

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS GENES BETA-ACTINA  
E MIOSINA DE CADEIA PESADA DO CAMARÃO ROSA *Farfantepenaeus*  
*subtilis*.

ELIANA MATOS RIBEIRO

FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL  
MARÇO/2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS GENES BETA-ACTINA  
E MIOSINA DE CADEIA PESADA DO CAMARÃO ROSA *Farfantepenaeus*  
*subtilis*.

ELIANA MATOS RIBEIRO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA DE PESCA.

FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL  
MARÇO/2009

R398i Ribeiro, Eliana Matos  
Isolamento e caracterização parcial dos genes beta-actina e miosina de cadeia pesada do camarão rosa *Farfantepenaeus subtilis* / Eliana Matos Ribeiro, 2009.  
107 f. ;il. color. enc.

Orientador: Prof. Dr. José Renato de Oliveira César  
Co-Orientadora: Profa.Dra. Diana Magalhães de Oliveira  
Área de concentração: Engenharia de Pesca  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias. Depto. de Engenharia de Pesca , Fortaleza, 2009.

1. Penaeidae 2.Desenvolvimento muscular 3. Identificação de genes  
I. César, José Renato de Oliveira (orient.) II. Oliveira, Diana Magalhães de (co-orient.) III. Universidade Federal do Ceará – Pós-Graduação em Engenharia de Pesca IV.Título

CDD 639.2

Esta dissertação foi submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Pesca, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

---

Eliana Matos Ribeiro

DISSERTAÇÃO APROVADA EM \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

---

Professor Doutor José Renato de Oliveira César  
Orientador da Dissertação  
Presidente

---

Professor Doutor Manuel Antônio de Andrade Furtado Neto  
Conselheiro

---

Professora Doutora Diana Magalhães de Oliveira  
Conselheira

## **AGRADECIMENTOS**

O agradecimento mais importante é para toda minha família, meu pai, minha mãe e meus irmãos e irmã.

Ao meu orientador, Prof. José Renato pelos ensinamentos sobre biologia molecular e pelas idéias sugeridas para o enriquecimento do trabalho.

À minha co-orientadora, Profa. Diana Magalhães, por toda dedicação, paciência e confiança, e por ter cedido as instalações do NUGEN (Núcleo de Genômica e Bioinformática) para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Manuel Furtado, por participar da banca examinadora.

A Profa. Silvana Sampaio, pelo apoio e amizade.

Aos colegas e parceiros do NUGEN pela imensa ajuda e dedicação para a realização deste trabalho.

Aos colegas pesquisadores da UFC, que me auxiliaram durante a pesquisa.

As minhas amigas e meus amigos, que estando perto ou longe geograficamente, estiveram sempre presentes na minha vida, me dando forças para a finalização deste trabalho.

A CAPES, pela bolsa de estudo e oportunidade de trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
<b>RESUMO</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	viii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	ix
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVO</b> .....	9
2.1 Objetivo geral .....	9
2.2 Objetivos específicos .....	9
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	10
3.1 Camarões peneídeos .....	10
3.2 O camarão rosa <i>Farfantepenaeus subtilis</i> .....	14
3.3 Genética de organismos aquáticos .....	18
3.4 Alvos moleculares no estudo genético de peneídeos: os genes actina e miosina .....	21
3.5 Inferências biológicas .....	25
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
<b>4.1 Material utilizado</b> .....	28
a) Equipamentos utilizados .....	28
b) Materiais de consumo .....	28
c) Softwares de análises genéticas .....	28
<b>4.2 Metodologias</b> .....	32
4.2.1 Obtenção e tratamento das amostras .....	32
4.2.2 Identificação da espécie <i>F. subtilis</i> .....	34
a) Morfológica/ Anatômica .....	34
b) Molecular .....	36
4.2.3 Extração de DNA genômico .....	37
4.2.4 Amplificação de 16S e COI .....	39

4.2.5 Sequenciamento de 16S e COI .....	41
4.2.6 Isolamento de beta-actina e miosina de cadeia pesada .....	43
4.2.6.1 Extração de RNA .....	43
4.2.6.2 Síntese de cDNA .....	44
4.2.6.3 Amplificação de beta-actina e miosina de cadeia pesada .....	45
a) Desenho de <i>primers</i> .....	45
b) Reação de PCR .....	48
4.2.6.4 Sequenciamento de beta-actina e miosina de cadeia pesada ....	49
4.2.6.5 Análise das seqüências por ferramentas de bioinformática .....	51
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>53</b>
<b>5.1 Identificação da espécie <i>F. subtilis</i> .....</b>	<b>53</b>
<b>5.2 Isolamento de beta-actina e miosina de cadeia pesada .....</b>	<b>60</b>
5.2.1 Desenho de <i>primers</i> .....	60
5.2.2 Reação de RT-PCR .....	62
5.2.3 Sequenciamento de beta-actina e miosina de cadeia pesada .....	64
5.2.4 Análise das seqüências por ferramentas de bioinformática .....	67
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>
<b>7. ESTUDOS FUTUROS .....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>79</b>

## RESUMO

O camarão peneídeo *Farfantepenaeus subtilis* é uma importante espécie nativa do litoral nordestino que possui uma grande ocorrência na pesca. Dentre os camarões marinhos de importância comercial, os peneídeos se destacam por constituírem um valioso recurso para pesca e aquicultura em regiões tropicais e subtropicais. Entretanto, a disponibilidade de informações sobre essas espécies é bastante escassa, principalmente em relação à estrutura genética que atua no crescimento muscular desses animais. Tendo como objetivo identificar genes envolvidos na contração muscular de camarões, neste trabalho foram parcialmente isolados e seqüenciados os genes de beta-actina e miosina de cadeia pesada do camarão rosa *F. subtilis*, a partir do cDNA do músculo abdominal. Para tanto, camarões coletados no estuário do rio Pacoti, estado do Ceará, foram inicialmente identificados taxonomicamente e, depois através de amplificação de DNA seguida por sequenciamento das regiões citocromo oxidase subunidade I (COI) e 16S. Utilizando-se os tecidos frescos dos camarões, foi extraído o RNA total e foram obtidos os respectivos DNAs complementares (cDNAs). Baseado na construção de *primers* específicos a partir do alinhamento entre seqüências descritas no *Genbank/NCBI*, os genes foram isolados por meio de RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase através da transcriptase reversa) e seqüenciados. Foi obtido um fragmento parcial de 760 pares de base para o cDNA de beta-actina e para o cDNA de miosina de cadeia pesada foi obtido um fragmento de 570 pares de base. Análises das seqüências realizadas pela ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) revelaram alta similaridade com outras beta-actinas e miosinas de camarões, confirmando a identidade das seqüências genéticas isoladas. Como resultado do alinhamento pareado entre as seqüências desses genes obtidos no trabalho com as de outras espécies presentes no GenBank, pôde-se observar que as maiores similaridades foram com *Penaeus monodon* (93%) e com *Farfantepenaeus paulensis* (88%). Os resultados obtidos neste estudo demonstraram a viabilidade da metodologia utilizada na identificação de genes relacionados com características importantes. Esses dados irão facilitar o isolamento completo das seqüências desses genes, além de contribuir para incentivar a identificação de outros genes importantes em camarões, principalmente os nativos do Brasil. Análise de genes que atuam no desenvolvimento do tecido muscular do animal poderá fornecer informações genéticas importantes acerca de uma espécie nativa que está sendo superexplorada e que poderá ser viável para cultivo. Outrossim, esses dados beneficiarão a comunidade científica, servindo como base para estudos de fisiologia, filogenia e evolução em peneídeos.

Palavras-chave: *Farfantepenaeus subtilis*. Gene da miosina. Gene da beta-actina. RT-PCR.

## ABSTRACT

The penaeid shrimp *Farfantepenaeus subtilis* is an important native species for fisheries industry in Brazil. Among marine shrimps of commercial importance, penaeids are recognized as a valuable resource for fishery and aquaculture in tropical and subtropical regions. However, data on these species is extremely reduced, especially concerning genetic elements involved in animal muscle growth. Therefore, aiming at identifying shrimp genes directly associated with muscle contraction in this research, beta-actin and myosin heavy chain genes of the pink shrimp *F. subtilis* were isolated from its muscular abdominal and partially sequenced. Shrimps collected from Pacoti estuary, Ceará, were first identified through taxonomy and, then, through DNA amplification followed by sequencing of Cytochrome Oxidase subunit I (COI) and 16S. From fresh shrimp tissues, total RNA was extracted and complementary cDNA was obtained. Based on specific primers designed after sequence alignments performed against sequences at GenBank/NCBI, genes were amplified from RT-PCR (reverse transcriptase - polimerase chain reaction) and sequenced. A 760bp partial *F. subtilis* beta-actin cDNA fragment was obtained, while the partial *F. subtilis* myosin heavy chain cDNA was 570bp long. Sequence analyses using the *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) program indicated that *F. subtilis* beta-actin gene product is very similar to beta-actin of other species of shrimps, while the myosin heavy chain protein is highly homologous to crustacean myosins heavy chain, confirming the identity of the isolated gene sequences. Alignment of these gene sequences with other sequences in GenBank showed high similarity with *Penaeus monodon* (93%) and *Farfantepenaeus paulensis* (88%). Results have showed the feasibility of partial gene identification as a means to identify genes of strategic interest. These data would help further attempts to elucidate the complete isolation of these genes, as well as the detection of other important genes, especially from shrimp species occurring at the Brazilian coast. Genes analyses involved with muscle growth might provide important genetic information on native species that are overexploited and may be viable for the shrimp cultivation. In addition, these data might also benefit the scientific community, improving a range of research areas such as physiology, phylogeny and evolution of penaeids.

Keywords: *Farfantepenaeus subtilis*. Myosin gene. Beta-actin gene. RT-PCR.

## LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1	Vista lateral representativa da anatomia externa do camarão peneídeo ..... 10
FIGURA 2	Distribuição geográfica do <i>F. subtilis</i> (Fonte: SEALIFEBASE, 2009) ..... 15
FIGURA 3	Mapa de Aquiraz, no litoral do Estado do Ceará (Fonte: Município de Aquiraz, 2009)..... 33
FIGURA 4	Local de coleta dos camarões no Rio Pacoti (Fonte: GoogleEarth, 2004) ..... 33
FIGURA 5	Diferenças anatômicas e morfológicas entre os sulcos adostrais de (A) <i>F. paulensis</i> (similar ao <i>F. brasiliensis</i> ) e (B) <i>F. subtilis</i> ..... 36
FIGURA 6	Página de apresentação do software Oligoanalyzer ..... 47
FIGURA 7	Figura representativa de exemplo de ocorrência de <i>hairpin</i> ... 48
FIGURA 8	(A) Camarão <i>F. subtilis</i> capturado do Rio Pacoti, ainda fresco e (B) <i>F. brasiliensis</i> cedido pelo LABOMAR, conservado em álcool ..... 54
FIGURA 9	Amplicons de COI e 16S visualizados em gel de agarose 1% com brometo de etídeo e marcador 1Kb plus da Invitrogen (M) ..... 55
FIGURA 10	Eletroferogramas do sequenciamento de DNA mitocondrial do <i>F. subtilis</i> : (A) COI e (B) 16S ..... 58
FIGURA 11	Resultado do melhor hit I obtido em um BLAST feito com a seqüência <i>Query</i> de COI obtida neste trabalho ..... 59
FIGURA 12	Resultado do melhor hit I obtido em um BLAST feito com a seqüência <i>Query</i> de 16S obtida neste trabalho ..... 59
FIGURA 13	Perfil eletroforético obtido para os genes da beta-actina e miosina de cadeia pesada de <i>F. subtilis</i> ..... 63

FIGURA 14	Ilustração de eletroferogramas de beta-actina (A) e miosina de cadeia pesada (B) de <i>F. subtilis</i> sequenciados neste trabalho .....	66
FIGURA 15	Resultados das análises de BLAST mostrando alta similaridade das regiões seqüenciadas neste trabalho: (A) beta-actina e (B) miosina de cadeia pesada .....	68
FIGURA 16	Alinhamento das seqüências de cDNA para beta-actina do camarão <i>F.subtilis</i> (ClustalW).....	71
FIGURA 17	Representação JalView do ClustalW para beta-actina.....	72
FIGURA 18	Cladograma para beta-actina .....	73
FIGURA 19	Alinhamento das seqüências de cDNA para miosina de cadeia pesada do camarão <i>F.subtilis</i> (ClustalW) .....	74
FIGURA 20	Cladograma para miosina de cadeia pesada .....	75

**LISTA DE TABELAS**

	Página
TABELA 1 Informações sobre os genes de beta-actina e miosinas de camarões peneídeos depositados no GenBank.	23
TABELA 2 <i>Primers</i> utilizados para a amplificação dos fragmentos de 16S e COI	40
TABELA 3 Espécies utilizadas para desenhar os <i>primers</i> de beta-actina	46
TABELA 4 Espécies utilizadas para desenhar os <i>primers</i> de miosina de cadeia pesada.	46
TABELA 5 Sequências dos genes COI para as principais espécies de camarões peneídeos encontradas no GenBank e as obtidas no presente trabalho.	56
TABELA 6 Sequências dos genes 16S para as principais espécies de camarões peneídeos encontradas no GenBank e as obtidas no presente trabalho.	57

**LISTA DE ANEXOS**

	Página
<b>ANEXO A</b> .....	92
<b>ANEXO B</b> .....	93

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

UFC	Universidade Federal do Ceará
NUGEN	Núcleo Tarcisio Pimenta de Pesquisa Genômica e Bioinformática
UECE	Universidade Estadual do Ceará
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
CEAC	Centro de Estudos Ambientais Costeiros
LABOMAR	Instituto de Ciências do Mar
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
GenBank	Banco de Dados do National Center for Biotechnology Information/ NCBI
BioEdit	<i>Sequence Alignment Editor</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
DNAm	DNA mitocondrial
RNA <sub>t</sub>	RNA transportador
RNA <sub>r</sub>	RNA ribossômico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
COI	citocromo oxidase subunidade I
QTL	Quantitative Trait Loci - locos de características quantitativas
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase através da Transcriptase Reversa
cDNA	DNA complementar
pb	pares de bases

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS GENES BETA-ACTINA  
E MIOSINA DE CADEIA PESADA DO CAMARÃO ROSA *Farfantepenaeus  
subtilis*.**

## **1. INTRODUÇÃO**

Os camarões da família Penaeidae são considerados como valiosos recursos para a pesca e para a aquicultura nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Pelo seu acentuado valor nutritivo e gastronômico, o camarão constitui fonte de emprego e renda para milhares de pessoas, sendo que a sua pesca apresenta uma significativa importância econômica, social e cultural (BRANCO, 2005; DIAS NETO; DORNELLES, 1996; FONTELES-FILHO, 1989).

Porém, a exploração intensiva e indiscriminada dos estoques pesqueiros naturais tem causado a diminuição e conseqüente extinção de algumas espécies, o que atentou para a necessidade de sustentabilidade do ambiente marinho, pois é fato que a capacidade de suporte dos mares não permite a pesca intensiva e ininterrupta (CARVALHO, 2004). Neste cenário, surgiu a aquicultura, como alternativa viável para fomentar a produção desses organismos aquáticos, oferecendo alimento com alto valor protéico para o consumo humano, no âmbito social, elevando a qualidade de vida das populações locais, fixando-as no meio rural, além de contribuir para o investimento de recursos nas economias em desenvolvimento (ABCC, 2004).

Estimulado pela alta demanda mundial e por alcançar elevados preços de mercado, o cultivo de camarão tem se expandido bastante em diversos países, entretanto, nos primeiros anos de desenvolvimento no Brasil, essa atividade não obteve muito sucesso com a tentativa de cultivo de espécies de camarões nativos. Embora apresentassem características zootécnicas relativamente satisfatórias, a principal restrição era a alta exigência protéica dessas espécies fazendo com que houvessem altos gastos no cultivo. Mesmo assim, dentre essas espécies, o camarão rosa *Farfantepenaeus subtilis* se destacou pelo seu desempenho em cativeiro, porém a inexistência de ração balanceada e de pacotes tecnológicos de cultivo foram os principais entraves que inviabilizaram o cultivo comercial desta espécie, ficando evidenciada a necessidade de pesquisas básicas para a melhor compreensão da biologia, reprodução e comportamento das espécies nativas, colaborando, dessa maneira para o conhecimento e conservação do ecossistema. (NUNES, 1995).

De acordo com Maia e Nunes (2003), a capacidade de adaptação da espécie nativa *F. subtilis* ao sistema de engorda intensiva é positiva, indicando a possibilidade concreta do seu cultivo em altas densidades de estocagem. Além do mais, essa espécie encontra-se distribuída por toda costa do Nordeste Brasileiro, com disponibilidade de fêmeas maduras e pós-larvas em ambiente natural, possui télico fechado, o que facilita a reprodução em cativeiro e também um alto valor de mercado (NUNES, 1995).

Entre os anos de 1980 até meados de 1990, a produção comercial do camarão cultivado no Brasil foi caracterizada pelo cultivo de espécies nativas, entretanto, a partir da década de 90, devido ao sucesso mundial do cultivo do camarão branco *Litopenaeus vannamei*, oriundo do Pacífico, a carcinicultura

brasileira praticamente se restringiu a essa espécie exótica que já tinha o pacote tecnológico definido e ótima adaptação às condições ambientais, deixando de lado as espécies autóctones que possuíam baixa produtividade (NUNES *et al.*, 1997).

No ano de 2003, dada a fragilidade de sustentação de monocultivos, aliado a variações climáticas, manejo inadequado, escassez de acompanhamento genético e principalmente ocorrência de doenças virais, ocorreu uma queda enorme na produção dessa espécie no Brasil. Esse fato deixou claro que para se atingir ideais de produtividade e sustentabilidade em um cultivo de camarão é necessário investimento em pesquisas científicas envolvendo áreas de reprodução, alimentação, doenças e genética (MARTINS, 2006). Devido a essa queda da produção do *L. vannamei* por sua susceptibilidade ao ataque de doenças, perda da variabilidade pela frequência de consangüinidade, bem como alteração na biodiversidade natural, e por se tratar de uma espécie exótica, passou-se a se considerar o cultivo de camarões nativos um fator de alta prioridade para o país (BORGHETTI *et al.*, 2003). Sendo assim, a domesticação de espécies silvestres e o êxito de sua exploração nos cultivos com fins comerciais não podem prescindir do conhecimento de sua biologia, quanto aos aspectos reprodutivos, nutricionais e de saúde.

Em organismos marinhos economicamente importantes, autóctones ou não, as pesquisas genéticas podem subsidiar o desenvolvimento das atividades ligadas ao cultivo desses animais, tais como mapeamento genético, implementação de estoques livres de patógenos e identificação de genes responsáveis por caracteres de interesse econômico. O conhecimento desses

aspectos pode contribuir para geração de tecnologias e conseqüentemente assegurar o sucesso dos empreendimentos, no entanto poucos estudos têm sido realizados com cultivo de espécies nativas (SHRIMP EST GENOME PROJECT, 2007).

Segundo Ribeiro (2008), a grande maioria dos trabalhos realizados nos últimos dez anos no Brasil visando a identificação de genes em camarões peneídeos, teve como principal alvo de pesquisa a espécie comercialmente importante *L. vannamei* (GONÇALVES *et al.*, 2005; NETO, 2006), abordando questões relativas à prevenção de doenças, como os mecanismos de resposta imune viral de camarões, tendo em vista que as infecções virais são responsáveis por grande mortalidade no ambiente aquático (SUTTLE, 2007). Deste modo, ainda há um grande potencial de estudos aliando o conhecimento da biologia com a área de genética, como exemplo, no entendimento a respeito de mecanismos que atuam no crescimento muscular, que ainda são completamente desconhecidos para os camarões, principalmente no âmbito genético, mas já foram amplamente estudados em espécies de vertebrados e invertebrados (WHITELEY; EL HAJ, 1997; KOCAMIS; KILLEFER, 2002; CHARGE; RUDNICKI, 2004; EYRIES *et al.*, 2004; FRANCH; PRICE, 2005).

O estudo dos genes que atuam no desenvolvimento do tecido muscular do animal auxilia na compreensão da biologia, além de fornecer subsídios para a obtenção de um animal com melhores desempenhos, maior crescimento e conseqüentemente um produto final de melhor qualidade. Como decorrência, esses estudos impulsionarão os avanços na área de biotecnologia de camarões peneídeos, principalmente das espécies cultivadas (ZHANG *et al.*, 2002).

A estrutura do tecido muscular dos crustáceos é semelhante a dos insetos, mamíferos e outros vertebrados (EL HAJ, 1996). O músculo esquelético dos crustáceos possui fibras musculares semelhantes às dos vertebrados, que sofrem mudanças de tamanho e composição em resposta a doenças, uso e desuso, estiramento, e atividade nervosa (BOOTH; THOMASON, 1991; BOOTH; KIRBY, 1992). A distribuição e a expressão das isoformas das proteínas das fibras musculares variam durante os estágios de desenvolvimento e somente obtém as características finais quando os músculos estão completamente diferenciados. (BOOTH; THOMASON, 1991).

O processo de crescimento em camarões compreende uma ação intermitente centralizada na troca de muda, ou seja, na ecdise, quando o exoesqueleto antigo é liberado e o volume corporal aumenta, devido à incorporação de água. A regulação do crescimento muscular neste momento é um processo complexo envolvendo um controle apurado entre a síntese protéica muscular e as taxas de degradação. Embora os fatores responsáveis por esta regulação não tenham sido ainda determinados na literatura, os mecanismos que regulam este processo aparentam ser tecido-específicos, envolvendo uma combinação de genes e proteínas que podem variar de espécie para espécie (WHITELEY; EL HAJ, 1997).

Existem vários genes envolvidos no crescimento, mas os que fornecem a base da contração muscular e mobilidade celular são actina e miosina, que se apresentam em diferentes isoformas. Dentre elas, a  $\beta$ -actina (beta-actina) e a miosina de cadeia pesada são as mais pesquisadas em camarões e estão sendo bastante usados como ferramentas de pesquisas científicas, apesar de

ainda haver a necessidade de trabalhos (ZHU et al., 2005; CESAR, YANG, 2006).

Em camarões peneídos,  $\beta$ -actina já foi isolada em: *Penaeus monodon* (QIU et al., 2008), *L. vannamei* (SUN et al., 2007), *Macrobrachium rosenbergii* (ZHU et al., 2005), *Fenneropenaeus chinensis* (ZHANG et al., 2006). Enquanto que para miosina, há as sequências isoladas de miosina de cadeia pesada para *Farfantepenaeus paulensis* (KAMIMURA et al., 2005) e miosina de cadeia leve para *L. vannamei* (AYUSO et al., 2008).

Nos últimos anos, estudos de identificação de genes têm sido desenvolvidos amplamente no mundo, principalmente devido ao surgimento de tecnologias cada vez mais eficazes na área de biologia molecular e bioinformática, oferecendo diversas ferramentas de trabalho que possibilitam novas descobertas na genética. Existem várias técnicas de identificação de genes de interesse, mas atualmente, algumas estratégias vêm se destacando como: isolamento de gene candidato, estudo de locos ligados à caracteres de interesse econômico (QTLs: Quantitative Trait loci), bibliotecas de cDNA e microarranjos de cDNA (ROTHSCHILD et al., 2000; LYONS et al., 2007; YUFENG et al., 2004; DHAR et al., 2003).

A desvantagem da maioria dessas técnicas ainda é o custo elevado e o longo tempo demandado no laboratório, fazendo com que a amplificação de sequências por meio de reações de PCR seja uma metodologia bastante utilizada para o processo no isolamento de genes de interesse pelo fato do relativo baixo custo, rapidez e eficácia. No caso do estudo em questão, com o intuito de isolar genes relacionados ao crescimento muscular do camarão *F. subtilis*, foi escolhido o método de genes identificados pela reação em cadeia

da polimerase a partir da transcrição reversa do ácido ribonucléico total (RNA total) (RT-PCR ou *reverse transcriptase - polimerase chain reaction*). (NIGAARD, HOVIG, 2009; CESAR; YANG, 2006).

Como ferramenta molecular mais informativa sobre a estrutura genética e mais utilizada ultimamente, está o sequenciamento de DNA, sendo o método dideoxinucleotídeo desenvolvido por Sanger o mais amplamente utilizado para seqüenciar. (AVISE, 1994). Esse método permitiu o desenvolvimento do sequenciamento automático, que é uma tecnologia em constante melhoramento, promovendo a identificação de regiões até em genomas bem pequenos (HILLIS *et al.* 1996).

O desenvolvimento da biotecnologia, com técnicas de identificação de genes e seqüenciamento de DNA, tem produzido um grande número de dados biológicos, em forma de seqüências de DNA e de proteína, geradas pelos laboratórios do mundo inteiro. Dessa maneira, bancos de dados para armazenar as seqüências foram sendo criados. Neles são armazenados genes e genomas inteiros, proteínas e suas estruturas tridimensionais, sendo o Genbank o mais conhecido que disponibiliza, gratuitamente, seqüências e ferramentas para sua análise. (SANTOS; ORTEGA, 2003).

Os dados biológicos advindos do conhecimento genômico são relativamente complexos em comparação aos provenientes de outras áreas científicas, dada a sua grande diversidade. Para a manipulação desses dados, é imprescindível o uso da bioinformática 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; SANTOS, 2003).

Dessa maneira, há a necessidade constante por programas eficientes de bioinformática que permitam utilizar esses dados de maneira eficiente. Os programas que realizam comparação de seqüências de DNA e proteínas com os bancos de dados genômicos; alinhamentos múltiplos entre seqüências e produção de árvores filogenéticas permitem fazer inferências tanto funcionais quanto evolutivas, proporcionando um maior entendimento sobre filogenia e evolução, assim como os mecanismos biológicos que ditam as funcionalidades entre diferentes espécies (NOGUEIRA, 2004; VIANA, 2006).

No caso deste estudo, a produção de dados biológicos inéditos e importantes do *F. subtilis* oferece subsídios que permitem analisar melhor a evolução genética entre as espécies, através da identificação de genes envolvidos no crescimento muscular de um camarão autóctone, pouco estudado sobre o aspecto genético, auxiliando também em futuras pesquisas sobre a estrutura muscular de invertebrados em geral.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Isolar e caracterizar parcialmente os genes das proteínas musculares beta-actina e miosina de cadeia pesada do camarão rosa *Farfantepenaeus subtilis*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Gerar informações sobre a estrutura genética de uma espécie nativa com potencial para o cultivo.
- Extrair material genético a partir do tecido muscular do camarão
- Desenhar *primers* a partir de seqüências de aminoácidos altamente conservadas correspondentes aos genes alvos.
- Realizar reações RT-PCR para isolar e amplificar as seqüências de aminoácidos das proteínas musculares.
- Comparar geneticamente o resultado obtido com outras espécies de camarões.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Camarões peneídeos

Os camarões são animais do filo Arthropoda, que possuem corpo caracterizado pela presença de exoesqueleto e apêndices articulados. Fazem parte do subfilo dos Crustacea, com cerca de 300.000 espécies descritas, possuindo como característica a presença de carapaça dura. São animais predominantemente aquáticos, portadores de exoesqueleto calcário (rico em quitina), cefalotórax (cabeça e tórax fundidos), apêndices birremes (com dois ramos) e dois pares de antenas, que os diferenciam dos demais artrópodos (NARCHI, 1973; HICKMAN *et al.*, 2001) (Figura 1).

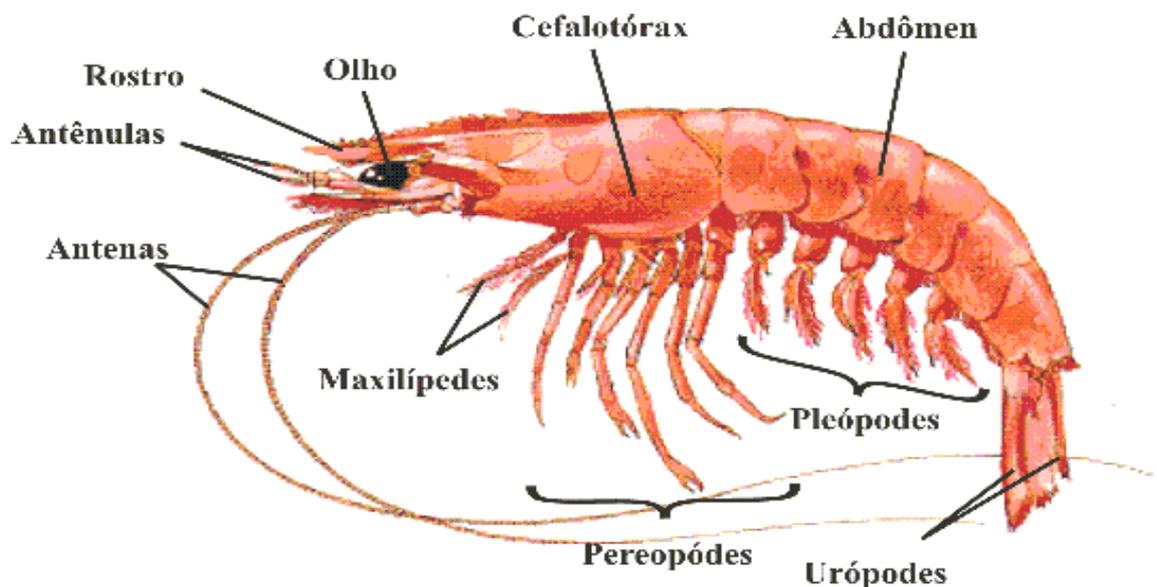


Figura 1 – Vista lateral representativa da anatomia externa do camarão peneídeo. Esquema representativo indicando as principais partes do camarão peneídeo: antenas, antênulas, rostro, olho, carapaça, cefalotórax, abdômen, urópodes, pleópodos, pereópodos e maxilípedes. (Fonte Dall *et al.*, 1990).

Juntamente com lagostas e caranguejos, os camarões pertencem a ordem Decapoda, que detém aproximadamente 8.500 espécies. Dentre esses, os animais que possuem a característica de liberar seus ovos na água, pertencem a subordem Dendobranchiata, que inclui os decápodos da família Penaeidae, conhecida por apresentar várias espécies que constituem importantes recursos pesqueiros (PINHEIRO; HEBLING, 1998). A família Penaeidae representa a maioria das capturas mundiais de camarões, em torno de 700 mil toneladas por ano (BUCKUP; BOND-BUCKUP, 1999). Como subfamília, tem-se a Penaeinae composta por 15 gêneros. Sendo o gênero *Penaeus* constituído por espécies de maior valor econômico, subdividido em cinco novos gêneros (*Litopenaeus*, *Marsupenaeus*, *Farfantepenaeus*, *Fenneropenaeus* e *Melicertus*), com base em características morfológicas e biogeográficas (BURUKOVSKII, 1985; PÉREZ-FARFANTE; KENSLEY, 1997).

De acordo com Dall *et al.* (1990) os peneídeos apresentam corpo alongado e lateralmente comprimido, possuem sexos separados, com reprodução sexuada por meio de cópula e fecundação externa. Periodicamente trocam sua carapaça, ou seja, realizam a muda para promover o seu crescimento; este processo ocorre rapidamente, geralmente em período noturno, deixando a espécie vulnerável aos predadores. O ciclo de vida dos camarões marinhos consiste em uma fase larval oceânica, uma fase de pós-larva juvenil estuarina e fase adulta retornando ao ambiente marinho para maturação e desova, recomeçando assim, o ciclo biológico (DALL *et al.*, 1990). O crescimento do animal varia, além da muda, em função da temperatura da água, do tipo de alimento ingerido e inclusive de acordo com a espécie. Como

a taxa de crescimento é maior enquanto jovens, então, maior é a quantidade de mudas realizadas nessa fase de vida (CARVALHO, 2004).

A taxonomia desses camarões peneídeos está representada no esquema a seguir (PÉREZ-FARFANTE; KENSLEY, 1997):

Reino Animalia

Filo Arthropoda

Subfilo Crustacea (Pennant, 1777)

Classe Malacostraca (Latreille, 1806)

Subclasse Eumalacostraca (Grobber, 1892)

Superordem Eucarida (Calman, 1904)

Ordem Decapoda (Latreille, 1803)

Subordem Dendobranchiata (Bate, 1888)

Superfamília Penaeoidea (Rafinesque, 1815)

Família Penaeidae (Rafinesque, 1815)

Subfamília Penaeinae (Dana, 1852)

Gênero *Penaeus* (Fabricious, 1798)

Espécies da família Penaeidae formam um grupo diversificado de camarões marinhos, apresentam ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrados nos oceanos Atlântico, Índico/Pacífico e Mediterrâneo, ou seja, habitando regiões tropicais e subtropicais, e ainda águas costeiras temperadas

em algumas regiões (NEAL; MARIS, 1985; PROVENZANO, 1985; PÉREZ-JAR *et al*, 2006).

No Brasil, entre as principais espécies de camarões peneídeos autóctones que possuem importância econômica, destacam-se: *Farfantepenaeus subtilis* (Pérez-Farfante, 1967), *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1934), *F. paulensis* (Pérez-Farfante, 1967), *F. brasiliensis* (Latreille, 1817), *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) e *Artemesia longinaris* (Bate, 1888) (BENZIE, 2000; GUSMÃO, 2001; HOLTHIUS, 1980).

Dentre os camarões marinhos utilizados comercialmente, os peneídeos são os mais importantes no mundo, por constituírem um valioso recurso para pesca e aquicultura, sendo que o camarão branco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) ocupa uma posição de destaque na produção em cativeiro mundial. Essa espécie é oriunda do Oceano Pacífico, mas devido às suas excelentes características zootécnicas e às condições ecológicas favoráveis, foi implementada com sucesso na carcinicultura brasileira na década de 90, ficando em primeiro lugar na produção brasileira, sendo a região Nordeste a maior produtora de camarões (RODRIGUES, 2005).

O cultivo de uma espécie exótica oferece riscos potenciais para as espécies nativas, principalmente se essa atividade for desordenada e não tiver um acompanhamento genético, causando desequilíbrio nos estoques das populações naturais. A introdução involuntária, ou seja, o escape de espécies exóticas para o ambiente natural favorece a proliferação de doenças e estabelecem risco de hibridização com as espécies nativas, podendo modificar a natureza genética do ecossistema. Como exemplo, *L. vannamei* e *L. schmitti*

apresentam forte potencial de hibridização, pois pertencem ao mesmo gênero, muito semelhantes morfológicamente (DUARTE, 2006).

Em regiões marinhas e estuarinas, as populações naturais de peneídeos sofrem tanto pela pesca intensiva, como pela introdução de cultivos de camarões exóticos, pois ao ultrapassar barreiras físicas, biológicas e ambientais, tornam-se espécies invasoras, que juntamente com a destruição de habitats, constituem-se as principais causas de extinção de espécies nativas (ÂNGELO; SILVA, 2004; MAGGIONI *et al.* 2003).

Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), *F. subtilis* e *F. brasiliensis* estão atualmente em estado de sobrepesca, tendo como principal causa, a pesca intensiva ao longo dos anos (SANTOS; CÂMARA, 2002). Este relato já pôde ser constatado por diversos autores, dentre eles, Amaral e Jablonski (2005), que observaram também a redução do tamanho dos espécimes de *F. subtilis*, *F. brasiliensis* e *F. paulensis*, atribuindo à sobrepesca e à captura seletiva.

### **3. 2 O camarão rosa *Farfantepenaeus subtilis***

O camarão peneídeo conhecido como camarão rosa *Farfantepenaeus subtilis* (Pérez-Farfante, 1967) é uma espécie nativa do litoral do Nordeste do Brasil e se distribui geograficamente no Oceano Atlântico desde a América Central até a América do Sul, de Cuba até as Antilhas e de Honduras até Cabo Frio no Estado do Rio de Janeiro (PÉREZ-FARFANTE, 1969; DORE; FRIMODT, 1987; PÉREZ-FARFANTE, 1988) (Figura 2).



Figura 2 – Distribuição geográfica do *F. subtilis* (Fonte: SEALIFEBASE, 2009)

Segundo Paiva (1997), o camarão-rosa *F. subtilis* vive, preferencialmente, em fundos brandos de lodo, lama ou areia-lama, até 190 m de profundidade, habitando biótopos bem distintos caracterizados pela distância da costa ou pelo grau de salinidade da água.

Desde 1960, o camarão *F. subtilis* tem sido uma das principais espécies da pesca industrial na região próxima a fronteira das Guianas e Brasil, e juntamente com *F. brasiliensis* é a espécie de maior ocorrência na pesca camaroneira desenvolvida na costa Norte do Brasil, compondo praticamente 95% das capturas (NUNES; PARSONS, 1999). Apresentou uma tendência de crescimento até 1987, quando se capturou 10.037t (peso inteiro) e o número de barcos em operação atingiu o máximo permitido (DIAS NETO; DORNELLES, 1996). Entretanto, devido à superexploração da pesca em geral, a partir de

então a tendência foi decrescente, ocasionando o declínio de populações de *F. subtilis*, assim como de várias espécies nativas de peneídeos (NETO, 1991).

Além da importância na pesca, o camarão *F. subtilis* teve papel fundamental para o estabelecimento da indústria de carcinicultura marinha, em meados dos anos 80, na Região Nordeste. Naquela época, também eram cultivadas outras espécies nativas como o *Farfantepenaeus brasiliensis*, sendo que mais de 70% do total de pós-larvas produzidas no país correspondiam às espécies *F. subtilis* e *L. schmitti* e menos de 30% à espécie *L. vannamei* (WAINBERG; CÂMARA, 1998). E ao contrário das outras espécies nativas, o camarão rosa destacava-se por apresentar: melhores desempenhos zootécnicos e índices superiores de crescimento, conversão alimentar e sobrevivência. Além disso, a espécie possui fácil reprodução em cativeiro por possuir tético fechado e atrativos preços no mercado Europeu devido sua coloração tipicamente amarronzada (MAIA; NUNES, 2003).

Entretanto, apesar das vantagens em relação às demais espécies nativas, poucas são as informações disponíveis sobre o *F. subtilis*. Além disso, desde 1993, o cultivo de camarões se restringiu basicamente à espécie exótica *L. vannamei*, fazendo com que os estudos fossem focados mais nas necessidades desta espécie exótica.

Devido à produção em larga escala de pós-larvas em larviculturas e o estabelecimento de indústrias de ração formulada no Brasil, a espécie *L. vannamei* foi introduzida com sucesso em diversos estados do país (GUERRELHAS, 1997). Apesar disso, a contínua dependência nesta espécie exótica tem levado a uma perda dos atributos zootécnicos, refletido em maior

índice de conversão alimentar, menor crescimento, menor taxa de sobrevivência e maior susceptibilidade a doenças (NUNES, PARSONS, 2000).

Dessa maneira, devido à fragilidade da sustentação de monocultivos, e em especial de uma espécie exótica, têm-se procurado analisar as potencialidades da utilização de camarões nativos para cultivo. Na região Nordeste ocorrem duas espécies de camarões marinhos, o *F. subtilis* e o *F. brasiliensis*, as quais apresentam potencial para o cultivo e comprovadamente têm maior valor de mercado que o *L. vannamei*, mas que não foram ainda devidamente estudadas, havendo uma escassa disponibilidade de informações sobre esses camarões (NUNES *et al.*, 1997).

O entendimento sobre mecanismos que atuam no crescimento muscular ainda são completamente desconhecidos para os camarões, principalmente no âmbito genético, mas já foram amplamente estudados em espécies de vertebrados e invertebrados (HOOPER; HOBBS; THUMA, 2008; WHITELEY; EL HAJ, 1997).

Em relação ao *F. subtilis*, conhecimentos básicos a respeito da biologia, comportamento, requerimentos nutricionais, fatores que afetam o crescimento e, principalmente da estrutura genética são importantes para a compreensão da dinâmica dos estoques naturais, auxiliando nas medidas de gestão pesqueira, assim como são limitantes para promover o cultivo dessa espécie em escala comercial (GUSMÃO *et al.*, 2005).

### 3.3 Genética de organismos aquáticos

Apesar do alto valor comercial e necessidade do entendimento da estrutura dos estoques pesqueiros, ainda há pouca informação disponível sobre a genética de populações de organismos aquáticos, principalmente de camarões. O acompanhamento genético de estoques naturais é fundamental para a administração eficiente do recurso pesqueiro, assim como para a exploração sustentável do material genético disponível de espécies cultivadas (GUSMÃO; LAZOSKI; SOLÉ-CAVA, 2000).

Entretanto, a genética molecular tem sido bastante utilizada em estudos com organismos aquáticos, principalmente quando a genética clássica por si só não consegue elucidar algumas questões. A alta eficiência de tecnologias baseadas em DNA vem colaborando para um maior entendimento de espécies brasileiras, auxiliando na produção de animais em cativeiro e na identificação de novas espécies. Pesquisas na área genética de populações vêm sendo aprimoradas, devido à utilização de técnicas moleculares e de bioinformática, permitindo um maior conhecimento sobre as características genéticas de peneídeos. O surgimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) desenvolvida por Mullis e Faloona (1987), ferramentas de sequenciamento e mais recentemente da bioinformática, vem impulsionando pesquisas em diversas áreas (FERREIRA; GRATTAPPAGLIA, 1998).

Mundialmente, alguns estudos de genética molecular com camarões obtiveram destaque, como a análise estrutural e funcional de genes importantes (CHIOU *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2005), o estudo do genoma

mitocondrial (SHEN *et al*, 2007) e o desenvolvimento de marcadores (CRUZ *et al*. 2002).

No ambiente natural, o conhecimento genético tem colaborado em estudos de filogenia e de estrutura populacional com espécies de camarões peneídeos. Na costa brasileira já foi possível identificar a presença de populações de camarão geneticamente diferenciadas através de estudos de genética molecular (MAGGIONI *et al*, 2001).

Na aquicultura, tecnologias de genética molecular têm colaborado bastante para avanços na área de melhoramento genético, com utilização de marcadores moleculares, transgênese e definição de mapas genéticos detalhados que servem de base, por exemplo, para a identificação de marcadores associados a características quantitativas de interesse econômico (QTL's), como aquelas associadas ao crescimento ou resistência a doenças (DINIZ, 2005).

O desempenho e a produção são características controladas por múltiplos genes e, portanto herdadas como traços quantitativos. QTL são, principalmente, codificadas por genes não-identificados que afetam o desempenho dos animais, sendo o crescimento a característica mais importante para qualquer espécie aquática que sofre seleção. Dessa maneira, com o intuito de produzir animais com maior crescimento, pode-se fazer uso de inserção de genes de crescimento e hibridização entre espécies, como Benzie *et al* (2001) que produziram animais a partir da hibridização de *P.monodon* com *P. esculentus*, obtendo assim híbridos com razão de crescimento e coloração herdadas, respectivamente.

Dentre as principais tecnologias utilizadas em estudos com camarões, estão os marcadores moleculares, em especial baseados em DNA mitocondrial (DNAMit), tanto para populações naturais (CHU *et al.*, 2003) como cultivadas. Algumas características são únicas do sistema mitocondrial, tornando-o um bom instrumento para estimar variabilidade, caracterizar populações, relacionar a distribuição com a biogeografia histórica e apontar relações filogenéticas entre espécies próximas, dentre elas: usa código genético diferente do universal e possui herança materna (GARESSE *et al.*, 1997; FRANCISCO, 2003).

Regiões mitocondriais de artrópodes têm sido largamente utilizadas em estudos de filogenia e genética de populações (SIMON *et al.*, 1994). Inúmeros *primers* existem para a amplificação das diversas regiões do genoma mitocondrial deste grupo de organismos e, recentemente, os avanços tecnológicos e a redução de custos têm estimulado o aumento do número de genomas mitocondriais completos publicados, por meio de PCR (DINIZ, 2005).

Em camarões, o DNAMit possui tamanho de 16000 pares de base (pb) e informações geradas através dessa região vem proporcionando maior conhecimento do status taxonômico de algumas espécies. Como exemplo, é o caso da descoberta de uma nova espécie de *Farfantepenaeus* revelada a partir de análises genéticas, mostrando que *F. subtilis* na verdade era a mistura de duas diferentes espécies: *Farfantepenaeus sp.* e *F. subtilis*. Para isso, Gusmão *et al.* (2000) utilizaram marcadores nucleares, aloenzimas e mitocondrial (COI), enquanto que Maggioni *et al.* (2001) realizaram análises do gene mitocondrial (16S) de dois morfotipos da espécie *F. subtilis* detectados, e de suas distribuições ao longo da costa brasileira, indicando a existência de um

isolamento reprodutivo entre os mesmos, sugerindo a diferenciação em espécies. Estes resultados mostram que o estudo do DNA mitocondrial possui um alto valor informativo.

Análises de DNA também foram usadas para determinar níveis da variação intraespecífica e diferenciação genética de populações de diversas espécies de camarão (BENZIE, 2000; CRUZ *et al.*, 2004; MAGGIONI *et al.*, 2003).

### **3.4 Alvos moleculares no estudo genético de peneídeos: os genes actina e miosina**

O estudo dos genes que atuam em características de interesse, como, por exemplo, no desenvolvimento do tecido muscular do animal, pode fornecer subsídios para a obtenção de um animal com melhores desempenhos, maior crescimento e conseqüentemente um produto final de melhor qualidade.

Os genes da actina e miosina fornecem a base da contração muscular e mobilidade celular e são bastante usados como ferramentas de pesquisas científicas, principalmente em estudos de filogenia (BRICHEUX; BRUGEROLLE, 1997; BHATTACHARYA; WEBER, 1997; HWANG *et al.*, 2002).

Como o crescimento muscular do camarão está diretamente ligado ao seu ciclo de muda, César *et al.*, (2006) estudaram as modificações morfológicas, fisiológicas e a expressão genética de actina e miosina de cadeia pesada no tecido muscular do *L. vannamei*, na tentativa de investigar os fatores moleculares responsáveis pelo crescimento muscular em camarões, durante o

ciclo de muda, onde foi observado que as expressões desses genes variam durante o ciclo, com valores crescentes na pós-muda e decrescentes na pré-muda.

A actina é a proteína intracelular mais abundante da célula eucariótica, altamente conservada e está envolvida em várias funções básicas do organismo, além da contração, como, estrutura do citoesqueleto e divisão celular (POLLARD, 1990). Actinas são referências clássicas de genes utilizados em análises de expressão com *northern blot* e semi-quantitativo RT-PCR (BUNGER *et al.*, 2003). Devido a essas razões, são amplamente estudadas em animais, tendo sido encontrados em vários organismos aquáticos. Em peixes já foram encontrados 23 genes de actinas (incluindo 13 citoplasmáticas) (HWANG *et al.*, 2002), e nos crustáceos, foram encontrados em: caranguejos (VARADARAJ; KUMARI; SKINNER, 1996), lagosta (KOENDERS *et al.*, 2002), artêmia (MACIAS; SASTRE, 1990), copépodos (KIM *et al.*, 2003; CRAWFORD, 1995) e em camarões (ZHU *et al.*, 2005).

Actinas são agrupadas em relação à sequência de aminoácidos e distribuição nos tecidos. Existem actinas citoplasmáticas e musculares. Os mamíferos superiores possuem no mínimo seis isoformas de actinas: duas citoplasmáticas,  $\beta$ -actina e  $\gamma$ -actina, e quatro musculares  $\alpha$ -actina (VANDEKERCKHOVE; WEBER, 1978). Genes  $\beta$ - e  $\gamma$ -actina têm sido estabelecidos como genes *housekeeping* (THELLIN *et al.*, 1999). A  $\alpha$ -actina é uma proteína muscular predominante no aparato de contração das células, e a  $\beta$ -actina é uma proteína do citoesqueleto importante na manutenção da citoarquitetura, tendo sido bem caracterizada em vertebrados: humanos (GUNNING *et al.*, 1983), ratos (TOKUNAGA *et al.*, 1986) e carpas (LIU *et al.*,

1990). Em camarões peneídos,  $\beta$ -actina já foi isolada em: *Penaeus monodon*, *Litopenaeus vannamei*, *Macrobrachium rosenbergii*, *Fenneropenaeus chinensis* (Tabela 1).

Tabela 1 – Informações sobre os genes de beta-actina e miosinas de camarões peneídeos depositados no GenBank.

<b>Descrição (número de acesso no GenBank)</b>	<b>Tamanho do gene (pb)</b>	<b>Fonte</b>
<i>Litopenaeus vannamei</i> beta-actin mRNA, complete cds (AF300705)	1320 pb	Sun <i>et al.</i> , 2007
<i>Penaeus monodon</i> beta-actin mRNA, complete cds (EF087977)	1134 pb	Qiu <i>et al.</i> , 2008
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> beta-actin mRNA, complete cds (AY626840)	1281 pb	Zhu <i>et al.</i> , 2005
<i>Fenneropenaeus chinensis</i> beta actin mRNA, complete cds (DQ205426 )	1358 pb	Zhang <i>et al.</i> , 2006
<i>Farfantepenaeus paulensis</i> myosin heavy chain mRNA, partial cds (DQ115397)	842 pb	Kamimura <i>et al.</i> , 2005
<i>Litopenaeus vannamei</i> myosin light chain mRNA, complete cds (EU449515)	1135 pb	Ayuso <i>et al.</i> , 2008

O isolamento de actina em camarões está relacionado também com a tentativa de obter camarões mais resistentes a doenças, a partir de manipulação genética. O gene da actina é considerado como um bom

candidato a vetor de expressão para ser usado em transgenia. Com esse intuito, já foi isolado para *M. japonicus* (MAEDA *et al.*, 2002).

Interagindo com os filamentos de actinas, estão as miosinas, proteínas motoras que participam da contração muscular. São classificadas de acordo com a diversidade da seqüência de aminoácidos (SELLERS, 1999). Existem pelo menos 13 tipos de miosinas, musculares e não musculares, de cadeia leve e cadeia pesada, sendo as miosinas I (com uma cadeia pesada) e II (com duas cadeias pesadas) as mais abundantes e mais estudadas. Em crustáceos, já foram isoladas miosinas de lagostas e lagostim. Foram identificadas pelo menos duas isoformas de miosinas de cadeia pesada em lagostas e três em lagostim (HOOPER; THUMA, 2005).

Actinas e miosinas de cadeia pesada têm sido extensivamente estudadas: actina - Pterobranchia, Annelida, Gastropoda, Brachiopoda, Chaetognatha, Chelicerata; para miosina de cadeia pesada - Cephalochordata, Urochordata, Annelida, Chaetognatha, Chelicerata (LAMERS *et al.*, 1998; HARRIS *et al.*, 1984; BOVENSCHULTE; WEBER, 1997).

Aliada a importância biológica, o estudo de genes e proteínas musculares de invertebrados é justificado pelo benefício que pode oferecer ao ser humano. Dois argumentos sustentam esse fato: primeiro, o último ancestral comum de vertebrados e invertebrados tinham músculo e a maioria dos genes musculares de vertebrados e invertebrados são homólogos. As vantagens experimentais com invertebrados permitem uma melhor investigação, com maior detalhamento do que com vertebrados. Em segundo, genes musculares de invertebrados apresentam maior variação, fazendo com que haja uma interação funcional mais correta (HOOPER; THUMA, 2005)

Várias doenças humanas resultam de erros na estrutura muscular de proteínas, então, o estudo com invertebrados possibilita a melhoria da saúde humana. E estudos comparativos também oferecem um grande campo para investigar a relação entre as estruturas de genes e proteínas musculares (HOOPER; THUMA, 2005).

Ainda em relação a saúde humana, os camarões são alimentos altamente alergênicos e isto se deve a presença de algumas proteínas envolvidas na indução dessas reações alérgicas. Segundo Ayuso *et al.* (2008), o gene da miosina de cadeia leve do *L. vannamei* foi identificado como sendo a nova proteína responsável por causar alergia ao homem, nomeado de Lit v 3.0101, pelo qual até recentemente era direcionado principalmente à proteína muscular tropomiosina (SHANTI *et al.*, 1993). Estudos como esse, podem colaborar para o desenvolvimento de vacinas não alergênicas (AYUSO *et al.*, 2008).

### **3.5 Inferências biológicas**

A genética estuda a transmissão, as alterações e a expressão dos genes, determinando as características fenotípicas, também possibilita verificar a estruturação de populações de uma dada espécie; adaptação de determinada população ao ambiente e comparação de espécies para detectar diferenças e/ou para fazer inferências filogenéticas. (CHETVERIKOV, 1926; FISHER, 1930). Para isso, a Genética Clássica faz uso de técnicas como isoenzimas e citogenética, enquanto que a Genética Molecular faz uso de técnicas mais poderosas, como PCR e sequenciamento de DNA.

Devido ao crescente número de dados genéticos obtidos em pesquisas de diversos laboratórios do mundo, com a identificação de genes a partir de sequenciamentos, fez-se necessário construir bancos de dados a fim de organizar de maneira acessível esse grande volume de dados, de modo a evitar redundância na pesquisa científica e possibilitar a análise por um maior número de cientistas. Dessa maneira, o banco de dados (GenBank) do Centro Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI) aparece como o mais conhecido banco de genes, disponibilizando sequências de DNA, genomas completos, proteínas e ferramentas para análise (SANTOS; ORTEGA, 2003).

Vários pesquisadores fazem uso desses dados para realizar inferências biológicas a partir da análise comparativa entre espécies com o auxílio da bioinformática, produzindo alinhamentos múltiplos de sequências, auxiliando 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; JAMBECK, 2001).

As estratégias de descobertas de genes e de elementos de sequências conservados baseadas em reação de PCR são bastante importantes, principalmente com a possibilidade de comparações com informações presentes em bases de dados (MOORE *et al.*, 1998).

Nos últimos anos, foram realizados vários estudos de filogenia com camarões peneídeos usando caracteres genéticos, na tentativa de elucidar questões de taxonomia e evolução, mas infelizmente ainda há fatores limitantes como o reduzido número de espécies estudadas e pouca informação genética obtida (SHANE *et al.*, 2004).

Como exemplo, são as análises realizadas a partir de sequências de DNA mitocondrial em estudos de filogenética em populações de camarões naturais (GUSMÃO *et al.*, 2000; MAGGIONI *et al.*, 2001) e para avaliar a divergência genética entre populações de cultivo (SEKINO *et al.*, 2002). Dentre os principais genes da região mitocondrial utilizados em estudos estão o 16S rRNA e o COI (citocromo oxidase I), sendo o primeiro altamente conservado e com baixa taxa de evolução mais indicado para estudos de filogenia, enquanto o COI menos conservado que o 16S, é frequentemente usado em estudos de evolução (BEARD *et al.*, 1993).

Palumbi e Benzie (1991) descobriram altos níveis de divergências moleculares entre espécies de peneídeos *Penaeus stylirostris*, *L. vannamei*, *P. esculentus* e *Metapenaeus endavevori* isolando genes mitocondriais COI e 12S. Da mesma maneira, Baldwin *et al.* (1998) também utilizaram COI para verificar a filogenia e biogeografia entre peneídeos, onde os dados moleculares resultantes discordaram da revisão sistemática anteriormente realizada por Perez-Farfante e Kensley (1997) baseada no tético do animal.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material utilizado

#### a) Equipamentos utilizados

Todos os equipamentos e materiais necessários à realização do trabalho estão apresentados no Anexo A.

#### b) Materiais de consumo

Uma extensa lista de reagentes e soluções empregadas nesse trabalho pode ser visualizada no Anexo B. De forma abreviada, dentre os principais componentes utilizados, destacam-se aqueles necessários para PCR, que são: os *primers*, complementares ao DNA alvo; desoxinucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), para serem incorporados aos produtos nascentes; enzima termo-estável Taq DNA-polimerase, que oferece condições para a amplificação; cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ), servem de cofator para a atividade da enzima; água ultrapura e amostra de DNA ou cDNA alvo.

Para o sequenciamento, a maioria dos reagentes são os mesmos para a PCR, com a inclusão de didesoxirribonucleotídeos marcados com diferentes corantes fluorescentes (fluorocromos), que vão permitir a detecção dos nucleotídeos pelo seqüenciador.

#### c) Softwares de análises genéticas

A construção de *primers* específicos para amplificação de genes de interesse é auxiliada pela utilização de programas disponíveis na internet que, a partir de uma determinada seqüência de oligonucleotídeos submetida à

análise, fornecem as principais características que influenciam no sucesso da reação de PCR, ou seja, garantindo um anelamento correto entre o *primer* e a seqüência alvo de DNA. Dentre elas, destacam-se: os *primers* escolhidos devem apresentar uma seqüência única dentro da região a ser amplificada, os pares de *primers* devem possuir temperatura de anelamento similar para garantir um anelamento simultâneo, a composição de bases e o comprimento deles devem ser mantidos em padrões pré-estabelecidos e devem anelar em sítios espaçados entre 100 a 600 pares de base, pois esta distância permite uma síntese eficiente durante a PCR (SAIKI, 1989).

Dentre os principais softwares de desenho de primers estão: o PRIMER3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) e o OligoAnalyzer, localizado no site do *Integrated DNA Technologies – IDTDNA* (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>), que foi o utilizado neste trabalho.

Inicialmente foi feita uma busca e análise de seqüências nucleotídicas do mRNA de beta-actina e miosina de organismos modelos e camarões, depositadas, até o momento, no banco de dados biológicos público - *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Essas seqüências obtidas de várias espécies foram salvas em formato FASTA e armazenadas localmente em um arquivo de texto. Em seguida, foram alinhadas apropriadamente através do programa de alinhamento múltiplo *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994), baseado em algoritmo heurístico progressivo, produzindo alinhamentos de acordo com as similaridades e diferenças entre as seqüências, que podem ser facilmente visualizadas pelas diferentes cores associadas a cada aminoácido ou nucleotídeo.

Essas análises comparativas permitem a identificação de regiões conservadas ao longo dos alinhamentos, ou seja, fragmentos candidatos à *primer*, que possuíssem pelo menos entre 20-30 pares de bases de comprimento e que fossem próximos às extremidades.

Com o intuito de verificar a viabilidade desses *primers* candidatos, essas regiões conservadas foram inseridas individualmente no *OligoAnalyzer*, (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>), que fornece os parâmetros que irão influenciar na especificidade desejada dos primers, como a temperatura de anelamento; conteúdo GC; a possível formação de estruturas secundárias internas e a complementaridade entre eles. Quanto menor for a complementariedade, menor será a formação de artefatos na reação de PCR, aumentando a eficiência da reação.

Dessa maneira, a partir da síntese dos *primers* desenhados, foi possível dar prosseguimento ao trabalho laboratorial, com a amplificação e sequenciamento dos fragmentos desejados. As informações geradas pelo seqüenciamento podem ser organizadas, analisadas e interpretadas com o apoio da bioinformática (SANTOS; ORTEGA, 2003). Sendo assim, alguns programas mereceram destaque.

Primeiramente, para verificar a qualidade da amplificação dos genes e quantificação das amostras no gel, foi utilizado o *software* proprietário e não disponível na internet, *Image Aid* v. 3.06 (*Synoptics Ltd. Spectronics Corporation*), que permite a comparação da intensidade e tamanho da banda do produto de PCR (denominado amplicon) com a intensidade e tamanho da banda do marcador aplicado.

Na etapa de sequenciamento é gerado um arquivo gráfico contendo picos representativos dos quatro nucleotídeos ou bases possíveis (A, T, C, G e N-base não identificada) e a posição delas. Esses dados foram convertidos em eletroferogramas através do programa *Chromas lite version 2.01* ([www.technelysium.com.au/chromas\\_lite.html](http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html)) onde foi possível transformar as seqüências em formato de arquivo de texto padrão, denominado formato FASTA, permitindo a utilização das seqüências em outros programas de bioinformática. Ainda com o auxílio desse programa, cada seqüência foi observada individualmente, inclusive, cada base/nucleotídeo, com a possibilidade de verificação manual da seqüência.

Depois de verificada a qualidade das seqüências, foi utilizado o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999), *software* para edição e análises de alinhamentos múltiplos, que permite a obtenção de uma seqüência consenso para cada *primer* F e R, e depois a montagem das seqüências parciais ou *contigs* de cada indivíduo sequenciado, prontas para serem trabalhadas.

Dessa maneira, para confirmar a identidade das seqüências, foi utilizado o programa de alinhamento pareado BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL *et al*, 1997), frequentemente usado na bioinformática, baseado em heurísticas, que realiza buscas de seqüências similares em base de dados. A partir de uma seqüência de trabalho submetida à análise (denominada *Query*), o BLAST faz uma busca local no banco de dados de interesse, neste caso, o GenBank do NCBI, oferecendo uma lista de possíveis seqüências semelhantes (denominadas *hits*) e seus alinhamentos com a seqüência *Query*. O resultado do BLAST 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, e cada *hit* exibe também 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).

Por último, novamente foi utilizado o *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) para a realização de alinhamento múltiplo entre as sequências obtidas no trabalho com outras sequências de espécies diferentes já depositadas no GenBank, afim de verificar o nível de proximidade entre elas.

## **4.2 Metodologias**

### **4.2.1 Obtenção e tratamento das amostras**

Os camarões utilizados neste estudo foram capturados diretamente do ambiente natural através de rede de arrasto manuseada por uma pescadora local, em abril de 2007. Foi escolhido como local de coleta o estuário do rio Pacoti (latitude 3°49'56, 15°S; longitude 38°25'11,82°O), localizado no município de Aquiraz (Figura 3), no litoral leste do estado do Ceará, em uma região próxima ao Centro de Estudos Ambientais Costeiros (CEAC) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Essa localidade vem sendo objeto de estudo em várias pesquisas, devido ao fato de ser bastante rica em diversidade de espécies e onde foi possível se

encontrar camarões peneídeos devido a uma atividade de coleta piloto antes de ser iniciada a coleta oficial para a pesquisa (Figura 4).



Figura 3 – Mapa de Aquiraz, no litoral do Estado do Ceará (Fonte: Município de Aquiraz, 2009).



Figura 4 – Local de coleta dos camarões no rio Pacoti (Fonte: GoogleEarth, 2009).

Na tentativa de selecionar corretamente camarões da espécie *F. subtilis*, algumas características básicas foram observadas para permitir uma rápida identificação visual, como o aspecto morfológico externo do camarão, de coloração geralmente marrom ou acinzentada e exoesqueleto contendo cromatóforos em toda sua extensão. Dessa maneira, foram coletados 50 camarões supostamente da espécie desejada, que foram transportados vivos ao Laboratório de Biologia Aquática pertencente ao Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará – UFC.

O transporte dos camarões do estuário para o laboratório foi realizado em sacos plásticos com aproximadamente 1/3 de água do estuário e 2/3 de ar comprimido, com aeração constante. Após chegada ao laboratório, foram aclimatados em um aquário de 50L com água do estuário filtrada, com salinidade 20, pH 7.8 e sistema de aeração constante.

Os camarões foram mantidos nesse aquário durante um período aproximado de sete dias, para então se prosseguir com os procedimentos de identificação taxonômica e molecular da espécie.

#### 4.2.2 Identificação da espécie *F. subtilis*

##### a) Morfológica/ Anatômica

A identificação taxonômica da espécie foi realizada segundo a metodologia de Pérez-Farfante e Kinsley (1997). Devido ao fato dessa espécie ser bastante semelhante à outra espécie de ocorrência no local, o *Farfantepenaeus brasiliensis*, alguns exemplares dessa espécie foram adquiridos para permitir um diagnóstico mais preciso.

As principais características consideradas para a correta identificação foram: presença ou ausência do sulco adostral; quando presente, o formato do sulco adostral; formato dos órgãos sexuais feminino (télico) e masculino (petasma) dos indivíduos que apresentavam dimorfismo sexual.

Espécies pertencentes ao gênero *Litopenaeus* apresentam o sulco adostral curto e possuem télico aberto, enquanto que espécies do gênero *Farfantepenaeus* apresentam sulco adostral longo, se prologando de uma extremidade a outra do rostro dorsal, alcançando quase a margem posterior da carapaça e possuem télico fechado. Já para diferenciar *F. subtilis* de *F. brasiliensis*, a presença de mancha vermelha entre 3° e 4° somito abdominal nesse último e o formato do sulco adostral, apresentando mesma largura ao longo da extensão, são cruciais para identificação, pois o *F. subtilis* não possui a tal mancha e o seu sulco vai se afunilando ao se aproximar da extremidade inferior.

Um esquema onde podemos observar as diferentes características dos sulcos adostrais foi apresentado no trabalho de Gusmão *et al.* (2000) entre *F. subtilis* e *F. paulensis*, sendo esta última espécie com mesmo tipo de sulco que o *F. brasiliensis*, portanto serviu como base para auxiliar na comparação (Figura 5).

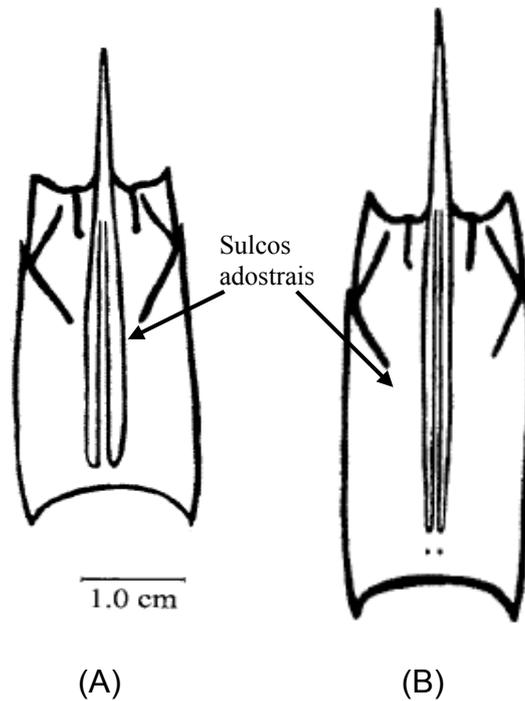


Figura 5 – Diferenças anatômicas e morfológicas entre os sulcos adostrais de (A) *F. paulensis* (similar ao *F. brasiliensis*) e (B) *F. subtilis*. Espécies de camarões *F. paulensis*, assim como *F. brasiliensis*, são caracterizadas por possuírem sulco adoral longo com mesma largura ao longo de sua extensão, enquanto que em *F. subtilis* o sulco adoral vai se afunilando no final da extremidade posterior, como podemos observar através de setas no desenho apresentado. (Fonte: Gusmão *et al.*, 2000).

#### b) Molecular

Os camarões identificados de acordo com suas características morfológicas externas foram transportados para o laboratório NUGEN - Núcleo de Genômica e Bioinformática, pertencente à Faculdade de Veterinária (FAVET) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), para serem realizados os procedimentos moleculares de análises genéticas. Os animais foram levados vivos, pois para o procedimento de extração de RNA, há a necessidade de tecido fresco.

A identificação molecular foi baseada no sequenciamento das regiões mitocondriais citocromo oxidase subunidade I (COI) e 16S. Em posse das

seqüências de DNA, foram realizadas análises comparativas dos respectivos nucleotídeos com as seqüências descritas por Gusmão *et al.*, (2000) para a espécie *F.subtilis* e *F.sp*, disponíveis no Banco Mundial de Genes (*GenBank*) através da ferramenta de busca BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Para fazer o alinhamento entre as sequências, foi utilizado o programa Clustal W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994).

#### 4.2.3 Extração de DNA genômico

Individualmente, quatro camarões foram mortos através de corte do cefalotórax com bisturi. Amostras do músculo do primeiro segmento abdominal do camarão foram retiradas para isolamento do DNA genômico, usando o reagente TRIZOL® Reagent (*Invitrogen Life Technologies*), seguindo a metodologia descrita pelo fabricante (CESAR; YANG, 2008). Esse reagente consiste em uma solução de fenol e guanidina isotiocianato, que permite um rápido isolamento de RNA, DNA e proteínas.

Para cada amostra, a extração foi iniciada a partir da maceração manual de 100mg de tecido muscular com 1mL de TRIZOL, em um tubo para centrifuga de 2mL com auxílio de uma ponteira. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 5 min em temperatura ambiente, depois foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio, os tubos foram rapidamente vortexados e incubados de 2 a 3 min em temperatura ambiente.

Os tubos foram centrifugados a 1200Xg por 15 min a 4°C promovendo uma separação de três fases, onde a fase superior é incolor contendo RNA, enquanto na fase intermediária se encontra o DNA, caracterizada por uma

camada esbranquiçada, e a fase inferior é composta por proteínas e com coloração rosada.

Nessa etapa do procedimento de extração, foi pipetada cuidadosamente o líquido da camada que contém RNA para um novo tubo para dar prosseguimento ao isolamento e purificação de RNA, etapa essa que será explicada em outro tópico do trabalho.

Para dar continuidade à extração de DNA, após a completa remoção da fase aquosa, prosseguiu-se com a precipitação e várias lavagens para purificar o DNA. Para isso, foi adicionado 300 mL de álcool etílico absoluto e agitou-se levemente por meio de inversão do tubo. Após isso, os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 3 min e então centrifugados por 5 min a 2000 g a 4°C. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente através de inversão de tubo na pia ou por meio de pipetagem, quando necessário.

O *pellet* de DNA foi lavado com adição de 1 mL de citrato de sódio (0,1M) em 10% de álcool absoluto, então, realizou-se vortexagem, incubação por 30 min a temperatura ambiente e centrifugação a 2000 g por 5 min a 4 °C. Após esse procedimento, foi realizada novamente a adição de citrato de sódio até a etapa de centrifugação.

Amostras foram lavadas com 1 mL de álcool etílico 75%, vortexadas e incubadas em temperatura ambiente por 20 min e então centrifugadas a 2000 g por 5 min a 4° C. O sobrenadante foi descartado com atenção para não se perder o *pellet*, deixando os tubos abertos durante aproximadamente 15 min para permitir a secagem do *pellet*, para, em seguida, o DNA ser ressuspenso com 600 mL de hidróxido de sódio (8mM).

Após ter sido realizado o ajuste de pH das amostras, através de adição de EDTA (1mM) com pH 8,0, as amostras foram acondicionadas a -20° C.

A qualidade das amostras de DNA genômico foi observada através de eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo e visualizada em transluminador UV, conforme protocolo padrão, enquanto que as concentrações das amostras foram obtidas por quantificação em espectrofotômetro, sendo esse procedimento realizado em três laboratórios para validar os resultados, são eles: Laboratório de Bioquímica Marinha do Departamento de Engenharia de Pesca da UFC; Laboratório de PCR do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) e no NUGEN.

#### 4.2.4 Amplificação de 16S e COI

Depois de extraído e quantificado, o DNA foi utilizado para a amplificação dos genes 16S e COI através de PCR. Essa etapa consiste na utilização de uma mistura de reagentes, denominada mix, necessários para sintetizar uma região alvo específica do DNA . Para uma reação de PCR com volume final de volume de 10 µl, o mix continha 200 µM de cada dNTP, tampão 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,4, KCl 50 mM,) 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM de cada *primer* (armazenados numa concentração 10 pM/µL), 1U de *PlatinumTaq DNA Polymerase* e 1µL de DNA que correspondia a 10ng. Como controle positivo foram utilizadas amostras de DNA de *L. vannamei*, decorrentes de uma pesquisa anteriormente realizada no NUGEN. Os *primers* utilizados foram previamente descritos na literatura, a saber: para o gene COI, conforme descrito por Palumbi (1996) e para o gene 16S, foram os *primers* utilizados por Maggioni (2002) (Tabela 2).

O programa de termociclagem, com duração de 2 horas, consistiu de um ciclo de desnaturação à 94°C/ 4 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação do DNA à 94°C/ 1 min, com temperatura de anelamento de 52°C para 16S e 50°C para COI por 1 min e a extensão à 72°C/ 1 min; e encerrando o processo com uma extensão final à 72°C/ 10 min.

Tabela 2 – *Primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos de 16S e COI. *Primers* de 16S e COI com suas respectivas sequências de nucleotídeos, o tamanho do fragmento esperado em pares de base e a temperatura de anelamento ideal para a reação de PCR.

<b>Primers</b>	<b>Seqüência (5' para 3')</b>	<b>Tamanho esperado (pb)</b>	<b>Temperatura de anelamento</b>
COI-Foward	CCTGCAGGAGGAGGAGAYCC	558	50 °C
COI-Reverse	AGTATAAGCGTCTGGGTAGTC	558	
16S ar	CCGCCTGTTTATCAAAAACAT	485-530	52°C
16S br	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	485-530	

Ao término da termociclagem, os produtos da PCR, denominados de amplicon, foram submetidos à corrida de eletroforese a fim de confirmar a amplificação. Para isso, uma alíquota de 2µL do amplicon e 1µL do corante azul *Loading dye* homogeneizados foram aplicados em gel de agarose 1%, contendo o tampão 1X TAE (Tris-Acetato-EDTA) e 1µL de brometo de etídio. Juntamente com o marcador 1Kb plus da *Invitrogen*, as amostras foram aplicadas no gel, submetidas a uma corrente elétrica de 60 V e o gel foi visualizado em transluminador ultravioleta, fotodocumentado por câmera digital através do software *Image Aid* v. 3.06 (*Synoptics Ltd. Spectronics Corporation*), possibilitando analisar a qualidade das amplificações obtidas, pela observação de uma única banda, intensa, bem definida e com tamanho correspondente ao

esperado. Todas as fotos dos géis foram editadas e identificadas no programa *Photo Studio* (ArcSoft).

A etapa seguinte, de quantificação das amostras, também foi realizada por meio do programa *Image Aid* v. 3.06 (*Synoptics Ltd. Spectronics Corporation*).

#### 4.2.5 Sequenciamento de 16S e COI

O sequenciamento dos genes 16S e COI foi baseado em três etapas: reação de sequenciamento, purificação dos amplicons e sequenciamento.

De acordo com as instruções do fabricante do seqüenciador, a concentração do produto da PCR a ser utilizado na reação de sequenciamento varia com o tamanho do fragmento amplificado. No caso, para o trabalho em questão, como o tamanho esperado dos fragmentos estava na faixa entre 100 e 1000pb (pares de base), é necessário que a concentração do amplicon esteja entre 10 e 50 ng. Dessa maneira, foi padronizada a utilização de 10 ng do amplicon tanto para 16S quanto para COI.

Com o amplicon quantificado e a concentração determinada, foi realizada a etapa da reação de sequenciamento, que consiste na utilização dos *primers Forward* e *Reverse* separadamente e terminais fluorescentes ddNTPs (*ABI Prism<sup>®</sup> Big Dye terminator Cycle Sequencing ready Reaction Kit Version 3.0, Applied Biosystems*). O mix para a reação de sequenciamento com um volume final de 10 $\mu$ L continha 1 $\mu$ L de *BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems<sup>®</sup>)*; 1,5 X de Tampão *Save \$\$*; 0,2 pmol de *primers (Forward* ou *Reverse)*; 10 ng de produto da PCR e água milliQ, para completar o volume final da reação.

O programa de termociclagem, de acordo com o protocolo do fabricante, consistia de 1 ciclo 96°C por 1 min, 30 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 seg, anelamento a 50°C por 15 seg e extensão a 60°C por 4min, sendo esta reação com duração de 3 horas aproximadamente.

Após as reações de sequenciamento, as amostras eram submetidas a uma purificação com etanol, de acordo com o protocolo do seqüenciador 3100 da *Applied Biosystems*, com algumas alterações. Primeiramente, foi adicionado 80 µL de etanol 80% em cada tubo com a amostra e depois foi pipetado todo o volume (90 µL) para uma placa de 96 poços. Em seguida, a placa foi selada, protegida da luz, deixada em temperatura ambiente por 15 min e então centrifugada a 4000 rpm por 45 min. O sobrenadante foi descartado por inversão da placa em papel absorvente, a placa foi submetida a um *spin* (breve centrifugação) e então foi adicionado 100 µL de etanol 70% em cada poço e centrifugou-se a 4000rpm a 4° C, durante 15 min. Novamente o sobrenadante foi descartado, e deixou-se a placa secando por 30 seg a 95° C no termociclador.

Para concluir, as amostras foram ressuspendidas com a adição de 10 µL de formamida Hidi, vortexadas, centrifugadas, desnaturadas a 95° C por 2 min e deixadas em contato com gelo durante 1 min, promovendo o choque térmico e a completa desnaturação.

A etapa de sequenciamento foi realizada no sequenciador automático de DNA ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*®). Para análise dos dados obtidos, cada sequência foi observada individualmente, inclusive, cada base/nucleotídeo. Primeiramente foram analisados os eletroferogramas com o auxílio do Chromas lite, onde há a possibilidade de verificação manual

da seqüência, quando necessário, pois nem sempre o seqüenciador oferece uma perfeita identificação das bases marcadas.

Depois de verificada a qualidade das seqüências, foi utilizado o programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, T.A. 1999) que permite a obtenção de uma seqüência consenso para cada *primer* F e R, e depois a montagem das seqüências parciais ou *contigs* de cada indivíduo seqüenciado.

Após a obtenção dos *contigs*, as seqüências estão prontas para serem trabalhadas. Sendo assim, para confirmar a identidade individual das seqüências, verificando se as amostras obtidas de 16S e COI correspondiam realmente à espécie *F. subtilis*, cada amostra foi inserida no programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL *et al*, 1997).

#### 4.2.6 Isolamento de beta-actina e miosina de cadeia pesada

##### 4.2.6.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído do músculo do primeiro segmento abdominal do camarão, amostra também utilizada para a extração de DNA, usando o reagente TRIZOL® Reagent (*Invitrogen Life Technologies*), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante, que é uma metodologia aperfeiçoada do método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987).

O procedimento teve algumas modificações, sendo que a etapa inicial da extração já foi descrita anteriormente (item 4.2.3), desde a digestão do tecido até a separação da solução em fase aquosa e orgânica, promovida pela adição de clorofórmio, apresentando a amostra com três camadas, estando a superior com RNA.

Após a transferência da fase superior para um novo tubo de 2mL, o RNA foi precipitado com a adição de 500 µL de álcool isopropílico, homogeneizado cuidadosamente e as amostras ficaram incubadas a temperatura ambiente por 10 min, para então serem centrifugadas a 1200 g/ 5 min/ 4°C. O RNA ficou precipitado no fundo do tubo, embora às vezes ficasse invisível. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 75%, centrifugado a 7500 g/ 5min/ 4°C. Após isso, o sobrenadante foi descartado novamente, o *pellet* foi posto a secar em temperatura ambiente por 10 min e o RNA foi ressuscitado em 50 µL de água tratada com DEPC 0,01% (dietilpirocarboneto).

Imediatamente após o isolamento do RNA, as concentrações foram estimadas por espectrofotometria com medidas de absorvância a 260/280 nm e 1µL de cada amostra foi analisada em gel de agarose 1% para checar a integridade e pureza do RNA, o qual foi estocado em freezer a -80°C para posterior utilização.

#### 4.2.6.2 Síntese de cDNA

A reação de transcriptase reversa do RNA total extraído do camarão foi processada utilizando o *Superscript first strand cDNA Synthesis* (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Em um tubo de 0,2 mL, foi adicionado 1µL de RNA, 1 µL de 10 mM dNTP mix, 1µL de Oligo (dT)<sub>12-18</sub> (0,5mg/µL), água DEPC até completar 10 µL, seguido por incubação a 65°C por 5 min e então colocada no gelo por 1 min.

Posteriormente, foi adicionado 2 µL de tampão 10X RT, 4 µL de 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µL de 10 mM DTT e 1 µL de *RNaseOUT Recombinant RNase*

*Inhibitor*. Essa mistura foi incubada a 42°C por 2 min, logo depois foi adicionado 1µL (50 U) de *Superscript II RT* e incubado a 42°C por 50 min. Para finalizar a reação, prosseguiu-se a incubação a 70°C por 15 min e então as amostras foram levadas ao gelo e estocadas em -20°C até futura utilização para a amplificação do fragmento alvo.

#### 4.2.6.3 Amplificação de beta-actina e miosina de cadeia pesada

##### a) Desenho de *primers*

O desenho de *primers* é basicamente dividido em quatro fases: busca e escolha das seqüências de interesse; alinhamento delas e determinação do consenso; seleção da região consenso mais conservada; síntese e teste dos *primers* (GARCÊS; LIMA, 2004).

Com o intuito de obter *primers* adequados para o trabalho, foram desenhados iniciadores com base na busca e análise de seqüências nucleotídicas do mRNA de beta-actina e miosina de cadeia pesada de organismos modelos e camarões, depositadas, até o momento, no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As seqüências obtidas de várias espécies para cada gene de interesse (beta-actina e miosina de cadeia pesada) foram coletadas para em seguida serem submetidas à alinhamento apropriado (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 – Espécies utilizadas para desenhar os *primers* de beta-actina. Sequências obtidas do GenBank com suas respectivas identificações (N. de acesso) e o tamanho de cada seqüência.

Espécies	N. de acesso no GenBank	Tamanho das Sequências	Fonte
<i>Litopenaeus vannamei</i>	AF300705	1320 bp	Sun <i>et al.</i> , 2007
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	DQ205426	1358 bp	Zhang <i>et al.</i> , 2006
<i>Penaeus monodon</i>	EF087977	1134 bp	Qiu <i>et al.</i> , 2008
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	AY626840	1281 bp	Zhu <i>et al.</i> , 2005
<i>Artemia franciscana</i>	AJ269584	1148 bp	Saez <i>et al.</i> , 2000
<i>Homarus gammarus</i>	AJ581663	1264 bp	Hauton, Hammond, Smith, 2005
<i>Drosophila melanogaster</i>	AB003910	4755 bp	Okamoto <i>et al.</i> , 1986
<i>Homo sapiens</i>	NM_001101	1793 bp	Rinne <i>et al.</i> , 2008

Tabela 4 – Espécies utilizadas para desenhar os *primers* de miosina de cadeia pesada. Sequências obtidas do GenBank com suas respectivas identificações (N. de acesso) e o tamanho de cada seqüência.

Espécies	N. de acesso no GenBank	Tamanho das sequências	Referência Bibliográfica
<i>Artemia franciscana</i>	DQ448227	577 bp	Acesso direto no GenBank
<i>Farfantepenaeus paulensis</i>	DQ115397	842 bp	Kamimura <i>et al.</i> , 2005
<i>Homarus americanus</i>	HAU03091	1529 bp	Acesso direto no GenBank
<i>Homo sapiens</i>	NM_014981	7074 bp	Desjardins <i>et al.</i> , 2002
<i>Drosophila melanogaster</i>	X60196	2760 bp	Kronert <i>et al.</i> , 1991

As análises comparativas entre as várias seqüências, foram realizadas com o auxílio do *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON,1994). Sendo assim, foram escolhidos fragmentos entre 20-30 pares de bases de comprimento e que fossem próximos às extremidades.

A viabilidade dos *primers* candidatos para beta-actina e miosina de cadeia pesada foi analisada a partir da submissão individual das regiões conservadas no software *OligoAnalyzer* (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) (Figura 6 ).

The screenshot displays the IDT OligoAnalyzer 3.1 web interface. At the top, there is a navigation bar with links for Home, Catalog, Order, Support, SciTools, and LabLinker. A search bar is located on the right. The main content area features a sequence input field with the sequence 5'-GAG GCC CAG AGC AAG GGW GG-3' and a '# Bases' counter set to 20. To the right of the input field are controls for Target Type (DNA), Oligo Conc (0.25 µM), Na<sup>+</sup> Conc (50 mM), Mg<sup>++</sup> Conc (0 mM), and dNTPs Conc (0 mM). Below these are buttons for 'Analyze', 'Hairpin', 'Self-Dimer', 'Hetero-Dimer', 'NCBI Blast', 'TM Mismatch', and 'LNA Conversion'. The 'RESULTS' section is visible at the bottom, showing the sequence, complement, length (20), GC content (70.0%), melt temperature range (52.6 to 63.1 °C), molecular weight (6261.6 g/mole), and extinction coefficient (204950 L/(mole\*cm)). The results also indicate the presence of Hairpin and Self-Dimer structures.

Figura 6 – Página de apresentação do software Oligoanalyzer. Nesta figura está o resultado da primeira análise de uma seqüência de oligonucleotídeos candidato à *primer* de beta-actina, apresentando um bom conteúdo GC de 70% e a temperatura *melt* ideal de 62,9°C. Os principais parâmetros observados ainda são Hairpin e Self-dimer.

A presença de estruturas secundárias nos primers, produzidas por interações intermoleculares (self-dimer) ou intramoleculares (hairpin) podem

afetar a temperatura de anelamento e conseqüentemente a amplificação, reduzindo a disponibilidade de *primers* para a reação (Figura 7). Por esse motivo, as principais estruturas que devem ser evitadas são *hairpin* (interação dentro do primer) e *self-dimer* (interações entre dois primers no mesmo sentido) (BURPO, 2001; RYCHLIK, 1990).

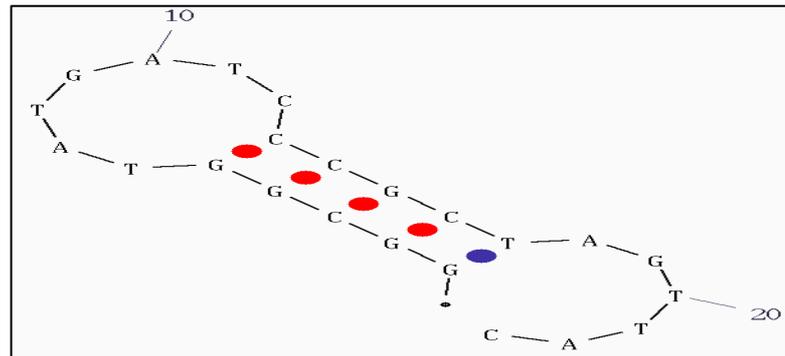


Figura 7 – Figura representativa de exemplo de ocorrência de *hairpin*. *Hairpin* com uma seqüência de oligonucleotídeos aleatória (GGC GGT ATG ATC CCG CTA GTT AC) (Fonte: BIO450 Primer Design Tutorial, 2006)

De posse dessas informações, foram escolhidos os oligonucleotídeos que apresentaram melhores características: 30-70% de conteúdo GC, reduzida formação de dímeros e *hairpins* (regiões de auto anelamento) e temperatura de melting ( $T_m$ ) por volta de 60 °C. Então, as seqüências dos *primers* foram encaminhadas para síntese em laboratório comercial e adquiridas para serem utilizadas posteriormente.

#### b) Reação de PCR

A reação de PCR foi realizada com a utilização dos primers específicos desenhados para beta-actina e miosina de cadeia pesada, etapa anteriormente explicada. Para uma reação de PCR com volume final de 10  $\mu$ l, o

mix continha 200  $\mu$ M de cada dNTP, tampão 1X (10 mM Tris-HCl pH 8,4) 1,5 mM  $MgCl_2$ , 0,4  $\mu$ M de cada *primer* (armazenados numa concentração 10 pM/ $\mu$ L), 1U de *PlatinumTaq DNA Polymerase* e 1 $\mu$ L de cDNA. Da mesma maneira quando na amplificação de 16S e COI, também foi utilizada amostra de DNA de *L. vannamei* como controle positivo.

Para a amplificação de cDNA para beta-actina foram programados 1 ciclo inicial de 1 min a 94°C; 35 ciclos sendo 30 seg/94°C, 30 seg/50°C, 1 min/72°C e um ciclo de extensão final de 5 min/72°C. Já para amplificação de miosina, foram seguidos os mesmo ciclos, mudando apenas a temperatura de anelamento que foi de 56°C.

Para analisar a qualidade das amplificações obtidas, ao término da termociclagem, alíquotas de 2 $\mu$ L de cada amplicon foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, com 1 $\mu$ L de brometo de etídio e foram visualizados em transluminador UV (*FBTI 88, FisherBiotec*). A quantificação dos amplicons foi realizada por meio do programa *Image Aid v. 3.06 (Synoptics Ltd. Spectronics Corporation)*.

#### 4.2.6.4 Sequenciamento de beta-actina e miosina de cadeia pesada

As amostras foram seqüenciadas conforme descrito no item 4.2.5, ou seja, baseando-se nas etapas de reação de sequenciamento, purificação dos amplicons e leitura no ABI 3100.

De acordo com as instruções do fabricante do seqüenciador, foi estipulada a utilização de 10 ng do amplicon de beta-actina e miosina, já que o tamanho dos fragmentos amplificados estava na faixa entre 100 e 1000pb (pares de base).

A reação de sequenciamento foi realizada de forma bi-direcional, utilizando os *primers Forward* e *Reverse* de cada gene separadamente e terminais fluorescentes ddNTPs (*ABI Prism Big Dye terminator Cycle Sequencing ready Reaction Kit Version 3.0, Applied Biosystems*). O mix para a reação de sequenciamento com um volume final de 10µL continha 1µL de *BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®)*; 1,5 X de Tampão *Save*; 0,2 pmol de *primers (Forward* ou *Reverse)*; 10 ng de produto da PCR e água milliQ, para completar o volume final da reação.

O programa de termociclagem, de acordo com o protocolo do fabricante, consistia de 1 ciclo 96°C por 1 min, 30 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 seg, anelamento a 50°C por 15 seg e extensão a 60°C por 4min.

Finalizada a reação de sequenciamento, as amostras foram submetidas a uma purificação com etanol, de acordo com o protocolo do seqüenciador 3100 da *Applied Biosystems*, com algumas alterações, que consistiram em: adição de 80 µL de etanol 80% em cada amostra; repouso em temperatura ambiente por 15 min; centrifugação a 4000 rpm/ 45 min; descarte do sobrenadante; adição de 100 µL de etanol 70%; centrifugação a 4000rpm/ 4°C/ 15 min; descarte do sobrenadante e secagem por 30 seg a 95° C no termociclador.

Concluindo, as amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida Hidi, vortexadas, centrifugadas, desnaturadas a 95°C/ 2 min e deixadas em contato com gelo durante 1 min, promovendo a desnaturação. Então, as amostras foram levadas ao sequenciador automático de DNA *ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®)*.

#### 4.2.6.5 Análise das sequências por ferramentas de bioinformática

As sequências obtidas foram analisadas com o auxílio dos programas *Chromas lite version 2.01* e *BioEdit Sequence Alignment Editor*, verificando a viabilidade dos fragmentos isolados através da qualidade dos picos dos eletroferogramas apresentados.

Para obtenção dos *contigs* das amostras de beta-actina e miosina de cadeia pesada, foi realizada a comparação de todas as amostras correspondentes a cada gene, através de alinhamento delas, obtendo, assim, as sequências consensos para cada referido gene.

Posteriormente, para confirmar a identidade das sequências, verificando se as amostras obtidas de cada gene correspondiam ao esperado, cada amostra foi submetida ao BLAST (ALTSCHUL *et al*, 1997).

Com a confirmação dos genes obtidos, as amostras de beta-actina e miosina para *F. subtilis* isoladas nesse trabalho, foram comparadas com outras espécies através do programa ClustalW, que fornece cladogramas apresentando a distância evolutiva entre as espécies.

Juntamente com a seqüência de beta-actina de *F. subtilis* obtida neste trabalho, foram alinhadas as seqüências de beta-actina das seguintes espécies: *L. vannamei* (SUN *et al*, 2007), *P. monodon* (QIU *et al*, 2008), *M. rosenbergii* (ZHU *et al*, 2005), *F. chinensis* (ZHANG *et al*, 2006), *H. gammarus* (HAUTON, HAMMOND, SMITH, 2005) e *H. sapiens* (RINNE *et al*, 2008).

Da mesma maneira, na tentativa de verificar o nível de similaridade entre seqüências genéticas para miosina de cadeia pesada de espécies diferentes, além da seqüência de *F. subtilis* isolada neste trabalho, foram utilizadas as seguintes seqüências de miosina de cadeia pesada: *F. paulensis* (KAMIMURA

et al., 2005), *A. franciscana* (acesso direto no GenBank: DQ448227), *H. gammarus* (acesso direto no GenBank: AF474972), *D.melanogaster* (KRONERT *et al*, 1991) e *H. sapiens* (DESJARDINS *et al*, 2002).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Identificação da espécie *F. subtilis*

A análise da coleta de 50 (cinquenta) espécimes de camarões realizada no estuário do rio Pacoti, mostrou que foram encontrados exemplares de três espécies distintas, sendo 30 de *F.subtilis*, 15 de *F.brasiliensis* e 5 de *L.vannamei*, correspondendo respectivamente a 60%, 30% e 10% do total de indivíduos coletados.

A presença de *L. vannamei* indica o provável escape de camarões desta espécie de alguma fazenda de carcinicultura da região. Essa introdução involuntária de espécies exóticas em ambientes estuarinos brasileiros já foi observada anteriormente em outros trabalhos, tendo como causa a instalação de fazendas de cultivo de camarões, podendo provocar sérios problemas que comprometem a integridade e sobrevivência das espécies nativas (SANTOS *et al*, 2004).

Em ambientes estuarinos e costeiros do Brasil, foi observado por Amaral e Jablonski (2005) a diminuição dos estoques de espécies nativas e alterações no tamanho das populações, e conseqüente redução da biodiversidade natural. Isso já levou muitas espécies de camarões nativos ao estado de sobrepesca, inclusive, segundo o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) a espécie alvo do trabalho *F. subtilis* encontra-se comprometida, com elevado grau de exploração (SANTOS; CÂMARA, 2002).

A ocorrência de espécies exóticas provavelmente colabora para essa redução, aliado a outros fatores como aumento do esforço de pesca e o aumento desordenado das indústrias pesqueiras (D'INCAO 1991; VALENTINI et al., 1991).

Como resultado da identificação morfológica e anatômica realizada, os 30 camarões da espécie *F. subtilis* identificados no trabalho eram juvenis, com peso médio de 3,0 g, o que atrapalhou um pouco na identificação. Entretanto, essa dificuldade foi atenuada pela presença de exemplares de *F. brasiliensis* cedidos pelo LABOMAR, permitindo que as comparações pudessem ser realizadas (Figura 8).

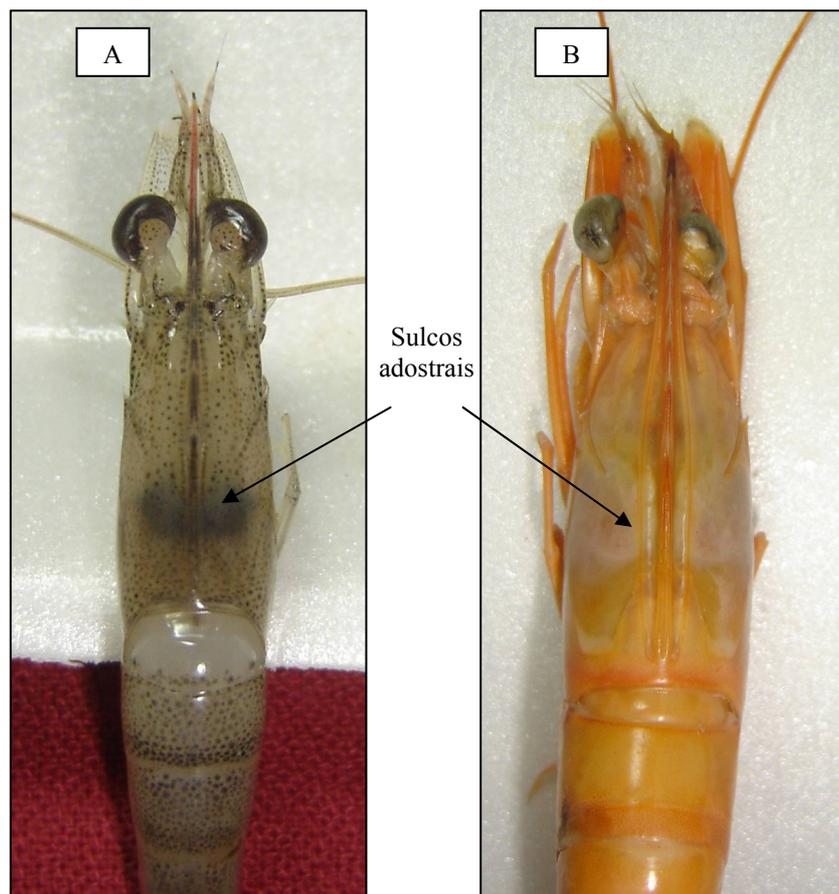


Figura 8 – (A) Camarão *F. subtilis* capturado do Rio Pacoti, ainda fresco e (B) *F. brasiliensis* cedido pelo LABOMAR, conservado em álcool. Os sulcos adostrais estão indicados por setas, mostrando que o indivíduo A possui afunilamento na espessura do sulco, enquanto que no indivíduo B o sulco permaneça com a mesma espessura ao longo do comprimento.

Na identificação molecular, como resultado da amplificação por PCR do gene COI e 16S do DNA mitocondrial, foram obtidos fragmentos de aproximadamente 590pb e 500pb respectivamente (Figura 9) e para o controle positivo *L. vannamei* foram amplificados fragmentos de aproximadamente 600pb para COI e 548pb para 16S.

O resultado obtido foi bastante satisfatório, levando em consideração que o tamanho dos fragmentos obtidos estava de acordo com o esperado, ou seja, eram de aproximadamente 600pb para o COI e de 500pb para o 16S.

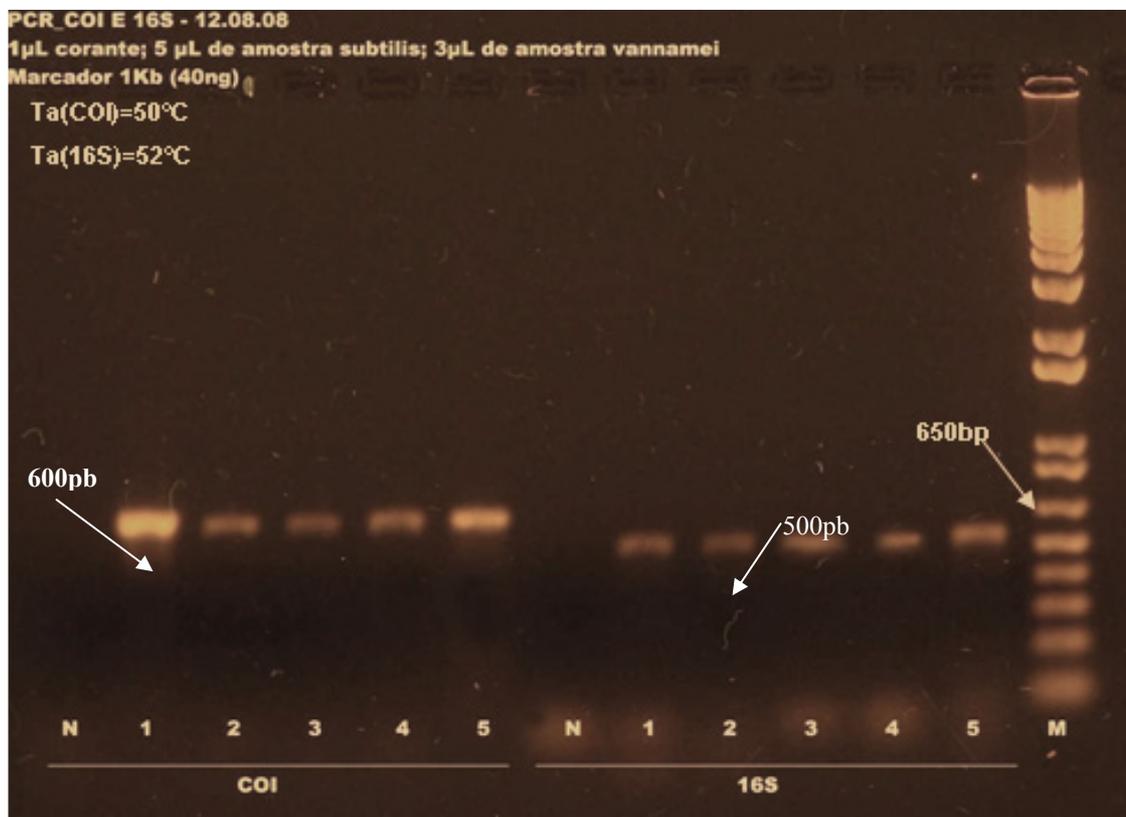


Figura 9 – Amplicons de COI e 16S visualizados em gel de agarose 1% com brometo de etídeo e marcador 1Kb plus da Invitrogen (M). Amostras de *F. subtilis* (1 a 4), do controle positivo *L. vannamei* (5) e controle negativo (N). Destaca-se o tamanho das bandas para COI com 600pb e a banda correspondente à 16S por volta de 500pb. A banda 1 apresenta-se mais brilhante, ou seja, mais concentrada por possuir uma maior concentração de cDNA do que nas outras amostras.

No Genbank/NCBI, comparando-se as sequências de COI existentes para os camarões peneídeos *F. subtilis*, *F. paulensis*, *F. brasiliensis*, *P.*

*monodon*, *M. japonicus*, *F. chinensis* e *L. vannamei*, o tamanho das sequências varia de 504 a 850pb. Já para o 16S, varia de 466 a 532pb, entre as mesmas espécies citadas acima, sendo todas essas sequências parciais. Dessa maneira, nota-se que o resultado obtido neste trabalho está de acordo com o encontrado na literatura para camarões peneídeos (Tabela 5).

Tabela 5 – Sequências dos genes COI para as principais espécies de camarões peneídeos encontradas no GenBank e as obtidas no presente trabalho. Esta tabela apresenta as espécies com seu respectivo número de acesso e tamanho dos fragmentos em pares de bases, observando-se que o tamanho da seqüência obtida no trabalho está de acordo com o esperado.

(\*) são as amostras provenientes desse trabalho.

Genes	Espécies	N. de acesso no GenBank	Tamanho das sequências	Fonte
COI	<i>F. subtilis</i> (COI)*	-	590 pb	-
	<i>F. subtilis</i>	AF248556	558 pb	Gusmão <i>et al.</i> , 2000
	<i>F. paulensis</i>	AF248554	558 pb	Gusmão <i>et al.</i> , 2000
	<i>F. brasiliensis</i>	AF248560	558 pb	Gusmão <i>et al.</i> , 2000
	<i>P. monodon</i>	EF646261	556 pb	Khamnamtong <i>et al.</i> , 2009
	<i>M. japonicus</i>	AY742282	504 pb	Tsoi <i>et al.</i> , 2005
	<i>F. chinensis</i>	EU366250	850 pb	Acesso direto no GenBank
	<i>L. vannamei</i>	AY781297	709 pb	Acesso direto no GenBank

Tabela 6 – Sequências dos genes 16S para as principais espécies de camarões peneídeos encontradas no GenBank e as obtidas no presente trabalho. Esta tabela apresenta as espécies com seu respectivo número de

acesso e tamanho dos fragmentos em pares de bases, observando-se que o tamanho da seqüência obtida no trabalho está de acordo com o esperado.

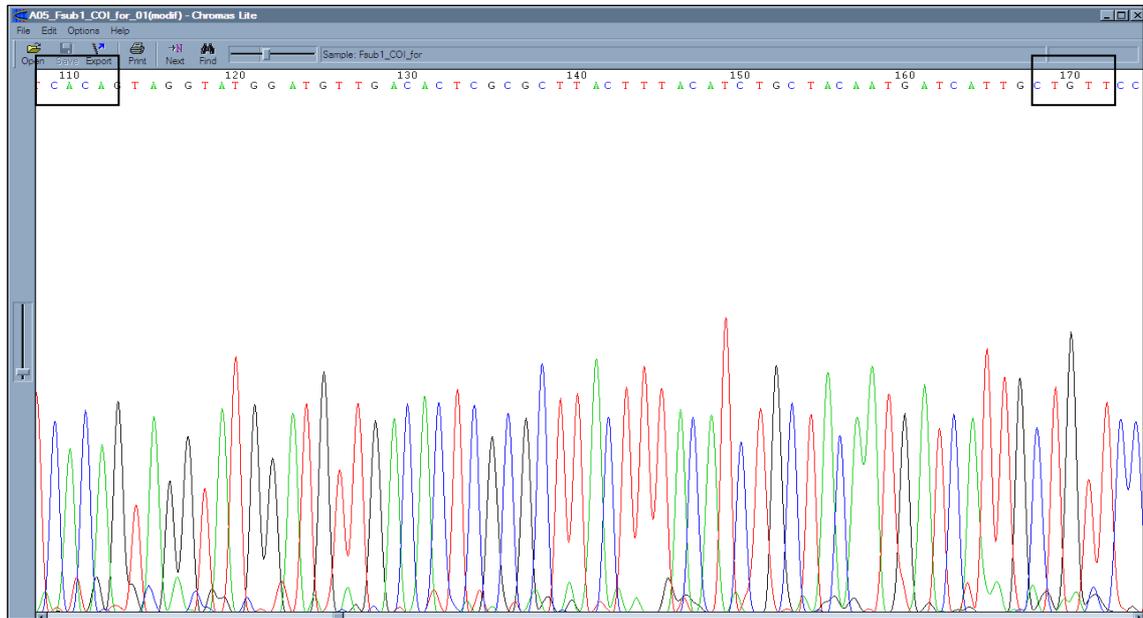
(\*) são as amostras provenientes desse trabalho.

Genes	Espécies	N. de acesso no GenBank	Tamanho das seqüências	Fonte
16S	<i>F. subtilis</i> (16S)*	-	500 pb	-
	<i>F. subtilis</i>	AF192061	485pb	Maggioni <i>et al.</i> , 2001
	<i>F. paulensis</i>	AF192060	485pb	Maggioni <i>et al.</i> , 2001
	<i>F. brasiliensis</i>	EF589701	532pb	Acesso direto no GenBank
	<i>P. monodon</i>	EU105473	470pb	Acesso direto no GenBank
	<i>M. japonicus</i>	EU056324	466pb	Acesso direto no GenBank
	<i>F. chinensis</i>	AF279813	468pb	Lavery <i>et al.</i> , 2004
	<i>L. vannamei</i>	AY344192	530pb	Acesso direto no GenBank

Foram obtidos amplicons de várias concentrações, mas, para a reação de sequenciamento, foi necessário padronizar as concentrações para que todos os amplicons tivessem 10ng, sendo necessário, às vezes, realizar algumas diluições.

Após análise dos eletroferogramas produzidos pelo sequenciamento e com o alinhamento das amostras de cada *primer*, foi obtida uma seqüência consenso para cada gene com 654pb para COI e 536pb para 16S. Em relação aos controles positivos, os fragmentos foram de 494pb para COI e 548pb para 16S (Figura 10). Com a submissão das seqüências de todas as amostras de COI e 16S ao programa BLAST, foi obtida a confirmação da espécie, devido à alta similaridade (99%) encontrada com as seqüências descritas para *F. subtilis* (Figuras 11 e 12).

(A)



(B)

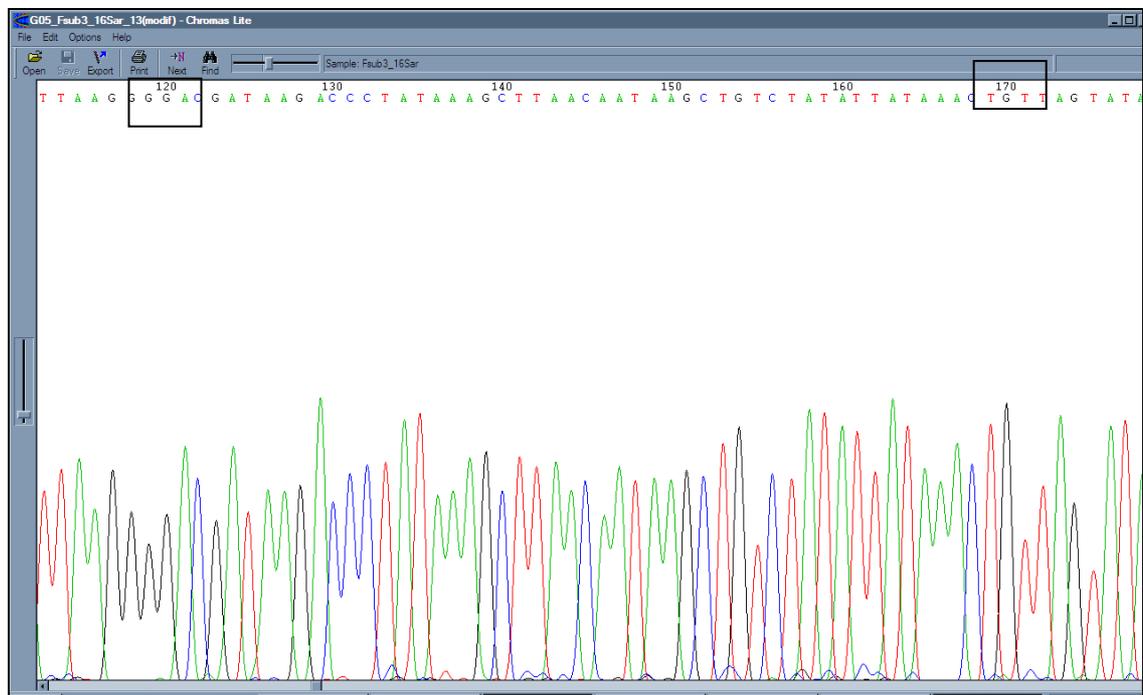


Figura 10 – Eletroferogramas parciais referentes ao sequenciamento de DNA mitocondrial do *F. subtilis*: (A) COI e (B) 16S. Os cromatogramas mostram trechos de seqüência destacando a posição entre 110 a 170pb para o COI e a posição entre 120 e 170 pb para 16S.

```

>|gb|AY135193.1| Farfantepenaeus subtilis cytochrome c oxidase I gene, partial
cds; mitochondrial gene for mitochondrial product
Length=577

Score = 1014 bits (1124), Expect = 0.0
Identities = 572/576 (99%), Gaps = 2/576 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 38   CTAAGAAATGTTGAGGAAAAAATGTAATATT-ACTCCGATAAATATAACGGAGAAAATGA 96
          |||
Sbjct 577   CTAAGAAATGTTGAGGAAAAAATGTAATATTACTCCGATAAATATAACG-AGAAAATGA 519

Query 97   ATTTTGTAGTCATTTAGGGTTTAAAGGTGAGCCCTGTAATAAAGGAAATCAGTGAGCAATA 156
          |||
Sbjct 518   ATTTTGTAGTCATTTAGGGTTTAAAGGTGAGCCCGTAAATAAAGGAAATCAGTGAGCAATA 459

Query 157  CCTGCAAAAATACCAAATACAGCTCCTATTGAAAGGACATAATGAAAATGTGCAACGACA 216
          |||
Sbjct 458   CCTGCAAAAATACCAAATACAGCTCCTATTGAAAGGACATAATGAAAATGTGCAACGACA 399

Query 217  TAATATGTATCATGTAGAATAATGTCAATTGAAGAATTAGCTAATACAACCTCCAGTTAGA 276
          |||
Sbjct 398   TAATATGTATCATGTAGAATAATGTCAATTGAAGAATTAGCTAATACAACCTCCAGTTAGA 339

Query 277  CCTCCAACTGTAATAAAAAATACAAATCCTAGAGCTCAAAATAGAGAGGGGGCTGTAGTTA 336
          |||
Sbjct 338   CCTCCAACTGTAATAAAAAATACAAATCCTAGAGCTCAAAATAGAGAGGGGGCTGTAGTTA 279

Query 337  AGTTGAGTACCATGAAGTGTTCCTAATCAGCTAAAGATTTTAAATACCACTAGGAACAGCA 396
          |||
Sbjct 278   AGTTGAGTACCATGAAGTGTTCCTAATCAGCTAAAGATTTTAAATACCACTAGGAACAGCA 219

Query 397  ATGATCATTGTAGCAGATGTAAGTAAGCGCGAGTGTCAACATCCATACCTACTGTGAAT 456
          |||
Sbjct 218   ATGATCATTGTAGCAGATGTAAGTAAGCGCGAGTGTCAACATCCATACCTACTGTGAAT 159

Query 457  ATATGATGTGCTCACACTACAATCCTAAAAACCAATTGCTAGTATAGCATAAATTATT 516
          |||
Sbjct 158   ATATGATGTGCTCACACTACAATCCTAAAAACCAATTGCTAGTATAGCATAAATTATT 99

Query 517  CCAAGTGTCCAAAAGCTTCTTTTTTACCAGATTCTTGACTAATAATGTGAGNAATTATA 576
          |||
Sbjct 98   CCAAGTGTCCAAAAGCTTCTTTTTTACCAGATTCTTGACTAATAATGTGAGNAATTATA 39

Query 577  CCAAAAGCAGGTAGAATTAGATATAGACTTCCGGG 612
          |||
Sbjct 38   CCAAAAGCAGGTAGAATTAGATATAGACTTCCGGG 3

```

Figura 11 – Resultado do melhor hit I obtido em um BLAST feito com a seqüência *Query* de COI obtida neste trabalho. A linha *Subject* (AY135193) apresenta 99% de similaridade com a seqüência *Query* aqui relatada.

```

>|gb|AY344193.1| Farfantepenaeus subtilis clone 232 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence; mitochondrial gene for mitochondrial product
Length=530

Score = 906 bits (1004), Expect = 0.0
Identities = 514/519 (99%), Gaps = 2/519 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1    CAGATCACGTAAGGATTTAAAGGTGCAACAGACCTTCCTTTATAAAGTGCATCATAAG 60
          |||
Sbjct 518   CAGATCATGTAAGGATTTAAAGGTGCAACAGACCTTCCTTTATAAAGTGCATCATAAG 459

Query 61   GATACCTTAATNTCAACATCGAGGGCGCAACCCCTCCTGTCGATATGAACCTCTCAAGGAA 120
          |||
Sbjct 458   GATACCTTAAT-TCAACATCGAGGTCGCAACCCCTCCTGTCGATATGAACCTCTCAAGGAA 400

Query 121  GATTACGCTGTTATCCCTAAAGTAACTTAATCTTATGATCTTTAAAAAAGGATCATPAAA 180
          |||
Sbjct 399   GATTACGCTGTTATCCCTAAAGTAACTTAATCTTATGATCTTTAAAAAAGGATCATPAAA 340

Query 181  TTTCAGATATTTCTGTTTATATATGTTATAAGAACAGTTACCTTTTATATTCCTGTCGC 240
          |||
Sbjct 339   TTTCAGATATTTCTGTTTATATATGTTATAAGAACAGTTACCTTTTATATTCCTGTCGC 280

Query 241  CCCAACGCAACAAATACCATCTAATATCAAGTTATACTAACAGTTTATAATATAGACAGC 300
          |||
Sbjct 279   CCCAACGCAACAAATACCATCTAGTATCAAGTTATACTAACAGTTTATAATATAGACAGC 220

Query 301  TTATTGTTAAGCTTTATAGGGTCTTATCGTCCCTTAATTTATTTAAGCCTTTTCACTCA 360
          |||
Sbjct 219   TTATTGTTAAGCTTTATAGGGTCTTATCGTCCCTTAATTTATTTAAGCCTTTTCACTCA 160

Query 361  AAAGTTAATTTCAACTATTTATAACTGAGACAGCTTGCTTCTTGTCACCAACATTATACAA 420
          |||
Sbjct 159   AAAGTTAATTTCAACTATTTATAACTGAGACAGCTTGCTTCTTGTCACCAACATTATACAA 100

Query 421  GCCTCCAATTAAAGACTAATGATTA-TGCTACCTTCGCACGGTCAGTATACCGGGCCC 479
          |||
Sbjct 99   GCCTCCAATTAAAGACTAATGATTA-TGCTACCTTCGCACGGTCAGTATACCGGGCCC 40

Query 480  TTTAAAATAAATCAGTGGGCGAGCCAGACTTTATATAAC 518
          |||
Sbjct 39   TTTAAAATAAATCAGTGGGCGAGCCAGACTTTATATAAC 1

```

Figura 12 – Resultado do melhor hit I obtido em um BLAST feito com a seqüência *Query* de 16S obtida neste trabalho. A linha *Subject* (AY344193) apresenta 99% de similaridade com a seqüência *Query* aqui relatada.

Confirmada a espécie através do BLAST, as seqüências foram submetidas à análise comparativa dos respectivos nucleotídeos com as seqüências desses genes de *F. subtilis* depositadas no Genbank/NCBI, com o auxílio da ferramenta de alinhamento múltiplo Clustal W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994).

## **5.2 Isolamento de beta-actina e miosina de cadeia pesada**

### **5.2.1 Desenho de *primers***

Devido ao fato de não existir *primers* específicos referentes aos genes de beta-actina e miosina para *F. subtilis*, foi realizado o desenho desses iniciadores, com o auxílio de ferramentas da bioinformática, para possibilitar a amplificação desses genes na reação de PCR. É importante destacar que a escolha adequada de *primers* é um fator que influencia diretamente a qualidade da PCR e prejuízos consideráveis ocorrem quando são empregados indevidamente, acarretando resultados inespecíficos, perda de reagentes químicos e horas de trabalho desperdiçadas (RYCHLIK, 1993).

Como resultados da busca por seqüências no banco de dados, foram encontrados genes de beta-actina e miosina para diversas espécies de animais, dentre elas, camarões, outros crustáceos, a mosca *Drosophila melanogaster* e para o homem, *Homo sapiens*.

Para o gene da beta-actina foram utilizadas 8 (oito) seqüências das espécies a seguir, com suas respectivas identificações no *GenBank* (n° de acesso): *Litopenaeus vannamei* (AF300705); *Fenneropenaeus chinensis* (DQ205426); *Penaeus monodon* (EF087977); *Macrobrachium rosenbergii* (AY626840); *Artemia franciscana* (AJ269584); *Homarus gammarus*

(AJ581663); *Drosophila melanogaster* (AB003910) e *Homo sapiens* (NM\_001101).

Já para miosina, devido a escassez de sequências desse gene no banco de dados, principalmente para camarões, incluindo *L. vannamei* e *F. chinensis*, que são espécies de grande importância, outras espécies foram utilizadas, a saber: *A. franciscana* (DQ448227); *Farfantepenaeus paulensis* (DQ115397); *H. americanus* (HAU03091), *H. sapiens* (NM\_014981) e *D. melanogaster* (X60196). Vale ressaltar que todas as sequências de miosina utilizadas foram para o gene da miosina de cadeia pesada, tendo em vista que, para miosina de cadeia leve, existiam ainda menos sequências descritas no *GenBank*.

Os resultados das análises comparativas entre as sequências de beta-actina e miosina, pela utilização do Clustal W, foram baseados em sequências completas e parciais disponíveis no *GenBank* e possibilitaram analisar semelhanças dos genes encontrados entre os organismos.

Entre as sequências de beta-actina comparadas, foi possível observar regiões que apresentavam alta similaridade, ou seja, regiões conservadas com potencial para serem utilizadas como *primers*. Após a análise dessas regiões no programa *OligoAnalyzer*, foram definidos como melhores *primers* candidatos degenerados: beta-actina\_Forward (5'-GAG GCC CAG AGC AAG GGW GG - 3') e beta-actina\_Reverse (5'-TCM TSC TTG STG ATC CAC AT-3').

Devido à ausência de regiões conservadas significativas, ou seja, com tamanho de 20 pb, que seria aconselhável para desenhar um *primer*, e de sequências completas, não foi possível a construção de *primers* para miosina de acordo com o pressuposto. Sendo assim, esses iniciadores foram desenhados a partir da análise de regiões promissoras de uma única

sequência de miosina de cadeia pesada do *F. paulensis* (DQ115397) com o programa comumente utilizado para construção de primers, *PrimerQuest*<sup>SM</sup> (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest>), onde foram obtidos os seguintes *primers*: miosina\_Forward (5'-ATG CCC GTG AAC AAG TCA ACA ACC-3'), miosina\_Reverse (5'-AGC CAG ATT CTT CGA GTT CCT GCT-3').

A utilização de ferramentas de bioinformática para o desenho de *primers* é de grande valia para pesquisas em biologia molecular, sendo o passo chave para uma reação bem sucedida de PCR (GARCÊS; LIMA, 2004; SAMBROOK, 2001). Como foi observado neste trabalho, é um procedimento relativamente simples, levando um pouco mais de tempo somente na etapa de buscas de sequências de qualidade no banco de dados de interesse. Mas pela disponibilidade de excelentes programas gratuitos na Internet, o trabalho de construção de *primers* tornou-se mais fácil e com resultados consistentes, fazendo com que seu uso possa ser implementado de maneira rápida, economizando tempo e recursos.

### 5.2.2 Reação de RT-PCR

A utilização de RT-PCR com os *primers* desenhados permitiu a amplificação dos fragmentos de beta-actina e miosina de cadeia pesada de *F. subtilis* bastante satisfatória. Amplicons de aproximadamente 1000pb para beta-actina e 600pb para miosina foram obtidos. Em relação aos controles positivos, foram amplificados fragmentos de 950pb para beta-actina e 690pb para miosina (Figura 13).

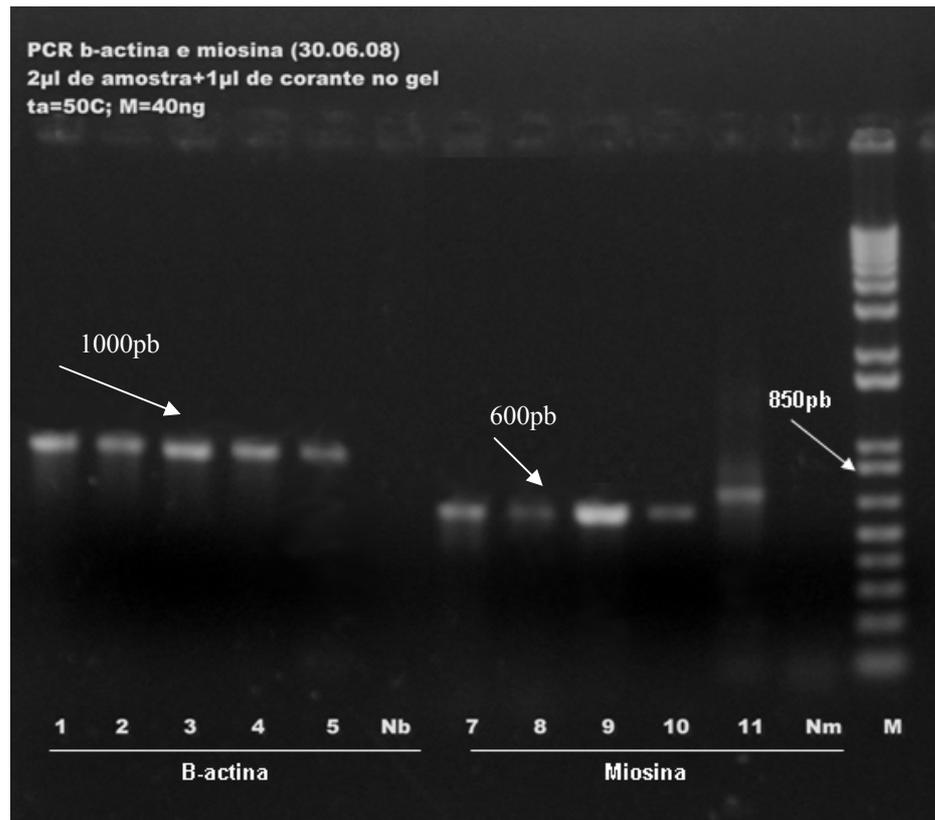


Figura 13 – Perfil eletroforético obtido para os genes da beta-actina e miosina de cadeia pesada de *F. subtilis*. Para beta-actina: (1, 2, 3, 4) amostras de *F. subtilis*; (5) Controle positivo; (Nb) Negativo. Para miosina: (7, 8, 9, 10) amostras de *F.subtilis*; (11) Controle positivo; (Nm) Negativo e (M) marcador. Nota-se a indicação do tamanho do marcador (850pb), das bandas para beta-actina (1000pb) e as bandas para miosina (600pb).

A justificativa para a utilização de RT-PCR foi devido ao fato desta técnica apresentar maior sensibilidade para a detecção e quantificação de sequências raras do RNAm, sendo assim, com esse processo de transcrição reversa, em que o RNA é transcrito em DNA, a probabilidade de identificação dos genes alvo deste trabalho seria bem maior do que com uma técnica baseada em DNA.

Além de isolar genes, RT-PCR vem sendo empregada para verificar os padrões de expressão de genes em diferentes estágios de desenvolvimento, diferentes tecidos em camarões. Cesar e Yang (2006) utilizaram esta técnica para comparar os níveis de expressão de mRNA em ubiquitina, proteína heat

shock 70 (Hsp 70) com as proteínas musculares alpha-actina e beta-actina em *L. vannamei*, em estágios distintos do ciclo de muda. Foi observado que as estruturas musculares de actina aumentam durante o estágio de intermuda e pré-muda, sugerindo que há um crescimento maior do músculo abdominal do camarão durante esses estágios.

O isolamento de genes de actina, e suas isoformas, a partir do cDNA de camarões já foi empregado em *M. japonicus* (MAEDA *et. al*, 2002), *Macrobrachium rosenbergii* (ZHU *et. al*, 2005), *L. vannamei* (SUN *et. al*, 2007). Como mencionado anteriormente, devido à escassez de sequências de genes para camarões, em alguns trabalhos é comum observar a utilização de *primers* de outras espécies e até de outros animais, como o de actina da mosca *Drosophila* e beta-actina do peixe medaka (*Oryzias latipes*).

Assim como permite uma melhor identificação de genes, a técnica de RT-PCR é muito útil para verificar a expressão de genes em diferentes tecidos ou diferentes estágios de desenvolvimento, o que não foi o objetivo do estudo em questão, mas que pode vir a ser realizado em estudos futuros.

### 5.2.3 Sequenciamento de beta-actina e miosina de cadeia pesada

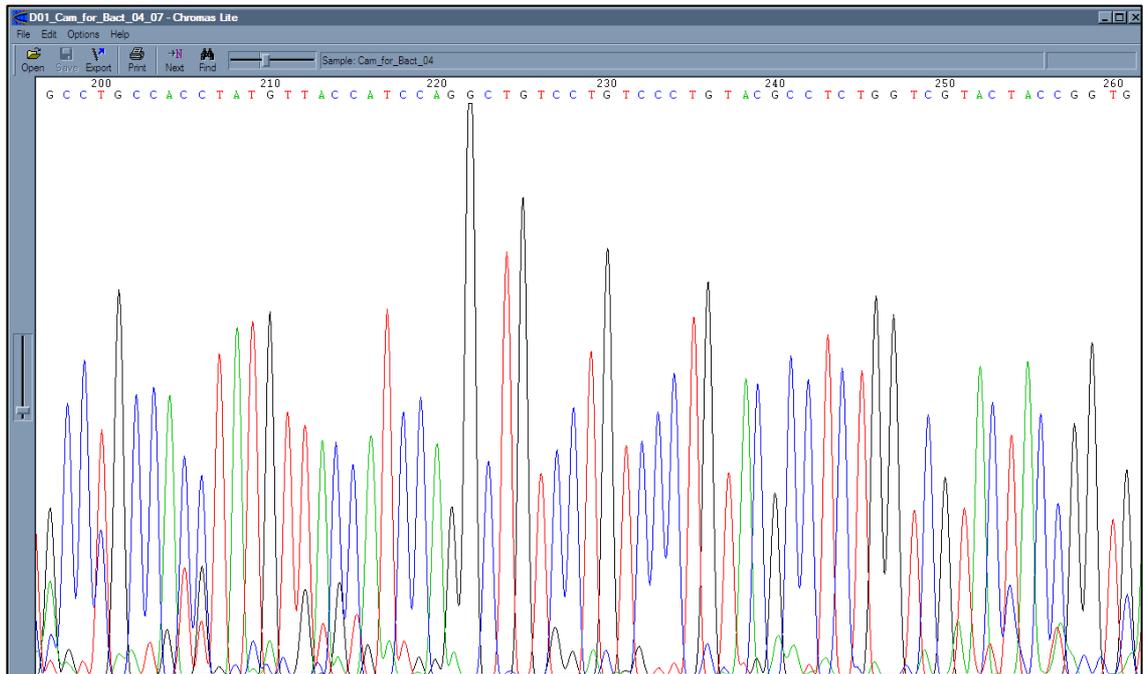
Como resultado do sequenciamento, e após análise dos eletroferogramas para cada gene, os fragmentos seqüenciados obtiveram aproximadamente 760pb para beta-actina e 570pb para miosina. O tamanho dos fragmentos para os controles positivos foi de 773pb para beta-actina e 640pb para miosina (Figura 14). Durante a análise visual dos fragmentos, geralmente, o começo e o final de cada seqüência observada, que corresponde a aproximadamente 100 nucleotídeos ao todo, são descartados, pois não

possuem uma boa qualidade, apresentando picos muito baixos, indefinidos e com ruídos.

De acordo com o tamanho das seqüências esperadas a partir dos *primers* desenhados, os fragmentos seqüenciados tinham tamanhos compatíveis, tendo em vista que para beta-actina o tamanho delimitava uma região de 915pb e de 630pb para miosina. É importante mencionar que o tamanho desses fragmentos foi menor do que os estimados pelo PCR, pois, geralmente, o começo e o final de cada seqüência observada no sequenciador, que corresponde a aproximadamente 100 nucleotídeos ao todo, são descartados, pois não possuem uma boa qualidade, apresentando picos muito baixos, indefinidos e com ruídos.

Dentre as seqüências completas de beta-actina já depositadas no *GenBank*, estão as do *Fenneropenaeus chinensis* (1358pb), *L. vannamei* (1320pb), *P. monodon* (1134pb) e *Macrobrachium rosenbergii* (1281pb). Não foi encontrada nenhuma seqüência de beta-actina para espécies de camarões nativos do Brasil, até o momento da realização deste trabalho, o que demonstra a necessidade de estudos moleculares para o melhor detalhamento do potencial genético e conhecimento de nossas espécies.

(A)



(B)

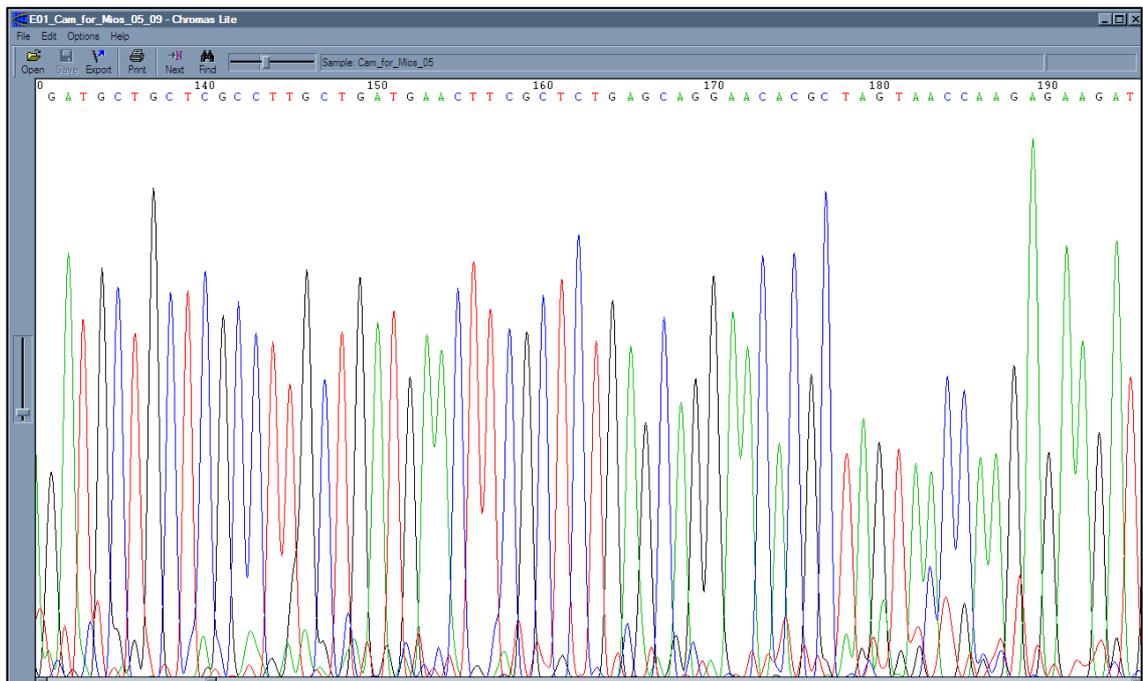


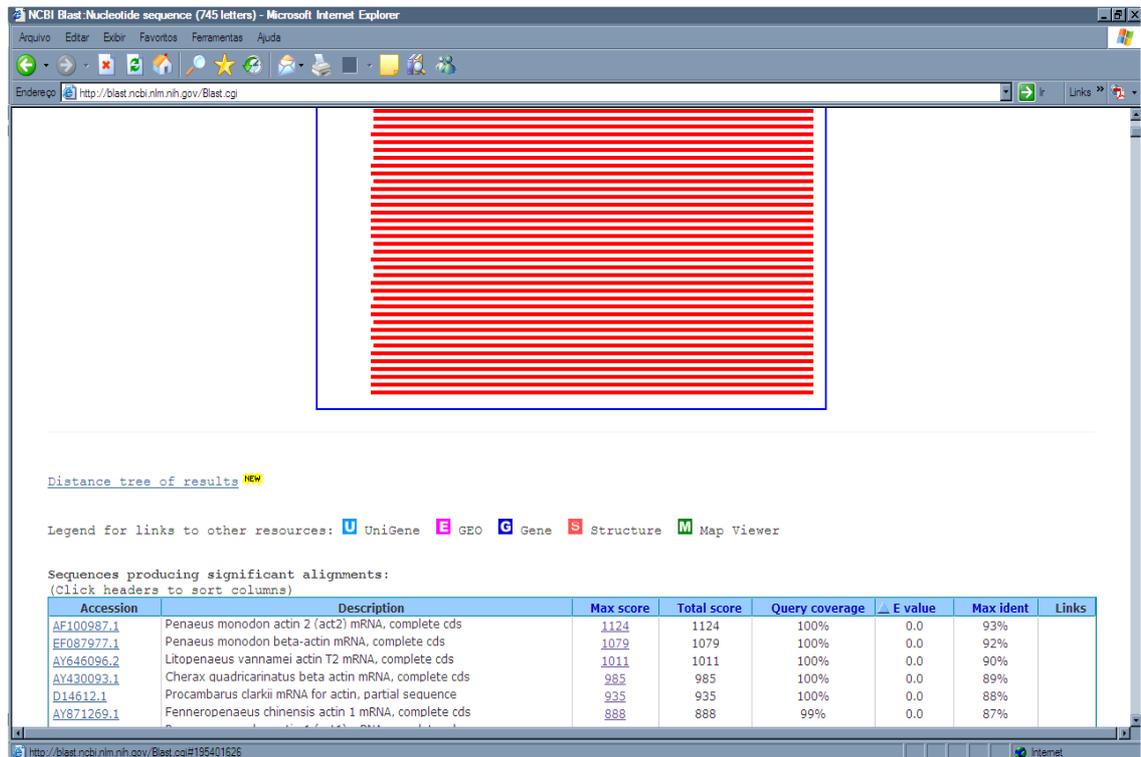
Figura 14: Ilustração de eletroferogramas de beta-actina (A) e miosina de cadeia pesada (B) de *F. subtilis* sequenciados neste trabalho, os quais foram gerados pelo aplicativo Chromas que produz uma interface gráfica com visualização de picos e posições das bases. Pode-se observar uma boa qualidade das sequências geradas, pela definição dos picos obtidos, que estão agudos, com afastamento uniforme e sem sobreposição.

#### 5.2.4 Análise das sequências por ferramentas de bioinformática

De acordo com o resultado do BLAST das amostras de beta-actina e miosina de cadeia pesada, os respectivos genes foram confirmados através da alta similaridade encontrada no banco de dados, como apresentado nas figuras abaixo, onde são mostradas as identificações das sequências similares, com a identidade máxima (Max. ident.) encontrada entre elas e a seqüência *query* (Figura 15).

Pode-se observar que para a beta-actina de *F. subtilis*, foi obtido um alinhamento bastante significativo devido à obtenção de uma alta similaridade de 93% em comparação com a beta-actina de *P. monodon* (AF100987) com um *e-value* de valor zero, o que significa dizer que é nula a probabilidade de que o alinhamento entre a seqüência de entrada (*query*) e a seqüência encontrada tenha sido ao acaso. Da mesma maneira, também foi obtido um alinhamento significativo para miosina de cadeia pesada de *F. subtilis*, com a presença de *e-value* zero e uma alta similaridade de 88% com *F. paulensis* (DQ115397).

(A)



(B)

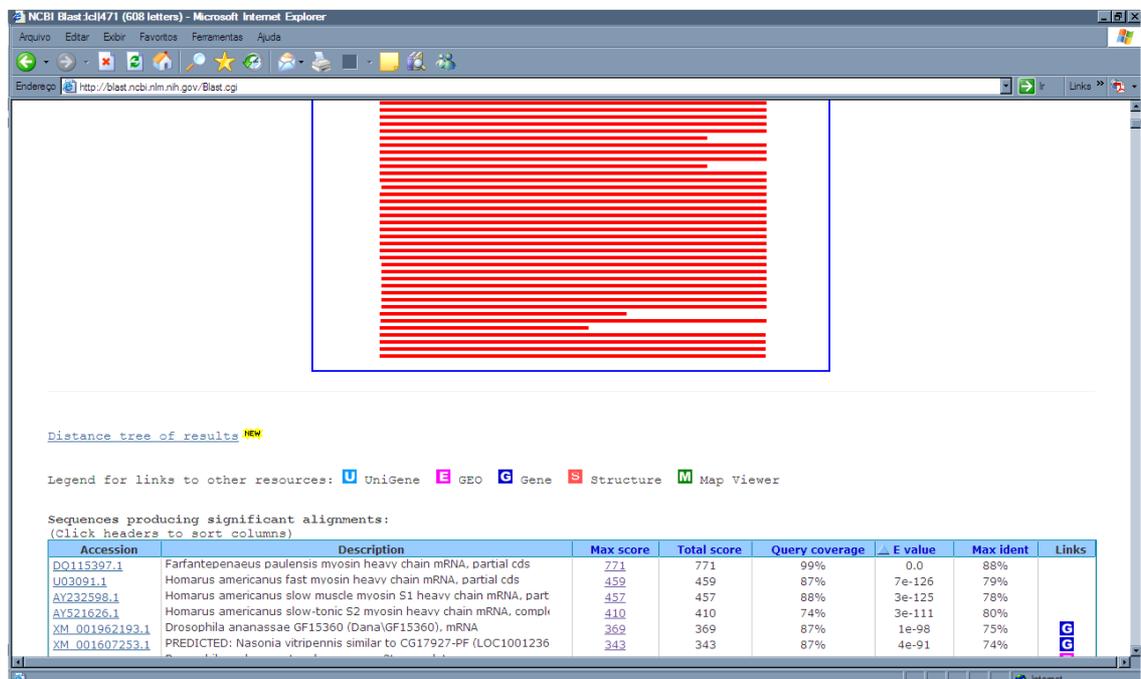


Figura 15 – Resultados das análises de BLAST mostrando alta similaridade das regiões seqüenciadas neste trabalho: (A) beta-actina e (B) miosina de cadeia pesada. Note-se o número de acesso que aparece no topo de cada quadro, mostrando a descrição da seqüência mais similar, com: A) e-value (0,0) e Máxima Identidade (93%); B) e-value (0,0) e Máxima Identidade (88%).

Os alinhamentos múltiplos entre espécies diferentes realizados através do ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON,1994) foram mais satisfatórios para beta-actina do que para miosina de cadeia pesada, devido ao número reduzido de seqüências de miosina, assim como à escassez de seqüências completas.

Foram observadas divergências nucleotídicas no resultado do alinhamento gerado entre a seqüência de beta-actina obtida no presente trabalho e as outras depositadas no GenBank, a saber: *P. monodon* (EF087977); *M. rosenbergii* (AY626840); *L. vannamei* (AF300705); *F. chinensis* (DQ205426); *H. sapiens* (NM\_001101) e *H. gammarus* (AJ581663) (Figura 16).

Além do alinhamento propriamente dito, há ainda a possibilidade de verificar o resultado do ClustalW através da visualização do arquivo Jalview (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON,1994), no qual é possível a observação da conservação das regiões resultantes do alinhamento, bem como da qualidade destas através de diagramas de barras, onde cada nucleotídeo possui uma coloração diferenciada: Adenina (azul); Guanina (laranja); Citosina (rosa); Timina (verde). Se ocorrer similaridade entre os nucleotídeos, há formação de uma barra preta completa, se não ocorre, a barra não fica completamente preta (Figura 17).

A utilização de programas que realizam alinhamentos múltiplos vem sido comumente empregada em trabalhos com isolamento e caracterização de genes (UNAJAK, BOONSAENG, JITRAPAKDEE, 2006), identificação de expressão de genes (DHAR *et al.*, 2003) e análise comparativa entre genes (RICHARDS *et al.*, 2005; NETO, 2006).





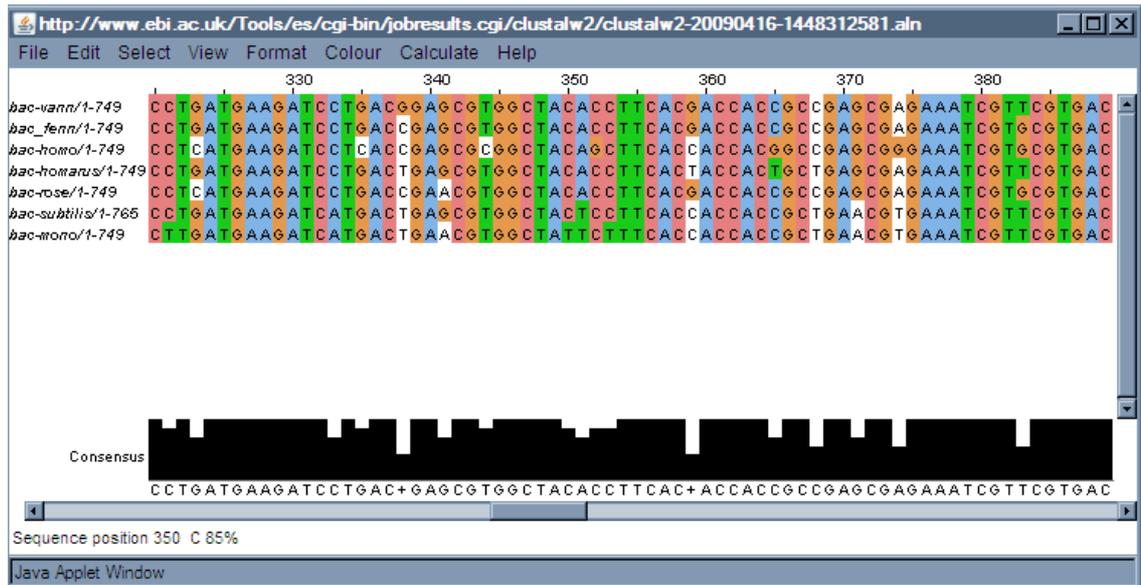


Figura 17: Representação JalView do ClustalW para beta-actina. Na parte superior da figura está o alinhamento com cores diferenciadas para cada nucleotídeo e na parte inferior, a seqüência consenso obtida no alinhamento, onde cada coluna apresentando região conservada está indicada pela cor preta.

O cladograma resultante para beta-actina mostrou uma evidente proximidade entre *F. subtilis* e *P. monodon*, apresentando a maior similaridade resultante de 91% (Figura 18). E mesmo apesar das divergências nucleotídicas encontradas a menor similaridade em relação à seqüência de *F. subtilis* com *H. sapiens* obteve uma porcentagem relativamente alta de 76%. Em relação aos níveis de similaridade encontrados para beta-actina de *F. subtilis* com as outras espécies, foram obtidos os seguintes valores: 79% com *M. rosenbergii*; 77% com *L. vannamei*, *F. chinensis* e *H. gammarus*.

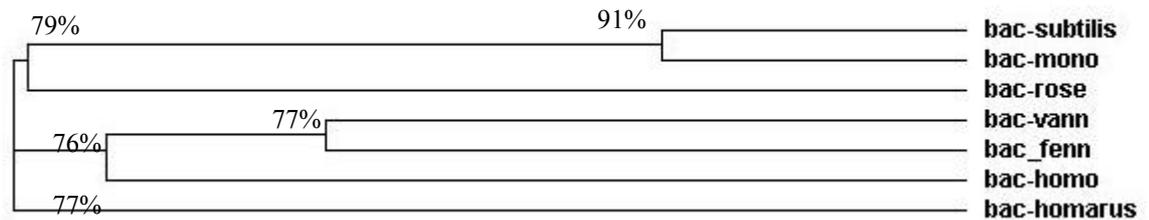


Figura 18 – Cladograma para beta-actina. Resultado do alinhamento múltiplo efetuado pela ferramenta ClustalW entre organismos que obtiveram alinhamento significativo com o gene da beta-actina. Pode-se observar a proximidade entre *F. subtilis* e *P. monodon*, apresentando 91% de similaridade. Legenda: bac - significa beta-actina; espécie (número de acesso no GenBank).; bac-subtilis: *F. subtilis* do estudo; bac-mono: *P. monodon* (EF087977); bac-rose: *M. rosenbergii* (AY626840); bac-vann: *L. vannamei* (AF300705); bac-fenn: *F. chinensis* (DQ205426); bac-homo: *H. sapiens* (NM\_001101) e bac-homarus: *H. gammarus* (AJ581663).

Na tentativa de verificar o nível de similaridade entre a seqüência de miosina de cadeia pesada de *F. subtilis* isolada neste trabalho através do alinhamento múltiplo com outras de espécies diferentes foram utilizadas as seguintes seqüências já detalhadas anteriormente no item 5.2.1: *F. paulensis* (DQ115397), *A. franciscana* (DQ448227), *H. gammarus* (AF474972), *D.melanogaster* (X60196) e *H. sapiens* (NM\_014981). O resultado obtido do alinhamento não foi muito significativo em comparação com o alinhamento para beta-actina, apresentando muitas divergências nucleotídicas, ou seja, índices de similaridades muito baixos, provavelmente devido a reduzida quantidade de seqüências para miosina no GenBank, embora saiba-se que muitas das espécies aqui estudadas são efetivamente aparentadas (Figura 19).

```

mio_sub      AACATGGAAGGACGCATTCGTGAACTCGAGTCTGCGCTGGATGAAGAGACCCGTCGTCAC 381
mio_paul     GATCTTGAAGCTCGCATTCGCGAACTGGAGGCTTCCCTGGACGATGAGACCCGTCGTCAC 538
mio_art      AAACCTGAACAGAGAGTTCGCGAACTTGAACAAGAACTTGACGGTGAACAGCGCCGACAT 69
mio_homo     AAACCTAGAATCCAGGGTTCGTGAACTGGAAGGTGAACTGGAGGGTGAATCCGTCGCGAGT 70
mio_homarus  -----GGGTCTTCGTGGACTTCGGTATGGATCTGCAGGC---CTGCATCGAGCT 46
mio_droso   -----GGGCCTTCATCGATTTTCGGTATGGACTTGTGGC---CTGTATCGATCT 46
              *   ***       * *               * *                   **

mio_sub      GCCGATTCGAGAAGAACCTGAGGAAGTGCAGAGGGCGCATCAAGGAGCTCGCCTTCCAG 441
mio_paul     GCTGATGCCCAGAAGAACCTGAGGAAGTGTGAGAGGCGCATCAAGGAGCTCGCCTTCCAG 598
mio_art      GCTGATGCTCAGAAGAACCTCCGCAATCCGAACGACGTATTAAGGAGCTCACTTTCCAA 129
mio_homo     GCAGAGGCCAGAGGGGAGCCCGCAGACTTGAGCGATGCATCAAGAGCTGACCTATCAG 130
mio_homarus  CTT----CGAGAAGAAAATGGGTCTGCTCTCCATCCTCGAAGAAGAGTCTATGTTCCCC 101
mio_droso   GAT--TGAAAAGGTTTCGTCTCCTCCCAACCAACCTTCTAGCCAAAATATTCGCATCG 104
              **                               * *

mio_sub      ACTGACGAGGACAAGAAGAACCACGACAGGATGCAGGAC---CTCGTCGATAAGCTC--C 496
mio_paul     ACTGACGAGGACAAGAAGAACCACGACAGAAATGCAGGAC---CTCATCGATAAGCTC--C 653
mio_art      GCTGATGAGGACAGGAAGAACCATGAACGCATGCAAGAT---CTTGTGACAAAACCT--C 184
mio_homo     GCAGAGGAAGACAAGAAGAATCTGAGCAGGATGCAAACT---CAGATGGATAAACTT--C 185
mio_homarus  AAGGCTACTGACAAGTCTTTCACTGAGAAGTTAAATGCTACCCACCTTGGAAGTCT--C 159
mio_droso   CTCGTTGTTCTGTCAACATATATGAATTAAGTTTATTTATAAAGTTTTCGGCACCCCTGAAT 164
              *                               * * *

mio_sub      AGCAGAAGATCAAGACCTACAAGCGCCAGATCGAGGAGGCTGAGG---AAATCGCC-GGC 552
mio_paul     AGCAGAAGATCAAGACCTACAAGCGCCAGATCGAGGAGGCTGAGG---AGATCGCC-GCC 709
mio_art      AACAGAAGATCAAGACATACAACGACAGATCGAAGAAGCCGAAG---AAATGCT-GCC 240
mio_homo     AGCTAAAAGTGCAAAATTACAAGCAGCAAGTCCGAGGTGGCGGAAA---CACAAAGCC-AAT 241
mio_homarus  CTGTGTTTCATCAAGCCCAAGCCACCAAGGCTGGTATACCAGAAGCTCACTTCGCC-ATT 218
mio_droso   GGCAATCATCTAAAACCTGATGATCCCAAGTGGGGGTAGCGTATATATACAATATTTATT 224
              * * * * * * * *

mio_sub      CTTA-----ACCTGGC---CAAGTTCGCA-AGGCTCAGCAGGAAC-TN 591
mio_paul     CTCA-----ACCTGGC---CAAGTTCGCA-AGGCCAGCAGGAAC-TC 748
mio_art      TTAA-----ATTTGGC---TAAATTCGCA-AAGCACAGCAAGATC-TG 279
mio_homo     CAAT-----ACCTTTC---CAAGTATAAGA-AACAGCAACATGAGT-TG 280
mio_homarus  GTTC-----ACTACGC---TG-GTACTGTC-AGCTACAACCTGAGT-GG 256
mio_droso   GTTTCAGTCATGCGGAGAGAAGTGCGCCCATTAAGCGTTTCTAGCTCCATATATATATA 284
              * * * * * **

mio_sub      AAAAAAATCTGGCTTAA----- 608
mio_paul     GAAGAA-TCTGGCTAAACTATACTGTACAGTACATCTAGTCATATGCCAGATGTTTATAA 807
mio_art      GAAGAA-GCAGAAGAGAGAGCAGACGCTGCTGAGCAGGTTGTTGCAAAAAGTTCGCGCTAA 338
mio_homo     AATGAA-GTGAAGGAAAGGGCAGAGGTGGCAGAACTCAAGTCA-ATAAACTCAAAATTA 338
mio_homarus  CTGGCTCGAGAAGAACAAGGATCCCCCTCAACGACACTGTTGTTGACCAGCTCAAGAAGTC 316
mio_droso   TATATATACTATAAGCACACAACCCACATCCATGTCATGCCCTCCAGAATGAAGAATC 344
              *

```

Figura 19 – Alinhamento das sequências de cDNA para miosina de cadeia pesada do camarão *F. subtilis* (ClustalW). Legenda: mio - significa miosina; espécie (número de acesso no GenBank); mio\_sub: *F. subtilis* do estudo; mio\_paul: *F. paulensis* (DQ115397); mio\_art: *A. franciscana* (DQ448227), mio\_homarus: *H. gammarus* (AF474972); mio\_droso *D. melanogaster* (X60196) e mio\_homo: *H. sapiens* (NM\_014981). O símbolo \* refere-se às posições conservadas entre as sete sequências das espécies.

O cladograma resultante para miosina de cadeia pesada mostrou uma evidente proximidade entre *F. subtilis* e *F. paulensis*, apresentando a maior similaridade resultante de 87% (Figura 20). Esse resultado já era esperado

devido ao fato de que o desenho de *primer* para miosina de cadeia pesada realizado nesse trabalho para o *F. subtilis* foi baseado nessa seqüência do *F. paulensis*. Os níveis de similaridade encontrados para *F. subtilis* com as outras espécies foram: 51% com *A. franciscana*; 41% com *H. sapiens*; 4% com *H. gammarus* e *D. melanogaster*.

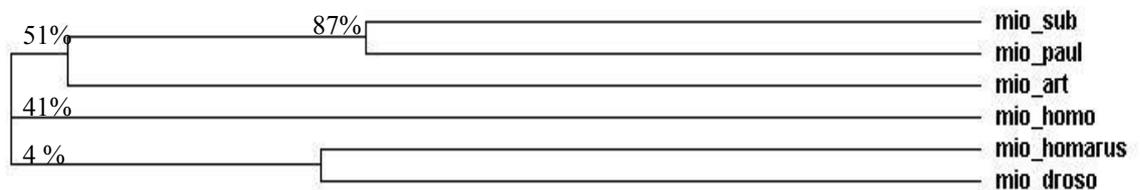


Figura 20 – Cladograma para miosina de cadeia pesada. Resultado do alinhamento múltiplo efetuado pela ferramenta ClustalW entre diferentes organismos com o gene da miosina de cadeia pesada. Pode-se observar a proximidade entre *F. subtilis* e *F. paulensis*, apresentando 87% de similaridade. Legenda: mio - significa miosina; espécie (número de acesso no GenBank); mio\_sub: *F. subtilis* do estudo; mio\_paul: *F. paulensis* (DQ115397); mio\_art: *A. franciscana* (DQ448227), mio\_homarus: *H. gammarus* (AF474972); mio\_droso: *D. melanogaster* (X60196) e mio\_homo: *H. sapiens* (NM\_014981).

Apesar dos resultados bastante satisfatórios, ainda há uma escassez de seqüências completas de isoformas de proteínas musculares em camarões peneídeos, principalmente em relação à miosina. Com exceção, está a seqüência parcial de miosina de cadeia pesada da espécie nativa *F. paulensis* (842pb) e também a recente inclusão no banco de dados da seqüência de miosina de cadeia leve do *L. vannamei* (EU449515) (AYUSO *et al*, 2008).

Estudos anteriores já identificaram vários genes de actina e suas variações, sendo que a obtenção da primeira seqüência completa de

aminoácidos de actina em crustáceos foi em *Artemia*, que é um organismo utilizado como animal modelo em pesquisas científicas (MACIAS; SASTRE, 1990). Devido ser relativamente recente o início desse tipo de estudos com crustáceos, especialmente com camarões, indica que ainda há muito campo de estudo e muitas descobertas importantes ainda poderão ocorrer.

A seqüência de  $\beta$ -actina de *F. subtilis* obtida neste trabalho apresentou alta similaridade com as seqüências de  $\beta$ -actina de vertebrados e invertebrados já conhecidas. Os resultados obtidos nesse trabalho suportam as observações anteriores de que o gene da actina é altamente conservado entre organismos vertebrados e invertebrados (FYRBERG *et al.*, 1981). Em invertebrados, várias isoformas de actinas foram descritas: seis da mosca-de fruta (FYRBERG *et al.*, 1981); duas do bicho de seda (MOUNIER; GAILLARD; PRUDHOMME, 1987); e duas de caranguejo (VARADARAJ; KUMARI; SKINNER, 1996).

Os resultados obtidos nesse trabalho fornecem subsídios que colaboram para a melhor compreensão da regulação genética do crescimento muscular de camarões, além de mostrar que a metodologia apresentada pode ser utilizada para a identificação de genes de interesse envolvidos tanto no crescimento muscular como em outras funções importantes.

## 6. CONCLUSÕES

- O presente estudo isolou e caracterizou parcialmente os genes das proteínas musculares beta-actina e miosina de cadeia pesada do camarão rosa *Farfantepenaeus subtilis* através da utilização de reações RT-PCR e seqüenciamento do cDNA.
- *Primers* para beta-actina e miosina de cadeia pesada foram desenhados a partir de sequências de aminoácidos conservadas e obtidas do GenBank., podendo ser utilizados em trabalhos posteriores.
- Material genético de boa qualidade foi obtido a partir da extração do tecido muscular abdominal do camarão.
- Foram isoladas sequências de cDNA das proteínas musculares com boa qualidade a partir da utilização dos *primers* desenhados.
- Foi encontrado alto índice de similaridade entre as sequências de beta-actina e miosina de cadeia pesada do *F. subtilis* em comparação às descritas no Genbank para outras espécies de camarões peneídeos, comprovando a identidade dessas sequências, sendo que a espécie que apresentou maior similaridade quanto à sequências de beta-actina foi *P. monodon* e quanto à miosina de cadeia pesada foi *F. paulensis*.

## 7. ESTUDOS FUTUROS

Estudos como esse, gerando informações sobre a estrutura genética de uma espécie nativa com potencial para o cultivo, auxiliam no melhor conhecimento da genética de camarões peneídeos nativos do Brasil,

produzindo subsídios que permitem analisar melhor a evolução genética entre as espécies.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, estudos futuros podem ser realizados visando a caracterização completa dos genes de beta-actina e miosina de cadeia pesada identificados, já que aqui só foi possível a caracterização parcial. A metodologia descrita também pode ser utilizada na identificação de outros genes relacionados com características importantes no *F. subtilis*, assim como em outras espécies.

Aliado a isso, estudos que visam verificar o padrão de expressão de genes durante o ciclo de muda de camarões é importantíssimo para podermos esclarecer como o crescimento muscular ocorre em camarões no âmbito molecular.

Adicionalmente, a identificação de genes em espécies nativas de camarões peneídeos pode ser impulsionada, gerando um maior conhecimento a cerca da estrutura genética da biodiversidade brasileira.

## REFERÊNCIAS

- ABCC. A carcinocultura brasileira. *Revista da ABCC*, v.1, p.30-45, 2004.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. ***Nucleic. Acid. Research***, 25:3389–3402, 1997.
- AMARAL, A.; JABLONSKI, S. Conservation of marine and coastal biodiversity in Brazil. ***Conservation Biology***, 19: 625-631. 2005.
- AVISE, J. C. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. **Chapman & Hall**. New York. 1994.
- AYUSO, R. *et al.* Myosin light chain is a novel shrimp allergen, *Lit v 3. J. Allergy Clin. Immunol*, v 122, n.4. 2008.
- BALDWIN, J. D. *et al.* Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*. ***Molecular Phylogenetics and Evolution***, v. 10, n 3, p. 399-407. 1998.
- BEARD, C. B. *et al.* The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. ***Insect Mol Biol***, n. 2, p. 103-124. 1993.
- BENZIE, J. A. H. Population genetic structure in penaeid prawns. ***Aquaculture Research***, n. 31, p. 95-119. 2000.
- BENZIE, J. A. H. *et al.* Growth of *Penaeus monodon* X *Penaeus esculentus* tiger prawn hybrids relative to the parental species. ***Aquaculture***, v. 193, n. 3-4, p. 227-237. 2001.
- BIO450 Primer Design Tutorial. 2006. Disponível em:  
<<http://faculty.buffalostate.edu/wadswogj/courses/450/BIO450%20Primer%20Design%20Tutorial%202006.doc>>.
- BHATTACHARYA, D.; WEBER, K. The actin gene of the glaucocystophyte *Cyanophora paradoxa*: analysis of the coding region and introns, and an actin phylogeny of eukaryotes. ***Curr. Genet.***, n. 31, p. 439–446. 1997.
- BOOTH, F.W.; KIRBY, C.R. Changes in skeletal muscle gene expression consequent to altered weight bearing. ***American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology***, n. 262, p. 329-332. 1992.
- BOOTH, F.W.; THOMASON, D. B. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise – perspective of various models. ***Physiological Reviews***, n. 71, p. 541-585. 1991.

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

BORGHETTI, N. R. B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R. Aqüicultura – Uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. **Curitiba: Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais**, 128p. 2003.

BOVENSCHULTE, M.; WEBER K. Deuterostomic actin genes and the definition of the chordates: cDNA cloning and gene organization for cephalochordates and hemichordates. **J. Mol. Evol.**, n. 45, p. 653–660. 1997.

BRANCO, J. O. Biologia e pesca do camarão-sete-barbas *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862) (Crustacea, Penaeidae), na armação Itapocoroy, Penha, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 22 (4): 1050-1062. 2005.

BRICHEUX, G.; BRUGEROLLE, G. Molecular cloning of actin genes in *Trichomonas vaginalis* and phylogeny inferred from actin sequences. **FEMS Microbiol. Lett.**, n. 153, p. 205– 213. 1997.

BUCKUP, L.; BOND-BUCKUP, G (Orgs.). Os crustáceos do rio Grande do sul. Porto Alegre: EDUFRGS, 1999.

BUNGER, M.H., *et al.* Semiquantitative mRNA measurements of osteoinductive growth factors in human iliac-crest bone: expression of LMP splice variants in human bone. **Calcif. Tissue Int.**, n. 73, p. 446–454. 2003.

BURPO, F. J. A critical review of PCR primer design algorithms and cross-hybridization case study. **Biochemistry**, 218. 2001.

CARVALHO, M. E. S. **A carcinicultura na zona costeira do estado de Sergipe**. São Cristóvão, 2004. 178p. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Núcleo de Pós-Graduação em Geografia, Universidade Federal de Sergipe, Sergipe. 2004.

CESAR, J. R. O. *et al.* Morphological and biochemical characterization of the molt stages of marine shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture (Amsterdam)*, v. 261, p. 688-694, 2006.

CESAR, J. R. O.; YANG, J. Expression Patterns of Ubiquitin, Heat Shock Protein 70,  $\alpha$ -Actin and  $\beta$ -Actin Over the Molt Cycle in the Abdominal Muscle of Marine Shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Molecular Reproduction and development**. Volume 74, Issue 5, p. 554 – 559. 2006.

CESAR, J. R. O.; ZHAO, B.; YANG, J. Analysis of expressed sequence tags from abdominal muscle cDNA library of the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Animal (The International Journal of Animal Biosciences)**, v. 2, p. 1377-1383, 2008.

CHARGE, S.B.; RUDNICK, M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 209-38. Review. 2004.

CHETVERIKOV, S. S. On certain aspects of the evolutionary process from the standpoint of modern genetics. Translation by M. Barker and I. M. Lerner. 1961. **Proc. Amer. Phil. Soc.** n. 105, p. 167-195. 1926.

CHIOU, T. T. *et al.* Molecular cloning and characterization of cDNA of penaeidin-like antimicrobial peptide from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Mar. Biotechnol.**, v. 7, n. 2, p. 119–127, 2005.

CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. "Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate - phenol-chloroform extraction." **Anal. Biochem.**, n.162, p.156-159. 1987.

CHU, K. H *et al.* Application of Mitochondrial Control Region in Population Genetic Studies of the Shrimp *Penaeus*. **Molecular Ecology Notes**, n. 3, p 120–122. 2003.

CRAWFORD, D.L. Nuclear genes from the copepod *Calanus finmarchicus*. **Mol. Mar. Biol. Biotechnol.**, n. 4, p. 241– 247. 1995.

CRUZ, P., *et al.* Isolation and characterization of microsatellites in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. **Molecular Ecology Notes** 2(3): 239-241, 2002.

CRUZ, P., *et al.* Genetic variability assessed by microsatellite in a breeding program of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Marine Biotechnology**, 6:157-164, 2004.

D'INCAO, F. Pesca e biologia de *Penaeus paulensis* na Lagoa dos Patos, RS. **Atlântica**, Rio Grande 13: 159-169. 1991.

DALL, *et al.* The Biology of Penaeidae. *Advances in Marine Biology*, Vol. 27 (J. H. S. Blaxter and A. J. Southward, series eds.). Academic Press, London, 1990. 489 pp.

DESJARDINS, P.R. *et al.* Evolutionary implications of three novel members of the human sarcomeric myosin heavy chain gene family. **JOURNAL Mol. Biol. Evol.** 19 (4), 375-393. 2002.

DHAR, A. K., *et al.* Identification of differentially expressed genes in shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with White Spot Syndrome Virus by cDNA microarrays. **Arch Virol.** 148:2381–2396. 2003.

DIAS NETO, J.; DORNELLES, L. D. C. Diagnóstico da pesca marítima do Brasil. Brasília, Coleção Meio Ambiente, Série Estudos-Pesca n°20, 165p. 1996.

DINIZ, M. C. **Variabilidade do Gene Mitocondrial Coi de dois Plantéis Reprodutores do Camarão *Litopenaeus Vannamei* do Nordeste Brasileiro.** Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, 2005.

DORE, I; C. FRIMODT. **An illustrated guide to shrimp of the world.** Osprey Books, New York, USA. 229p, 1987.

DUARTE, A. K. de A. **Abundância e Distribuição Sazonal de Espécies Autóctones de Camarões Peneídeos no Canal de Abastecimento do Sistema Primar de aquicultura orgânica (Laguna de Guarairas, Tibau do Sul, Rio Grande do Norte, Brasil).** 2006. Dissertação (Mestrado em Bioecologia Aquática) – Programa de Pós-Graduação em Bioecologia Aquática da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 37p. 2006.

EL HAJ, A. J. Crustacean genes involved in growth. In: Ennion S, G. Goldspink (eds). **Gene regulation in aquatic organisms.** SEB seminar series. Cambridge: Cambridge University Press, 94-112. 1996.

EYRIES, M.; COLLINS, T.; KHACHIGIAN, L. M. Modulation of growth factor gene expression in vascular cells by oxidative stress. **Endothelium**, 11(2):133-9. Review. 2004.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética.** Brasília: Embrapa. 1998

FISHER, R. A. **The Genetical Theory of Natural Selection**, Oxford Universit. Chapter 6. 1930.

FONTELES-FILHO, A. A. Recursos Pesqueiros: biologia e dinâmica populacional. Fortaleza: Imprensa Oficial do Ceará. 1989.

FRANCH, H.A.; PRICE, S. R. Molecular signaling pathways regulating muscle proteolysis during atrophy. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care** 8(3):271-5. 2005.

FRANCISCO, A. K. De. 2003. **Relações genéticas entre plantéis de reprodutores do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, através do seqüenciamento dos genes RNAr 16S e COI do DNAm.** Dissertação (Pós-Graduação em Genética e Evolução) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2003.

FYRBERG, E. A. *et al.* The actin genes of *Drosophila*: protein coding regions are highly conserved but intron position are not. **Cell** 24: 107–116. 1981.

GARCÊS, S. P. S., LIMA, A. O. S. Desenho e Validação in silico de Primers Intragenéricos - **II Workshop de Tecn. da Inf. aplicada ao Meio Ambiente** – CBComp. 2004.

GARESSE, R. *et al.* Artemia mitochondrial genome: molecular biology and evolutive considerations. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 117B, n. 3., p. 357-366, 1997.

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

GONÇALVES, M. M. *et al.* Fluorescent amplified fragment length polymorphism (fAFLP) analyses and genetic diversity in *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2005.

GUERRELHAS, A. C. B. Seed production of *Penaeus vannamei* in Brazil. **IV Simposio Centroamericano de Acuicultura**, Teguncigalpa, Honduras, pp 152-153. 1997.

GUNNING, P. *et al.* Isolation and characterization of full length cDNA clones for human a-, b-, c-actin mRNAs: skeletal but not cytoplasmic actins have an aminoterminal cysteine that is subsequently removed. **Molecular and Cellular Biology** 3: 787–795. 1983.

GUSMÃO, J.; LAZOSKI, C.; SOLÉ-CAVA, A. M. 2000. A new species of *Penaeus* (Crustacea:Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses. **Marine Biology**. 137:435-446. 2000.

GUSMÃO, J. 2001. **Sistemática molecular e genética populacional de espécies brasileiras de camarão (*Penaeus*:Decapoda:Penaeidae)**. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 120pp. 2001.

GUSMÃO, J.; LAZOSKI, C.; SOLÉ-CAVA, A. M. Population genetic structure of Brazilian shrimp species (*Farfantepenaeus* sp., *F. brasiliensis*, *F. paulensis* and *Litopenaeus schmitti*: Decapoda: Penaeidae). **Genetics and Molecular Biology**, 28, 1, 165-171. 2005.

HALL, T.A.; BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp.** Ser. 41:95-98, 1999.

HARRIS; D. A.; SHERBANY, A. A.; SCHWARTZ, J. H. Purification and characterization of muscle proteins from *Aplysia californica*. **Biol Bull** 166: 482–493, 1984.

HAUTON,C.; HAMMOND,J.A.; SMITH,V.J. Real-time PCR quantification of the in vitro effects of crustacean immunostimulants on gene expression in lobster (*Homarus gammarus*)granular haemocytes. **Dev. Comp. Immunol.** 29 (1), 33-42. 2005.

HICKMAN JR, C. P.; ROBERTS, L. S. **Integrated Principles of Zoology**. 2001.11<sup>th</sup> ed.

HILLIS, D.M. *et al.* Nucleic Acids IV: Sequencing and Cloning. In: **Molecular Systematics**, 2nd ed. Hillis DM, Moritz C and Mable BK eds. Sinauer, Sunderland. p321-381. 1996.

HOLTHIUS, L. B. Shrimps and prawns of the world: an annotated catalogue of species of interest to fisheries. **Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO) Species Catalogue**, Rome, 271p. 1980.

HOOPER, S.L., THUMA, J.B., 2005. Invertebrate muscles: muscle specific genes and proteins [Corrigenda 85, 1417]. **Physiol. Rev.** 85, 1001–1060.

HOOPER, S. L.; HOBBS, K. H.; THUMA, J. B. Invertebrate muscles: Thin and thick filament structure; molecular basis of contraction and its regulation, catch and asynchronous muscle. **Progress in Neurobiology**, 86. p 72–127. 2008.

HWANG, U.W. Cloning and sequences of beta-actin genes from *Rhodeus notatus* and the silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* (Cyprinidae) and the phylogeny of cyprinid fishes inferred from beta-actin genes. **DNA Seq.** 13, 153–159. 2002.

KAMIMURA, M.T. 2005. **Prospecção de genes relacionados com o crescimento do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis***. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Programa de Pós-graduação em Aqüicultura, Fundação Universidade Federal do Rio Grande. 2005.

KHAMNAMTONG, B.; KLINBUNGA, S.; MENASVETA, P. Genetic diversity and geographic differentiation of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand analyzed by mitochondrial COI sequences. **Biochem. Genet.** 47 (1-2), 42-55. 2009.

KIM, I.C. *et al.* The intertidal harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* (Crustacea: Copepoda) betaactin gene: cloning, sequence and intraspecies variation. **DNA Seq.** 14, 279– 284. 2003.

KOCAMIS, H.; KILLEFER J. Myostatin expression and possible functions in animal muscle growth. **Domestic animal endocrinology**, 23(4):447-54. 2002.

KOENDERS, A. *et al.* Ubiquitin and actin expression in claw muscles of land crab, *Gecarcinus lateralis*, and American lobster, *Homarus americanus*: differential expression of ubiquitin in two slow muscle fiber types during molt-induced atrophy. **J. Exp. Zool.** 292, 618– 632. 2002.

KRONERT, W.A. *et al.* Muscle-specific accumulation of *Drosophila* myosin heavy chains: a splicing mutation in an alternative exon results in an isoform substitution. **EMBO J.** 10 (9), 2479-2488. 1991.

LAMERS, A. E.; HEINEY, J. P.; RAM, J. L. Isolation and characterization of a cDNA encoding an actin protein from the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. **J Shellfish Res**, 17: 1215–1217, 1998.

- LAVERY, S.; CHAN, T.Y.; TAM, Y.K.; CHU, K.H. Phylogenetic relationships and evolutionary history of the shrimp genus *Penaeus s.l.* derived from mitochondrial DNA. **Mol. Phylogenet. Evol.** 31 (1), 39-49, 2004.
- LIU, F. *et al.* Molecular cloning and expression profile of putative antilipoplysaccharide factor in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). **Mar. Biotechnol.** 7 (6), 600–608, 2005.
- LIU, Z. *et al.* Isolation and characterization of b-actin gene of carp (*Cyprinus carpio*). **Nucleic Acids Research** 17: 5850. 1990.
- LYONS, R. E. *et al.* Characterization of AFLP markers associated with growth in the Kuruma Prawn, *Marsupenaeus japonicus*, and identification of a candidate gene. **Marine Biotechnology (NY)**. 2007.
- MACIAS, M.T.; SASTRE, L. Molecular cloning and expression of four actin isoforms during *Artemia* development. **Nucleic Acids Res.** 18, 5219–5225. 1990.
- MAEDA, M. *et al.* Isolation of the actin-encoding cDNA of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. **J Crustacean Biol** 22: 704–707, 2002.
- MAGGIONI, R. *et al.* Molecular Phylogeny of Western Atlantic *Farfantepenaeus* and *Litopenaeus* Shrimp Based on Mitochondrial 16S Partial Sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 2001. 18 (1): 66-73, 2001.
- MAGGIONI, R., ROGES, A. D., MACLEAN, N. Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda Penaeidae) from the Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. **Molecular Ecology Notes** 12: 3213-3217, 2003.
- MAIA, E. P.; NUNES, A. J. P. Cultivo de *Farfantepenaeus subtilis*: resultados das performances de engorda intensiva. **Panorama da Aqüicultura**, 13: 36-41, 2003.
- MARTINS, P. C. C. Cultivo de Camarão marinho. **Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil**, 2006. p. 121- 135. 2006.
- MOORE, S.S. *et al.* The characteristics and mapping of DNA markers in *Penaeus japonicus*: towards integrated genetic maps in penaeid shrimp. **Plant & Animal Genome VI Conference**. San Diego, CA, p. 13. 1998.
- MOUNIER, N.; GAILLARD J.; PRUDHOMME J. C. Nucleotide sequence of the coding region of two actin genes in *Bombyx mori*. **Nucleic Acids Research** 15: 2781. 1987.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymology**, v.55,p.355-350, 1987.
- NARCHI, W. **Crustáceos**. Editora Polígono/EDUSP. São Paulo, 116pp. 1973.

NEAL, R. A.; MARIS, R. C. Fisheries biology of shrimp and shrimp-like animals. In **"The Biology of Crustacea (10). Economic Aspects: Fisheries and Culture"** (A. J. Provenzano, Jr., Ed.; D. E. Bliss, Series Ed.), pp. 1–100, Academic Press, London, 1985.

NETO, E. C. de L. Identificação de genes relacionados ao sistema imune do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Fevereiro 2006.

NETO, J.D. Pesca de camarões na costa norte do Brasil. **Atlântica**. 13:21-28. 1991.

NIGAARD, V; HOVIG, E. Methods for quantitation of gene expression. **Front Biosci**. 1;14:552-69. 2009.

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. *Penaeus subtilis*; dieta e manejo alimentar em viveiros de cultivo semi-intensivo no Nordeste. **Panorama da Aqüicultura**, 5(32): 1-14. 1995.

NUNES, A.J.P.; PARSONS, G.J. Food handling efficiency and particle size selectivity by the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* fed a dry pelleted feed. **Marine and Freshwater Behavior and Physiology**, 31(4): 193-213. 1998.

NUNES, A.J.P., PARSONS, G.J. Feeding levels of the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* in response to food dispersal. **Journal of the World Aquaculture Society**, 30(3): 331-348. 1999.

NUNES, A.J.P. E PARSONS, G.J. Size-related feeding and gastric evacuation measurements for the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis*. **Aquaculture**, 187: 133-151. 2000.

NUNES, A.J.P., GESTEIRA, T.C.V. E GODDARD, S. Food ingestion and assimilation by the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. **Aquaculture**, 149: 121-136. 1997.

NUNES, A.J.P., GODDARD, S. E GESTEIRA, T.C.V. Feeding activity patterns of the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. **Aquaculture**, 144: 371-386. 1996.

OKAMOTO, H. *et al.* Molecular characterization of mutant actin genes which induce heat-shock proteins in *Drosophila* flight muscles. **EMBO J**. 5 (3), 589-596. 1986.

PAIVA, M.P. **Recursos pesqueiros estuarinos e marinhos do Brasil**. Edições UFC, 286 p., Fortaleza, 1997.

PALUMBI, S. R. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. *In*: Hillis, C. Moritz, and B. Mable (Eds.), "**Molecular Systematics**". 2nd ed., pp. 205–247, Sinauer, Sunderland, MA, 1996.

PALUMBI, S. R.; BENZIE, J. Large mitochondrial differences between morphologically similar Penaeid shrimp. **Mol. Mar. Biol. Biotechnol.** Vol 1: 27-34, 1991.

PEREZ-FARFANTE, I. A new species and two new subspecies of shrimp of the genus *Penaeus* from the western Atlantic. **Proc. Biol. Soc.** Washington 80: 83–100. 1967.

PÉREZ-FARFANTE, I. Western Atlantic shrimps of the genus *Penaeus*. **Fishery Bulletin**, United States Fish and Wildlife Service, 67(3): 461-591, 1969.

PÉREZ-FARFANTE, I. **Illustrated key to Penaeid shrimps of commerce in the Americas**. NOAA Technical Report NMFS 64, National Oceanic and Atmospheric Administration, 32 p, 1988.

PÉREZ-FARFANTE, I.; KENSLEY, B. Penaeid and sergestoid shrimps and prawns of the world. **Keys and diagnoses for the families and genera**. Éditions du Muséum Paris 175:1-79. 1997.

PÉREZ-JAR, L. et al. Changes in metabolic and immunological variables of wild and pond reared southern white shrimp *Litopenaeus schmitti* adult males during continuous reproductive activity. **Aquaculture**, 252: 591-597. 2006.

PINHEIRO, M. A. A; HEBLING, N. J. Biologia de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *In*: **Valenti WC (ed) Carcinicultura de água doce: Tecnologia para produção de camarões**. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Brasília, 383pp. 1998.

POLLARD, T. D. Actin. **Curr. Opin. Cell Biol.** 2, 33–40. 1990.

PROVENZANO, A. J. JR. Commercial culture of decapod crustaceans. *In*: "**The Biology of Crustacea (10). Economic Aspects: Fisheries and Culture**" (A. J. Provenzano, Jr., Ed.; D. E. Bliss, Series Ed.), pp. 269–314. Academic Press, London. 1985.

QIU, L. *et al.* Molecular cloning and mRNA expression of cathepsin C gene in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.** 150 (3), 320-325. 2008.

RIBEIRO, E. M. Identificação de genes em camarões marinhos. *In*: III Congresso Brasileiro de Oceanografia – CBO'2008 e I Congresso Ibero-Americano de Oceanografia, Fortaleza. 2008.

RICHARDS, S. *et al.* Comparative genome sequencing of *Drosophila pseudoobscura*: Chromosomal, gene, and *cis*-element evolution. **Genome Res.** 15(1):1-18. 2005.

RINNE, T. *et al.* A novel translation re-initiation mechanism for the p63 gene revealed by amino-terminal truncating mutations in Rapp-Hodgkin/Hay-Wells-like syndromes. **Hum. Mol. Genet.** 17, v. 13, 1968-1977. 2008.

RODRIGUES, J. Carcinicultura marinha – Desempenho 2004. **Revista da associação Brasileira dos Criadores de camarão (ABCC)**, 7 (2): 38-44. 2005.

ROTHSCHILD, M. F.; MESSER, L.; DAY, A.; WALES, R.; SHORT, T.; SOUTHWOOD, O.; PLASTOW, G. (2000) Investigation of the retinol-binding protein 4 (*RBP4*) gene as a candidate gene for increased litter size in pigs. **Mammalian Genome.** 11:75–77.

RYCHLIK, W. Selection of primer for polymerase chain reaction. In: **WHITE, B. A. Methods in molecular biology.** Totowa, NJ: Humana Press, p. 31-40. 1993.

RYCHLIK W, SPENCER WJ, RHOADS RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. **Nucleic Acids Res.** 1990 November 11; 18(21): 6409–6412.

SAEZ, A.G., ESCALANTE, R., SASTRE, L. High DNA sequence variability at the alpha 1 Na/K-ATPase locus of *Artemia franciscana* (brine shrimp): polymorphism in a gene for salt-resistance in a salt-resistant organism. **Mol. Biol. Evol.** 17 (2), 235-250. 2000.

SAIKI, R. K. The design and optimisation of the PCR . In: **Erlich, H. A., PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification.** UK: Macmillan Publishers. p. 7–16. 1989.

SAMBROOK J, RUSSELL DW. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.

SANTOS, T. C.; CÂMARA, J. B. **GEO Brasil – Perspectivas do meio ambiente no Brasil.** Brasília: edições IBAMA. 2002.

SANTOS, M. C. F., PEREIRA, J.A.; IVO, C.T.C. Sinopse de informações sobre a biologia e pesca do camarão branco, *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936) (Crustácea, Decapoda, Penaeidae), no nordeste do Brasil. **Boletim Técnico-Científico do CEPENE**, 12:149-185. 2004.

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

SEALIFEBASE. 2009. Disponível em: <<http://www.sealifebase.org>>. Acesso em: 12Fev. 2009.

SEKINO, M., HARA, M., TANIGUCHI, N. Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 213:101-122, 2002.

SELLERS, J. R. **Myosin**. 2nd edn, Protein Profile. Oxford University Press, Oxford. 1999.

SHANE, L. *et al.* Phylogenetic relationships and evolutionary history of the shrimp genus *Penaeus* s.l. derived from mitochondrial DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Vol 31: 39–49, 2004.

SHANTI, K. N. *et al.* Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. **J Immunol**, 151:5354-63. 1993.

SHEN, X. *et al.* The complete mitochondrial genomes of two common shrimps (*Litopenaeus vannamei* and *Fenneropenaeus chinensis*) and their phylogenomic considerations. **Gene**. Volume 403, Issues 1-2, 15 November 2007, Pages 98-109. 2007.

SHRIMP EST GENOME PROJECT, 2007. A genética de *L. vannamei* no Brasil e no mundo. Disponível em: <<http://www.shrimp.ufscar.br/historico/>>. (Acessado em novembro de 2007).

SIMON, C. *et al.* Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 87, p. 651-701, 1994.

SUN, P. S. *et al.* Isolation and characterization of two actins of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Marine Biology**, Volume 151, N. 6, pp. 2145-2151(7). 2007.

SUTTLE, C. A. Marine viruses – major players in the global ecosystem. **Nature Reviews Microbiology**. V. 5, p.801-812. 2007.

THELLIN, O. *et al.* Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology** 75: 291–295. 1999.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, vol. 22, n. 22. 1994.

TOKUNAGA, K., *et al.* Nucleotide sequence of a full length cDNA for mouse cytoskeletal b-actin mRNA. **NucleicAcids Research** 14: 2819. 1986.

TSOI, K.H.; WANG,Z.Y.; CHU,K.H. Genetic divergence between two morphologically similar varieties of the kuruma shrimp *Penaeus japonicus*. **Mar. Biol.** 147, 2, 367-379. 2005.

UNAJAK, S; BOONSAENG, V; JITRAPAKDEE, S. Isolation and characterization of cDNA encoding Argonaute, a component of RNA silencing in shrimp (*Penaeus monodon*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, p. 145 179–187. 2006.

VALENTINI, H. et al. Análise da pesca do camarão-rosa (*Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulensis*) nas regiões sudeste e sul do Brasil. **Atlântica**, Rio Grande 13:143-157. 1991.

VANDEKERCKHOVE, J., WEBER, K. Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 75, 1106– 1110. 1978.

VARADARAJ, K.; KUMARI, S.S.; SKINNER, D.M. Actin-encoding cDNAs and gene expression during the intermolt cycle of the Bermuda land crab *Gecarcinus lateralis*. **Gene**, 171, 177– 184. 1996.

VIANA, C. J. 2006. **Aspectos de genômica comparativa**. Dissertação (Mestrado em Computação e Estatística) - Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Agosto 2006.

WAINBERG, A. A.; CAMARA, M. R. Brazilian shrimp Farming... it's growing, but, is it sustainable? In: **World Aquaculture. Brazilian Journal of Genetics**, 1998. v 20, n. 3, p. 421-423. 1998.

WHITELEY, N.M.; EL HAJ, A.J. Regulation of muscle gene expression over the moult in crustacea. **Comparative Biochemistry and Physiology (B)** 117(3): 323-331. 1997.

YUFENG, L.; SHIAO, Y. W.; JEFFREY, M. L. The use of differential display to isolate viral genomic sequence for rapid development of PCR-based detection methods A test case using Taura syndrome virus. **Journal of Virological Methods**.121:107–114. 2004.

ZHU, X.J. *et al.* Actin gene in prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: characteristics and differential tissue expression during embryonic development. **Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.** 140 (4), 599-605. 2005.

ZHANG,J. *et al.* Cloning, expression and identification of ferritin from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **J. Biotechnol.** 125 (2), 173-184 . 2006.

ZHANG X, L. ZHOU, J. XIANG. **Studies on the chromosome of marine shrimps with special reference to different techniques**. Plant, Animal & Microbe X Conference, San Diego, CA, p. 10. 2002.

## Documentos e Fontes em Meio Eletrônico

BIO450 Primer Design Tutorial. 2006. Disponível em:

<<http://faculty.buffalostate.edu/wadswogj/courses/450/BIO450%20Primer%20Design%20Tutorial%202006.doc>>.

GenBank - Banco de dados biológicos público. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>

Programa PRIMER3. Disponível em:

<[http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)>

Programa PrimerQuest<sup>SM</sup> Disponível em:

<<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest>>

Programa OligoAnalyzer, IDTDNA- Integrated DNA Technologies. Disponível em:

<<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>>

Programa ClustalW Disponível em:

<<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>>

## **ANEXO A – LISTA DE MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NO PRESENTE TRABALHO**

1. Luvas descartáveis
2. Sacos plásticos para o transporte dos animais
3. Caixa isotérmica para o transporte dos animais
4. Lupa
5. Pinça
6. Bisturi
7. Pisseta
8. Microtubos para PCR (0,2ml)
9. Microtubos de 2ml
10. Micro Pipetas (0-20ul)
11. Ponteiros Estéreis P-10, P-100, P-1000
12. Centrífuga Refrigerada
13. Câmara de Fluxo Laminar
14. Espectrofotômetro
15. Refrigerador
16. Balança (0,01g)
17. Freezer - 80°C
18. Autoclave
19. Termociclador
20. Sequenciador Automático Capilar Abi 3100 (Applied)

**ANEXO B - LISTA DE REAGENTES UTILIZADOS NO PRESENTE****TRABALHO**

1. Água (Livre De Rnase e Dnase) Ultrapure™ Distilled Water - Dnase/Rnase-Free (Invitrogen)
2. Trizol (Invitrogen)
3. Tris-Hcl - Ultrapure™ Tris Hydrochloride (Invitrogen)
4. Oligo(Dt)12–18 Primer (Invitrogen)
5. Superscript Ii Reverse Transcriptase (Invitrogen)
6. Clorofórmio
7. Álcool Etílico Pa
8. Isopropanol
9. Dnase
10. 10x Pcr Buffer [200 Mm Tris-Hcl (Ph 8.4), 500 Mm Kcl]
11. Mgcl<sub>2</sub> (Applied)
12. 1x Te Buffer
13. Ultrapure™ 10x Tae Buffer (Invitrogen)
14. Hidróxido de Sódio (Naoh) - 8 Mm
15. Citrato de Sódio (0,1m)
16. Corante Loading Dye
17. Primer COI-F [5'-CCTGCAGGAGGAGGAGAYCC-3'], COI-R [5'-AGTATAAGCGTCTGGGTAGTC-3']
18. Bigdye® Xterminator™ Purification Kit (Applied)
19. Tampão Save Money \$\$

20. Pop-6™ Polymer For 3100/3100-Avant™ Genetic Analyzers  
(Applied)
21. Taq Polymerase (Invitrogen)
22. Agarose
23. Brometo de Etídio/ Ultrapure™ Ethidium Bromide (10 Mg/MI)
24. 1kb bp Dna Ladder (Marcador Invitrogen)
25. DNTP (Invitrogen)
26. Etanol 70%
27. Etanol Absoluto 100%
28. Platinum Taq (1 Unidade/μl)
29. Hi-Di™ Formamide (Applied)
30. Running Buffer, 10x (Applied)

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)