que 15 pares de base de comprimento.

20 5. "AGENTE DO ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO", de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por a referida sequência de ácido nucleico ter mais que 30 pares de base de comprimento.

25 6. "AGENTE DO ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO", de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-2 e 4-5, caracterizado por o referido parasita Nosema ser o N. cerana ou N. apis.

7. "AGENTE DO ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO", de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-2 e 4-6, caracterizado por o referido parasita Nosema ser o N.

cerana e o referido polipeptídeo Nosema ser uma proteína mitossoma de Nosema.

8. "AGENTE DO ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO", de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-2 e 4-6, caracterizado por o referido parasita Nosema ser o N. cerana e o referido polipeptídeo Nosema ser uma proteína transportadora de ATP/ADP de Nosema ou homólogo da mesma.

9. "ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO", de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por a referida proteína transportadora de ATP/ADP ou homólogo da mesma ser selecionado do grupo consistindo de proteínas codificadas pelos N^os de ID de SEQ: 44, 45, 46 e 47.

10. "AGENTE DO ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido agente do ácido nucleico isolado compreender pelo menos duas sequências não contíguas de ácido nucleico de dupla fita de RNA específico para Nosema, pelo menos uma proteína transportadora de ATP/ADP ou homólogo da mesma e pelo menos uma proteína mitossoma de Nosema.

11. "AGENTE DO ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO", de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por as referidas sequências de ácido nucleico compreenderem pelo menos uma sequência de ácido nucleico complementar à sequência estabelecida no N^o de ID de SEQ: 59 e pelo menos uma sequência de ácido nucleico complementar à sequência estabelecida nos N^os de ID de SEQ: 57 ou 58.

12. "ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO", de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por as

Nosema EEQ82057.1 (1) -MIERG-IMEKIKN--LLTEDEVEAEANSR-RGILSIFRIAKVERRMFVLMITLMF
 Nosema EEQ82872.1 (1) -----MTKTKKFKPKVKILLSLTF
 Nosema EEQ82913.1 (1) MSVDNSKVLQNNENSALPTEDEIEYEASNG-SGIYSLIRVAKVERKMFWIMAAMF
 Nosema EEQ83030.1 (1) -MSVINET---PENNLPTDEIDQLANSR-TGLLSYFKVAKVEMPKFFILGIMF
 Enc. SEQ1 (1) -MNEVENNNHSPREDIPTEDEIEEEEANSR-QGILRYFRVARAEYTKFALLGLMF
 Enc. SEQ2 (1) -MSEIGSSVPVNENRPLLTEDEVEAQANSSTVWPLSRIRVARCEWKLWGLAIF
 Enc. SEQ3 (1) -MSTFQLSASSKDSYLFRTTEEELEEEVYK-TGFFKHIRVARNEWPRVLYLSLFF
 Enc. SEQ4 (1) -MSENREIDATDRDKTFDKKLRPHVYSS---VAGGMRSTSGDTKAVLLFSLFF
 56 110
 Nosema EEQ82057.1 (51) SLISFIYSVGRVTKDAAVLSRQMPLSINCLKSEVILPVTLCVGLIQKSTLSYSF
 Nosema EEQ82872.1 (19) LMACVINTLLEFYREIVMTKQIPSSLYYIKLFFSLPICLMMSYVQKALNVYSI
 Nosema EEQ82913.1 (55) FIISFIYSVARVTKDAAVIGKQLPASIFFLKFVILPFSFISVGIQKALDKYPF
 Nosema EEQ83030.1 (50) GLINFVYSFLRILKDLFVMVRQDQNSIMFMKIFVYLPISFASVILIQWLMQNKPV
 Enc. SEQ1 (54) GIIGFIYSFMRILKDMFVMVRQEPPTILFIKIFYILPVSMAVFLIQYMLGKTKV
 Enc. SEQ2 (55) GASAYIYSFSRVMKDSFVLSRQLPIAISFLKTCFVLPISVIVIGIVQKLLVTRHI
 Enc. SEQ3 (109) GVTIMVHTIMGNLREMVLMGRQDPMSEFFIKSIFLPPCSLLFIWAIQLGLSLFTP
 Enc. SEQ4 (52) ALLSYIDAFLYVLGDMVMMINTQMPSSILFIKSVLVLPMTHFFIVIVQKGLRYLSQ
 111 165
 Nosema EEQ82057.1 (106) TKIFDGALLIFAFYIILGLVLLPYSHLFQLDSEYFRDLFSDGKCVVRGYDALLS
 Nosema EEQ82872.1 (74) LSVNFIHFGFIGIFLIGSLLIPFEYKIQKGSQWALDIFCDGKMSVRSMLMGLSP
 Nosema EEQ82913.1 (110) TKIFDVTLIVFAVAITILGSLLPFSDYIQIPFWAKDIFADGKAVARSTDFLFS
 Nosema EEQ83030.1 (105) SSIFNLFIIFTAFFFGGLGAIFL-FEEKVTPSSFLFRDIFADNKGALGLNFIKY
 Enc. SEQ1 (109) SRIFSIFCGGFASLFFLCGAVFL-IEEQVSPSKFLFRDMFIDGKMSSRSLSNVEKS
 Enc. SEQ2 (110) SKVFDYTLIAFSFLYLLIGMVLPLFAEKIQGLYFSRDIFADDKMAYKGFELFA
 Enc. SEQ3 (109) SKMFDITLILFSGCYLIFGLVVWPLKGYIKDFYWSRDIFGDGKMESLRIHFLYP
 Enc. SEQ4 (107) PRMLEVILHSSVFFLLFGFVIWVYCKRQLQPDFFWSRDIFSDGKMKTRHLDFFFP
 166 220
 Nosema EEQ82057.1 (161) LALVFNEWTSSLVYIVSEMFGNLVLSYFLLTFANSLTPGQSARFIFLYVFSNI
 Nosema EEQ82872.1 (129) FLYMYSEWISTLCYILSELWSTLVVGFALYALANHACTEDEMKEIVPNFSIITAI
 Nosema EEQ82913.1 (165) IALVFNEWTSSAIYVLSSEMFGSLLSYLFMTFANGLSTPGQSARFVPLFYVGSNL
 Nosema EEQ83030.1 (159) FLITANEPVSTCIFIEMWGSLLMAYLYMSFLNESCTIRQFTRFLPPFYAIANL
 Enc. SEQ1 (163) MFLTLNEPLATIVISAEMWGSLLVLSYFLSFLNESCTIRQFSRHIPLIITNV
 Enc. SEQ2 (165) IFLIFNEWTTSFVYVCAELFGSLVVQFMFLAFANEALTRQSTRMPLFYVISNI
 Enc. SEQ3 (164) VFLVFNEWTSSFLFLCSEMVGALVVSFFNIFANEVSTRRQSQRYSVYNSNAI
 Enc. SEQ4 (162) IFLVFSEWASTMLYLVAELWGSLLISFMFFSRAIHQCTEAQVKKFLPITISLISAV
 221 275
 Nosema EEQ82057.1 (216) SLFLSSQVTELFTRYRSKLFSEAFLYNG--FFVFSQVLVIVIFLIKYLERNV
 Nosema EEQ82872.1 (184) SMHISVAFIYIKDELANILPAGLHDKIDGSSLFFLILSFVITLIYFLKSYPLKT
 Nosema EEQ82913.1 (220) ALLSGMINYFYSVKSKMSYVAAERFENG--FFCLSGILCAVYLLKKYLENV
 Nosema EEQ83030.1 (214) ALLVSGLASSSIRELRKGFSEYEQNQLLYSS--VFAMGGICLILMYMKYFENKI
 Enc. SEQ1 (218) SLFLSATVAGAFFKLREKLAQQNQVLLSG--JFIFQGFVVLVIFLKIYLERVT
 Enc. SEQ2 (220) LLLSSESTSFYSKKVREWDYKKTCLITNS--FFAVFGAMIAVTVLVKKYAENTI
 Enc. SEQ3 (219) SIFLSAVLTLVFNKWRDGVAFETKELGFRI--LILVLGSTVIGILALKKYMEREI
 Enc. SEQ4 (217) VFLSSGLLTKSLNSRRDALPYHEKERLFSQ--VFIVTSALTVMSAITSFFIDRAL
 276 330
 Nosema EEQ82057.1 (269) TNKPLFVVK--VKKKGPVKVGFAGEGLKEMMASKLLNLSLTVMFYGISTNLIE
 Nosema EEQ82872.1 (239) KEIKETINKE-----EDKTTSSFDLLOSKFLRNMCAAALIYAINAGFID
 Nosema EEQ82913.1 (273) TSKPMFVRKT--FTKKKSKVKVGFVDGLIEMSKSKLLNMSLVVLFYAVSTNIE
 Nosema EEQ83030.1 (267) MSVPIFIPSN--TIKKKQKVSVGFSEGISIMKSKLLMSLCIVFFYNITFNIE
 Enc. SEQ1 (271) MKRPLFVSSG--SRRKAKANVSFSEGLEIMSQSKLLAMSLVLFNINISYNMVE
 Enc. SEQ2 (273) LKKQLFIRTEGVAKKKGRKSSAGFSEMKLMAQSKFLVAMVMNALFYFAGINLIE

FIG.1

Enc. SEQ3 (272) LPAPVFLIREVEKTSTERR-KLKLDEARQTLRSRKLIIAISLNVLLYGVTSLVE
 Enc. SEQ4 (270) AKDDPRHKGK---KEHKVRKIGFAGSLKMMQKSRFLRAMTESVVAASVC SNIFE
 331 385

Nosema EEQ82057.1 (322) STFKSGLVKGAEELNENTKSYSMGYNSFEQKIASITVILLSPFPKLIQTKGWI
 Nosema EEQ82872.1 (283) MSLKNSLSTGSRINNMPPKDYSQKYLVTTSLSIISAVSLFYNFVIRGNRIASR-IF
 Nosema EEQ82913.1 (326) SAYKSALAVGANETGEAKSTYASINYTSIEQSGVAVIVMILLTPFRLIKTKGWI
 Nosema EEQ83030.1 (320) SVYKAGIKAASKSLGLEVGEYSGKFNIDQILVAVIVITLNL SAFSTLVESSGW
 Enc. SEQ1 (325) STFKVGVKVAAEYFNEEKGYSGKFNRIDQYMTSVVVICLNLSPFSSYVETRGFL
 Enc. SEQ2 (328) SSWKNGISVAADANNMEKRAYSASIVSGEQRVVGALVAIILLTPISTLVQTHGWI
 Enc. SEQ3 (326) ATFKSGIAAGARYTNNSKETFANFYNGLEQIIAISLLVINTPYALVKKGGWK
 Enc. SEQ4 (321) AIYRGGIVLGAVQSSTSKSSYMNRNLNAMAQIITSIFLLVMFFKPATHLIERRGW
 386 440

Nosema EEQ82057.1 (377) FVAIACPLITLFAVVSVCGLAFYNYPATNNDTNFFLNLCATPGKSFIKLENVLG
 Nosema EEQ82872.1 (337) YLSIASPIAAIFFTALISGLSFYNLRTAP-----SVLRINLENWCA
 Nosema EEQ82913.1 (381) TIAILCPITTFSAFGTFVLAAYLNFPIITNKEDNIFDIYRLPST-DSIIKLENVG
 Nosema EEQ83030.1 (375) TMGLLTPFLLLGSIIVMGASINSAIE--GLAFSWISVFFKMSYTYTIENYSG
 Enc. SEQ1 (380) LVGLITPIVTLMAIVFLGSAALYNTSME--ESGLGIVNGLFPGGKPLYVLENYFG
 Enc. SEQ2 (383) TMAIVPPLVTLVSSLVIFGSAFFNYSNYPEGKTSVILSSLVKGYKPNFYLECNIG
 Enc. SEQ3 (381) YLASLPVIVAMFSLFSVFLIAFYNVGAD--SGGNVLFGSLFKNRMPTEILENTLG
 Enc. SEQ4 (376) PVAITAPIVAIITLVLFPPMVFENNITEG-----DLIASGEEYVGSFVLENYTG
 441 495

Nosema EEQ82057.1 (432) CVAVALMKVAKYGSFDISKEAISMQIDSSLRARYKGFIDGVFGKLGKSLGSLFVW
 Nosema EEQ82872.1 (378) TIGFAFSKIICYVLFDLAKEMI.SMRVPVKYRYKFKSFYDGVCIKIGKSIISLYGT
 Nosema EEQ82913.1 (435) VICVSLMKISKYAAFADITKEALSMQIDGSIRAKYKGFIDGVFGKLGKSFSGSVYGF
 Nosema EEQ83030.1 (428) MFFLAFIKVLKYSAFDICKEKMGMRIDPAHRARFKSVYDGIENKLGKSGISLYGL
 Enc. SEQ1 (433) VIFMSLLKITKYSAFDICKEKLGMRINPTYRARFKSVYDGIENKLGKSGISLYGL
 Enc. SEQ2 (438) IYCVSGMKIAKYAFYDISKEAISLQIDPLYRPLKAVYDGLCGKLGKSGISLYAM
 Enc. SEQ3 (434) LVTNASMKIGKYL GADVSKAISMQIDPLYRAKYKAVYDGLCGKLGKSLGSIICT
 Enc. SEQ4 (425) MFLTTHIRISKYCFEDVAKEAASIRVSPVHRHSFRGHDGLGENIGKTIGSVYCT
 496 550

Nosema EEQ82057.1 (487) IMGYAFQTRDFRKLAPLCISVIVFVVIWYISVYTLNKKYKESVVSNLPIDVDLF
 Nosema EEQ82872.1 (433) FLT-FIEIPDIRQVSYVSFIFLIFANFLWIRSVCYLSKKYNESIEQNSEIDVDFN
 Nosema EEQ82913.1 (490) TITLLGTRDVRRGAPISLCLVLIIFCLJWFYSVYFLNRKYKESVENNAPIDIDLF
 Nosema EEQ83030.1 (483) AILVALDTDNVRKGSPIITLIIAILIYIWRHAYLAGAYNVSIKNTSVDIDL
 Enc. SEQ1 (488) LMFEALDTEDLRKATPITAGIIFITVMVVKAIYLSRSYSAVQHNDRDVIDMT
 Enc. SEQ2 (493) FWS-VMGYNDVRAAAPITLGMWLIISPIWYISVYTLNRKYNQSIQTSSPIDDLF
 Enc. SEQ3 (489) VMTGLWDITDIRRVSSVSGILIVIIAMWYFILKYL SRQFQAAVEANTYIELDEF
 Enc. SEQ4 (480) LVTVVFDVRDVRNVVSVSTVFGVFCVIWIRSLHINKKYKESIERNDFINVELA

FIG.1
 continuação

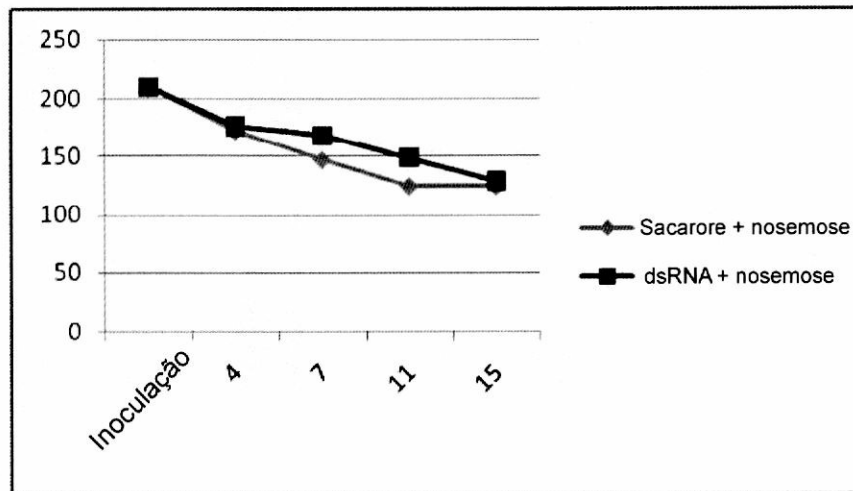


FIG.2

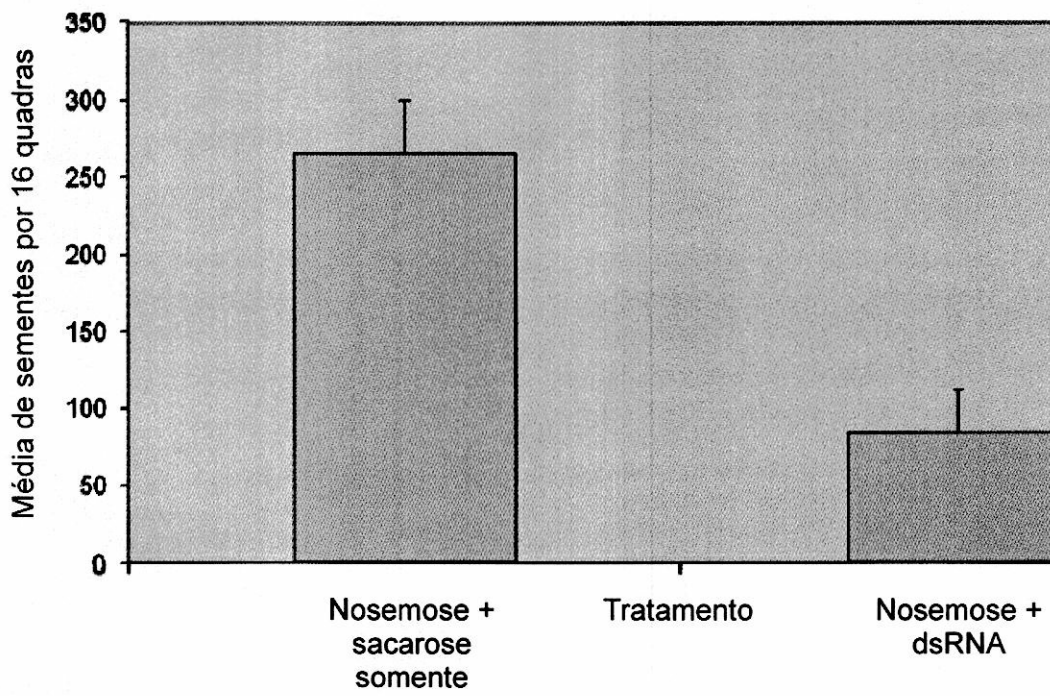


FIG.3

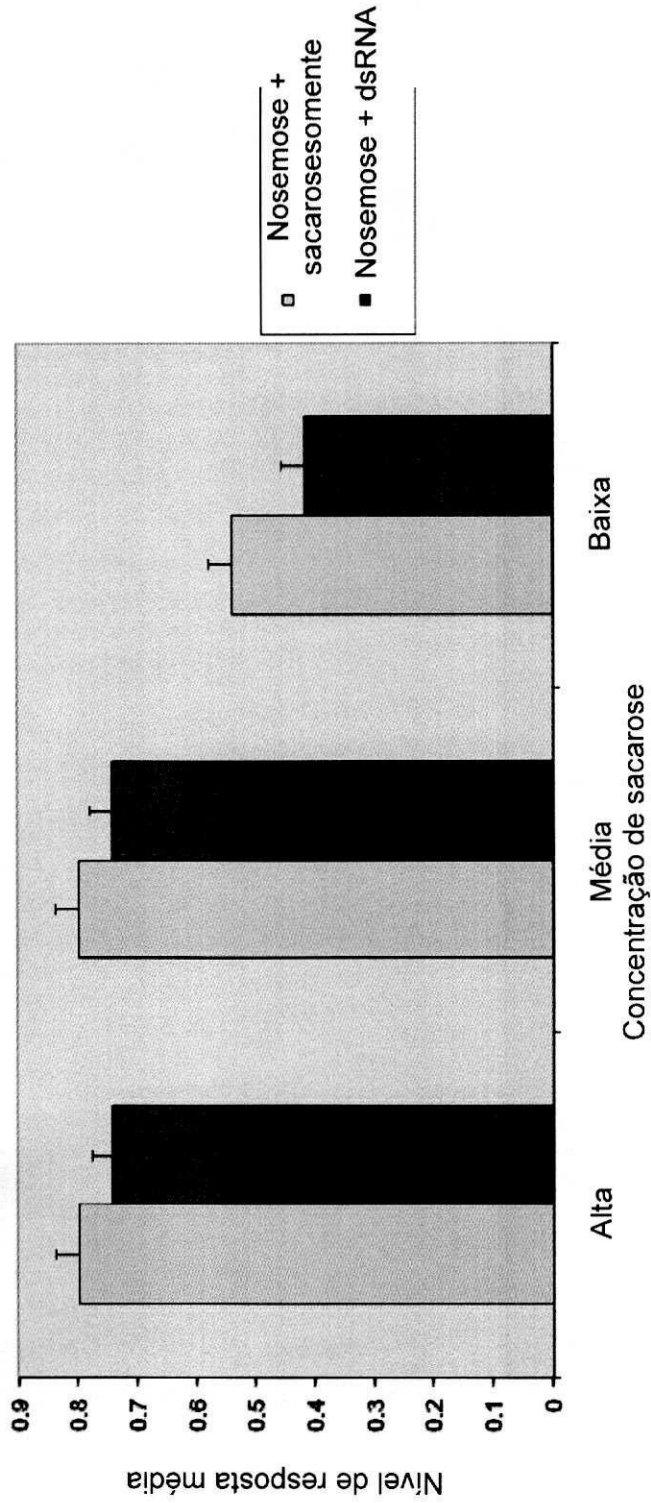


FIG.4

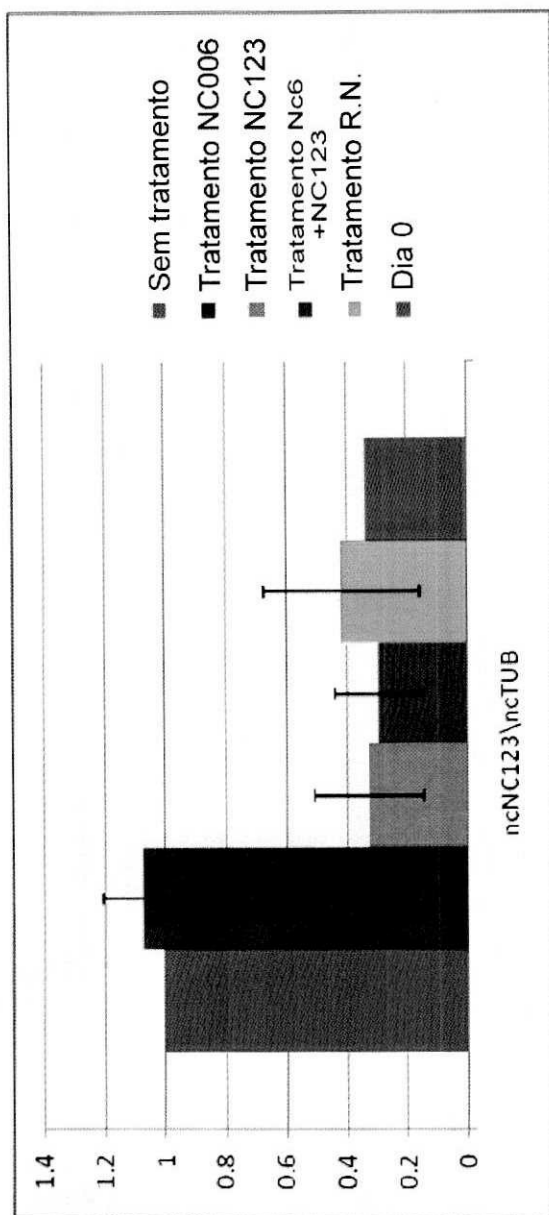


FIG.5

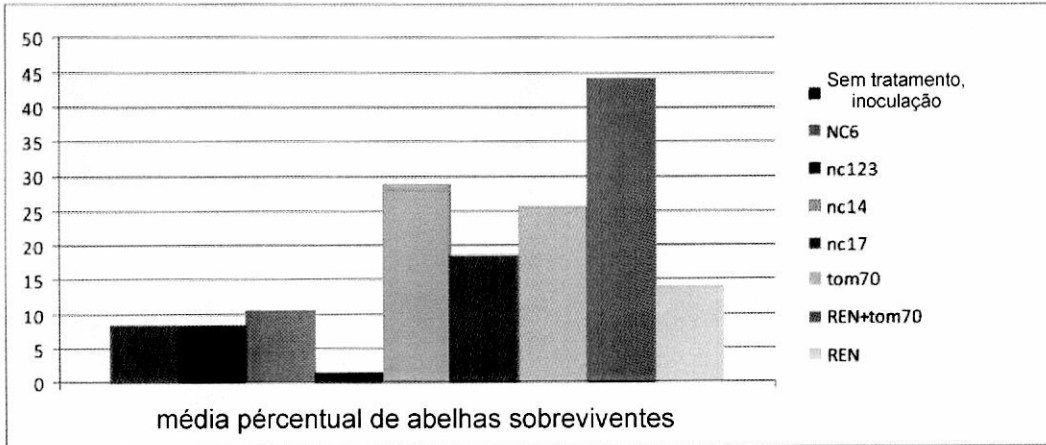


FIG.6

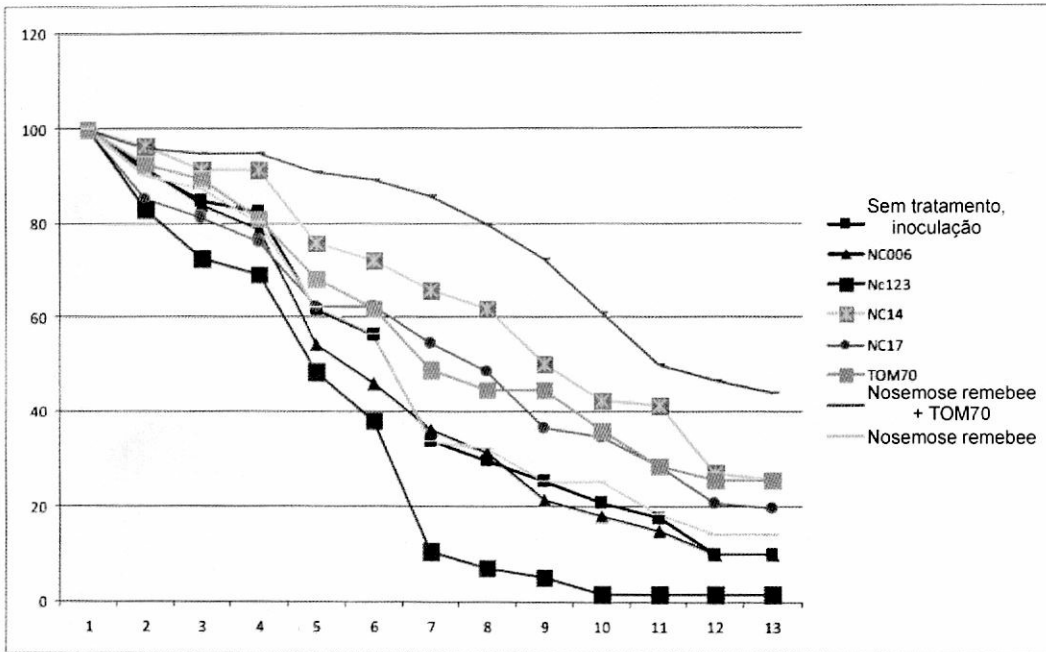


FIG.7

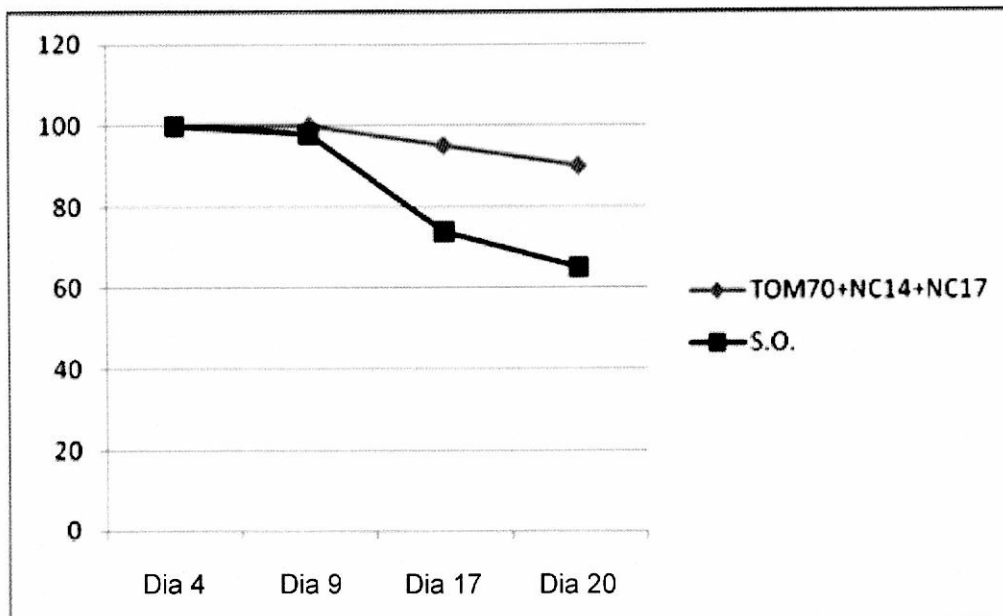


FIG.8

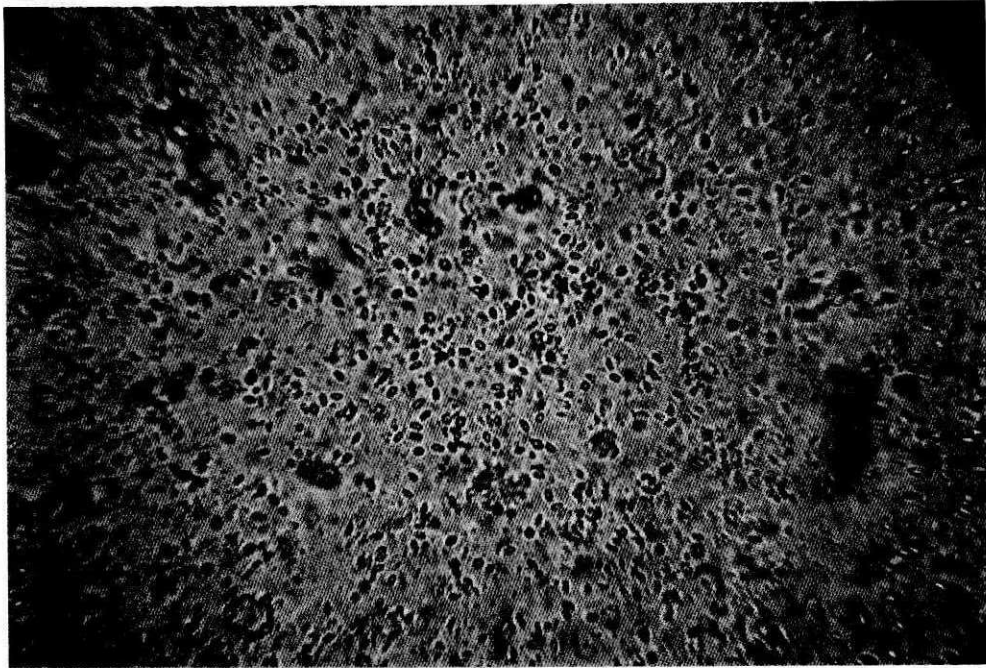


FIG.9

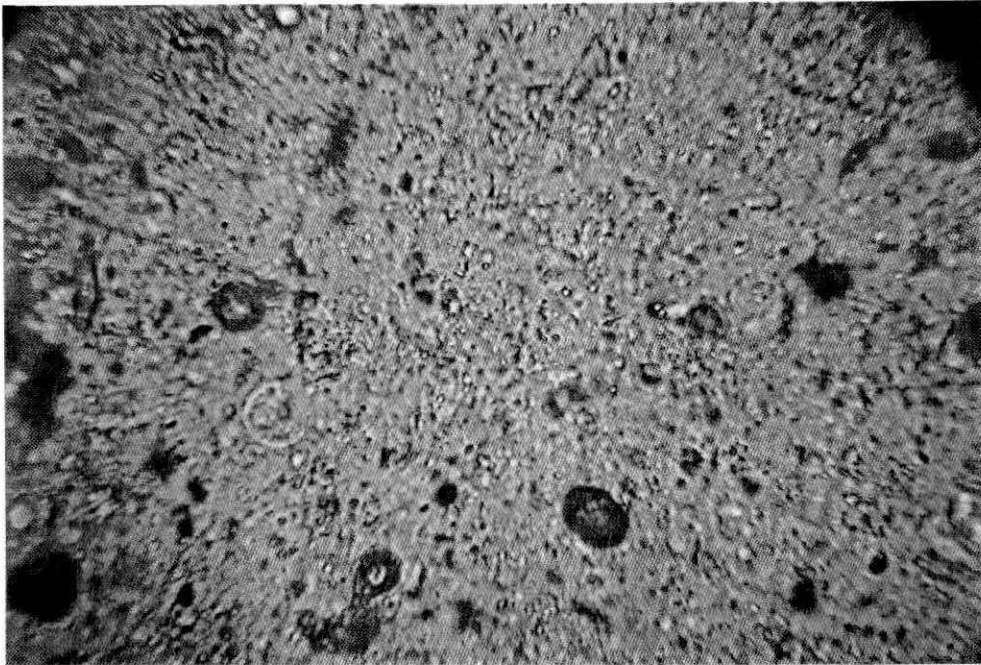


FIG.10

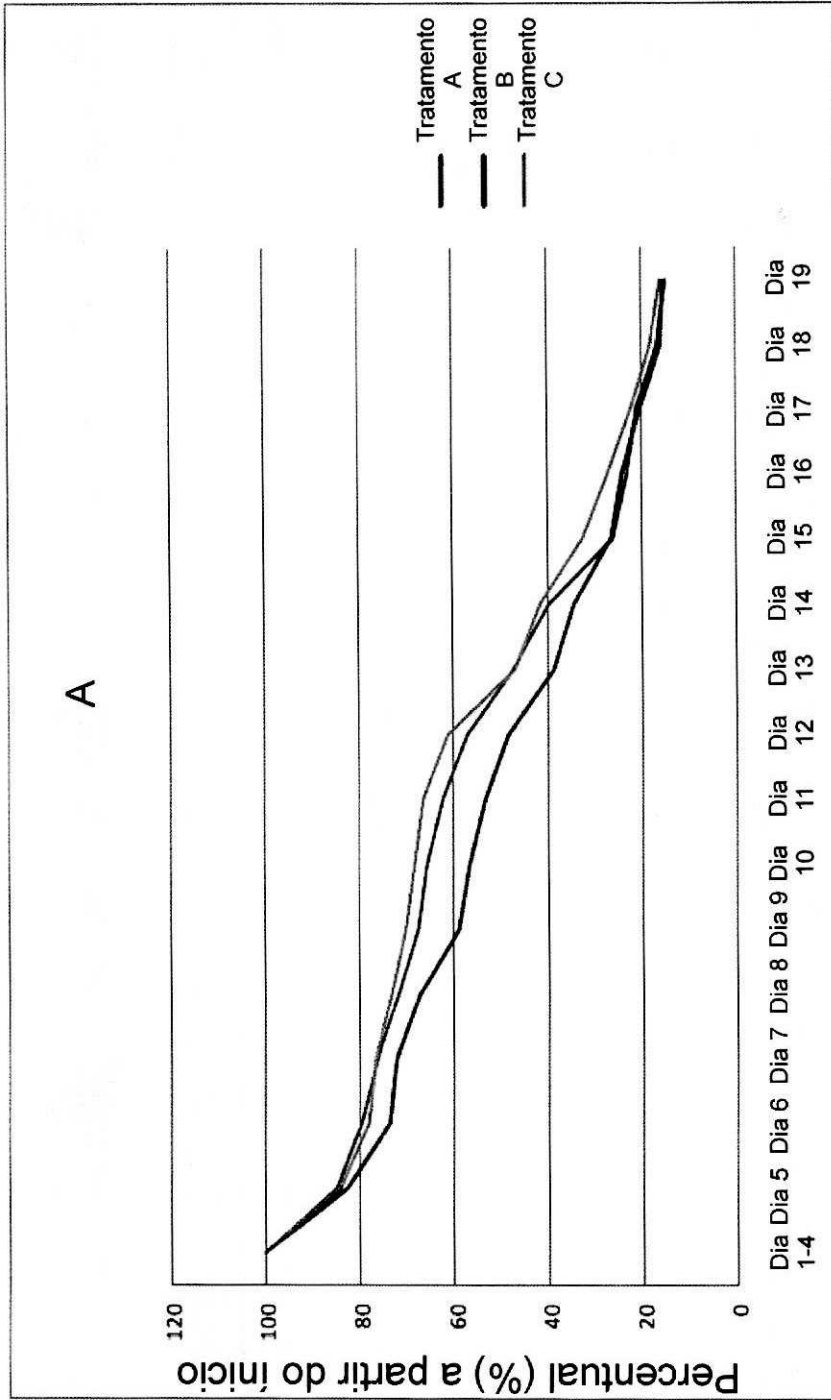


FIG.11

RESUMO

"AGENTE DO ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, CONSTRUÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, COMPOSIÇÃO INGERÍVEL PELAS ABELHAS, E MÉTODO PARA 5 REDUZIR A SUSCEPTIBILIDADE DE UMA ABELHA À INFECÇÃO POR NOSEMA", composições e métodos para reduzir a susceptibilidade e aumentar a tolerância à doença de Nosema (Nosemose) utilizando tecnologia de interferência em RNA, e mais particularmente, a prevenção e tratamento de infecções 10 por Nosema em abelhas melíferas pela alimentação de dsRNA específico para Nosema.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



43453FD9F6CD176B

Campo 2



CBBC7750CE94A1B4

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: beeologics 051980.txt
- Data de Geração do Código: 15-09-2014
- Hora de Geração do Código: 15:04:13
- Código de Controle:
 - Campo 1: 43453FD9F6CD176B
 - Campo 2: CBBC7750CE94A1B4