

EDVALDO CAVALCANTE DE LIMA NETO

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES RELACIONADOS AO
SISTEMA IMUNE DO CAMARÃO MARINHO
*Litopenaeus vannamei***

**Recife
2006**

EDVALDO CAVALCANTE DE LIMA NETO

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES RELACIONADOS AO
SISTEMA IMUNE DO CAMARÃO MARINHO**
Litopenaeus vannamei

Dissertação apresentada ao **Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura** da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de **Mestre em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura**.

Orientador: **Dra. Maria Raquel Moura Coimbra**, Depto. de Pesca e Aqüicultura, da UFRPE.

Recife
Fevereiro de 2006

Universidade Federal Rural de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura

Parecer da comissão examinadora da defesa de dissertação de mestrado de

EDVALDO CAVALCANTE DE LIMA NETO

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES RELACIONADOS AO SISTEMA IMUNE DO
CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei***

Área de concentração: **Aqüicultura**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera o candidato **EDVALDO CAVALCANTE DE LIMA NETO** como aprovado.

Recife, 20 de fevereiro de 2006

Prof. Dra. Maria Raquel Moura Coimbra (DSc, UFRPE)
Orientador

Prof. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho (DSc, UFRPE)
Membro externo

Prof. Dr. Roberto Soares de Castro (DSc, UFRPE)
Membro externo

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra (DSc, UFPE)
Membro interno

Prof. Dr. Alfredo de Olivera Galvez (DSc, UFRPE)
Suplente

Aos meus pais, Geraldo e Rosa, e à
minha irmã, Catarina, por estarem
sempre presentes nos momentos
importantes de minha vida.

“Querer vencer significa já ter percorrido metade do caminho para a vitória”.

Paderewsky

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Raquel Moura Coimbra, pela oportunidade, confiança, paciência e aprendizado durante esses dois anos de convivência.

Ao Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho e à Dr^a. Roseane Cavalcanti dos Santos, por não medirem esforços para ajudar quando solicitados e pela convivência.

Ao Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho, diretor de unidade do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelo apoio, cordialidade e simpatia.

Ao amigo David Anderson de Lima Morais, pesquisador do Laboratório Nacional de Computação Científica, LNCC, pelos conselhos e sugestões.

A sempre presente, Thaís Cristina, pela compreensão e força nos momentos difíceis.

Aos amigos Ana Cristina, Marília, Patrícia, Henrique, Samuel, Suzianny, Hosana, Andréia e Karine, pelas colaborações e pelo companheirismo.

Aos amigos do Laboratório Genoma, Fabiana, Ebenézer, Isabel, Silvo, Cláudio e outros que por lá passaram, pelos momentos de descontração e troca de idéias.

Aos colegas de mestrado, que compartilharam dúvidas, sugestões e opiniões durante o curso das disciplinas.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura e do Departamento de Pesca e Aqüicultura, pela dedicação e competência no trabalho.

SUMÁRIO

Lista de tabelas	ii
Lista de figuras	iii
Resumo	v
Abstract	vi
1. Introdução	13
2. Objetivos	16
2.1 Geral	
2.2 Específicos	
3. Revisão da literatura	17
3.1. Sistema Imune	17
3.1.1 Resposta Inata	17
3.1.2 Resposta Adaptativa	18
3.1.3 Imunidade nos Invertebrados	19
3.1.4 Sistema Profenoloxidase	21
3.1.5 Sistema de Coagulação	23
3.1.6 Receptores Toll	24
3.1.7 Sistema Interferon	26
3.1.7.1 Sinalizadores JAK/STAT	27
3.1.7.2 Indução de Interferons	27
3.1.7.3 Proteínas induzidas por Interferons	28
3.1.8 Peptídeos e Proteínas Antimicrobianas	28
3.2 Bioinformática	31
3.2.1 Banco de Dados Genômicos	32
3.2.2 Principais Ferramentas da Bioinformática	33
3.2.2.1 A Ferramenta Blast	33
3.2.2.2 Alinhamento de Seqüências	35
4. Artigo científico	37
Identificação de genes relacionados ao sistema imune do camarão marinho <i>Litopenaeus vannamei</i>	
5. Conclusões	48
6. Referências bibliográficas	49
Anexo	56

LISTA DE TABELAS

Quadro 1. Comparação entre as respostas inata e adaptativa	18
Quadro 2. Classificação dos peptídeos antimicrobianos (AMPs)	29

Artigo

Tabela 1. Genes relacionados ao sistema imune de <i>Litopenaeus vannamei</i> identificados no Genbank	45
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de ativação do sistema complemento	19
Figura 2. Tipos de hemócitos circulantes na ostra <i>Crassostrea gigas</i>	20
Figura 3. Infiltração hemocítica no terceiro segmento do <i>Litopenaeus vannamei</i> acometido por IMNV	21
Figura 4. Esquema do sistema de ativação da profenoloxidase	22
Figura 5. A cascata de coagulação em <i>Tachypleus tridentatus</i>	24
Figura 6. Os receptores semelhantes a Toll (TLRs) e as moléculas que eles reconhecem	25
Figura 7. Estruturas em 3D dos tipos de interferons	26
Figura 8. Modelo proposto de resposta antimicrobiana em camarões, envolvendo os peptídeos antimicrobianos	30
Figura 9. Página de acesso ao site do Centro Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI)	32
Figura 10. Resultado do BLASTx realizado com a seqüência X77318	34
Figura 11. Alinhamento múltiplo produzido pelo CLUSTAX versão 1.83	35

Artigo

Figura 1. Resultado do alinhamento da seqüência AY695938 usando-se o programa tBLASTn	44
Figura 2. Resultado do alinhamento da seqüência CAA52920 usando-se o programa tBLASTn	44

RESUMO

Os vírus estão entre os patógenos mais danosos encontrados na aqüicultura e são os mais numerosos e diversificados descritos para os crustáceos. O conhecimento sobre os genes associados à resposta imune viral, bem como a relação entre patógenos e hospedeiro ainda é escasso. Além disso, não há disponibilidade de linhas de célula para camarões, o que limita os sistemas primários de cultura celular, que por sua vez subsidiam pesquisas voltadas à expressão gênica. A análise de Seqüências Expressas Identificadas *Expressed Sequence Tags* (ESTs) tem se tornado uma prática comumente utilizada para identificar genes envolvidos em funções biológicas específicas, especialmente em organismos onde os dados genômicos ainda não estão disponíveis. O Laboratório de Genética Aplicada (LAGA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) é um dos participantes do projeto genoma EST do camarão *Litopenaeus vannamei* (ShEST) auxiliando no seqüenciamento e busca de genes de *L. vannamei* que atuam na resposta imune dos camarões contra as infecções virais. Foram seqüenciadas bibliotecas de diferentes tecidos (músculo, hepatopâncreas, pedúnculo ocular, etc) e diferentes fases larvais de *Litopenaeus vannamei* usando BigDye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems) ou ET-Dye Terminator (Amersham/GE Healthcare) e o primer M13 universal (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'). As seqüências foram analisadas em seqüenciadores automáticos MegaBace1000 (Amersham/GE Healthcare) e Applied Biosystems 377 (ABI377). Estas seqüências foram analisadas usando-se a *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Os resultados obtidos apresentaram homologia com proteínas do sistema interferon, como 2',5'-Oligoadenylate binding protein, Toll like receptors (TLRs), JAK/STAT e interferon like protein (IntIP). A 2',5'-Oligoadenylate binding protein pode ser a primeira proteína descrita para camarões que está relacionada ao sistema interferon. Muitas seqüências ainda precisam ser processadas para completar o genoma de *Litopenaeus vannamei*, contudo já há indícios de que este tenha um complexo sistema de defesa contra vírus, semelhante ao sistema interferon.

ABSTRACT

Viruses are among the most harmful pathogens found in aquaculture and are the most numerous and diverse of the pathogenic agents described to crustaceans. The knowledge about genes associated to immunity viral response, as well as the relationships between pathogen and host still very incomplete. Moreover, shrimp cell lines are not available, thus limiting primary systems of cellular culture to assist searches in genomic expression. The Expressed Sequence Tags (ESTs) analyses have become a common tool used to identify genes involved in some specific biological functions, particularly in organisms in which genomic data are not available. The Laboratory of Applied Genetics (LAGA) of the Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) is one of the members of the Shrimp EST Genome Project (ShEST), assisting on sequencing and search for genes related to shrimp immune response against the viral infections. Libraries of different tissues (muscle, hepatopancreas, ocular peduncle) and different larval stages of *Litopenaeus vannamei* were sequenced using BigDye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems) or ET-Dye Terminator (Amersham/GE Healthcare) and M13 universal primer (5'-TGAAAACGACGGCCAGT-3'). The sequences were analyzed in automated sequencers MegaBace1000 (Amersham/GE Healthcare) and Applied Biosystems 377 (ABI377). These sequences were analyzed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). The results presented homology with interferon system proteins, like 2',5'-Oligoadenylate binding protein, Toll like receptors, JAK/STAT and Interferon like protein. The 2',5'-Oligoadenylate binding protein would be the first protein related to interferon system described in shrimps. A lot of sequences are still need to be investigated to complete the whole genome of *Litopenaeus vannamei*, nevertheless there are indications that this animal has a complex antiviral defense system, similar to interferon.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* registrou crescimentos elevados e consistentes de produção até 2003. Em 2004, a sustentabilidade desta atividade foi comprometida por uma série de fatores não apenas econômicos, mas também ambientais e biológicos (surgimento do vírus da Mionecrose Infecciosa - IMNV), que juntos contribuíram com uma queda na produção total de 15,84% (Rodrigues, 2005).

Altas densidades são freqüentemente vistas como uma das razões para o surgimento de doenças na aqüicultura. Os animais em cultivos intensivos estão continuamente sendo afetados por variações ambientais e práticas de manejo, que podem criar condições de estresse consideráveis e tornar os animais susceptíveis a uma grande variedade de doenças infecciosas. Os vírus estão entre os patógenos mais danosos encontrados na aqüicultura e são os mais numerosos e diversificados descritos para os crustáceos (Renault, 2005).

Mais de 20 vírus já foram relatados e conhecidamente são responsáveis por grandes perdas na produção (Pan et al., 2000), merecendo destaque o vírus da Taura (TSV - *Taura Syndrome Virus*), a Mancha Branca (WSSV - *White Spot Syndrome Virus*), a Cabeça Amarela (YHD - *Yellow Head Disease*) e a Infecção Viral na Hipoderme e Necrose do tecido Hematopoético (IHNV) (Nunes e Martins, 2002).

A situação se agravou com o aumento do número de fazendas de camarão baseadas em novas tecnologias de manejo, mas sem o conhecimento necessário da fisiologia dos peneídeos e o freqüente negligenciamento da qualidade ambiental. A prevenção e o controle de doenças de camarão requer uma abordagem integrada, na qual o conhecimento da imunidade deve ser aprofundado, levando em consideração outras áreas de pesquisa relacionadas à patologia e fisiologia do camarão, aliadas às pesquisas genéticas (Bachère, 2000).

Os camarões, como outros invertebrados, não têm um verdadeiro sistema imune adaptativo e, portanto, dependem da resposta imune inata. O primeiro nível da resposta imune inata é o reconhecimento de patógenos invasores, realizado por hemócitos e proteínas plasmáticas.

A partir disso, uma série de eventos são desencadeados na tentativa de eliminar o invasor, incluindo coagulação, fagocitose e ativação de moléculas como fenoloxidasas, lectinas, hemocianinas e peneidinas (van de Braak, 2002; Gross et al., 2001; Luo et al., 2003). Apesar da resposta imune antibacteriana e antifúngica serem amplamente estudadas, pouco se sabe sobre os mecanismos de defesa em nível celular ou molecular para a resposta imune viral.

O conhecimento sobre os genes associados à resposta imune viral, bem como a relação entre patógenos e hospedeiro ainda é escasso. Além disso, não há disponibilidade de linhas de célula para camarões, o que limita os sistemas primários de cultura celular, que por sua vez subsidiam pesquisas voltadas à expressão gênica (Bachère et al., 2004).

Com o volume crescente de dados genômicos obtidos a partir de diversos laboratórios do mundo, fez-se necessário organizá-los de maneira acessível, de modo a evitar redundância na pesquisa científica e possibilitar a análise por um maior número de pesquisadores. O Centro Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI) é considerado o banco de dados central sobre informações genômicas. O *GenBank* é o principal banco de dados do NCBI e armazena todas as seqüências disponíveis publicamente de DNA, RNA e proteínas (Santos e Ortega, 2003).

Várias ferramentas desenvolvidas pela bioinformática permitem o acesso e análise dos bancos de dados no *GenBank*. Entre elas, a mais utilizada para comparar seqüências de DNA ou proteína com os bancos de dados genômicos é o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

O projeto genoma EST do camarão *Litopenaeus vannamei* (ShEST), constituído por uma rede de 14 laboratórios de universidades brasileiras, espalhados por nove Estados: Bahia, Ceará, Maranhão, Pará, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Santa Catarina, São Paulo e Rio Grande do Sul, tem por objetivo seqüenciar 300.000 Seqüências de Genes Expressos (ESTs) do *L. vannamei* e minerá-las através do *GenBank* para o desenvolvimento de tecnologias de base genética para o setor produtivo. O ShEST conta com 10 grupos de mineração, envolvendo diversos temas, tais como: estudos funcionais de proteínas de cutícula do camarão; identificação de marcadores moleculares com alta taxa evolutiva; prospecção de genes ligados ao sexo; genes codificadores de isoformas de actina no camarão.

O Laboratório de Genética Aplicada (LAGA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco participa desse projeto auxiliando no seqüenciamento e busca de genes de *L. vannamei* que atuam na resposta imune dos camarões contra as infecções virais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificação de genes relacionados ao sistema imune de *Litopenaeus vannamei*, principalmente àqueles referentes aos mecanismos da resposta antiviral.

2.2 Objetivos Específicos

- Seqüenciamento de ESTs de diferentes tecidos (pedúnculo ocular, músculo, hepatopâncreas) e de diferentes fases larvais de *L. vannamei*.
- Submissão das seqüências ao projeto genoma EST do camarão marinho (ShEST).
- Mineração de seqüências no banco de dados Genbank (NCBI).
- Utilização das ferramentas BLAST nas modalidades BLASTn, BLASTp e tBLASTx.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SISTEMA IMUNE

O sistema imune compreende todos os mecanismos pelos quais os organismos se defendem de invasores. Ele também é responsável pela remoção de células mortas, renovação de determinadas estruturas e memória imunológica. É ativo contra células alteradas, que surgem como resultado de mitoses anormais e atua numa rede de cooperação, envolvendo a participação de muitos componentes estruturais, celulares e também moleculares (Machado et al., 2004; Wikipédia, 2005).

Qualquer resposta imune envolve, primeiramente, o reconhecimento do antígeno, quer seja um organismo agressor (patógeno) ou outro material estranho e, em segundo lugar, a elaboração de uma reação direcionada a este elemento, com a finalidade de eliminá-lo do organismo. De uma maneira geral, existem duas categorias de resposta imune: a inata ou não-específica e a adaptativa ou específica (Roitt et al., 2003).

3.1.1 RESPOSTA INATA

A resposta inata é composta por todos os mecanismos que estão naturalmente presentes nos organismos e não são influenciados por contato prévio com agentes infecciosos. Atuam como a primeira linha de proteção e retardam o estabelecimento da manifestação infecciosa. Constituem as estratégias de defesa mais antigas, sendo algumas destas formas encontradas nos seres multicelulares mais primitivos, nas plantas e fungos. Consistem de elementos celulares e humorais (Lee e Söderhäll, 2002).

A defesa celular pode ser realizada por macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos que reagem iniciando os processos de fagocitose, encapsulação, coagulação e citotoxicidade mediada por células. Além disso, produzem fatores que compõem a resposta humoral, como as proteínas coagulantes, aglutininas, enzimas hidrolíticas e peptídeos antimicrobianos, que atuam em conjunto contra as infecções (He et al., 2004; van de Braak, 2002).

3.1.2 RESPOSTA ADAPTATIVA

A resposta adaptativa é filogeneticamente mais recente e difere da inata por ser induzida pela exposição prévia a microorganismos ou a seus determinantes antigênicos e por ser mediada pela produção de anticorpos das células B e T. Além disso, apresenta memória imunológica, onde a cada exposição a um dado agente infeccioso a resposta adaptativa torna-se mais eficiente, evitando que este agente volte a causar doença. Todo esse sistema específico se concentra na capacidade das células distinguirem proteínas produzidas pelo próprio organismo daquelas produzidas por invasores ou pelas células sob o controle de vírus (Janeway et al., 2002).

Quadro 1. Comparação entre as respostas inata e adaptativa.

Resposta Inata	Resposta adaptativa
Rápida e não específica	Lenta e específica
Não requer exposição prévia	Requer exposição prévia
A exposição não resulta em indução de células de memória	A exposição resulta em indução de células de memória
Alguns dos componentes celulares ou seus produtos são sinalizadores para a resposta adaptativa	Alguns dos produtos podem auxiliar a resposta inata

Os linfócitos são as células centrais da resposta imune adaptativa uma vez que reconhecem, especificamente, patógenos individuais quer se localizem no interior das células do hospedeiro quer estejam nos fluidos teciduais ou no sangue. Basicamente, se enquadram em duas categorias: linfócitos B (produção de anticorpos) e linfócitos T (controle do desenvolvimento de linfócitos B; interação com células fagocitárias na destruição de patógenos; reconhecimento e destruição de células infectadas por vírus) (Roitt et al., 2003).

Há ainda o sistema complemento, que é um grupo de proteínas que estão presentes no sangue e tem a função de controlar o processo inflamatório. Pode ser ativado por microorganismos, espontaneamente, através da via alternativa que é uma reação inata ou pela via clássica, quando é ativado por anticorpos que se ligam à superfície do patógeno, sendo um mecanismo da resposta adaptativa (**Figura 1**) (Iturry-Yamamoto e Portinho, 2001).

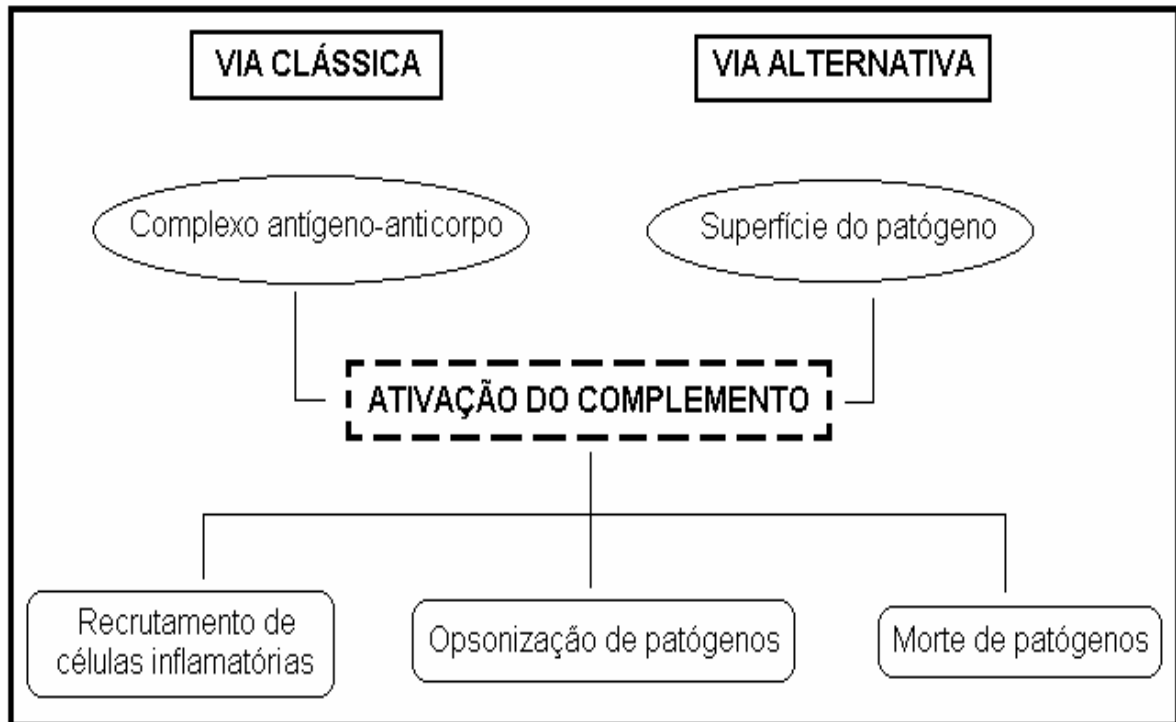


Figura 1. Vias de ativação do sistema complemento.

A ativação do complemento, tanto pela via clássica como pela via alternativa, leva a formação de peptídeos que têm as funções de: opsonização (revestir a superfície dos patógenos, facilitando o reconhecimento e internalização pelos fagócitos); morte dos patógenos através da lise de suas membranas; e atrair células inflamatórias para o local da reação.

3.1.3 IMUNIDADE NOS INVERTEBRADOS

Os invertebrados não possuem imunidade adaptativa. Não possuem imunoglobulinas, moléculas que apresentam alta especificidade contra os invasores, nem receptores de células T, ou seja, não produzem anticorpos específicos, por isso, não têm um verdadeiro sistema imune adaptativo, embora proteínas semelhantes às imunoglobulinas (*Ig-like protein*) tenham sido encontradas em alguns insetos (Wu et al., 2002). Assim, a resistência a doenças se baseia no sistema inato de defesa, que inclui uma série de reações celulares e humorais coordenadas (Luo et al., 2003).

Nessas reações, os hemócitos, células circulantes da hemolinfa, atuam de várias maneiras. Na presença de pequenos organismos, como as bactérias, os hemócitos realizam a fagocitose. Quando o número de bactérias é elevado ou quando parasitas maiores são os responsáveis pela infecção, grupos de hemócitos atuam formando cápsulas ou nódulos em torno dos organismos invasores, provocando a morte destes por asfixia ou por ação de substâncias tóxicas que são liberadas no interior dos nódulos ou cápsulas (Silva, 2000).

Segundo Bachère et al., (2004), três tipos de hemócitos são identificados em invertebrados de acordo com a presença de grânulos citoplasmáticos; hialino ou agranular, semigranular (com pequenos grânulos) e granular (grânulos maiores) (**Figura 2**). As células hialinas estariam envolvidas na coagulação, enquanto as semigranulares na encapsulação e também, em conjunto com as granulares participariam na fagocitose, citotoxicidade e produção de peptídeos antimicrobianos (Bartlett et al., 2002). Esta situação pode ser observada na **Figura 3**, que mostra uma miosite relacionada à infecção pelo vírus da IMN.

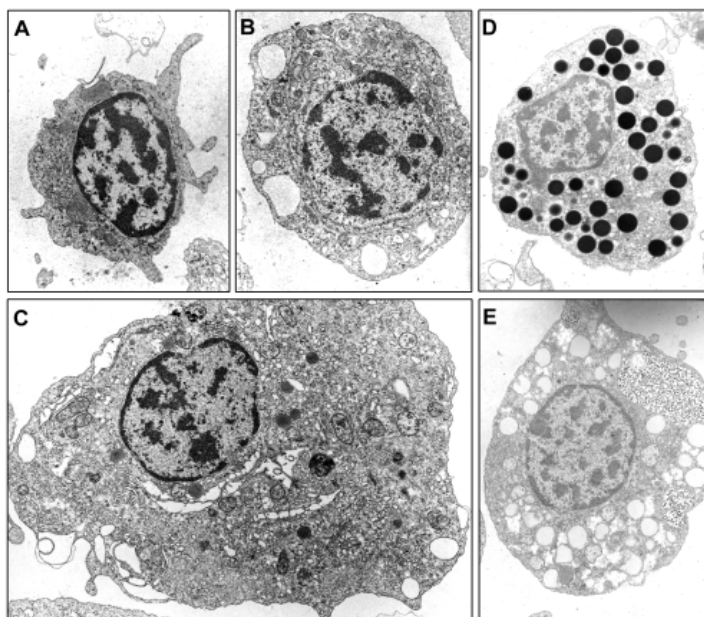


Figura 2. Tipos de hemócitos circulantes na ostra *Crassostrea gigas*. (A) Células pequenas, provavelmente um hemócito imaturo; (B) Hemócito hialino basófilo; (C) Grande célula hialina com um citoplasma rico em membranes e lamela; (D) Hemócitos granulares possuindo grânulos densos; e (E) Hemócitos granulares contendo grânulos e alguns corpos citoplasmáticos que são aparentemente resíduos da fagocitose (Ampliação: $\times 15000$). (Fonte: Bachère et al. 2004).

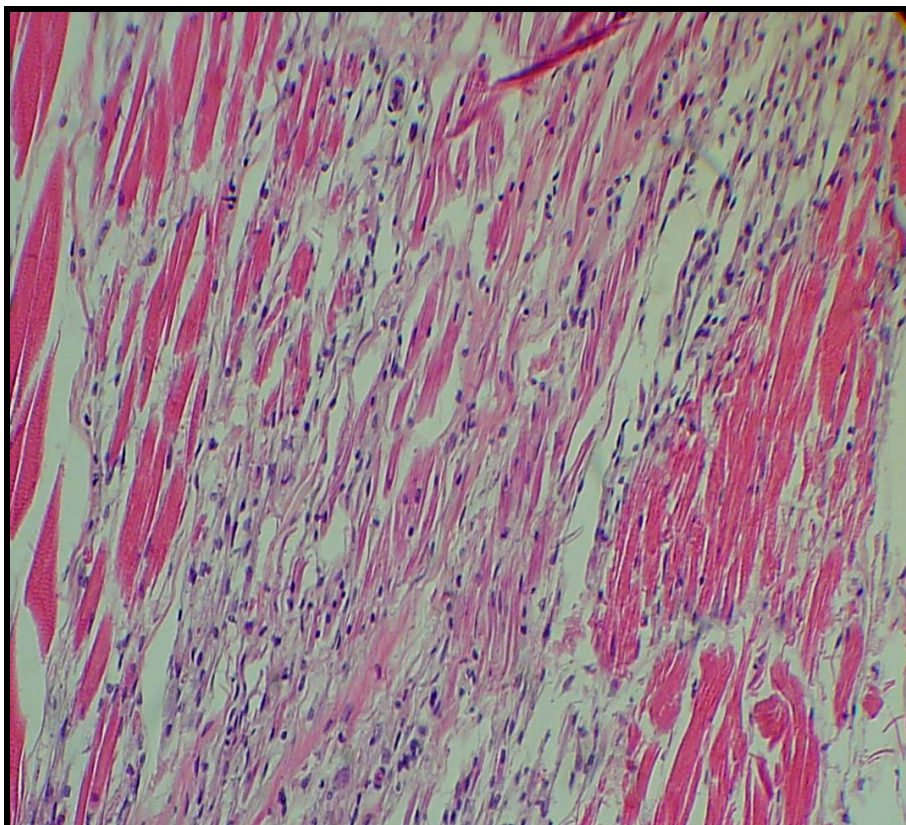


Figura 3. Infiltração hemocítica no terceiro segmento do *Litopenaeus vannamei* acometido por IMNV. Camarão obtido durante um surto no Piauí em 2003. (Fonte: Fernando Leandro dos Santos).

3.1.4 SISTEMA PROFENOLOXIDASE

É um sistema de reconhecimento não-específico em invertebrados que pode reconhecer e responder a pequenas doses por litro de lipopolissacarídeos ou peptidoglicanos de bactérias e β -1,3- glucanos de fungos. Esse reconhecimento de material exógeno parece ser mais eficiente que em vertebrados. Como resultado do sistema de ativação da profenoloxidase, o parasita é escurecido na hemolinfa do hospedeiro pela deposição de melanina (**Figura 4**). Esta reação é conhecida como melanização e é facilmente observada em torno de parasitas na hemolinfa ou no exoesqueleto (Pereira, 2000).

A melanina se origina a partir de quinonas formadas através da ação da enzima fenoloxidase sobre fenóis. Esta enzima é sintetizada pelos hemócitos como uma forma inativa (profenoloxidase) e é convertida na sua forma ativa por uma cascata de serina-proteases (van de Braak, 2002).

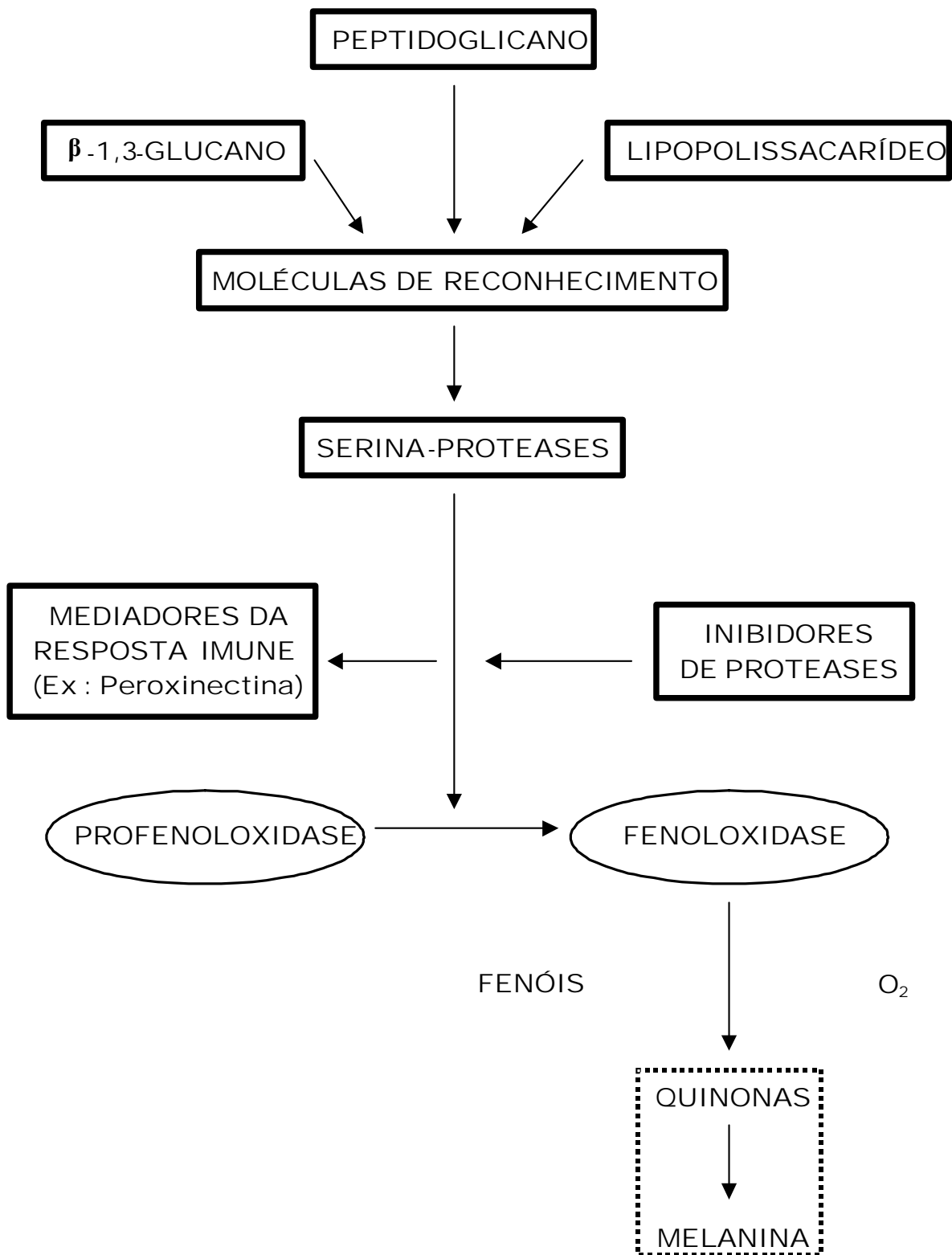


Figura 4. Esquema do sistema de ativação da profenoloxidase (adaptado de Cerenius and Söderhäll, 2002).

Os compostos intermediários originados no processo de melanização, como semiquinonas e espécies reativas de oxigênio, e a própria melanina são tóxicos aos microorganismos (Cerenius e Söderhäll, 2004).

Em insetos, foram isoladas e caracterizadas duas proteínas que atuam como receptores na etapa inicial da cascata, pela ligação das mesmas aos componentes da parede microbiana. Em crustáceos, há um mecanismo semelhante, mas os componentes da cascata da profenoloxidase estão localizados no interior dos hemócitos, diferentemente dos insetos, onde se localizam no plasma (Silva, 2000).

3.1.5 SISTEMA DE COAGULAÇÃO

A coagulação da hemolinfa é ativada por uma cascata de serina-proteases, semelhantes às do sistema profenoloxidase. Essas proteases possuem funções homólogas aos componentes do sistema complemento e aos fatores de coagulação dos mamíferos (Silva, 2000).

No camarão de água doce, *Pacifastacus liniusculus*, a reação é induzida quando a transglutaminase (TGase) é liberada dos hemócitos ou de outros tecidos. A Tgase depende do Ca^{2+} , que catalisa a polimerização da proteína de coagulação, encontrada no plasma, para formar um gel (van de Braak, 2002). Esse fenômeno tem sido pouco estudado em insetos, no entanto em *Limulus* (Chelicerata) todos os componentes da reação de coagulação já foram caracterizados molecularmente (Silva, 2000).

Em *Tachypleus tridentatus* (caranguejo japonês), o sistema de coagulação é formado por cinco componentes protéicos que compõem um sistema de cascata, fatores C, B e G, enzima de pré-coagulação e a proteína coagulogênio. Os fatores C e G atuam como proteínas de reconhecimento sensíveis a lipopolissacarídeos (LPS) e β -1,3-glucanos, respectivamente. O fator B é essencial para converter a enzima de pré-coagulação em coagulogênio (**Figura 5**).

Os patógenos liberam carboidratos que se ligam a essas proteínas resultando na ativação seqüencial dos fatores de coagulação e subsequente formação do coágulo (Lee e Söderhäll, 2002).

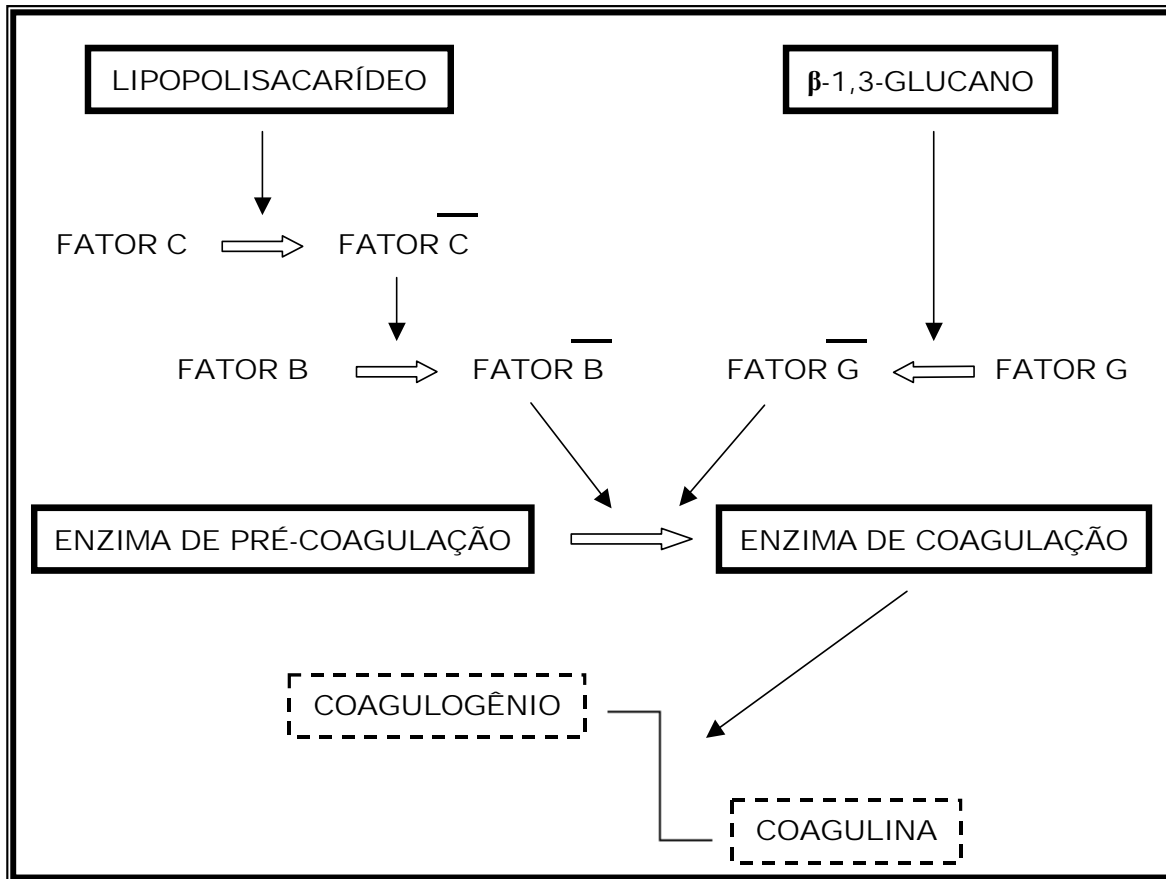


Figura 5. A cascata de coagulação em *Tachypleus tridentatus*. (Fonte: adaptado de TRENDS in Immunology Vol.25 N°6 June 2004).

3.1.6 RECEPTORES TOLL

Pesquisas recentes revelaram que insetos e mamíferos conservam uma via de sinalização do sistema imune inato através de receptores de superfície celular chamados *Toll* e receptores semelhantes a *Toll* (Toll-Like Receptor - TLRs) (Inamori et al., 2004).

Os TLRs são receptores transmembrana com um domínio extracelular contendo regiões ricas em leucinas e um domínio intracelular similar ao do receptor interleucina-1. *Toll* e alguns outros genes desta via foram identificados, primeiramente, por seus papéis no estabelecimento do eixo dorso-ventral no embrião de drosófilas e posteriormente se mostrou que estavam envolvidos na resposta imune de moscas adultas (Leclerc e Reichhart, 2004).

Em mamíferos, os TLRs ativos estão relacionados com a expressão de citocinas inflamatórias e moléculas co-estimuladoras, que ativam o sistema imune adaptativo e são responsáveis pelo reconhecimento de ácidos nucleicos virais.

O TLR3 reconhece RNA de dupla fita (dsRNA); o TLR7 e TLR8 reconhecem RNA de fita simples (ssRNA) e o TLR9 reconhece DNA viral e bacteriano (**Figura 6**). O reconhecimento de dsRNA pelos TLRs de células infectadas promove a ativação de fatores de transcrição (IRF3 e NFκB) que se translocam para o núcleo e ativam a transcrição dos interferons (Robertsen, 2005).

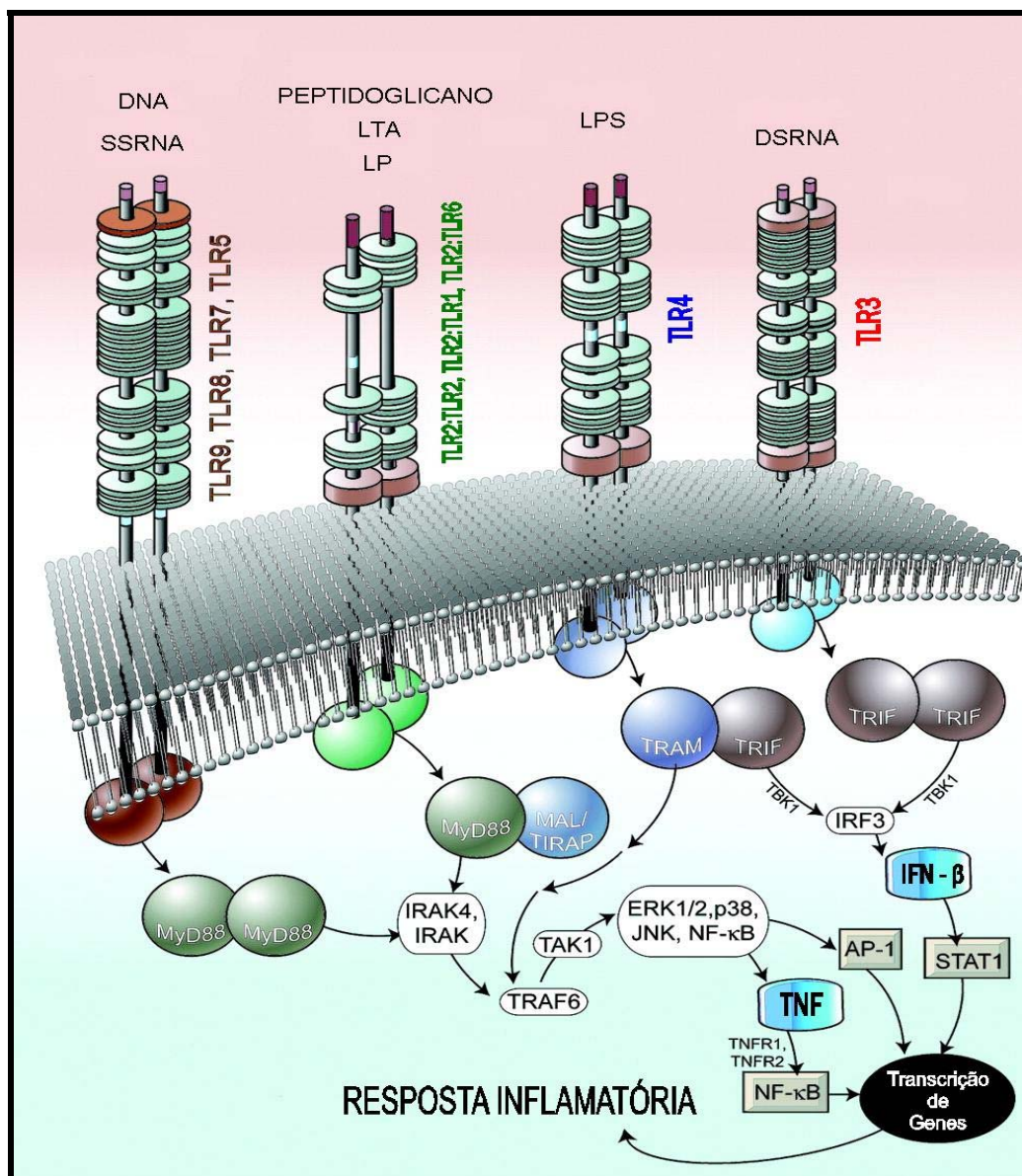


Figura 6. Os receptores semelhantes a Toll (TLRs) e as moléculas que eles reconhecem. ssRNA (RNA de fita simples), LTA (ácido lipoteicóico), LP (lipopeptídeo), LPS (lipopolissacarídeo) e dsRNA (RNA de fita dupla). (Fonte: <http://ahavj.ahajournals.org/cgi/content-nw/full/circresaha;96/1/15/FIG1>).

Em *Drosophila melanogaster*, dez TLRs já foram identificados, contudo apenas um apresentou um papel na imunidade inata, sendo capaz de responder a bactérias, fungos e infecções virais (Zambon et al., 2005). Um homólogo ao *Toll* também foi identificado no caranguejo japonês *Tachypleus tridentatus* (Inamori et al., 2004).

3.1.7 SISTEMA INTERFERON

Os interferons (IFNs) são citocinas resistentes a pH que induzem um estado antiviral em células e exercem um importante papel na defesa contra infecções virais de vertebrados (Samuel, 2001). Duas famílias de IFNs (Tipo I e Tipo II) podem ser diferenciadas com base em suas seqüências de genes, estrutura protéica e propriedades funcionais (Samuel, 2001; Pestka et al., 2004a; Kontsck et al., 2003).

Os IFNs do tipo I são IFN α e IFN β que são produzidos por leucócitos e fibroblastos. O IFN do tipo II é o IFN γ e é produzido por células *natural killer* (NK) e linfócitos T (Samuel, 2001; Vilcek e Sem, 1996). Os IFNs do tipo I podem ser distinguidos do IFN γ por serem mais estáveis em pH ácido (Pfeffer et al., 1998). Apesar de estruturalmente os dois tipos pertencerem à família de citocinas α -hélice de classe II, eles têm estruturas tridimensionais diferentes e se ligam a receptores distintos (Robertsen, 2005) (**Figura 7**).

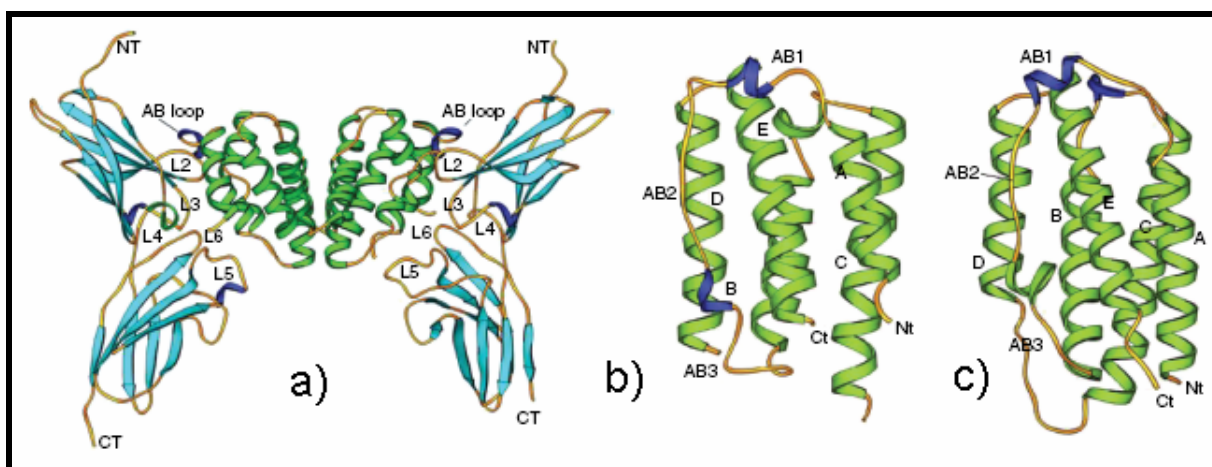


Figura 7. Estruturas em 3D dos tipos de interferons. a) Interferon γ (IFN γ); b) Interferon α (IFN α); c) Interferon β (IFN β). (Fonte: Immunological Reviews 2004, Vol. 202: 8-32).

Os IFNs produzidos são transportados pela corrente sangüínea para células não infectadas e se ligam a seus respectivos receptores. O receptor dos IFNs α e β contém as subunidades IFNAR-1 e IFNAR-2, enquanto que o receptor do IFN γ é formado pelas subunidades IFNGR-1 e IFNGR-2 (Samuel, 2001; Pestka et al., 2004a; Pestka et al., 2004b). Juntas, essas subunidades são capazes de se ligar aos IFNs e iniciarem uma cascata de transdução de sinais (Pestka, 2005).

3.1.7.1 SINALIZADORES JAK/STAT

A cascata de transdução de sinais consiste na fosforilação de tirosinas-quinase chamadas Janus quinases (JAK), fosforilação do receptor e subsequente fosforilação do transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT) (Pestka, 2005). Esse fator de transcrição se dimeriza e se transloca para o núcleo onde se associa a genes induzidos pelos interferons, ativando sua transcrição (Robertson 2005).

3.1.7.2 INDUÇÃO DE INTERFERONS

Os IFNs são fortemente induzidos por RNAs de dupla fita (dsRNA), uma molécula que ocorre freqüentemente durante infecções virais como um resultado da replicação genômica do vírus e de RNAs virais com estrutura secundária extensa (Jacobs e Langland, 1996).

O reconhecimento de ácidos nucléicos virais ocorre através de receptores semelhantes a *Toll* (TLRs). Os TLRs são receptores transmembrana que estão envolvidos na expressão de citocinas e moléculas estimuladoras da resposta adaptativa. O TLR3 reconhece dsRNA; o TLR7 e TLR8 reconhecem RNA de fita simples (ssRNA) e o TLR9 reconhece DNA viral e bacteriano (Alexopoulou et al., 2001; Lund et al., 2004; Tabet et al., 2004; Heil et al., 2004; Diebold et al., 2004). O reconhecimento de dsRNA pelos TLRs de células infectadas promove a ativação de fatores de transcrição (IRF3 e NF κ B) que se translocam para o núcleo e ativam a transcrição dos interferons (Robertson, 2005).

3.1.7.3 PROTEÍNAS INDUZIDAS POR INTERFERONS

A transcrição de genes leva à formação de proteínas com propriedades antivirais, impedindo a proliferação do vírus e estimulando antígenos de superfícies e a citotoxicidade celular (Pestka, 2005). Entre essas proteínas estão a proteína quinase dependente de RNA (PKR), a proteína Mx e a 2',5' - oligoadenilato sintetase (OAS). PKR é uma quinase que fosforila o fator de iniciação eucariótico 2 (eIF2), resultando na inibição da síntese de proteínas virais e das células do hospedeiro. A OAS, quando ativada, converte ATP em oligoadenilatos ligados às extremidades 2'5' e ativa a uma endorribonuclease (RNase L), que degrada mRNA viral e celular (Robertsen, 2005). As proteínas Mx previnem a replicação viral impedindo o tráfego intracelular de nucleocapsídeos (Haller e Kochs, 2002).

3.1.8 PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS ANTIMICROBIANAS

Em algumas reações de defesa, uma série de substâncias que estão presentes em pequenas quantidades na hemolinfa ou que aparecem durante o curso de uma infecção, tem sua síntese estimulada. Essas substâncias estão envolvidas no reconhecimento, na mediação da resposta imune celular ou na resposta direta antimicrobiana. Entre elas estão as lectinas e os peptídeos ou proteínas antimicrobianas (AMPs) (Mendonza e Faye, 1999; Kawabata e Iwanaga, 1999).

As lectinas são proteínas com afinidade por carboidratos e estão relacionadas a vários fenômenos de reconhecimento celular, incluindo adesão a hemócitos e microorganismos. Desempenham assim, um importante papel na imunidade dos artrópodes, funcionando como opsoninas, proteínas que se ligam a partículas antigênicas e facilitam sua fagocitose, ao se aderirem aos organismos invasores (Borneman e Lowrie, 1998).

Os AMPs são convencionalmente descritos como moléculas anfipáticas e catiônicas, compostas de 12 a 45 resíduos de aminoácidos e codificadas por genes, mas já há evidências de que outros AMPs ou polipeptídios possam se originar de várias outras fontes, tais como de hidrólises de proteínas inativas (Bachère et al., 2004).

O principal modo de ação destas moléculas é por meio do aumento da permeabilidade da membrana plasmática. Inicialmente, há uma interação eletrostática entre o AMP positivamente carregado e os componentes da membrana do microorganismo, carregados negativamente. Posteriormente, a interação entre a porção apolar da membrana das células e os resíduos hidrofóbicos das AMPs culminam na permeabilização das membranas (Silva, 2000).

Os AMPs apresentam uma grande diversidade em termos de características estruturais, propriedades e funções biológicas, e também em sua distribuição no tecido e nível de expressão (**Quadro 2**).

Quadro 2. Classificação dos peptídeos antimicrobianos (AMPs).

Famílias	Características	Exemplos	Grupos de Invertebrados
Peptídeos Lineares	Formam estruturas anfipáticas em α -hélice	Cecropinas, Moricina	Dípteras, lepidópteras
Peptídeos ricos em cisteína	Apresentam pontes dissulfeto intramoleculares	Defensinas, Drosomicinas, Taquipesinas	Insetos, aracnídeos, quelicerados, moluscos
Peptídeos ricos em prolina	Aminoácidos compostos por resíduos de prolina	Apidaecinas, Abaecinas, Drosocinas	Díptera, himenóptera, hemíptera
Peptídeos ricos em glicina	Aminoácidos compostos por resíduos de glicina	Atacinas, Dipterocinas, Sarcotoxinas	Coleópetra, lepidóptera

Em insetos, a síntese de AMPs induzida por ferimentos leva a uma rápida e transitória transcrição de alguns genes que codificam potentes peptídeos antimicrobianos e antifúngicos, que são liberados dentro do sangue onde atuam destruindo os microorganismos invasores (Bachère, 2000).

Mais de 700 AMPs foram descritos e destes, mais de 50% têm sido identificados em invertebrados. Desde a primeira caracterização da cecropina no inseto *Hyalophora cecropia*, mais de 170 AMPs foram identificados em insetos (Bartlett et al., 2002; Bachère et al., 2004).

As peneidinas formam uma nova família de AMPs, pois apresentam tanto um domínio rico em prolina na porção amina quanto um domínio contendo seis cisteínas na porção carboxi (Bachère et al., 2004; Bartlett et al., 2002).

Sob condições normais, as peneidinas são produzidas por hemócitos e estão localizadas na corrente sanguínea ou difundidas nos tecidos do camarão (Figura 8).

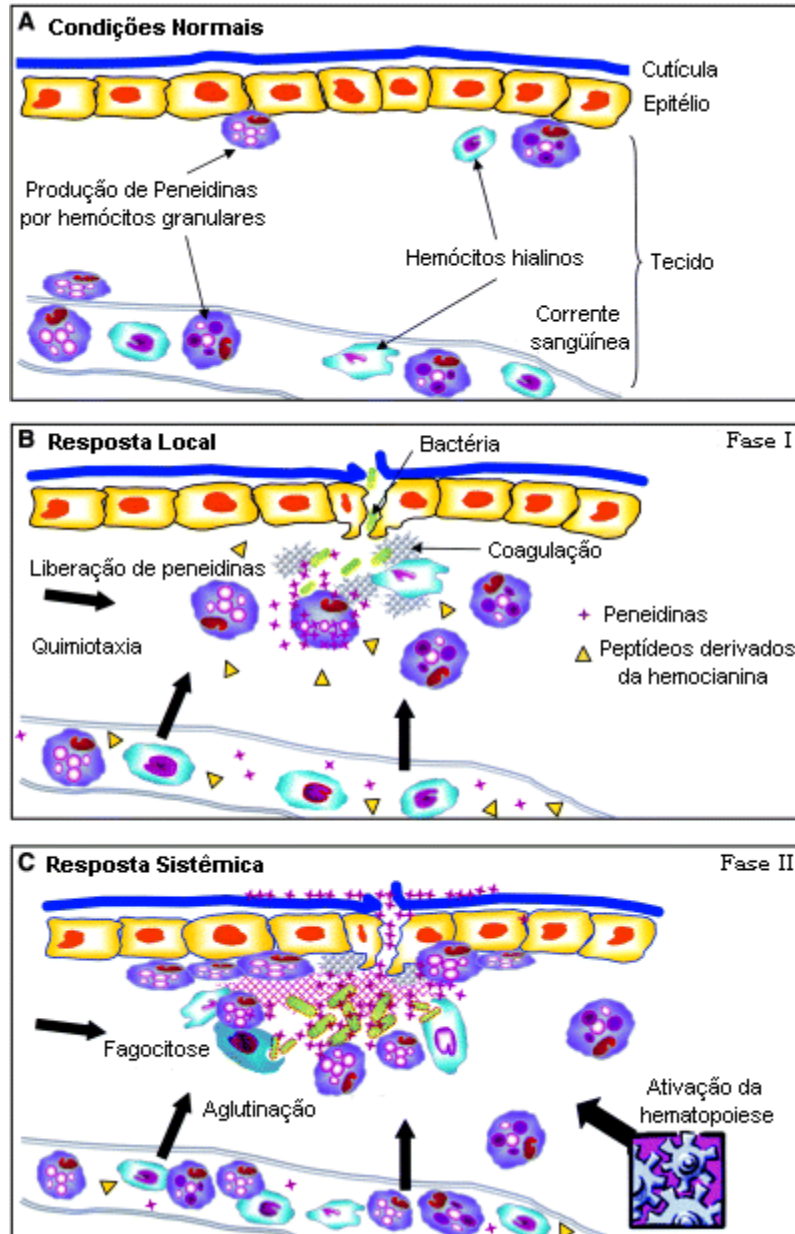


Figura 8. Modelo proposto de resposta antimicrobiana em camarões, envolvendo os peptídeos antimicrobianos. (A) Condição normal. (B) Resposta local. (C) Resposta sistêmica. (Fonte: Adaptado de Bachère et al. 2004).

Quando há uma infecção microbiana, a resposta ocorre em duas fases. A Fase I ou resposta local é caracterizada pela migração dos hemócitos em direção ao local da infecção e por intensa liberação de peneidinas.

As peneidinas livres e os peptídeos derivados da hemocianina são vistos na circulação. A Fase II ou reação sistêmica é caracterizada por uma forte acumulação das peneidinas produzidas pelos hemócitos, como um resultado da ativação da hematopoiese. As peneidinas também migram para a superfície da cutícula.

3.2 BIOINFORMÁTICA

Dados biológicos advindos do conhecimento genômico são relativamente complexos em comparação aos provenientes de outras áreas científicas, dada a sua diversidade e ao seu inter-relacionamento. O seqüenciamento do genoma objetiva compreender o conjunto de genes e produtos gênicos que atuam no funcionamento complexo de todo o organismo. A genômica *per se* busca entender as estruturas moleculares das proteínas, as interações entre elas, bem como suas interações com as demais moléculas biológicas, as diversas vias metabólicas celulares e o papel da variabilidade genética representada pelas várias formas de cada proteína. As informações geradas pelo seqüenciamento só podem ser organizadas, analisadas e interpretadas com o apoio da informática (Santos e Ortega, 2003).

A bioinformática é imprescindível para a manipulação dos dados biológicos e pode ser definida como uma modalidade que abrange todos os aspectos de aquisição, processamento, armazenamento, distribuição, análise e interpretação, através da combinação de procedimentos e técnicas da matemática, estatística e ciência da computação (Borém e Santos, 2003).

A necessidade do desenvolvimento de ferramentas de bioinformática aplicadas às seqüências de DNA e proteínas começou a surgir com o acúmulo de informações de interesse público ou comum a diversos grupos de pesquisa, que surgiram como resultado do Projeto Genoma Humano. Dessa forma, universidades, instituições governamentais e indústrias farmacêuticas compõem grupos de bioinformática para suprir as informações geradas em grande escala pelos seqüenciadores no mundo (Prosdocini et al., 2002).

3.2.1 BANCO DE DADOS GENÔMICOS

Para organizar de maneira acessível esse volume de informações geradas pelos seqüenciadores, de modo a evitar redundância na pesquisa científica e possibilitar a análise por um maior número de cientistas, fez-se necessário construir bancos de dados. Neles são armazenadas seqüências de DNA e genomas inteiros, proteínas e suas estruturas tridimensionais (Santos e Ortega, 2003).

O Genbank é o mais conhecido banco de dados que disponibiliza, gratuitamente, seqüências e ferramentas para sua análise. Este banco foi criado, inicialmente, pelo Centro Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI) (**Figura 9**) com o objetivo de abrigar seqüências submetidas diretamente por autores de publicações científicas. Entretanto, não só autores, como também centros de pesquisa passaram a depositar regularmente seus dados (Tateno et al., 2002).

Figura 9. Página de acesso ao site do Centro Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

No campo *Search* pode-se escolher *Nucleotide* (para seqüências de nucleotídeos depositadas no banco) *Pubmed* (para artigos científicos), *Protein* (para seqüências de aminoácidos) e muitas outras fontes de dados.

Cada acesso do Genbank inclui uma breve descrição da seqüência, seu nome científico, a taxonomia do organismo e uma tabela determinando regiões codificantes, bem como outras com relevância biológica, como unidades de transcrição, sítios mutados e repetições, além de artigos e referências bibliográficas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Junto com o Genbank, fazem parte do *International Nucleotide Sequence Database* (INSD) o *DNA DataBase of Japan* (DDBJ) e o *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) que também disponibilizam muitas informações de autores japoneses e europeus, além de manter um importante acordo de cooperação e de intercâmbio de dados (Tateno et al., 2002).

3.2.2 PRINCIPAIS FERRAMENTAS DA BIOINFORMÁTICA

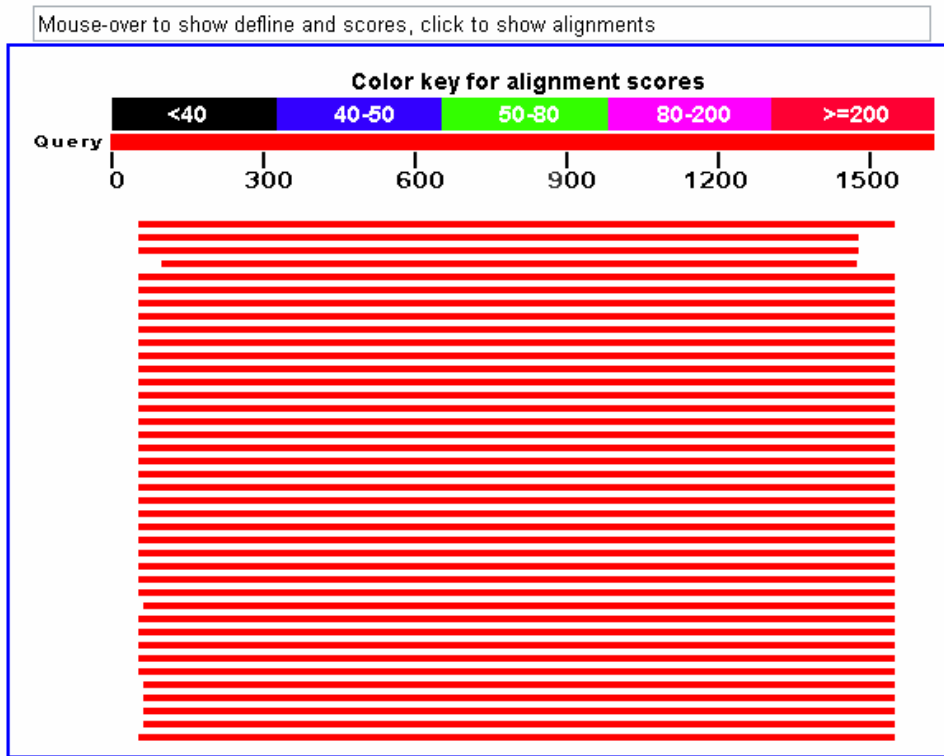
3.2.2.1 A FERRAMENTA BLAST

O *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) é a ferramenta mais popular de comparação de seqüências de DNA e proteínas com os bancos de dados genômicos. Além disso, esse algoritmo permite fazer inferências tanto funcionais quanto evolutivas a respeito das seqüências (Nogueira, 2004).

O programa não procura conduzir uma comparação da extensão total das moléculas comparadas, mas apenas identificar, no banco de dados, a presença de uma seqüência suficientemente parecida com a pesquisada, descartando assim, os resultados não produtivos e estendendo a região homóloga detectada até não mais ser possível (Santos e Ortega, 2003).

O resultado da aplicação do BLAST (**Figura 10**) é dado na forma de um gráfico onde a seqüência analisada e as alinhadas aparecem com barras coloridas designando a qualidade do alinhamento. Cada cor informa o grau de similaridade em relação à seqüência analisada. Além de mostrar o alinhamento, exhibe informações estatísticas designadas *scores* (quanto maior o valor, melhor o alinhamento) e *e-value* (quanto menor o valor, menor a chance de que o alinhamento seja casual) (Morais, 2003).

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence



Related Structures

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gi 452675 emb CAA54524.1 preamylase 1 [Litopenaeus vannamei]	1035	0.0
gi 6689049 emb CAB65553.1 alpha-amylase [Litopenaeus vannamei]	980	0.0
gi 18676373 emb CAB65552.2 amylase I [Litopenaeus vannamei]	893	0.0
gi 6625489 emb CAB63937.1 alpha-amylase [Litopenaeus vannamei]	827	0.0
gi 14318646 gb AAH09121.1 Amy1 protein [Mus musculus] >gi 26...	645	0.0
gi 85002763 gb ABC68516.1 alpha-amylase [Blattella germanica]	644	0.0
gi 38571651 gb AAH62867.1 Amylase-3 protein [Danio rerio]	643	0.0
gi 49927 emb CAA24097.1 alpha-amylase [Mus musculus] >gi 113...	642	0.0
gi 83026376 gb ABB96226.1 salivary alpha-amylase [Clethrionomys	642	0.0
gi 34786087 gb AAH56841.1 MGC64337 protein [Xenopus laevis]	641	0.0
gi 32493344 gb AAH54669.1 Amylase-3 protein [Danio rerio] >g...	641	0.0
gi 26347671 dbj BAC37484.1 unnamed protein product [Mus musculu	641	0.0
gi 56971297 gb AAH88228.1 Amy1 protein [Rattus norvegicus]	640	0.0
gi 58293772 ref NP_001010970.1 amylase 1, salivary [Rattus n...	640	0.0
gi 6996909 ref NP_031472.1 amylase 1, salivary [Mus musculus...	640	0.0
gi 72679786 gb AAI00580.1 Amylase 2, pancreatic [Mus musculu...	640	0.0
gi 49929 emb CAA24098.1 unnamed protein product [Mus musculu...	637	0.0
gi 49956 emb CAA26414.1 pancreatic alpha-amylase precursor [Mus	635	1e-180
gi 49954 emb CAA26413.1 unnamed protein product [Mus musculus]	635	1e-180
gi 1065223 pdb 1PPI Alpha Amylase (Ppa) (E.C.3.2.1.1) Complexe	634	3e-180
gi 17148483 emb CAC87127.1 amylase-3 protein [Tetraodon nigrovi	634	3e-180
gi 55587618 ref XP_524782.1 PREDICTED: amylase, alpha 1A; saliv	634	3e-180
gi 21730571 pdb 1KXV B Chain B, Camelid Vhh Domains In Comple...	634	3e-180
gi 10280622 ref NP_066188.1 amylase, alpha 2B; pancreatic pr...	634	4e-180

Figura 10. Resultado do BLASTx realizado com a seqüência X77318. Esta seqüência trata-se do gene que codifica para a síntese da preamilase 1.

De acordo com o NCBI, os principais tipos de BLAST são:

- BLASTn: compara seqüências de nucleotídeos com o banco de dados de nucleotídeos.
- BLASTp: compara seqüências de aminoácidos com o banco de dados de proteínas. Também identifica possíveis domínios conservados nas proteínas analisadas.
- BLASTx: compara seqüências de nucleotídeos com o banco de dados de proteínas.
- tBLASTn: traduz uma seqüência de aminoácidos para nucleotídeos e compara com o banco de dados de genes.
- tBLASTx: traduz uma seqüência de nucleotídeos para aminoácidos e compara com o banco de proteínas.

3.2.2.2 ALINHAMENTO DE SEQÜÊNCIAS

O programa computacional CLUSTALX (Thompson et al., 1997) é um dos mais usados para obter múltiplos alinhamentos de seqüências, quer sejam de aminoácidos ou nucleotídeos. Produz alinhamentos de acordo com as identidades, similaridades e diferenças entre as seqüências (**Figura 11**).

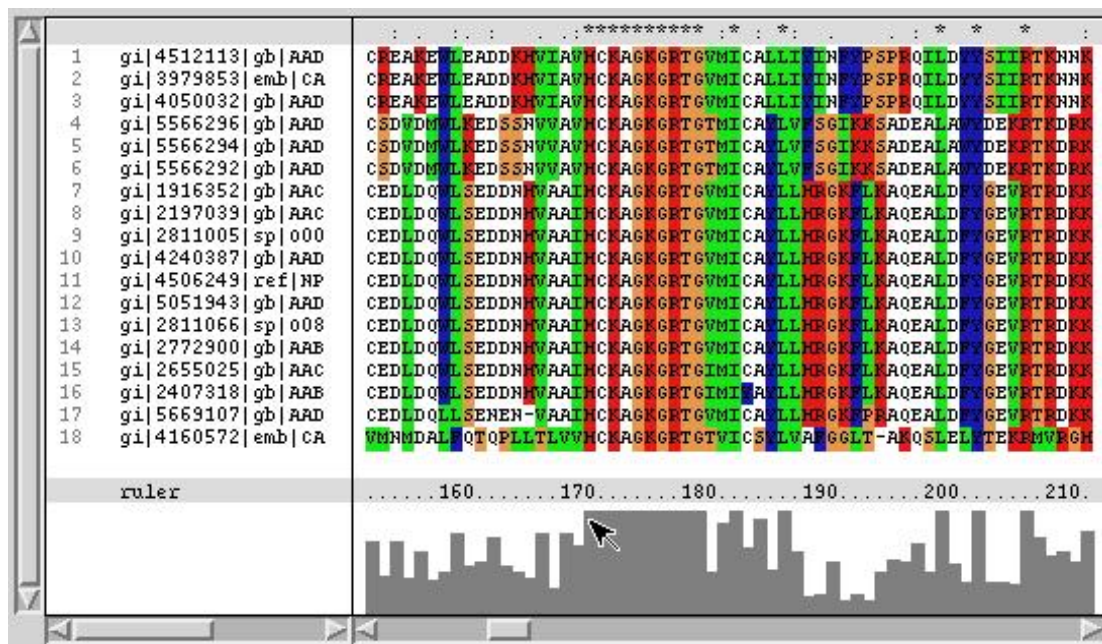


Figura 11. Alinhamento múltiplo produzido pelo CLUSTALX versão 1.83. Os asteriscos na parte superior indicam as regiões mais conservadas entre as seqüências investigadas.

O programa possui cores diferenciadas para cada aminoácido ou nucleotídeo, facilitando a visualização. Podem ser observadas relações evolutivas entre as seqüências através de cladogramas que podem ser gerados pelo CLUSTALX por meio de análises filogenéticas.

Os alinhamentos múltiplos auxiliam a identificação visual de locais em um DNA ou em uma seqüência de proteínas que pode ser funcionalmente importante. Tais locais são normalmente conservados, ou seja, o mesmo aminoácido está presente nesse local em cada um dos grupos das seqüências relacionadas (Gibas e Jambeck, 2001).

Apesar de versátil, o CLUSTAX apresenta algumas restrições de uso, podendo apenas ser utilizado para alinhar genes que tenham um mesmo domínio devendo aparecer na mesma ordem em todas as seqüências (Morais, 2003).

4. ARTIGO CIENTÍFICO

IDENTIFICAÇÃO DE GENES RELACIONADOS AO SISTEMA IMUNE DO CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei*.

Artigo a ser submetido para o periódico Genetics and Molecular Biology

LIMA NETO, E.C.¹; PINHEIRO, A.C.A.S.¹; CABRAL, S.M.¹; MOTA, L.H.M.¹;
COIMBRA, M.R.M.^{1*}

¹ Departamento de Pesca e Aqüicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil, Laboratório de Genética Aplicada - LAGA, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

* Autor para correspondência:

Maria Raquel Moura Coimbra, Laboratório de Genética Aplicada - LAGA,
Departamento de Pesca e Aqüicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil,
CEP 52171-900, Tel: 81-3320-6522, email: rcoimbra@ufrpe.br.

ABSTRACT

Viruses are among the most harmful pathogens found in aquaculture and are the most numerous and diverse of the pathogenic agents described to crustaceans. The knowledge about genes associated to immunity viral response, as well as the relationships between pathogen and host still very incomplete. Moreover, shrimp cell lines are not available, thus limiting primary systems of cellular culture to assist searches in genomic expression. The Expressed Sequence Tags (ESTs) analyses have become a common tool used to identify genes involved in some specific biological functions, particularly in organisms in which genomic data are not available. The Laboratory of Applied Genetics (LAGA) of the Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) is one of the members of the Shrimp EST Genome Project (ShEST), assisting on sequencing and search for genes related to shrimp immune response against the viral infections. Libraries of different tissues (muscle, hepatopancreas, ocular peduncle) and different larval stages of *Litopenaeus vannamei* were sequenced using BigDye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems) or ET-Dye Terminator (Amersham/GE Healthcare) and M13 universal primer (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'). The sequences were analyzed in automated sequencers MegaBace1000 (Amersham/GE Healthcare) and Applied Biosystems 377 (ABI377). These sequences were analyzed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). The results presented homology with interferon system proteins, like 2', 5'-Oligoadenylate binding protein, Toll like receptors, JAK/STAT and Interferon like protein. The 2', 5'-Oligoadenylate binding protein would be the first protein related to interferon system described in shrimps. A lot of sequences are still need to be investigated to complete the whole genome of *Litopenaeus vannamei*, nevertheless there are indications that this animal has a complex antiviral defense system, similar to interferon.

Keywords: Innate immunity, interferon, sequencing, ESTs.

INTRODUÇÃO

Os camarões peneídeos representam uma das espécies mais cultivadas na aqüicultura. O cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, no Brasil, registrou crescimentos elevados e consistentes de produção até 2003. Em 2004, a sustentabilidade desta atividade foi comprometida por uma série de fatores não apenas econômicos, mas também ambientais e biológicos (surgimento do vírus da Mionecrose Infecciosa - IMNV), que juntos contribuíram para a queda na produção total de 15,84% (Rodrigues, 2005).

O cultivo de camarões em altas densidades é freqüentemente visto como uma das razões para o surgimento de doenças na aqüicultura. Os animais em cultivos intensivos são continuamente afetados por variações ambientais e práticas de manejo, que podem criar condições de estresse consideráveis e tornar os animais susceptíveis a uma grande variedade de doenças infecciosas.

Os camarões, como outros invertebrados, não têm um verdadeiro sistema imune adaptativo e, portanto, dependem da resposta imune inata (Hoffmann et al., 1999). O primeiro nível da resposta imune inata é o reconhecimento de patógenos invasores, realizado por hemócitos e proteínas plasmáticas (Bachère, 2000). A partir disso, uma série de eventos são desencadeados na tentativa de eliminar o invasor, incluindo coagulação, fagocitose e ativação de moléculas como fenoloxidasas, lectinas, hemocianinas e peneidinas.

O estudo do transcriptoma de um organismo, além de ser importante para a identificação de genes, incorpora informações sobre o funcionamento do genoma. Para estudar o transcriptoma não é necessário seqüenciar completamente todos os genes de um tecido ou organismo. Os genes podem ser identificados através da análise de pequenas seqüências denominadas Seqüências Expressas Identificadas *Expressed Sequence Tags* (ESTs), que são resultado do seqüenciamento parcial de cDNAs (Santos e Ortega, 2003) e constituem ferramentas extremamente úteis para a exploração orientada à investigação da expressão gênica (Gibas e Jambeck, 2001).

A análise de ESTs tem se tornado uma prática comumente utilizada para identificar genes envolvidos em funções biológicas específicas, especialmente em organismos onde os dados genômicos não estão disponíveis, como por exemplo, a tolerância ao estresse osmótico em plantas (Zhang et al., 2001) ou perfil dos genes durante a embriogênese em ascídias (Satou et al., 2002).

ESTs também foram utilizados para identificar marcadores genéticos em salmão (Davey et al., 2001), indicadores de estresse ambiental na ostra americana (Jenny et al., 2002) e para caracterizar genes relacionados com a imunidade em camarões (Gross et al., 2001).

Nos organismos marinhos, particularmente aqueles de interesse econômico, o acesso aos dados genômicos pode subsidiar o desenvolvimento de novas tecnologias para as atividades ligadas à aquicultura (Bachère et al., 2004), tais como mapeamento genético, identificação de genes relacionados a caracteres de interesse econômico e seleção assistida por marcadores moleculares.

Alguns projetos de ESTs, em camarões, foram realizados em várias espécies tanto em animais não submetidos a desafios quanto em animais infectados por vírus (Bachère et al., 2004). Em *Litopenaeus vannamei* e *Litopenaeus setiferus*, a alta representação de genes do sistema imune nas bibliotecas de hemócitos confirmou o papel primário dessas células na defesa do organismo (Gross et al., 2001). Além disso, vários peptídeos antimicrobianos (AMPs) já foram identificados, principalmente os pertencentes ao grupo das peneidinas (Bachère et al., 2004).

O projeto genoma EST do camarão *Litopenaeus vannamei* (ShEST), constituído por uma rede de 14 laboratórios de universidades brasileiras, espalhados por nove Estados: Bahia, Ceará, Maranhão, Pará, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Santa Catarina, São Paulo e Rio Grande do Sul, tem por objetivo seqüenciar 300.000 Seqüências de Genes Expressos (ESTs) do *L. vannamei* e minerá-las através do *GenBank* para o desenvolvimento de tecnologias de base genética para o setor produtivo.

O ShEST conta com 10 grupos de mineração, envolvendo diversos temas, tais como: estudos funcionais de proteínas de cutícula do camarão; identificação de marcadores moleculares com alta taxa evolutiva; prospecção de genes ligados ao sexo; genes codificadores de isoformas de actina no camarão, entre outros.

Apesar da resposta imune antibacteriana e antifúngica serem amplamente estudadas, pouco se sabe sobre os mecanismos de defesa em nível celular ou molecular para a resposta imune viral. O conhecimento sobre os genes associados à resposta imune viral, bem como a relação entre patógenos e hospedeiro ainda é escasso.

Além disso, não há disponibilidade de linhas de célula para camarões, o que limita os sistemas primários de cultura celular, que por sua vez subsidiam pesquisas voltadas à expressão gênica. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi identificar genes relacionados aos mecanismos de defesa contra vírus em *Litopenaeus vannamei*, como parte integrante do projeto genoma do camarão.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos Animais

Os animais utilizados para extração do RNA foram obtidos do Laboratório de Larvicultura AQUATEC, da fazenda de produção CAMANOR, ambos localizados no município de Canguaretama (RN), e da fazenda BAHIA - MARICULTURA, do município de Valença (BA).

Extração do RNA total

O RNA total foi extraído de diferentes tecidos (músculo, hepatopâncreas, pedúnculo ocular) e diferentes fases larvais de *Litopenaeus vannamei* (ovo, náuplio, mysis) utilizando-se Trizol (Invitrogen) ou o kit *Total RNA Isolation System* (Promega) de acordo com as recomendações dos fabricantes. O RNA mensageiro foi purificado a partir do RNA total usando-se o kit *Fast Track 2.0 mRNA Isolation* (Invitrogen), também de acordo com as recomendações do fabricante. A integridade e pureza do RNA foram monitoradas por medidas de absorbância a 260/280 nm, bem como análises em gel de agarose.

Construção das bibliotecas de cDNA

As bibliotecas foram construídas utilizando *Superscript cDNA Synthesis and Plasmid Cloning kit* (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Cinco microgramas de mRNA foram submetidos à reação de transcrição reversa usando um oligonucleotídeo poli-dT contendo um sítio para a enzima Not I. A eficiência da síntese foi monitorada usando-se desoxinucleotídeos radioativos. A segunda fita do cDNA foi sintetizada por substituição da fita de RNA híbrido usando-se uma mistura de RNase H, DNA pol I e DNA ligase. Após a síntese da 2ª fita, ao cDNA foram ligados adaptadores Sa/I e o cDNA foi digerido com Not I, de forma a gerar extremidades Sa/I na região 5' e Not I na região 3'. O excesso de adaptadores foi retirado através de separação em coluna de Sepharose CL-2b (1mmx40cm).

Alíquotas de 150µL foram coletadas das quais 8-10µL foram analisadas em gel de agarose 1,5% para determinar o tamanho médio dos cDNAs. Foram selecionadas frações contendo cDNAs com um tamanho mínimo de 500pb para ligação no vetor pSPORT1 (Invitrogen) pré-digerido com Sa/I e Not I. As misturas de ligação foram utilizadas para transformar células de *Escherichia coli* DH10B por eletroporação. As bibliotecas não amplificadas foram submetidas então ao plaqueamento e colônias individuais foram transferidas para placas de 96 poços.

Procedimento para o seqüenciamento

Trinta placas das bibliotecas, referentes a pedúnculo ocular, náuplio e ovo foram processadas para crescimento e seqüenciamento na UFRPE. Cada placa continha 96 clones bacterianos, transformados com o plasmídeo pSPORT 1 e cDNA de *L. vannamei*.

As bactérias foram cultivadas em placas de crescimento contendo meio Circle Grow a 4% e incubadas a 37°C e 250 rpm por 24 horas. Após esse período, o DNA plasmidial foi separado e amplificado por PCR, seguindo 25 ciclos de 95° - 20s; 50° - 15s e 60° - 60s, usando BigDye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems) ou ET-Dye Terminator (Amersham/GE Healthcare) e o primer M13 universal (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'). As reações foram precipitadas com etanol após adição de acetato de sódio, seguindo o protocolo de cada Kit empregado no seqüenciamento. As seqüências foram analisadas em seqüenciadores automáticos MegaBace1000 (Amersham/GE Healthcare) e Applied Biosystems 377 (ABI377).

Submissão e análise das seqüências

As seqüências obtidas foram transmitidas em formato “zip”, via rede, para o Laboratório de Bioinformática da UFSCar para serem analisadas e posteriormente depositadas em um banco de dados do projeto ShEST, disponibilizadas para todos os participantes do projeto.

As seqüências depositadas no referido banco de dados foram usadas para a mineração de genes que estivessem relacionados à imunidade contra vírus, usando-se a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

RESULTADOS

Foram processadas um total de 2880 seqüências das bibliotecas de pedúnculo ocular, náuplio e mysis. Dentre essas seqüências, algumas tiveram similaridade com genes relacionados à imunidade. As **figuras 1 e 2** mostram os resultados dos alinhamentos obtidos utilizando-se o programa BLAST, que tiveram altas homologias a proteínas do sistema interferon, a proteína semelhante ao interferon (IntIP) com 78% de identidade e a proteína de ligação 2',5'-oligoadenilato (2',5'-oligoadenylate binding protein) com 68% de identidade.

```
>UEI-MC2-210604-1-007-E12.G SUBMISSION_ID [(88)] HQ [(7,572)]
      VECTORS [(39,126),(7,42)]
      Length = 623

Score = 105 bits (263), Expect = 2e-24
Identities = 50/64 (78%), Positives = 55/64 (85%)
Frame = +1

Query: 1  MRRKPSGRLKVRRCFLMPSEKMLHSSLKLLTERGWQLFMLRSRKGWTTSWRPPMSKLALS 60
          MRR+PSG+LK R+  MPSEKMLHSSLKL TE+GWQLF+ R RKGWTTSWR P SKLALS
Sbjct: 214 MRRRPSGKLKARKYSSMPSEKMLHSSLKLPTEKGWQLFIQRLRKGWTTSWRLPTS KLALS 393

Query: 61  RSTW 64
          RSTW
Sbjct: 394 RSTW 405
```

Figura 1. Resultado do alinhamento da seqüência AY695938 usando-se o programa tBLASTn.

```
>UEI-MC2-220604-1-003-B03.G SUBMISSION_ID [(86)] HQ [(48,742)]
      VECTORS [(76,164),(48,79)]
      Length = 907

Score = 228 bits (580), Expect(3) = 1e-65
Identities = 115/169 (68%), Positives = 135/169 (79%), Gaps = 1/169 (0%)
Frame = +2

Query: 102 VTMPFSVREGINIFLDGYVPTENLRF RDASLVFKVAETANEEEEVXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 161
          VT+PFSVREGIN+FLDG+VPTENLRF R+ SL FKV++ +EEE+
Sbjct: 170 VTPVFSVREGINVF LDGFVPTENLRF REESLTFKVSDQLSEEEIKRMCRLKYPKMTKKMG 349

Query: 162 EFELAI VAGEFTDSEIMV MLGENTGKTTFIRMLAGRLKPDEG-GEVPVLNVSYKPQKIS 220
          +F L I AG FTDSEIMV+LGENTGKTTFIRMLAGRL+PDEG ++P L++SYKPQKIS
Sbjct: 350 DFHLTIDAGNF TDSEIMVLLGENTGKTTFIRMLAGRLEPDEGKSDLPELHISYKPQKIS 529

Query: 221 PKSTG SVRQLLHEKIRDAYTHPQFVTDVMKPLQIENIIDQEVQTL SGGE 269
          PKS +VRQLLH+KIRDAY PQFVTDVMKP++IE + DQEVQ LSGGE
Sbjct: 530 PKSQSTVRQLLHDKIRDAYILPQFVTDVMKPKIEELFDQEVQHLSGGE 676
```

Figura 2. Resultado do alinhamento da seqüência CAA52920 usando-se o programa tBLASTn.

A **tabela 1** mostra outros resultados obtidos empregando-se o programa BLAST, mas que tiveram baixas homologias com outras proteínas relacionadas ao sistema interferon. Além disso, são mostrados resultados obtidos com outras proteínas que estão relacionadas com a imunidade, tais como hemocianina, fortilina e ubiquitina.

Tabela 1. Genes relacionados ao sistema imune de *Litopenaeus vannamei* identificados no Genbank

Genes	Nº de acesso	Espécies	Tamanho do fragmento (bp)	e-Value x/y^a aminoácidos (%Identidade)
Sistema Interferon				
TLR	AAQ64938	<i>Drosophila melanogaster</i>	761	3e-04 34/130 (26%)
TLR	BAD12073	<i>Tachypleus tridentatus</i>	761	9e-07 32/84 (38%)
Jak/Stat	NM_078564	<i>Drosophila melanogaster</i>	1477	6e-06 36/121 (29%)
2-5 Adenilato sintetase	CAB38027	<i>Geodia cydonium</i>	1141	0.53 32/121 (26%)
Outros				
Hemocianina ^b	X82502	<i>Penaeus monodon</i>	1199	0.0 646/652 (99%)
Fortilina	AAO61938	<i>Penaeus monodon</i>	765	5e-92 165/168 (98%)
Ubiquitina	AY695937	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	758	5e-51 102/132 (77%)

^a x/y : número de aminoácidos idênticos entre as seqüências comparadas / número de aminoácidos por alinhamento.

^b: Vários clones foram identificados para a hemocianina

DISCUSSÃO

Interessantemente, o presente trabalho obteve um resultado com alta similaridade à proteína semelhante ao interferon (IntIP) de uma outra espécie de camarão, *Marsupenaeus japonicus*. Essa proteína (nº de acesso AY695938) foi encontrada pela primeira vez em camarões desta espécie por He et al., (2005), que relatou uma homologia de 40% com o interferon alfa de uma espécie de mamífero. Os resultados mostraram a existência de dois clones de *L. vannamei* com alta homologia em relação à proteína descrita por aqueles autores, contudo uma análise mais detalhada na referida seqüência revelou que a mesma parece tratar-se de ATP-sintase, haja vista sua similaridade com esta enzima em vários organismos, incluindo invertebrados e espécies de peixe, mais do que com interferons.

Uma OAS já foi identificada em um grupo de invertebrados, as esponjas, permitindo o questionamento de que outros grupos de invertebrados também a possuam (Loker et al., 2004). O resultado obtido, quando comparado com a seqüência (CAB38027) não produziu homologia significativa. Porém, quando comparado à seqüência de *Homo sapiens* (CAA52920) obteve-se uma alta similaridade (68%). Essa seria a primeira descrição de uma OAS para camarões. Esse fato evidenciaria a presença desse componente em mais um grupo de invertebrados, sugerindo que exista um mecanismo de resposta viral semelhante ao do sistema interferon dos vertebrados.

Apenas um resultado mostrou homologia ao Jak/Stat de *Drosophila melanogaster*, obtendo uma baixa similaridade (29%).

Em invertebrados, especialmente na *Drosophila sp.*, os TLRs são muito semelhantes ao Toll de mamíferos (Inamori et al., 2004). Alguns clones das bibliotecas apresentaram homologias com TLRs de *Drosophila sp.* e *Tachypleus tridentatus*, um caranguejo japonês. No entanto, essas similaridades não foram significativas, apresentando 26% e 38% de identidade, respectivamente.

A hemocianina é o principal componente protéico da hemolinfa, que tem como função primária transportar oxigênio, mas também está envolvida em outros processos fisiológicos como a osmorregulação e atividades enzimáticas. Além disso, ela apresenta uma propriedade antiviral que não culmina com a eliminação do vírus, mas inibe sua replicação (Zhang et al., 2004).

Outro resultado encontrado em nas bibliotecas foi a fortilina. Essa proteína está relacionada com a sobrevivência das células contra o mecanismo de apoptose. Rojtinnakorn et al. (2002) afirmam que a alta taxa de expressão dessa proteína em camarões resistentes ao vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) sugere que ela tenha um papel fundamental no processo de defesa, mas não se tem conhecimento ainda de seu mecanismo antiviral.

Já a ubiquitina foi descrita pela primeira vez em camarões por He et al. (2004). Em seu trabalho, os autores relataram uma similaridade de 100% com as seqüências de mamíferos e invertebrados. Aqui, os resultados corroboram com os encontrados por esses autores, apresentando homologia de 77% com a ubiquitina de *Marsupenaeus japonicus*.

5. CONCLUSÕES

- A oligoadenilato sintetase aqui encontrada, que teve homologia de 68% com 2',5' - Oligoadenylate binding protein de *Homo sapiens*, é um indício de que camarões exibam mecanismos de defesa antivirais semelhantes ao sistema interferon dos vertebrados;
- O número de seqüências relativas ao genoma do *L. vannamei*, até então obtidas, é ainda insuficiente para esclarecer por completo sua defesa via sistema interferon.
- A presença de outras proteínas, tais como: hemocianina, fortilina e ubiquitina encontradas nas bibliotecas de cDNA de *L. vannamei*, sugerem a existência de outros mecanismos de defesa contra vírus, além do sistema interferon.
- O sistema imune inato dos camarões parece ser mais complexo do que se imaginava, uma vez que o genoma do *L. vannamei* apresenta genes que codificam determinadas proteínas, até então só relatadas em vertebrados. Esse achado aponta uma nova perspectiva para os mecanismos de defesa dos camarões contra infecções virais e ressalta a necessidade de se determinar a função exata destes genes e os mecanismos de controle transcricional que viabilizarão o desenvolvimento de quimioterápicos estimulantes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOU, L.; HOLT, A.C.; MEDZHITOV, R.; FLAVEL, R.A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. **Nature**, v.413, n.6857, p.732-738, 2001.

BACHÈRE, E. Shrimp immunity and disease control. **Aquaculture**, v.191, p.3-11, 2000.

BACHÈRE, E.; GUEGUEN, Y.; GONZALEZ, M.; de LORGERIL, J.; GARNIER, J.; ROMESTAND, B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, v.198, p.149-170, 2004.

BARTLETT, T.C.; CUTHBERTSON, B.J.; SHEPARD, E.F.; CHAPMAN, R.W.; GROSS, P.S.; WARR, G.W. Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. **Marine Biotechnology**, v.4, p.278-293, 2002.

BORÉM, A.; SANTOS, F.R. **Biociencia Simplificada**. 2.ed. Minas Gerais: Suprema, 2003. 306p.

BORNEMAN, E.; LOWRIE, J. The immune response of corals. Part One: The Invertebrate Immune System. **Aquarium.net**. Abril, 1998. Disponível em: <http://www.reefs.org/library/aquarium_net/0498/0498_1.html> Acesso em: novembro, 2005.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, v.198, p.116-126, 2004.

DAVEY, G.C.; CAPLICE, N.C.; MARTIN, S.A.; POWELL, R. A survey of genes in the Atlantic salmon (*Salmo salar*) as identified by expressed sequence tags. **Gene**, v.363, p.121-130, 2001.

DIEBOLD, S.S.; KAISHO, T.; HEMMI, H.; AKIRA, S.; REIS e SOUSA, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. **Science**, v.303, n.5663, p.1529-1531, 2004.

GIBAS, C.; JAMBECK, P. **Desenvolvendo Bioinformática: ferramentas de software para aplicações em Biologia**. Rio de Janeiro: Campus/O'REILY, 2001. 464p.

GROSS, P. S.; BARTLETT, T.C.; BROWDY, C.L.; CHAPMAN, R.W.; WARR, G.W. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic white shrimp, *L. setiferus*. **Developmental & Comparative Immunology**, v.25, p.565-577, 2001.

HALLER, O.; KOCHS, G. Interferon-induced Mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. **Traffic**, v.3, n.10, p.710-717, 2002.

HE, N.; LIU, H.; XU, X. Identification of genes involved in the response of haemocytes of *Penaeus japonicus* by suppression subtractive hybridization (SSH) following microbial challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, v.17, p.121-128, 2004.

HE, N.; QIN, Q.; XU, X.; Differential profile of genes expressed in hemocytes of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization. **Antiviral Research**, v.66, p.39-45, 2005.

HEIL, F.; HEMMI, H.; HOCHREIN, H.; AMPENBERGER, F.; KIRSCHNING C.; AKIRA, S. et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. **Science**, v.303, n.5663, p.1526-1529, 2004.

HOFFMANN, J.A.; KAFATOS, F.C.; JANEWAY JR, C.A.; EZEKOWITZ, R.A.B. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, v.284, p.1313-1318, 1999.

INAMORI, K.; ARIKI, S.; KAWABATA, S. A toll-like receptor in horseshoe crabs. **Immunological Reviews**, v.198, p.106-115, 2004.

ITURRY-YAMAMOTO, G.R.; PORTINHO, C.P. Sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.47, p.41-51, 2001.

JACOBS, B.L.; LANGLAND J.O. When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. **Virology**, v.219, n.2, p.339-349, 1996.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 762p.

JENNY, M.J.; RINGWOOD, A.H.; LACY, E.R.; LEWITUS, A.J.; KEMPTON, J.W.; GROSS, P.S.; WARR, G.W.; CHAPMAN, R.W. Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the American oyster, *Crassostrea virginica*. **Marine Biotechnology**, v.4, p.81-93, 2002.

KAWABATA, S; IWANAGA, S. Role of lectins in innate immunity of horseshoe crab. **Developmental & Comparative Immunology**, v.23, p.391-400, 1999.

KONTSCK, P.; KARAYIANNI-VASCONCELOS, G.; KONTSCKOVA, E. The human interferon system: characterization and classification after discovery of novel members. **Acta Virologica**, v.47, n.4, p.201-215, 2003.

LECLERC, V.; REICHHART, JM. The immune response of *Drosophila melanogaster*. **Immunological Reviews**, v.198, p.59-71, 2004.

LEE, S.Y.; SÖDERHÄLL, K.; Early events in crustacean innate immunity. **Fish & Shellfish Immunology**, v.12, p.421-437, 2002.

LOKER, E.S.; ADEMA, C.M.; ZHANG, SM.; KEPLER, T.B. Invertebrate immune systems - not homogenous, not simple, not well understood. **Immunological Reviews**, v.198, p.10-24, 2004.

LUND, J.M.; ALEXOPOULOU, L.; SATO, A.; KAROW, M.; ADAMS, N.C.; GALE, N.W. et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.15, p.5598-5603, 2004.

LUO, T.; ZHANG, X.; SHAO, Z.; XU, X. PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. **FEBS Letters**, v.551, p.53-57, 2003.

MACHADO, P.R.L.; ARAÚJO, M.I.A.S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E.M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.79, n.6, p.647-664, 2004.

MENDONZA, H.L; FAYE, I. Physiological aspects of immunoglobulin superfamily in invertebrates. **Developmental & Comparative Immunology**, v.23, p.359-374, 1999.

MORAIS, D.A.L. **Análise bioinformática de genes de resistência a patógenos no genoma expresso da cana-de-açúcar**. 2003. 114f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>> Acesso em: Janeiro, 2005.

NOGUEIRA, A.C.W. **Identificação e análise estrutural do gene de resistência Xa21 no transcriptoma da cana-de-açúcar**. 2004. 70f. Monografia (graduação) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife.

NUNES, A.J.P.; MARTINS, P.C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda. **Panorama da Aqüicultura**, v.12, n.72, p.23-33, 2002.

PAN, J.; KUROSKY, A.; XU, B.; CHOPRA, A.K.; COPPENHAVER, D.H.; SINGH, I.P.; BARON, S. Broad antiviral activity in tissues of crustaceans. **Antiviral Research**, v.48, p.39-47, 2000.

PEREIRA, L.S. **Resposta imune do carrapato bovino *Boophilus microplus*: investigação da produção de espécies reativas de oxigênio pelos hemócitos**. 2000. 102f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

PESTKA, S.; KRAUSE, C.D.; WALTER, M.R. Interferons, interferons-like cytokines, and their receptors. **Immunological Reviews**, v.202, p.8-32, 2004a.

PESTKA, S.; KRAUSE, C.D.; SARKAR, D.; WALTER, M.R.; SHI, Y.; FISHER, P.B. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annual Review of Immunology**, v.22, p.929-979, 2004b.

PESTKA, S. Interferons. Janeiro, 2005. Disponível em <<http://www2.umdj.edu/mimmweb/Instruction/week39/2005%20interferon.pdf>> Acesso em: novembro, 2005.

PFEFFER, L.M.; DINARELLO, C.A.; HERBEMAN, R.B.; WILLIAMS, B.R.; BORDEN, E.C.; BORDENS, R. et al. Biological properties of recombinant alpha-interferons : 40th anniversary of the discovery of interferons. **Cancer Research**, v.58, n.12, p.2489-2499, 1998.

PROSDOCINI, F.; CERQUEIRA, G.C.; BINNECK, E.; SILVA, A.F.; REIS, A.N.; JUNQUEIRA, A.C.M.; SANTOS, A.C.F. et al. Bioinformática: Manual do usuário. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.29, p.12-25, 2002.

RENAULT, T. Anti-viral innate immunity in cultured aquatic species AVINSI (Anti Viral Infection Non-Specific Immunity). Disponível em: <<http://www.ifremer.fr/latremblade/en/europeanprojects/Avinsi/backgrou.htm>> Acesso em: Outubro, 2005.

ROBALINO, J.; BROWDY, C.L.; PRIOR, S.; METZ, A.; PARNELL, P.; GROSS, P.; WARR, G. Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. **Journal of Virology**, v.78, n.19, p.10442-10448, 2004.

ROBERTSEN, B. The interferon system of teleost fish. **Fish & Shellfish Immunology**, *in press*, 2005.

RODRIGUES, J. Carcinicultura Marinha - Desempenho em 2004. **Revista da ABCC**, ano7, n.2, p.38, 2005.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia** 6.ed. Barueri: Manole, 2003. 481p.

ROJTINNAKORN, J.; HIRONO, I.; ITAMI, T.; TAKAHASHI, Y.; AOKI, T. Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. **Fish & Shellfish Immunology**, v.13, p.69-83, 2002.

SAMUEL, C.E. Antiviral actions of interferons. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.4, p.778-809, 2001.

SANTOS, F.C.; ORTEGA, J.M. Bioinformática aplicada à genômica. In: **Melhoramento Genômico**, Minas Gerais: UFV, 2003.

SATOU, Y.; TAKATORI, N.; FUJIWARA, S.; NISHIKATA, T.; SAIGA, H.; KUSAKABE, T.; SHIN-I, T.; KOHARA, Y.; SATOH, N. *Ciona intestinalis* cDNA projects: expressed sequence tag analyses and gene expression profiles during embryogenesis. **Gene**, v.287, p.83-96, 2002.

SILVA, P.I. **Sistema imune em aracnídeos: estrutura química e atividade biológica de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana***. 2000. 169f. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

TABETA, K.; GEORGEL, P.; JANSSEN, E.; DU, X.; HOEBE, K.; CROZAT, K. et al. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.10, p.3516-3521, 2004.

TATENO, Y.; IMANISHI, T.; MIYAZAKI, S.; FUKANI-KOBAYASHI, K.; SAITOU, N.; SUGAWARA, H.; GAJOBORI, T. DNA databank of Japan (DDBJ) for genome scale research in life science. **Nucleic Acids Research**, v.30, p.27-30, 2002.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.25, n.24, p.4876-4882, 1997.

Van de BRAAK, K. **Haemocytic defence in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)**. 2002. 168f. Tese PhD - Wageningen University, Netherlands.

VILCEK, J.; SEN, G.C. Interferons and other cytokines. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven publishers, 1996, p.375-399.

ZAMBON, R.A.; NANDAKUMAR, M.; VAKHARIA, V.N.; WU, L.P. The toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. **PNAS**, v.102, n.20, p.7257-7262, 2005.

ZHANG, X.; HUANG, C.; QIN, Q. Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*. **Antiviral Research**, v.61, p. 93-99, 2004.

WIKIPÉDIA. Sistema imunitário. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Sistema_imunit%C3%A1rio> Acesso em: Novembro, 2005.

WU, J.L.; NISHIOKA, T.; MORI, K.; NISHIGAWA, T.; MUROGA, K. A time-course study on the resistance of *Penaeus japonicus* induced by artificial infection with white spot syndrome virus. **Fish & Shellfish Immunology**, v.13, p.391-403, 2002.

ANEXO

Guia para autores

3. Categories of Contribution:

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout, including the References Cited section, appendices, tables and legends; printed on one side only of A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) The title page must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, arranging for the payment of color illustrations and author's alteration charges.

b) The Abstract must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) The text must be as succinct as possible. Text citation s: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use "et al". Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name ("et al" should not be used). Number s: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. Binomial Name s: Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics; names of orders and families should be in the Title.

The text includes the following elements:

Introduction – Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods – Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results – Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion – The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) The Acknowledgments must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) The References Section: citations must be ordered alphabetically by the first author; only articles that are published or in press should be included; personal communications must be cited within the text; journal titles must be abbreviated according to Medline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi>).

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Bertollo LAC, Takahashi CS and Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev Bras Genet* 1:103-120.

Sample book citation:

Salzano FM and Freire-Maia N (1967) *Populações Brasileiras*. Companhia Editora Nacional and EDUSP, São Paulo, 178 pp.

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Carvalho A, Monaco LC and Krug CA (1966) Melhoramento genético das plantas e sua repercussão econômica. In: Pavan C and da Cunha AB (eds) *Elementos de Genética*. 2nd ed. EDUSP and Companhia Editora Nacional, São Paulo, pp 587-653.

Sample abstracts in meeting citation

Basile R (1973) Cromossomos Politênicos em células nutritivas de ovócitos de ovário atrofiado de *Rhynchosciara* a. *Ciênc e Cult* 25 (suppl): 248. XXV Reunião Anual da SBPC, Rio de Janeiro, Brazil.

Sample Thesis/Dissertation citation

Frota-Pessoa O (1953) Revision of the Tripunctata group of *Drosophila* with description of fifteen new species. PhD Thesis, Universidade do Brasil, Rio de Janeiro .

Sample Electronic Article citation:

Simin K, Wu H, Lu L, Pinkel D, Albertson D, Cardiff RD, Van Dyke T (2004) pRb Inactivation in Mammary Cells Reveals Common Mechanisms for Tumor Initiation and Progression in Divergent Epithelia. *Plos Biol* 2: 194-205. <http://www.plosbiology.org> .

Sample Electronic Database citation:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>

f) Tables each table must start on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript numbers.

g) Figures must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a separate sheet. A set of original illustrations of the highest quality must be provided in glossy paper. If you have created figures electronically submit them also as hard copies. Scanned figures should not be submitted. Images should be in TIFF or JPEG format and provided in separate files. Figures in Word format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale and color at resolution yielding 300 dpi. Authors should submit bitmapped line art at resolution yielding 600–1200 dpi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Identify each illustration by affixing on the back a label containing: the number of the figure, the name of the first author and an arrow indicating top of illustration. Illustrations supplied on disks must follow instructions in item 2 (Submission package). Color illustration can be accepted, but authors are asked to defray the cost. For costs of color figures, check with the Editorial Office.

h) Nomenclature: current standard international nomenclature should be adhered to.

i) Sequences may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases. The accession number must be provided and released to the general public together with publication of the article. Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that the publication is necessary. Complete mtDNA sequence will not be published.

j) Data access: reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

k) Ethical issues: Reports of experiments on live vertebrates must include a brief statement that the work was approved by the institutional review board. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

3.2 Short Communications present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited. They should include an Abstract no longer than five percent of the paper's length and no further subdivision with introduction, material and methods, results and discussion in a single section. Up to two tables and two figures may be submitted. The title page and reference section format is that of full-length article.

3.3 Letters to the Editor relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles are welcome.

3.5 Book Reviews: publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.6 History, Story and Memories: accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil .

4. Proofs: Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

5. Reprints are free of charge and provided as a pdf-file.