



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL
NÍVEL: MESTRADO

Liany Figuerêdo de Andrade Melo

**CLONAGEM MOLECULAR DE GENES DE *Palythoa caribaeorum*
(DUCHASSAING & MICHELOTTI, 1860) RELACIONADOS À IMUNIDADE INATA**

RECIFE
2011

Liany Figuerêdo de Andrade Melo

**CLONAGEM MOLECULAR DE GENES DE *Palythoa caribaeorum*
(DUCHASSAING & MICHELOTTI, 1860) RELACIONADOS À IMUNIDADE INATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal (PPGBA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: Dr. Gandhi Rádis-Baptista

Coorientador: Dr. Carlos Daniel Pérez

RECIFE

2011

Melo, Liany Figuerêdo de Andrade

Clonagem molecular de genes de *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860) relacionados à imunidade inata / Liany Figuerêdo de Andrade Melo. – Recife: O Autor, 2011.

117 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Gandhi Rádis-Baptista

Co-Orientador: Carlos Daniel Pérez

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia Animal, 2011.

Inclui bibliografia e apêndices.

**1. Celenterado 2. Imunidade natural 3. Clonagem molecular
I. Título.**

593.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-185

Liany Figuerêdo de Andrade Melo

**CLONAGEM MOLECULAR DE GENES DE *Palythoa caribaeorum*
(DUCHASSAING & MICHELOTTI, 1860) RELACIONADOS À IMUNIDADE INATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal (PPGBA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Gandhi Rádís-Baptista
(Orientador)

Instituto de Ciências do Mar
Universidade Federal do Ceará

Dra. Paula Braga Gomes
(Titular)

Departamento de Ecologia
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Jeanne Claine de A. Modesto
(Titular)

Núcleo de Biologia - CAV
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Miriam Camargo Guarnieri
(Titular)

Departamento de Zoologia
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. José Roberto Botelho de Souza
(Suplente)

Departamento de Zoologia
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. José Eduardo Garcia
(Suplente)

Núcleo de Biologia - CAV
Universidade Federal de Pernambuco

Recife, 30 de junho de 2010.

*Nessa minha caminhada,
tive o privilégio de conhecer pessoas
interessantes com as quais muito tenho
aprendido. Algumas delas me marcaram
de um modo especial por sua inspiração,
por sua disposição em ajudar e transmitir
seus conhecimentos, pelo amor que
demonstram nas coisas que fazem,
pela garra e ousadia em tentar, por me
desafiarem a seguir meus sonhos,
por fazerem a diferença...*

*Dedico este trabalho aos meus
orientadores, Dr. Carlos Daniel Pérez e Dr.
Gandhi Rádis-Baptista, por sempre
acreditarem e por me ensinarem que
sonhar e realizar é possível.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu constante refúgio e fortaleza, por ter me conduzido e me concedido bênçãos muito além do que eu esperava.

À minha família, que mesmo distante tem me dado seu apoio e amor incondicionais, ouvindo com paciência meus sonhos, minhas conquistas e minhas lamentações. Amo vocês!

Aos meus orientadores, pela confiança e companheirismo na execução desse trabalho.

Ao Dr. Gandhi Rádis-Baptista, por ter aceitado esse desafio, abrindo completamente as portas para nós, e por ter me apresentado ao maravilhoso mundo da Biologia Molecular! Muito obrigada por sua paciência, por todas as lições de vida e por ter me dado a chance de aprender um pouco mais.

Ao Dr. Carlos Daniel Pérez, pela amizade, pelo conhecimento compartilhado, pelo apoio sempre constante desde a graduação e por não ter desistido de mim, mesmo nos momentos em que pensei em abandonar tudo. Saiba que se eu cheguei até aqui, em grande parte foi graças a você. Muito obrigada!

Aos professores Dra. Luciana Magalhães Melo e Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas e aos demais integrantes do Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução - LFCR/UECE por terem nos acolhido na fase inicial dos experimentos.

Ao Dr. José Luiz de Lima Filho, por ter me dado permissão para desenvolver uma etapa dos experimentos nas dependências do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da UFPE.

A Nathalia Alencar, Klécia Melo e Juliana Mendes por toda ajuda e orientação durante o período de experimentos realizados no LIKA. Sem vocês teria sido muito difícil... Muito obrigada!

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal (PPGBA) da UFPE na pessoa dos coordenadores Dr. Diego Astúa de Moraes e Dr. Paulo Jorge Parreira dos Santos por toda a compreensão e ajuda no processo de conclusão do mestrado.

À secretária do PPGBA Ana Elisabete Fraga por ter facilitado tanto nossa vida! Muito obrigada!

Aos professores do PPGBA, porque foram além da “simples” transmissão de

conhecimentos e nos ajudaram a crescer, nos ensinaram a pensar e a desenvolver nosso lado crítico. Muito obrigada!

Aos membros da banca examinadora, pelo tempo e atenção dedicados à leitura desse trabalho, bem como pelos comentários, sugestões e grandes contribuições para melhoria da versão final do texto aqui proposto. Muito obrigada!

A Bruna Cirino, Laura Bento e Taysa Vasconcelos por toda a ajuda no tocante às coletas. Valeu, meninas!

Ao jangadeiro Junior e à Secretaria de Tecnologia e Meio Ambiente do Município de Ipojuca, na pessoa do secretário Erivelton Lacerda de Araújo e da bióloga Lenilda Abreu por todo apoio nas coletas em Porto de Galinhas.

Aos meus colegas de mestrado, pela companhia nas diversões e também nas horas sofridas. Aprendi muito com cada um de vocês. Muito obrigada pelo companheirismo, pelo aprendizado e pelo carinho.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos durante o período do mestrado.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

*“Será então necessário continuar por esta
estrada para manter viva a esperança que do
mar, de onde nasceu a vida, chegue a cura para
as piores doenças modernas.”*

Anna Sustersic

RESUMO

Na ausência de um sistema imune adaptativo propriamente dito, os cnidários se valem de uma série de mecanismos bioquímicos e celulares que coletivamente compreendem sistemas da imunidade inata e são utilizados para o reconhecimento de micro-organismos, tanto parasitas quanto simbioses. O objetivo do presente trabalho foi investigar se precursores gênicos relacionados a três polipeptídeos envolvidos na resposta inata (CTL: lectina do tipo C, MBL: lectina ligante de manose e C3: componente 3 do sistema complemento) seriam expressos em *Palythoa caribaeorum*. Tendo como base dados moleculares descritos na literatura para os cnidários *Nematostella vectensis*, *Pocillopora damicornis*, *Acropora millepora* e *Swiftia exserta*, foram utilizadas duas estratégias metodológicas distintas para responder tal proposição: (1) síntese direta de cDNA a partir do RNAm e amplificação dos homólogos por RT-PCR e (2) construção de uma biblioteca de cDNA para propagação e resgate dos precursores completos (*full length cDNAs*). Ao todo, foram obtidos 11 produtos de RT-PCR (cDNAs amplificados), dos quais um se refere a um segmento similar a um domínio do receptor de imunoglobulinas das células NK (KIR), encontrado em gorilas. A presença de um domínio semelhante a KIR em *P. caribaeorum* sugeriria a existência de formas alternativas de imunidade antecipatória em cnidários. Tão importante quanto esse achado foi a obtenção de amplicons de CTL. Dessa forma, os níveis de expressão de transcritos de CTL foram comparados entre colônias saudáveis e doentes (em processo de branqueamento) de *P. caribaeorum*. Os resultados para o ensaio de expressão diferencial mostraram que a CTL teve uma expressão aumentada entre 63,2 e 65,5% nas colônias branqueadas, o que sugere um possível papel na resposta ao branqueamento, uma vez que essas moléculas participam do processo de reconhecimento celular. Esse resultado pode ser interpretado de duas formas: o aumento na transcrição de CTL após o branqueamento seria uma tentativa de proteção imediata contra patógenos ou estaria envolvido no recrutamento de novos simbioses. Como um todo, o estudo de moléculas polipeptídicas da imunidade de cnidários é de importância considerável. Não somente fornece dados sobre a ancestralidade e evolução das reações imunes, mas também serve de base para uma série de aplicações de caráter científico e biotecnológico, que vão desde o monitoramento e conservação de espécies marinhas até estudos voltados ao tratamento e cura de doenças que acometem vertebrados superiores.

Palavras-chave: *Palythoa caribaeorum*. Cnidaria. Imunidade inata. Branqueamento. Lectina do tipo C (CTL). Lectina ligante de manose (MBL). Complemento C3. Domínio KIR-símile.

ABSTRACT

In the absence of an adaptive immune system, cnidarians rely on a number of biochemical and cellular mechanisms that collectively comprise the systems of innate immunity, which are employed for recognition of both pathogenic and symbiotic microorganisms. The aim of this work was to investigate whether three gene precursors encoding polypeptides involved in innate immune response (i.e., CTL: C-type lectin, MBL: mannose-binding lectin and C3: complement component 3) are expressed in *Palythoa caribaeorum*. Based on molecular data described in the literature for the cnidarians *Nematostella vectensis*, *Pocillopora damicornis*, *Acropora millepora* and *Swiftia exserta*, two different methodological strategies were used to answer this proposition: (1) direct cDNA synthesis from mRNA and amplification of the homologues by RT-PCR and (2) construction of a cDNA library for propagation and rescue of complete precursors (full length cDNAs). As a result, 11 RT-PCR products (amplified cDNAs) were obtained, of which one refers to a segment similar to a domain of the killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) found in gorillas. The presence of a KIR-like domain in *P. caribaeorum* might suggest the existence of alternative forms of anticipatory immunity in cnidarians. As important as this finding was the obtention of CTL amplicons. Thus, the expression levels of CTL transcripts were compared between healthy and diseased colonies (undergoing bleaching) of *P. caribaeorum*. The results of the differential expression assay has showed that CTL expression was increased between 63.2 and 65.5% in bleached colonies, what suggests a possible role of CTL in the bleaching response, given that these molecules are involved in the cellular recognition process. This result may be interpreted in two different ways: the increase of CTL transcription would either be an attempt to an immediate protection against pathogens or would be involved in new symbionts recruitment. As a whole, the study of polypeptide molecules of the immunity of cnidarians is of considerable importance. It not only provides data about the ancestry and evolution of immune reactions, but also serves as the basis for many scientific and biotechnological applications, ranging from monitoring and conservation of marine species to studies related to treatment and cure of diseases in higher vertebrates.

Keywords: *Palythoa caribaeorum*. Cnidaria. Innate immunity. Bleaching. C-type lectin (CTL). Mannose-binding lectin (MBL). Complement C3. KIR-like domain.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Vias de ativação do sistema complemento. Uma vez ativado, o sistema complemento gera produtos de clivagem que vão participar nos processos de inflamação e destruição dos micróbios. (Adaptado de ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).....30
- Figura 2: Filogenia dos grupos de metazoários basais. (Modificado de TELFORD, 2009)34
- Figura 3: Esquema da anatomia geral de formas corpóreas solitárias dos cnidários. A - Pólipo; B - Medusa. Os diagramas na parte superior indicam sua simetria radial, que é adaptada a receber estímulos (setas) de todas as direções. (Adaptado de RUPPERT; FOX; BARNES, 2005, p. 132)35
- Figura 4: Corte transversal de pólipos na altura da faringe. A - Hexacorallia; B - Octocorallia. Os termos “completo” e “incompleto” são utilizados para determinar se um septo toca ou não a faringe. (Modificado de RUPPERT; FOX; BARNES, 2005, p. 146 e 148).....35
- Figura 5: Colônias sadias (a,c,e) e branqueadas (b,d,f) de *Palythoa caribaeorum*. A,B - Visão geral das colônias sobre os recifes de arenito da costa pernambucana; C,D - Detalhe das colônias expostas, exibindo os pólipos retraídos; nessa condição, há produção de muco (reduzida em colônias branqueadas); E,F - Detalhe das colônias submersas, exibindo os pólipos abertos. (Fotos: Liany Melo)37
- Figura 6: Representação esquemática dos métodos empregados. A 1ª Etapa corresponde à busca por genes da imunidade inata de *Palythoa caribaeorum*, na qual foram utilizadas duas estratégias distintas (A,B). A 2ª Etapa consistiu em um ensaio de expressão diferencial para o gene CTL.44
- Figura 7: Coleta de material biológico realizada durante a maré baixa. A - Área de estudo, localizada na praia de Porto de Galinhas; B,C - Respectivamente,

local de retirada das amostras de tecido sadio e branqueado de <i>Palythoa caribaeorum</i> . (Fotos: Liany Melo)	45
Figura 8: Diagrama esquemático para o procedimento de purificação do RNA mensageiro. PMP: Partículas Paramagnéticas; B: Biotina. (Fonte: Promega, com modificações)	48
Figura 9: Esquema de síntese de cDNA através do sistema SMART™. RT: Transcriptase Reversa; dC: deoxicitidina. (Fonte: Clontech, com modificações).....	54
Figura 10: Mapa do vetor pDNR-LIB usado para construção da biblioteca de cDNA SMART™. São indicados os sítios múltiplos de clonagem (MCS) e de restrição, bem como os genes contidos. A área em azul representa um fragmento a ser substituído pelo inserto de cDNA. (Fonte: Clontech, com modificações).....	59
Figura 11: Relação entre o tamanho do fragmento a ser sequenciado e a quantidade de produto de PCR necessária para a reação. (Adaptado de: http://genoma.ib.usp.br/servicos/pop_pcr-opA.htm)	70
Figura 12: Gel de eletroforese em condição desnaturante para os RNAs obtidos de <i>Palythoa caribaeorum</i> . A - RNA total: as setas indicam as bandas correspondentes às subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal; B - RNA mensageiro purificado a partir do RNA total: em destaque, o arraste característico correspondente aos inúmeros transcritos de RNAm de diferentes tamanhos.	74
Figura 13: Síntese da primeira fita de cDNA por RT-PCR usando-se os <i>primers</i> Oligo(dT) ₁₅ (Q _T) e hexâmeros randômicos (R) a partir do RNA mensageiro (Estratégia 1). Os rastros correspondem aos vários cDNAs de diferentes tamanhos.....	76
Figura 14: Amplicons de C3 e CTL de <i>Palythoa caribaeorum</i> obtidos na estratégia 1. Da esquerda para a direita: CTL-1, CTL-2, C3-1 e marcador 100 bp DNA ladder (Promega).....	76
Figura 15: Síntese da primeira fita de cDNA por LD-PCR usando-se os <i>primers</i>	

SMART IV e CDS III/3' PCR Primer (Estratégia 2). O rastro corresponde aos vários cDNAs de diferentes tamanhos.	77
Figura 16: Fracionamento do cDNA por cromatografia em coluna. As quatro frações em destaque foram agrupadas.	77
Figura 17: Distribuição de tamanhos de insertos clonados no vetor pDNR-LIB contidos na biblioteca parcial de cDNA de <i>Palythoa caribaeorum</i> . Marcador 1 kb (Promega).	78
Figura 18: Amplicons de C3, CTL e MBL de <i>Palythoa caribaeorum</i> obtidos na estratégia 2. Da esquerda para a direita: C3-2, C3-3, MBL-1, MBL-2, CTL-3 e marcador 100 bp DNA ladder (Promega).	79
Figura 19: Sequência parcial de um domínio relacionado ao receptor semelhante à imunoglobulina de células <i>Natural Killer</i> (KIR) obtido de <i>Palythoa caribaeorum</i> . As letras em vermelho indicam bases degeneradas – K: G,T; R: A,G; Y: C,T; S: G,C; W: A,T; M: A,C e marcadas em azul estão as bases correspondentes ao <i>primer</i> senso (KIR-SE) utilizado para amplificação desse fragmento. Abaixo de cada códon estão indicados os aminoácidos correspondentes obtidos por tradução <i>in silico</i>	80
Figura 20: Alinhamento múltiplo (CLUSTAL W) entre a sequência de aminoácidos obtida de <i>Palythoa caribaeorum</i> (VIRT861) e duas outras que codificam um receptor semelhante à imunoglobulina de células <i>Natural Killer</i> (KIR) em gorila.	81
Figura 21: Primeira amplificação do domínio KIR obtido a partir da biblioteca parcial de cDNA de <i>Palythoa caribaeorum</i>	82
Figura 22: Ensaio de expressão diferencial de CTL entre colônias sadias e branqueadas de <i>Palythoa caribaeorum</i> realizado por PCR acoplado à transcrição reversa (RT-PCR). S1 - Colônia sadia (<i>primers</i> CTL-SE / Q0 [QT-IDT]); B1 - Colônia branqueada (<i>primers</i> CTL-SE / Q0 [QT-IDT]); S2 - Colônia sadia (<i>primers</i> CTL-SE / Q0 [QT-IVG]); B2 - Colônia branqueada (<i>primers</i> CTL-SE / Q0 [QT-IVG]).	84
Figura 23: Curvas densitométricas resultantes da análise quantitativa das bandas	

referentes ao gel do ensaio de expressão diferencial da CTL, realizada através do programa *ImageJ*. São apresentados os valores correspondentes à área de cada gráfico (dada em *pixels*). S1 - Colônia sadia (*primers* CTL-SE / Q0 [QT-IDT]); B1 - Colônia branqueada (*primers* CTL-SE / Q0 [QT-IDT]); S2 - Colônia sadia (*primers* CTL-SE / Q0 [QT-IVG]); B2 - Colônia branqueada (*primers* CTL-SE / Q0 [QT-IVG])......84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação entre as principais características da imunidade inata e imunidade adquirida.	25
Tabela 2: Principais componentes do sistema imune inato e suas funções.	27
Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos cDNAs fita simples (Estratégia 1). As letras em negrito indicam as bases degeneradas. SE – <i>Primer Senso</i> ; AS – <i>Primer Antissenso</i>	52
Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados na síntese da primeira fita de cDNA (Estratégia 2).	55
Tabela 5: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do cDNA por LD-PCR.	56
Tabela 6: Ligações usando três diferentes razões entre cDNA e o vetor pDNR-LIB.	58
Tabela 7: <i>Primers</i> universais M13 para o vetor pDNR-LIB utilizados para determinação da porcentagem de clones recombinantes após transformação de células de <i>Escherichia coli</i> NovaBlue por eletroporação. SE = <i>senso</i> ; AS = <i>antissenso</i>	62
Tabela 8: <i>Primers</i> utilizados no ensaio de expressão diferencial do gene CTL para amostras de tecidos sadios e branqueados de <i>Palythoa caribaeorum</i> . As letras em negrito indicam as bases degeneradas e as regiões sublinhadas correspondem à sequência do <i>primer</i> Q0, interno a QT.	72
Tabela 9: Quantificação dos RNAs total e mensageiro por espectrofotometria de luz ultravioleta.	75
Tabela 10: Amplicons encaminhados ao sequenciamento de nucleotídeos, seguidos de seus tamanhos aproximados em pares de base (pb). As diferentes cores agrupam os clones pelo tipo de gene.	80
Tabela 11: Quantificação por densitometria das bandas referentes ao gel do ensaio de expressão diferencial da CTL, realizada através do programa <i>ImageJ</i>	

São apresentados os valores correspondentes à área de cada banda (em *pixels*), bem como o resultado da diferença entre os valores (dada em porcentagem) para cada sistema. S1 - Colônia sadia (*primers* CTL-SE / Q0 [QT-IDT]); B1 - Colônia branqueada (*primers* CTL-SE / Q0 [QT-IDT]); S2 - Colônia sadia (*primers* CTL-SE / Q0 [QT-IVG]); B2 - Colônia branqueada (*primers* CTL-SE / Q0 [QT-IVG]).....85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	– Micrograma (10^{-6} gramas)
µL	– Microlitro (10^{-6} litros)
µM	– Micromolar (10^{-6} molar)
A_{260nm}	– Absorbância a 260 nm
A_{280nm}	– Absorbância a 280 nm
ABNT	– Associação Brasileira de Normas Técnicas
AMP	– Ampicilina
ATP	– Adenosina trifosfato
bp	– <i>Base pairs</i> (pares de base – pb)
BSA	– <i>Bovine Serum Albumin</i> (albumina de soro bovino)
C3, C4, C5	– Componentes 3, 4 e 5 do sistema complemento
cDNA	– DNA complementar (à fita de RNAm)
Células NK	– Células <i>Natural Killer</i> (células assassinas naturais)
cfu	– Unidade formadora de colônia
cm	– Centímetro
Cm^r	– Cloranfenicol
CTL	– <i>C-Type Lectin</i> (lectina do tipo C = Cálcio-dependente)
dC	– Deoxicitidina
DEPC	– Dietilpirocarbonato
DNA	– Ácido desoxiribonucleico
dNTP	– Desoxinucleotídeos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
DO_{600nm}	– Densidade óptica a 600 nm
dT	– Deoxitimidina
DTT	– Ditionitreitol
EDTA	– Ácido etilenodiaminotetracético
EST	– <i>Expressed Sequence Tags</i> (etiquetas de sequências expressas)
g	– Grama
GenBank	– <i>Genetic Sequence Data Bank</i> (banco de dados genético)
GTE	– Tampão Glicose tris-HCl EDTA
HCl	– Ácido clorídrico
IBGE	– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDT	– <i>Integrated DNA Technologies</i> (EUA)

IFN-γ	– Interferon gama
Ig	– Imunoglobulina
IVG	– <i>Invitrogen Life Technologies</i> (EUA)
kb	– Quilobase (10^3 pares de base)
KDa	– Quilodalton (10^3 dalton – unidade de massa atômica)
KIR	– <i>Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor</i> (receptor semelhante à imunoglobulina de células NK)
kV	– Quilovolt
LB	– Meio Luria-Bertani
LB-Amp	– Meio LB acrescido de Ampicilina
LB-Cm	– Meio LB acrescido de Cloranfenicol
LD-PCR	– <i>Long Distance PCR</i> (PCR de longa distância)
m	– Metro
M	– Molar (massa molar)
MBL	– <i>Mannose-Binding Lectin</i> (lectina ligante de manose)
MCS	– <i>Multiple Cloning Sites</i> (sítios múltiplos de clonagem)
mg	– Miligrama
MgCl₂	– Cloreto de magnésio
MHC	– <i>Major Histocompatibility Complex</i> (complexo principal de histocompatibilidade)
mL	– Mililitro
mm	– Milímetro
mM	– Milimolar
mV	– Milivolts
N	– Normal (normalidade)
NaOH	– Hidróxido de sódio
NCBI	– <i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional para Informações Biotecnológicas)
ng	– Nanograma (10^{-9} gramas)
nm	– Nanômetro (10^{-9} metros)
°C	– Grau Celsius
PAMPs	– <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> (padrões moleculares associados aos patógenos)
PBS	– <i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampão fosfato-salino)
PCR	– <i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia de polimerase)
pH	– Potencial hidrogeniônico

PMPs	– <i>Paramagnetic Particles</i> (partículas paramagnéticas)
Primer_AS	– Sequência iniciadora antissenso
Primer_SE	– Sequência iniciadora senso
PRRs	– <i>Pattern Recognition Receptors</i> (receptores de reconhecimento padrão)
RNA	– Ácido ribonucleico
RNA_m	– RNA mensageiro
RNase	– Ribonuclease (enzima que degrada RNA)
rpm	– Rotações por minuto
RT	– <i>Reverse Transcriptase</i> (transcriptase reversa)
RT-PCR	– <i>Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction</i> (amplificação por PCR de um produto de transcrição reversa)
SA-PMPs	– <i>Streptavidin – Paramagnetic Particles</i> (estreptavidina associada a partículas paramagnéticas)
SDS	– Dodecil sulfato de sódio
SIB	– <i>Swiss Institute of Bioinformatics</i> (Instituto Suíço de Bioinformática)
SSC	– <i>Sodium Chloride / Sodium Citrate</i> (tampão contendo citrato de sódio e cloreto de sódio)
TAE	– Tampão Tris-Acetato-EDTA
TE	– Tampão Tris-HCl EDTA
TEP	– <i>Thioester-containing Protein</i> (proteína tioéster)
TLRs	– <i>Toll-like Receptors</i> (receptores semelhantes a Toll)
Tris	– Tris(hidroximetil)aminometano
U	– Unidade enzimática
UV	– Radiação ultravioleta
V	– Volts
x g	– Velocidade de sedimentação em unidade gravitacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 JUSTIFICATIVA.....	22
1.2 OBJETIVOS	23
1.2.1 Objetivo geral	23
1.2.2 Objetivos específicos.....	23
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
2.1 SISTEMA IMUNOLÓGICO	24
2.2 SISTEMA IMUNE INATO.....	25
2.2.1 Componentes e respostas da imunidade inata contra micróbios	27
2.2.1.1 Barreiras epiteliais	28
2.2.1.2 Fagócitos.....	28
2.2.1.3 Células “Natural Killer” (NK)	29
2.2.1.4 Sistema Complemento	29
2.2.1.5 Algumas moléculas com função antimicrobiana.....	30
2.2.1.6 Organismos simbiontes como uma barreira biológica.....	31
2.3 IMUNIDADE INATA EM INVERTEBRADOS.....	32
2.4 FILO CNIDARIA	33
2.4.1 <i>Palythoa caribaeorum</i> (Anthozoa, Hexacorallia, Zoanthidea)	36
2.4.2 Imunidade inata em cnidários	38
2.4.3 Alguns genes envolvidos na resposta imune de cnidários.....	40
2.4.3.1 Lectinas do tipo C (CTLs).....	41
2.4.3.2 Lectinas ligantes de manose (MBL)	41
2.4.3.3 Componente 3 (C3) do sistema complemento	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS DE TECIDO	45
3.2 OBTENÇÃO DO RNA	45
3.2.1 Extração do RNA total.....	46
3.2.1.1 Maceração do tecido, homogeneização e separação de fases.....	46
3.2.1.2 Precipitação, lavagem e ressuspensão do RNA total.....	46
3.2.1.3 Análise e quantificação do RNA total.....	47
3.2.2 Purificação do RNA mensageiro	47

3.2.2.1 Pareamento da sonda	48
3.2.2.2 Lavagem das partículas paramagnéticas acopladas à estreptavidina.....	49
3.2.2.3 Captura e lavagem dos híbridos oligo(dT)-RNAm.....	49
3.2.2.4 Eluição do RNA mensageiro.....	50
3.2.2.5 Análise e quantificação do RNA mensageiro.....	50
3.3 ESTRATÉGIA 1: SÍNTESE E AMPLIFICAÇÃO DE cDNA POR RT-PCR	50
3.3.1 Combinação de RNAm-Primer e desnaturação	50
3.3.2 Transcrição reversa (RT-PCR).....	51
3.3.3 Amplificação por PCR.....	51
3.3.3.1 Oligonucleotídeos ("primers") utilizados	52
3.3.4 Análise do cDNA.....	53
3.4 ESTRATÉGIA 2: CONSTRUÇÃO E SCREENING DA BIBLIOTECA DE cDNA ..	53
3.4.1 Síntese de cDNA.....	54
3.4.1.1 Síntese da primeira fita de cDNA	54
3.4.1.2 Amplificação do cDNA por LD-PCR.....	55
3.4.1.3 Digestão com proteinase K	56
3.4.1.4 Digestão com Sfi I	57
3.4.1.5 Fracionamento de cDNA por tamanho	57
3.4.2 Ligação do cDNA dupla-fita ao vetor plasmidial pDNR-LIB.....	58
3.4.3 Transformação de células de <i>Escherichia coli</i> NovaBlue.....	60
3.4.3.1 Preparação de células eletrocompetentes	60
3.4.3.2 Transformação por eletroporação.....	61
3.4.3.3 Porcentagem de clones e tamanho médio dos insertos de cDNA.....	62
3.4.4 Titulação da biblioteca de plasmídeos	63
3.4.5 Amplificação das bibliotecas de plasmídeos.....	63
3.4.6 Screening da biblioteca (PCR Colony)	64
3.4.7 Extração dos plasmídeos	65
3.4.8 Amplificação dos plasmídeos purificados	66
3.5 SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO DE NUCLEOTÍDEOS.....	66
3.5.1 Purificação das amostras de cDNA	66
3.5.1.1 Amplificação por PCR e recorte das bandas do gel	67
3.5.1.2 Purificação do cDNA por centrifugação	68
3.5.2 Quantificação dos cDNAs.....	68
3.5.3 Reação de sequenciamento e injeção das amostras	69

3.5.4 Análise das sequências de nucleotídeos	71
3.6 ENSAIO DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL PARA CTL	71
3.7 NORMATIZAÇÃO DO TEXTO	73
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1 QUALIDADE E QUANTIFICAÇÃO DO RNA	74
4.2 ESTRATÉGIA 1: SÍNTESE E AMPLIFICAÇÃO DE cDNA POR RT-PCR	75
4.3 ESTRATÉGIA 2: CONSTRUÇÃO E <i>SCREENING</i> DA BIBLIOTECA DE cDNA	76
4.4 SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS	79
4.5 ENSAIO DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL PARA CTL	83
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
REFERÊNCIAS	90
APÊNDICES	104
ANEXOS	107

1 INTRODUÇÃO

Todos os seres vivos estão constantemente interagindo com o meio ambiente, seja captando e utilizando recursos naturais, seja relacionando-se com outros organismos, muitas vezes em estreitas associações ecológicas mediadas por diferentes compostos químicos.

Por suas características, alguns ambientes em particular, tais como o ambiente marinho, favorecem as interações entre esses organismos. Segundo Reinheimer (1992 citado por ENGEL; JENSEN; FENICAL, 2002), este ambiente contém cerca de 10^7 partículas virais, 10^6 células bacterianas, 10^3 células fúngicas e 10^3 microalgas por mililitro de água do mar. Isso implica dizer que os animais marinhos estão continuamente expostos a uma ampla variedade de micro-organismos potencialmente prejudiciais, os quais ameaçam sua integridade e sobrevivência.

A necessidade dos organismos em se proteger contra esses possíveis agentes infectantes levou ao desenvolvimento de várias estratégias de defesa, que foram refinadas ao longo do processo evolutivo. Dentre estas se encontram os mecanismos da defesa inata, particularmente importante em invertebrados (IWANAGA; LEE, 2005).

O sistema imune inato corresponde à primeira linha de defesa contra infecções, agindo inicialmente nas camadas epiteliais (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007). A grande vantagem desse sistema é que ele responde de maneira rápida e eficiente, reconhecendo os agentes patogênicos microbianos sem que haja a necessidade de uma exposição prévia aos mesmos. Sua relevante função tem conduzido várias pesquisas direcionadas à compreensão da origem e do funcionamento do sistema imune (LITMAN; CANNON; DISHAW, 2005), sobretudo em humanos.

Além disso, moléculas bioativas também têm sido alvos dessa linha de pesquisa pela possibilidade de serem empregadas na biotecnologia para cura de doenças (OTERO-GONZÁLEZ et al., 2010), a exemplo das lectinas, que agem no reconhecimento de patógenos, e das proteínas do sistema complemento, que desencadeiam uma série de reações para eliminação dos micróbios.

Uma das várias abordagens para o estudo dessas moléculas se baseia na

investigação do conjunto de genes expressos pelos organismos (transcriptoma), o qual varia de acordo com condições ambientais e necessidades do próprio organismo. Parte-se do princípio que um gene, ao ser expresso, é transcrito em uma molécula de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm), que é então traduzida durante a síntese de proteínas.

Por ferramentas de Biologia Molecular, o RNAm é utilizado como molde na síntese de um ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA). O cDNA pode ser então empregado em uma série de estudos, que vão desde a construção de bibliotecas de cDNA (que garantem um acesso a longo prazo a esse conjunto de genes expressos) até o sequenciamento, os estudos de função e a expressão gênica, dentre outros. A vantagem de métodos envolvendo cDNAs é permitir, de forma indireta, um acesso a um determinado conjunto genes expressos cujas sequências são inicialmente desconhecidas.

É nesse contexto que o presente trabalho se insere: busca de moléculas relacionadas à imunidade inata em cnidários, particularmente em *Palythoa caribaeorum*, através do estudo de seus transcritos ou cDNAs.

1.1 JUSTIFICATIVA

Apesar de intensa investigação, o conhecimento sobre moléculas da imunidade inata em invertebrados marinhos ainda é incipiente. Esses dados são muito mais escassos em cnidários como *P. caribaeorum*.

Visto que os cnidários estão entre os organismos mais basais, a clonagem dessas moléculas contribui para o conhecimento dos mecanismos imunológicos elementares que evoluíram e se sofisticaram nos animais. Além disso, o estudo dessas moléculas fornece dados sobre interações ancestrais entre hospedeiros e patógenos, colaborando com pesquisas envolvendo as desordens no sistema imunológico humano e o desenvolvimento de tratamentos adequados.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Isolar e caracterizar clones de cDNA referentes a genes da imunidade inata do cnidário marinho *Palythoa caribaeorum*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar o cDNA e construir uma biblioteca de cDNA a partir do tecido de *P. caribaeorum*;
- Clonar precursores gênicos relacionados a três polipeptídios envolvidos na imunidade inata: componente 3 do sistema complemento (C3), lectina do tipo C (CTL) e lectina ligante de manose (MBL), a partir de seus transcritos (RNAm);
- Realizar uma busca dirigida na biblioteca de cDNA dos clones que correspondem aos genes transcritos da imunidade inata (C3, CTL e MBL), a partir de técnicas de PCR de homologia;
- Sequenciar os genes obtidos;
- Verificar a expressão diferencial do(s) gene(s) relacionado(s) à imunidade inata entre colônias sadias e branqueadas de *P. caribaeorum*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 SISTEMA IMUNOLÓGICO

Imunidade (do latim *immunitas*, livre de) se refere à habilidade dos organismos em resistir à infecção por agentes patogênicos microbianos (HOEBE; JANSSEN; BEUTLER, 2004). No entanto, ela também confere proteção contra macromoléculas estranhas ao corpo (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007; MAYER, 2006).

A principal função do sistema imune é a discriminação entre “próprio” e “não próprio” (BOEHM, 2006; KHALTURIN; BOSCH, 2007; MEDZHITOV; JANEWAY Jr, 2002). Em outras palavras, os constituintes próprios do organismo são ignorados ou tolerados pelo sistema imune, enquanto os demais constituintes (agentes patogênicos, substâncias estranhas e elementos próprios alterados, como células tumorais) são processados e destruídos pelas células imunes e seus produtos (TAUBER, 2009).

O sistema imunológico encontra-se subdividido em duas partes principais: sistema imune inato e sistema imune adaptativo (Tabela 1).

O sistema imune inato ou natural é a primeira e mais antiga linha de defesa contra micróbios, estando presente em todos os seres multicelulares. As camadas epiteliais correspondem ao local de primeiro contato com os agentes patogênicos, possuindo a função primária de impedir a entrada desses micro-organismos no corpo. Se essa barreira é ultrapassada, a imunidade inata atua de modo a eliminar a infecção (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

Entretanto, muitos patógenos desenvolveram estratégias de virulência que conseguem burlar essas respostas imunes. Incapazes de eliminar o invasor, as defesas inatas podem manter a infecção controlada até que as respostas adaptativas sejam formadas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

O sistema imune adaptativo ou adquirido, que corresponde à segunda linha de defesa contra os agentes patogênicos, apareceu tardiamente com o surgimento dos primeiros vertebrados mandibulados (PANCER; COOPER, 2006), passando a agir em sobreposição à imunidade inata para melhorar as estratégias de defesa

desses organismos. Seu nome provém do fato que esses mecanismos imunes são adquiridos após o contato prévio com um agente invasor e se desenvolvem como uma resposta à infecção, adaptando-se à mesma (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

Apesar de apresentarem funções e papéis diferentes, os mecanismos moleculares da defesa inata e da adaptativa estão interligados e funcionam cooperativamente (MEDZHITOV; JANEWAY Jr, 2000; PINTO et al., 2007).

Tabela 1: Comparação entre as principais características da imunidade inata e imunidade adquirida.

CARACTERÍSTICAS	IMUNIDADE INATA	IMUNIDADE ADQUIRIDA
Tipo de resposta	Independente de antígeno	Antígeno-dependente
Tempo de resposta	Resposta máxima imediata	Período de latência entre exposição e resposta máxima
Especificidade	Por estruturas compartilhadas por grupos de micróbios	Por antígenos microbianos e não microbianos
Receptores	Codificados na linhagem germinativa	Codificados na linhagem somática
Memória imunológica	Não*	Sim
Elementos	Barreiras epiteliais, fagócitos, substâncias antimicrobianas, sistema complemento (via alternativa e das lectinas), células NK, citocinas	Linfócitos (B e T), anticorpos, células efectoras, sistema complemento (via clássica)
Mecanismos	Fagocitose, opsonização, destruição de micróbios por substâncias antimicrobianas, citotoxicidade (células NK)	Produção de anticorpos, ativação de macrófagos (células T), citotoxicidade (células T)

Fonte: Abbas; Lichtman, Pillai (2007) e Mayer (2006).

* Estudos recentes indicam que uma memória específica também pode existir no sistema imune inato (ver comentários na seção 2.3 IMUNIDADE INATA EM INVERTEBRADOS).

2.2 SISTEMA IMUNE INATO

O sistema imune inato funciona no sentido de prevenir, eliminar ou controlar a infecção por agentes patogênicos, os quais são detectados através do reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs).

Os PAMPs constituem estruturas altamente conservadas e exclusivas de micro-organismos, sendo geralmente essenciais para o seu funcionamento e sobrevivência e, portanto, não podem ser eliminadas ou alteradas por mutação (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Dessa forma, ao selecionar essas moléculas, o sistema imune limita a capacidade dos patógenos em burlar as defesas inatas.

Esses padrões correspondem a uma série de moléculas de grupos diversos, tais como: ácidos nucleicos microbianos (ex.: RNA dupla fita, muito importante para replicação de alguns vírus), componentes estruturais da parede celular bacteriana (ex.: lipopolissacarídeo para Gram negativas, e ácido teicoico para Gram positivas), proteínas (ex.: N-formilmetionina em bactérias) e oligossacarídeos ricos em manose (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

Os PAMPs são especificamente reconhecidos pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), os quais são codificados na linhagem germinativa (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). As células germinativas não se dividem, não formam clones e não produzem células de memória. Isso faz com que esse sistema disponha de um repertório limitado de especificidades (reconhecendo 10^3 padrões moleculares microbianos) quando comparado ao sistema adaptativo (que reconhece 10^7 ou mais antígenos distintos) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

Por esse motivo, os PRRs permitem que os componentes da imunidade inata distingam apenas entre classes de micróbios (ex.: vírus, bactérias Gram positivas e Gram negativas, fungos), pois diferentes classes expressam diferentes padrões. Em contrapartida, o sistema adaptativo é capaz de distinguir tanto antígenos de diferentes micróbios pertencentes a uma mesma classe quanto diferentes antígenos para um mesmo micróbio (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006).

Vários PRRs da imunidade inata reconhecem também células estressadas ou lesadas do hospedeiro. Tanto as células infectadas quanto aquelas que estão próximas a estas geralmente apresentam uma expressão aumentada de moléculas não abundantes em células saudáveis, a exemplo de proteínas de choque térmico e fosfolipídeos de membrana alterados (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007). Sendo assim, o sistema inato pode eliminar células infectadas por micróbios mesmo que os produtos microbianos não sejam expostos na superfície celular.

A família mais importante de PRRs são os receptores semelhantes a Toll (TLRs), que constituem proteínas transmembrana do tipo I as quais figuram entre os

componentes mais antigos e conservados do sistema imune. Esses receptores estão envolvidos tanto na produção de citocinas quanto na ativação celular em resposta à presença de micróbios (NETEA et al., 2004; TAKEDA; AKIRA, 2005).

2.2.1 Componentes e respostas da imunidade inata contra micróbios

O sistema imune inato é formado por um conjunto de componentes e mecanismos bioquímicos e celulares intrínsecos ao organismo, cada qual com uma função específica a ser desempenhada (Tabela 2).

Tabela 2: Principais componentes do sistema imune inato e suas funções.

COMPONENTES	FUNÇÃO
Barreiras epiteliais	Bloquear a entrada de micróbios nos tecidos
Fagócitos	Ingerir e digerir micróbios invasores
Células <i>Natural Killer</i>	Destruir células tumorais e infectadas por vírus
Sistema Complemento	Estimular o processo inflamatório Promover opsonização e lise celular
Lectinas	Identificar e neutralizar micróbios Ativar o sistema complemento Promover opsonização
Citocinas	Recrutar leucócitos para o local de infecção Estimular o processo inflamatório
Opsoninas	Aumentar a eficiência do processo de fagocitose
Interferon gama	Inibir crescimento e replicação de micróbios Destruir células tumorais
Quimiocinas	Recrutar e ativar macrófagos
Espécies reativas de oxigênio e Enzimas	Danificar membranas e biomoléculas de micróbios no interior do fagolisossomo
Peptídeos antimicrobianos	Formar poros na membrana microbiana Promover lise celular

Dentre estes, encontram-se: barreiras epiteliais e celulares envolvendo fagócitos (ex.: macrófagos, neutrófilos) e células *Natural Killer*, sistema complemento, polipeptídios que participam em processos de reconhecimento e eliminação de micróbios (ex.: lectinas, citocinas, opsoninas, interferon gama, quimiocinas, enzimas, peptídeos antimicrobianos) e espécies reativas de oxigênio.

2.2.1.1 Barreiras epiteliais

Alguns dos componentes da imunidade inata, como as superfícies epiteliais e seus elementos (ex.: muco e cílios), estão sempre ativos mesmo antes da infecção. Esses componentes formam uma barreira natural que tem a função primária de impedir a invasão dos tecidos pelos patógenos. Se essa barreira é rompida, os demais componentes do sistema inato são rapidamente ativados para destruir ou limitar o crescimento dos micróbios (MAYER, 2006).

2.2.1.2 Fagócitos

Os fagócitos são leucócitos responsáveis pelo englobamento e digestão de patógenos nas camadas subepiteliais. Ao reconhecerem os PAMPs típicos para o grupo microbiano, essas células são ativadas e se ligam aos invasores. Os micróbios são então ingeridos e envoltos por uma membrana para formar o fagossomo. Essa estrutura migra para o citoplasma do fagócito e é então fusionada a lisossomos, formando o fagolisossomo (PAUSTIAN; ROBERTS, 2006).

No interior dessa organela, o baixo pH (que pode atingir o valor de 4,0) é responsável pela inibição do crescimento de alguns tipos de micro-organismos, além de intensificar a atividade de enzimas ali presentes (ex.: lisozimas, glicosilases, fosfolipases e nucleases). São produzidas também espécies reativas de oxigênio que, em conjunto com as enzimas, agem para danificar membranas e biomoléculas do patógeno (PAUSTIAN; ROBERTS, 2006).

2.2.1.3 Células “Natural Killer” (NK)

Células NK são grandes linfócitos granulares que representam a primeira linha de defesa contra células tumorais e infectadas por vírus (PAPAMICHAIL et al., 2004). O nome “células assassinas naturais” provém do fato que, quando isoladas dos locais onde normalmente são encontradas (ex.: sangue e baço), matam várias células-alvo sem que haja a necessidade de uma ativação adicional, como ocorre com outros linfócitos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

Além de agir na lise celular, essas células também constituem uma das principais fontes de síntese de quimiocinas e citocinas imunoreguladoras (PAPAMICHAIL et al., 2004).

As quimiocinas funcionam como reguladores do processo de inflamação devido à sua capacidade de recrutar e ativar macrófagos (ESCHE; STELLATO; BECK, 2005). Dentre as citocinas, encontra-se o interferon gama (IFN- γ), uma proteína que apresenta funções imunoreguladoras, antitumorais e antivirais (inibição do crescimento e da replicação viral) (SCHRODER et al., 2004).

2.2.1.4 Sistema Complemento

O Complemento é um importante efetor do sistema imune, consistindo em mais de 40 proteínas que circulam no plasma e estão associadas às membranas celulares (ZIPFEL; MIHLAN; SKERKA, 2007).

Esse sistema age como mediador em reações de proteólise em cadeia e agrupamento de complexos proteicos, participando tanto da defesa inata quanto da adaptativa (IWAKI et al., 2006). Pode ser ativado por três vias diferentes: via clássica¹, via alternativa e via das lectinas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007) (Figura 1).

¹ Pertencente à imunidade adaptativa, a via clássica corresponde à ativação do sistema complemento a partir do reconhecimento de anticorpos produzidos pelo organismo.

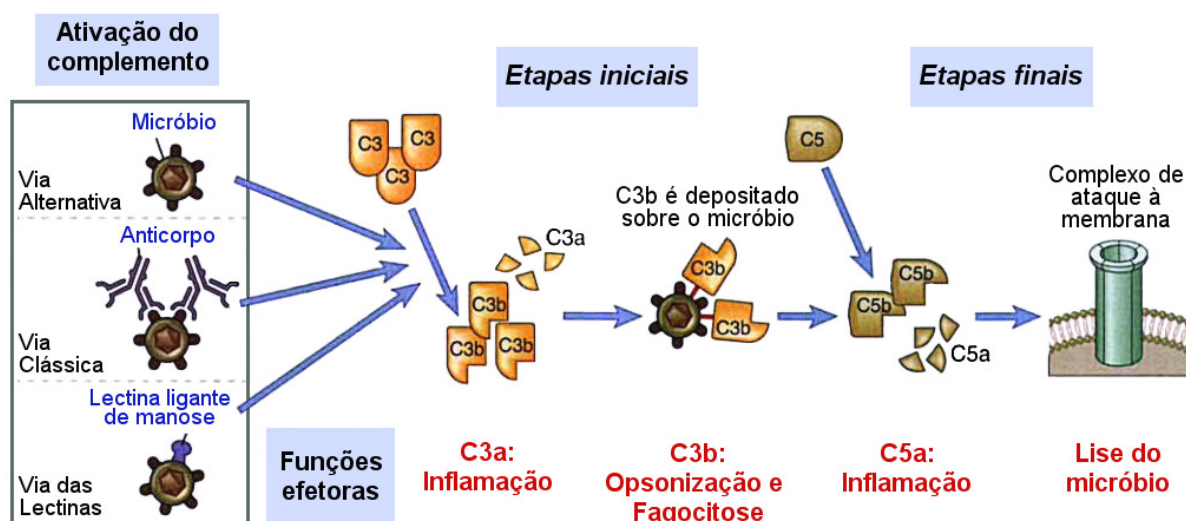


Figura 1: Vias de ativação do sistema complemento. Uma vez ativado, o sistema complemento gera produtos de clivagem que vão participar nos processos de inflamação e destruição dos micróbios. (Adaptado de ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007)

Na imunidade inata, o complemento pode ser ativado diretamente por elementos da superfície microbiana (via alternativa) e pela presença de uma lectina ligante de manose (MBL) (via das lectinas) que reconhece resíduos terminais de manose em glicoproteínas e glicolipídeos microbianos. Essa ativação resulta na geração de produtos de clivagem que estimulam a inflamação, envolvem micróbios para torná-los mais susceptíveis à fagocitose (processo denominado opsonização) e constituem um complexo de ataque à membrana microbiana, resultando em formação de poros e extravasamento do conteúdo celular (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

2.2.1.5 Algumas moléculas com função antimicrobiana

Lectinas – embora detentoras de uma série de funções nos organismos, o principal papel dessas proteínas é agir como moléculas de reconhecimento no sistema imune, participando da defesa direta contra patógenos e do reconhecimento celular (KILPATRICK, 2002). Elas identificam tanto açúcares da superfície microbiana quanto glicoproteínas, polissacarídeos e glicolipídeos responsáveis pela interação entre células e destas com a matriz extracelular (KILPATRICK, 2002; SHARON, 2007).

Algumas lectinas funcionam ainda como moléculas efetoras que promovem opsonização e fagocitose de patógenos (ex.: coletinas, ficolinas e pentraxinas), além de participarem na ativação do sistema complemento (VASTA et al., 2007) (Figura 1).

Citocinas – Na imunidade inata, as principais fontes dessas macromoléculas são os macrófagos, os neutrófilos e as células NK. São as “moléculas mensageiras” do sistema imune que promovem a comunicação entre as células e atuam no processo de inflamação, recrutando e ativando leucócitos para o local de infecção.

Também são responsáveis pela produção de algumas alterações sistêmicas (ex.: aumento na síntese de células efetoras e proteínas que potencializam as respostas antimicrobianas), além de controlar infecções virais, estimular a proliferação e atividade das células NK e ativar macrófagos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007).

Opsoninas – são macromoléculas que se ligam a patógenos e facilitam o processo de fagocitose, aumentando sua eficiência (OWENS III; PEPPAS, 2006). Exemplos de opsoninas são algumas lectinas e certos componentes do sistema complemento.

Peptídeos antimicrobianos – são moléculas anfipáticas com massa inferior a 10 KDa e sequências menores que 100 aminoácidos, as quais se ligam a carboidratos da superfície dos micro-organismos, agindo através da formação de poros nas membranas microbianas (TINCU; TAYLOR, 2004).

2.2.1.6 Organismos simbiotes como uma barreira biológica

Além das barreiras químicas e celulares, a defesa contra micro-organismos invasores pode ser realizada também por organismos simbiotes. Estes podem impedir o crescimento de patógenos no hospedeiro através da secreção de substâncias tóxicas ou competindo com estes por nutrientes e substrato na superfície celular (HAINE, 2008; MAYER, 2006).

2.3 IMUNIDADE INATA EM INVERTEBRADOS

Os invertebrados são desprovidos dos mecanismos de defesa adaptativa dos vertebrados (IWANAGA; LEE, 2005), cujas respostas são mediadas por linfócitos T de memória e expressão de imunoglobulinas por clones de linfócitos B.

A sobrevivência desses organismos se baseia unicamente na defesa inata, que tem se mostrado ser um sistema bastante eficiente, considerando que os primeiros invertebrados surgiram no final do período pré-cambriano, há aproximadamente 600 milhões de anos atrás.

Até pouco tempo, era amplamente aceito o fato que invertebrados não apresentam um alto nível de especificidade e memória nas suas estratégias imunológicas. Contudo, alguns trabalhos recentes têm contestado esse ponto de vista (KURTZ, 2005; ROWLEY; POWELL, 2007; SCHULENBURG; BOEHNISCH; MICHIELS, 2007).

Uma pesquisa envolvendo copépodos *Macrocylops albidus* demonstrou que a imunidade desses organismos contra uma linhagem específica de seu parasita *Schistocephalus solidus* foi aumentada após um contato prévio com o patógeno, verificando-se uma redução dos níveis de reinfecção em exposições posteriores (KURTZ; FRANZ, 2003).

Em um trabalho com a pulga-d'água *Daphnia magna*, foi comprovado que a prole dos animais expostos a uma linhagem do seu microparasita *Pauteuria ramosa* apresentou um aumento na resistência contra esta linhagem especificamente, mas não contra uma segunda linhagem testada (LITTLE et al., 2003).

Outro estudo buscou mimetizar uma infecção primária em larvas do besouro *Tenebrio molitor* usando lipopolissacarídeos. Os resultados mostraram que quando essas larvas eram posteriormente expostas a esporos do fungo *Metarhizium anisopliae*, produziam uma resposta antimicrobiana de longa duração e resistência a subsequentes infecções (MORET; SIVA-JOTHY, 2003).

Outra pesquisa demonstrou que certo nível de especificidade imune está presente na mamangaba *Bombus terrestris*, que desenvolveu uma resposta imune espécie-específica contra dois táxons estritamente relacionados do gênero *Paenibacillus* (SADD; SCHMID-HEMPEL, 2006).

Todos esses resultados sugerem que alguns invertebrados apresentam um

alto nível de especificidade em suas respostas imunes contra diferentes patógenos e que essa especificidade resulta em uma proteção aumentada em subsequentes reexposições (“memória”).

No entanto, tais conclusões são baseadas apenas em observações fenomenológicas, enquanto os mecanismos moleculares básicos ainda permanecem desconhecidos e, por isso, essas ideias têm sido contestadas por outros pesquisadores (HAUTON; SMITH, 2007).

Muitos estudos ainda precisam ser feitos no intuito de provar a existência de mecanismos de defesa em invertebrados que produzam memória imunológica e especificidade nos seus modos de ação, além de investigar sua possível homologia com os tipos de mecanismos presentes em vertebrados (HAUTON; SMITH, 2007; ROWLEY; POWELL, 2007).

2.4 FILO CNIDARIA

O filo Cnidaria (do grego antigo *knidē*, urtiga) é um grupo de invertebrados aquáticos (marinhos em sua maioria), coloniais ou solitários, os quais apresentam grande variedade de formas, tamanhos e cores. Esses organismos figuram entre os animais multicelulares mais antigos, formando, juntamente com os ctenóforos, um grupo-irmão dos metazoários bilaterais (Figura 2) (TELFORD, 2009).

A principal característica que une os cnidários é a capacidade de sintetizar um produto celular altamente complexo, o cnidocisto ou cnida, que pode ser de três tipos: espirocisto, pticocisto e nematocisto, este último presente em todos os cnidários (DALY et al., 2007). Essas organelas estão basicamente relacionadas à defesa e à alimentação (captura de presas, digestão, entre outros) (FAUTIN, 2009; ÖZBEKA; BALASUBRAMANIANA; HOLSTEIN, 2009).

Esses animais possuem uma organização corporal relativamente simples, com células e grupos de células especializados. É o primeiro clado no curso da evolução a apresentar um plano corporal definido, incluindo um eixo, bem como primórdios de um sistema nervoso e organização de tecidos em camada (BOSCH, 2008; RUPPERT; FOX; BARNES, 2005).

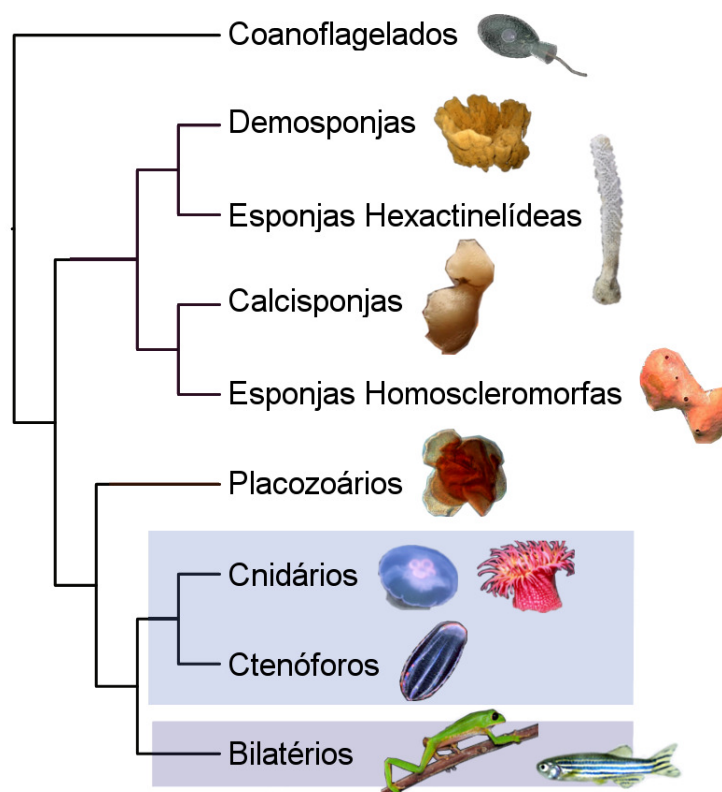


Figura 2: Filogenia dos grupos de metazoários basais. (Modificado de TELFORD, 2009)

O corpo, radialmente simétrico em torno do eixo oral-aboral, apresenta duas camadas epiteliais, a epiderme e a endoderme ou gastroderme (que forma a cavidade gastrovascular). Estas estão unidas pela mesogleia, uma matriz extracelular gelatinosa que serve como tecido conector (HYMAN, 1940) (Figura 3).

Sua reprodução ocorre de forma sexuada e/ou assexuada (FAUTIN, 2002), podendo ser encontradas as fases polipoide e/ou medusóide (FAUTIN, 2002; HYMAN, 1940).

Atualmente, o filo encontra-se dividido em cinco classes: Anthozoa (anêmonas, zoantídeos, octocorais, antipatários, ceriantários e corais pétreos), Cubozoa (cubomedusas), Hydrozoa (hidroides, caravela-portuguesa, corais-de-fogo, hidromedusas, dentre outros), Scyphozoa (“águas-vivas”) e Staurozoa (medusas sésseis) (DALY et al., 2007; MARQUES; COLLINS, 2004).

Os Anthozoa, também conhecidos como “animais-flor”, apresentam apenas a fase de pólipos (variando entre 0,5 cm a 1 m de diâmetro) e correspondem ao maior táxon dentre os cnidários, contendo mais de 6000 espécies solitárias e coloniais distribuídas em duas subclasses: Hexacorallia e Octocorallia (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). A principal diferença entre elas diz respeito à simetria do pólipo, determinada pelo número, forma e arranjo dos tentáculos (que circundam o disco

oral) e dos septos (que dividem a cavidade gastrovascular) (Figura 4).

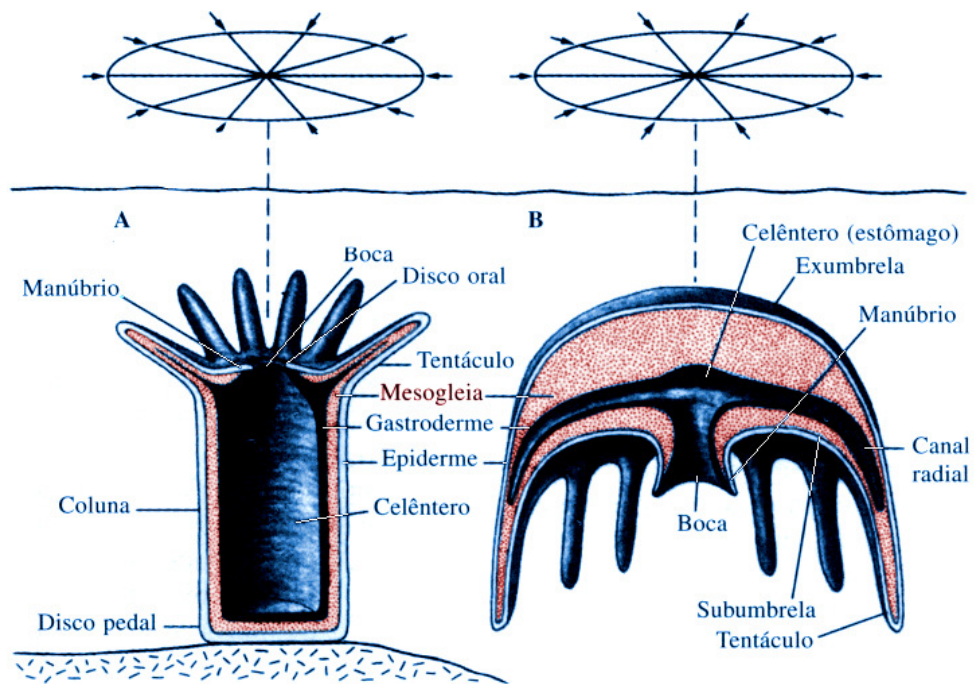


Figura 3: Esquema da anatomia geral de formas corpóreas solitárias dos cnidários. **A** - Pólipo; **B** - Medusa. Os diagramas na parte superior indicam sua simetria radial, que é adaptada a receber estímulos (setas) de todas as direções. (Adaptado de RUPPERT; FOX; BARNES, 2005, p. 132)

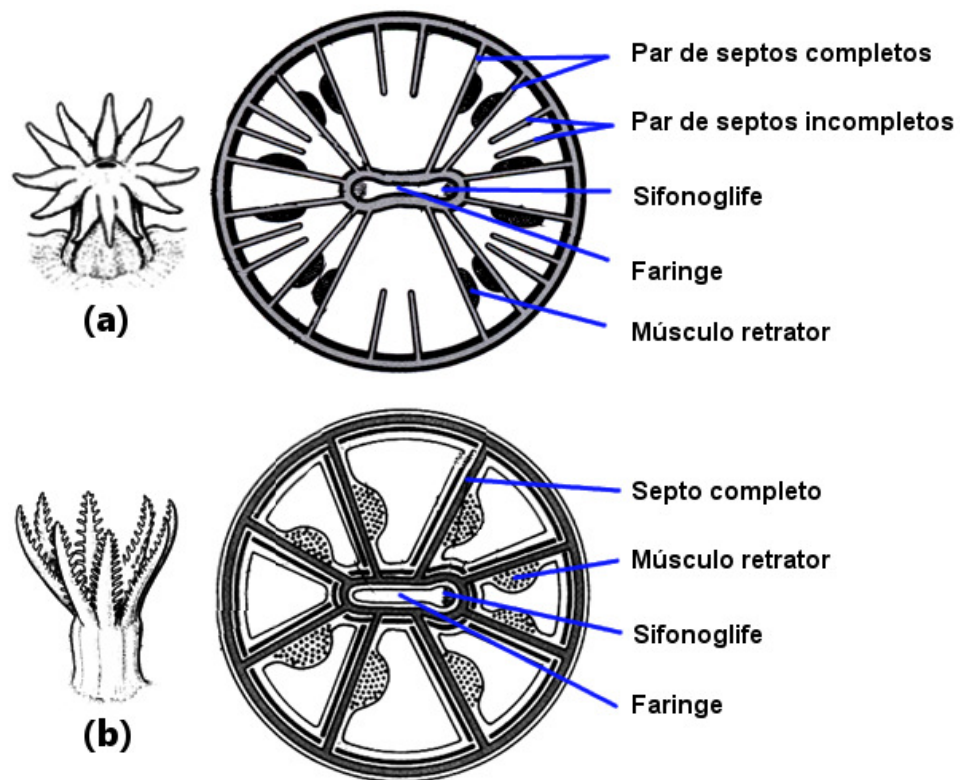


Figura 4: Corte transversal de pólipos na altura da faringe. **A** - Hexacorallia; **B** - Octocorallia. Os termos “completo” e “incompleto” são utilizados para determinar se um septo toca ou não a faringe. (Modificado de RUPPERT; FOX; BARNES, 2005, p. 146 e 148)

Os Hexacorallia (Figura 4a) normalmente apresentam uma simetria hexâmera, com tentáculos lisos e septos (completos ou incompletos, tipicamente aos pares) ocorrendo em números múltiplos de seis. Os Octocorallia (Figura 4b), por sua vez, apresentam sempre oito tentáculos pinados e oito septos completos e não pareados (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005).

2.4.1 *Palythoa caribaeorum* (Anthozoa, Hexacorallia, Zoanthidea)

Palythoa caribaeorum (Duchassaing & Michelotti, 1860) é uma espécie colonial exclusivamente marinha que apresenta apenas a forma polipoide. A coloração das colônias varia entre amarelo e marrom (Figura 5), cujos pólipos, medindo cerca de 5 a 10 mm de diâmetro por 1 cm de espessura (HAYWICK; MUELLER, 1997), encontram-se inseridos no cenênquima, uma massa de tecido espessa que forma uma camada subepidérmica de sustentação.

Esse organismo apresenta um rápido crescimento colonial que varia entre 2,5 a 4 mm por dia, correspondendo a uma das taxas de crescimento mais altas dentre os antozoários (SUCHANEK; GREEN, 1982).

P. caribaeorum é notável pela grande quantidade de material inorgânico particulado que incorpora tanto em seus tecidos quanto no cenênquima durante o crescimento da colônia (ACEVEDO-SOTO, 2007; HAYWICK; MUELLER, 1997). Foi demonstrado que essa espécie pode assimilar uma variedade de minerais provenientes do recife, incluindo aragonita, calcita, calcita de magnésio e pequenas quantidades de componentes siliciclásticos, os quais chegam a compor 45% da biomassa total do organismo (HAYWICK; MUELLER, 1997).

Devido à sua estreita relação de simbiose com zooxantelas do gênero *Symbiodinium* (BAKER, 2003; KEMP et al., 2006; LAJEUNESSE, 2002), essa espécie é geralmente encontrada em ambientes recifais de alta incidência luminosa (HAYWICK; MUELLER, 1997), embora também ocorra em ambientes com intensa deposição de sedimentos (ACEVEDO-SOTO, 2007).

De forma sazonal, esses organismos sofrem um fenômeno chamado branqueamento (KEMP et al., 2006), que se refere à perda de coloração de seus tecidos devido à saída dos simbiossitos (DOUGLAS, 2003) (Figura 5), podendo

ocasionar também perda de massa tecidual, como ocorre em corais (FABRICIUS, 1999). Durante eventos de branqueamento em massa, *P. caribaeorum* é uma das primeiras espécies a apresentar sinais de branqueamento (VILLAMIZAR et al., 2008).

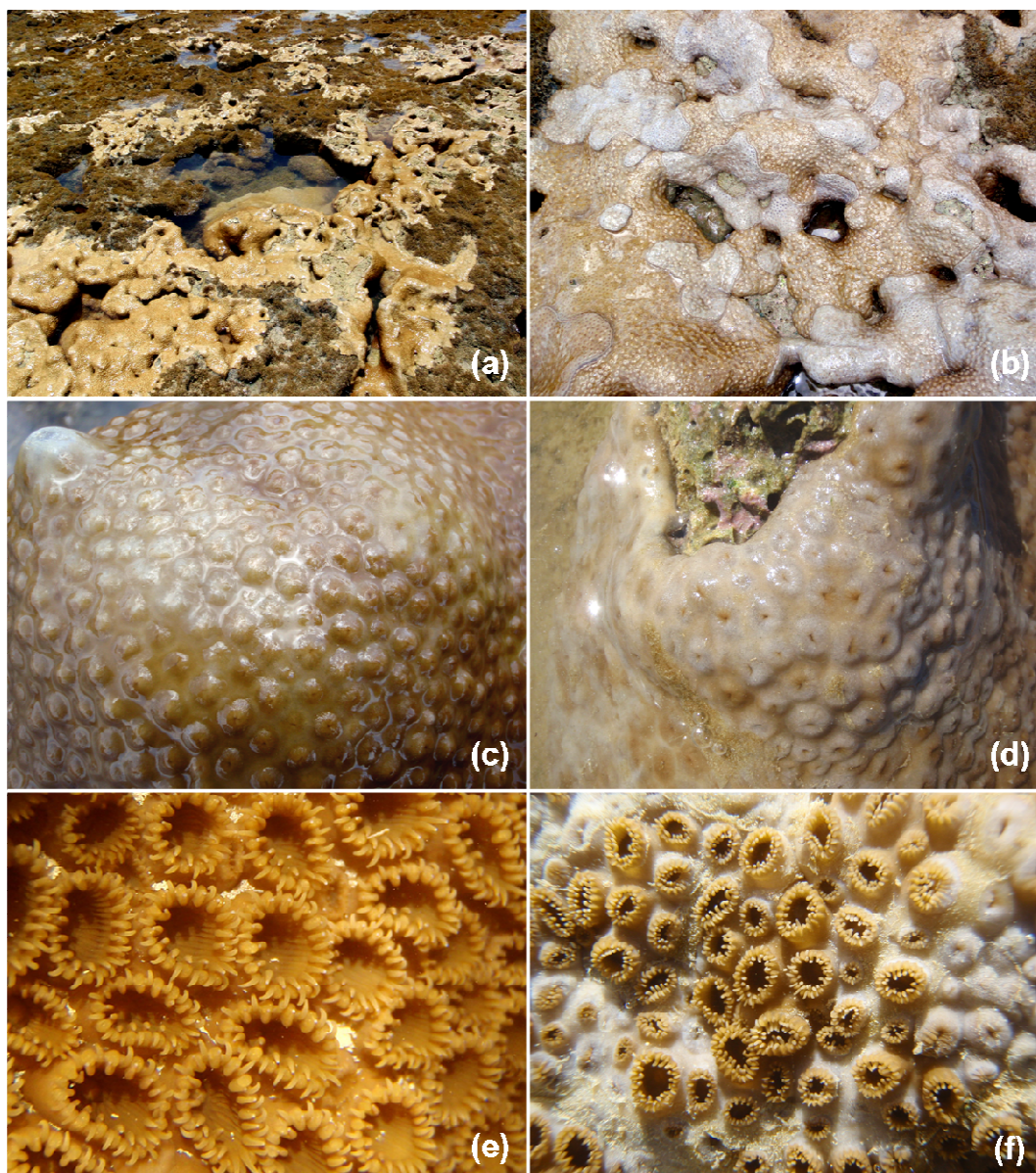


Figura 5: Colônias saudáveis (a,c,e) e branqueadas (b,d,f) de *Palythoa caribaeorum*. **A,B** - Visão geral das colônias sobre os recifes de arenito da costa pernambucana; **C,D** - Detalhe das colônias expostas, exibindo os pólipos retraídos; nessa condição, há produção de muco (reduzida em colônias branqueadas); **E,F** - Detalhe das colônias submersas, exibindo os pólipos abertos. (Fotos: Liany Melo)

O branqueamento pode ser provocado tanto por influência de fatores ambientais (WEIS, 2008), quanto por poluição e infecção por micro-organismos patogênicos (DOUGLAS, 2003) e pela disposição do hospedeiro (ao expelir

simbiontes que serão trocados por outro grupo), como uma forma de proteção a condições adversas (BAKER, 2001; LEWIS; COFFROTH, 2004; TOLLER; ROWAN; KNOWLTON, 2001).

P. caribaeorum é o zoantídeo mais abundante no litoral de Pernambuco (ALVES; GOMES, 2010; SOARES et al., 2006), estando distribuído desde a zona infralitoral até a zona intermareal. Quando exposto durante a maré baixa, produz um muco que protege a colônia contra dessecação, o que o torna popularmente conhecido como “baba-de-boi”.

Uma vez que os recifes que protegem a costa pernambucana são tipicamente de arenito e não de coral (BARRETO et al., 2010), a abundância dessa espécie lhe confere um papel de destaque na dinâmica ecológica desse ambiente (PÉREZ; VILA-NOVA; SANTOS, 2005).

Por um lado, esses organismos são ávidos competidores por espaço e bem adaptados às condições eutróficas do meio (COSTA Jr; NIMMO; ATTRILL, 2008), podendo crescer praticamente sobre qualquer invertebrado sésil nativo ou invasor (MENDONÇA-NETO; GAMA, 2009; SUCHANEK; GREEN, 1982). Dessa forma, também influenciam diretamente a estrutura de comunidades pelágicas que destes dependem (CHAVES, 2006; MENDONÇA-NETO et al., 2008).

Por outro lado, as grandes áreas ocupadas por esses zoantídeos coloniais favorecem a formação de micro-habitats que servem de abrigo para uma série de organismos (PÉREZ; VILA-NOVA; SANTOS, 2005), função geralmente exercida por corais dominantes nos recifes biogênicos (MOBERG; FOLKE, 1999).

2.4.2 Imunidade inata em cnidários

Características como organização corporal simples e ausência de barreiras impermeáveis (ex.: cutícula ou exoesqueleto) poderiam sugerir, em princípio, que os cnidários apresentam uma elevada vulnerabilidade a patógenos (HEMMRICH; MILLER; BOSCH, 2007). No entanto, seus eficazes mecanismos de defesa inata têm garantido sua existência há milhões de anos.

A imunidade em cnidários está intrinsecamente ligada à forma como esses organismos percebem o ambiente e se relacionam com outros seres, sobretudo no

tocante à competição inter e intraespecífica, competição entre diferentes linhagens de células (em organismos coloniais que se fusionam) e interações do tipo hospedeiro-patógeno e hospedeiro-simbionte (BOSCH, 2008).

Uma das funções imunes fundamentais na manutenção de sua integridade é a capacidade de discriminação entre células próprias e não próprias, que traz uma série de implicações especialmente importantes em organismos coloniais (CADAVID, 2004). Abaixo seguem alguns exemplos de estudos que evidenciam alguns aspectos da imunidade em cnidários.

Uma pesquisa realizada com alcionáceos (LA BARRE; COLL; SAMMARCO, 1986) demonstrou que, em situações de competição por espaço, esses organismos reconhecem células estranhas e apresentam comportamentos para evitar o outro indivíduo. Dentre seus mecanismos, estão a alelopatia e o contato físico direto que resulta em necrose de tecidos.

Outro estudo envolvendo reconhecimento celular em corais, como *Acropora formosa* e *Porites andrewsii* (HILDEMANN; LINTHICUM; VANN, 1975), demonstrou que transplantes de tecidos intracoloniais (singênicos) apresentam uma alta compatibilidade, enquanto transplantes de tecidos provenientes de outros indivíduos da mesma espécie (mas geneticamente diferentes – alogênicos) ou de espécies diferentes (xenogênicos) são incompatíveis, podendo resultar em agressão entre os indivíduos (HILDEMANN; LINTHICUM; VANN, 1975; RINKEVICH, 2004).

Colônias geneticamente distintas do hidrozoário *Hydractinia symbiolongicarpus* naturalmente se fusionam para produzir quimeras, resultando em aumento de tamanho e garantia de sobrevivência da colônia híbrida, embora a presença de tais aparentes benefícios seja contestada por alguns pesquisadores (GILD; FRANK; MOKADY, 2003). Como consequência dessa união, as diferentes linhagens celulares dos organismos fusionados passam a competir por uma representação nos tecidos reprodutivos (SCHWARZ; CADAVID, 2007; WILSON; GROSBERG, 2004).

Alguns cnidários apresentam ainda relações de simbiose (muitas vezes específicas). Eles dispõem de mecanismos para o reconhecimento de seus potenciais simbiossiontes, fazendo distinção entre células compatíveis e incompatíveis (BELDA-BAILLIE; BAILLIE; MARUYAMA, 2002; BOSCH, 2008; COLLEY; TRENCH, 1985; STEINERT; HENTSCHEL; HACKER, 2000).

Outro aspecto muito importante na imunidade de cnidários é a defesa química

antimicrobiana baseada na produção de metabólitos secundários (BOSCH, 2008; CHANGYUN et al., 2008; KELMAN et al., 2006; SHAPO; MOELLER; GALLOWAY, 2007) e de peptídeos antimicrobianos, que exercem um papel fundamental na defesa inata (KASAHARA; BOSCH, 2003; OTERO-GONZÁLEZ et al., 2010; OVCHINNIKOVA et al., 2006; SHER et al., 2005). Descobertas recentes de peptídeos antimicrobianos altamente ativos em hidras e medusas têm evidenciado o potencial emprego dessas moléculas no desenvolvimento de novos antibióticos com atividade antimicrobiana de amplo espectro (BOSCH, 2008).

2.4.3 Alguns genes envolvidos na resposta imune de cnidários

O sequenciamento completo do genoma do antozoário *Nematostella vectensis* (PUTNAM et al., 2007) e do hidrozoário *Hydra magnipapillata* (CHAPMAN et al., 2010), juntamente com uma grande quantidade de dados de sequências expressas (EST) disponíveis para estes organismos e para o coral *Acropora millepora* (KORTSCHAK et al., 2003), têm permitido avanços no estudo de moléculas do sistema imune, demonstrando a existência de vários processos biológicos que são evolutivamente conservados em metazoários (DUNN, 2009).

Uma vez que os cnidários são um grupo-irmão dos Bilateria, potencialmente oferecem novas perspectivas sobre a origem e evolução das reações imunes (inclusive em mamíferos), bem como informações sobre o repertório imunológico ancestral dos animais (MILLER et al., 2007).

O uso de cnidários como sistemas-modelo em metazoários tem contribuído para a compreensão de processos celulares envolvidos em simbiose, regulação da imunidade, morte celular e longevidade do organismo (DUNN, 2009; WEIS et al., 2008).

Grande parte dos esforços de pesquisas com esses organismos tem sido direcionada à clonagem de genes que apresentam papéis importantes na imunidade inata em bilatérios. Vários homólogos a moléculas-chave já foram identificados em cnidários, dentre eles lectinas e componentes similares ao sistema complemento (HEMMRICH; MILLER; BOSCH, 2007; KVENNEFORS et al., 2008; MILLER et al., 2007), indicando que esses organismos estão longe de serem “simples” em termos

de estratégias moleculares que usam para combater micro-organismos invasores (DUNN, 2009).

2.4.3.1 Lectinas do tipo C (CTLs)

As CTLs compõem uma família de lectinas dependentes de cálcio (Ca^{2+}), funcionando como receptores de carboidratos que são capazes de se ligar a açúcares de patógenos (MEYER-WENTRUP et al., 2005). Essas proteínas compartilham domínios de reconhecimento de carboidratos que apresentam uma sequência variando entre 115 a 130 aminoácidos (DRICKAMER; TAYLOR, 1993).

Alguns homólogos de CTL já foram encontrados em cnidários como *Nematostella vectensis* (WOOD-CHARLSON; WEIS, 2009), *Hydra vulgaris* (REIDLING; MILLER; STEELE, 2000), *Acropora millepora* (SENECA et al., 2009) e *Pocillopora damicornis* (VIDAL-DUPIOL et al., 2009).

As CTLs participam de uma série de eventos biológicos que requerem o reconhecimento de carboidratos específicos, como: adesão entre células, reconhecimento e fagocitose de potenciais patógenos e de simbioses por organismos hospedeiros (WOOD-CHARLSON; WEIS, 2009).

2.4.3.2 Lectinas ligantes de manose (MBL)

Em cnidários, uma MBL (denominada *Millectin*) foi encontrada em *Acropora millepora* e há evidências que essa molécula participa no reconhecimento tanto de patógenos quanto de simbioses (KVENNEFORS et al., 2008).

Essa molécula é homóloga ao domínio de lectina de uma série de CTLs envolvidas na imunidade em outros animais. Apresenta um sítio conservado de ligação a carboidratos na posição 158-160, que predominantemente confere especificidade por manose (e carboidratos similares), além de ser cálcio-dependente (KVENNEFORS et al., 2008).

Outra importante função é sua participação na ativação de vias semelhantes

ao sistema complemento e opsonização (DUNN, 2009).

2.4.3.3 Componente 3 (C3) do sistema complemento

O componente C3 (juntamente com C4 e C5) é uma proteína tioéster (TEP) que também está incluída no grupo de genes do tipo C (dependentes de cálcio). Apresentam um papel importante no sistema complemento de vertebrados: as três vias de ativação do sistema resultam na clivagem de C3, culminando na formação do complexo de ataque à membrana (Figura 1) (HEMMRICH; MILLER; BOSCH, 2007).

Algumas moléculas semelhantes ao C3 foram encontradas em cnidários como *Swiftia exserta* (DISHAW; SMITH; BIGGER, 2005), *Nematostella vectensis* (KIMURA; SAKAGUCHI; NONAKA, 2009; MILLER et al., 2007) e *Acropora millepora* (MILLER et al., 2007), indicando que a origem do sistema complemento antecede a divergência dos cnidários em relação aos Bilateria.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia empregada foi desenvolvida em duas etapas distintas. Uma representação esquemática pode ser visualizada na figura 6.

A primeira etapa consistiu na busca por genes da imunidade inata de *P. caribaeorum* (C3, CTL e MBL), onde foram utilizadas duas diferentes estratégias, objetivando-se uma maximização dos resultados:

- 1) Na primeira estratégia (Figura 6a), foi realizada a síntese de cDNA por reação em cadeia de polimerase acoplada à transcriptase reversa (RT-PCR). Esse material foi amplificado e diretamente destinado ao sequenciamento de nucleotídeos;
- 2) Na segunda estratégia (Figura 6b), além da síntese de cDNA, foi construída uma biblioteca parcial de cDNA, posteriormente utilizada em uma triagem por homologia (*screening*) através de técnicas de PCR. Os clones positivos foram então selecionados e encaminhados ao sequenciamento de nucleotídeos.

A segunda etapa do trabalho compreendeu a realização de um ensaio de expressão diferencial para o gene CTL, a fim de averiguar se o mesmo apresentava variação nos níveis de expressão de seus transcritos entre colônias sadias e branqueadas de *P. caribaeorum*. Para tanto, o cDNA foi sintetizado por RT-PCR e em seguida submetido a uma análise semi-quantitativa através de uma reação de PCR convencional.

Os métodos utilizados estão detalhados adiante. Uma lista referente à composição das soluções, dos tampões e de alguns reagentes utilizados pode ser visualizada no apêndice A.

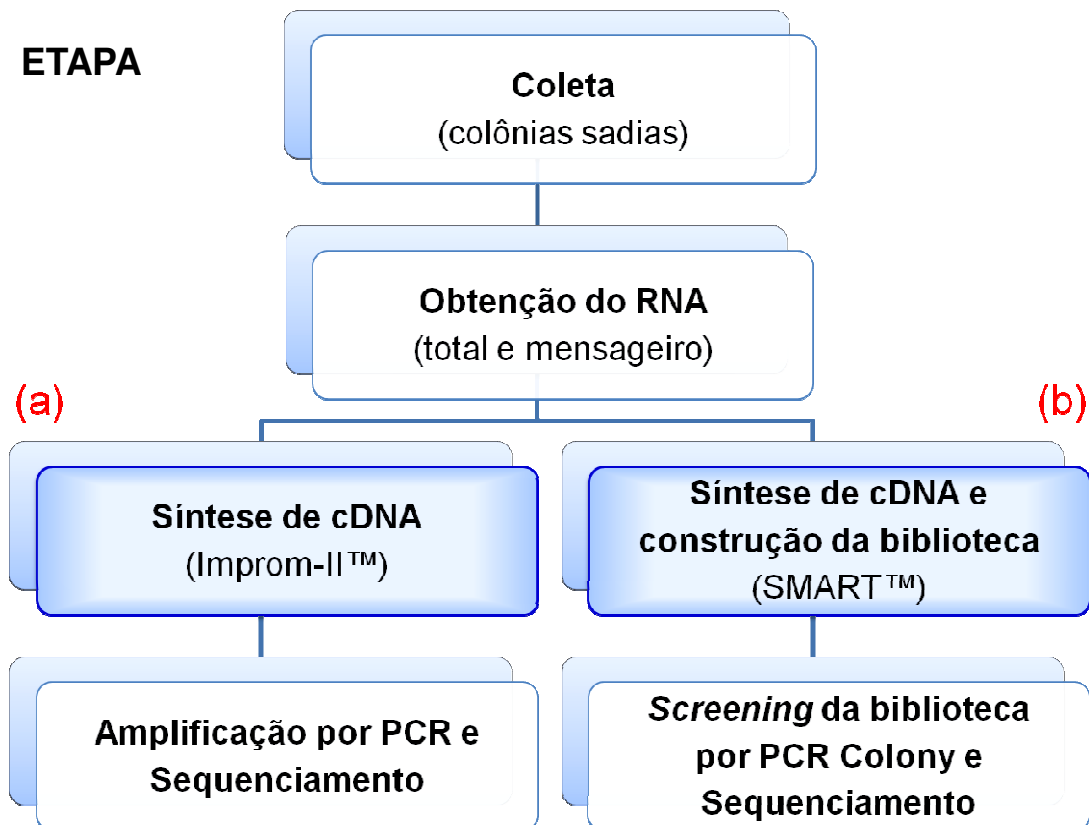
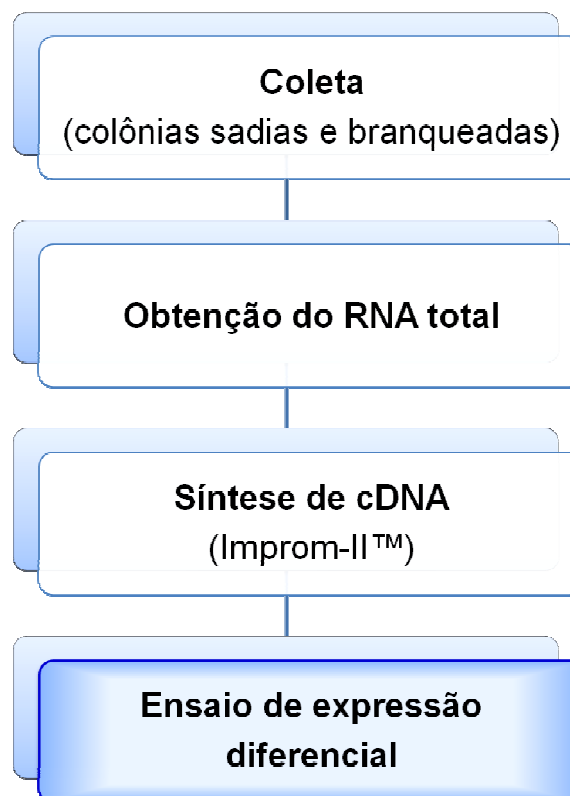
1ª ETAPA**2ª ETAPA**

Figura 6: Representação esquemática dos métodos empregados. A 1ª Etapa corresponde à busca por genes da imunidade inata de *Palythoa caribaeorum*, na qual foram utilizadas duas estratégias distintas (A,B). A 2ª Etapa consistiu em um ensaio de expressão diferencial para o gene CTL.

3.1 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS DE TECIDO

A área de estudo compreendeu os recifes de arenito presentes na praia de Porto de Galinhas (Figura 7a), localizada no município de Ipojuca, litoral sul do estado de Pernambuco.

Com auxílio de canivete e luvas, foi retirada uma amostra de cerca de 1 g de tecido livre de sedimento, de colônias sadias (Figura 7b) e branqueadas (Figura 7c) de *P. caribaeorum*. Os tecidos foram imersos em dois tubos de polipropileno contendo 5 mL de RNA^{later}® (Ambion, EUA) e em seguida transportados em gelo até o laboratório. O material foi mantido a 4 °C por 16 horas e posteriormente a -20 °C até o momento de uso.

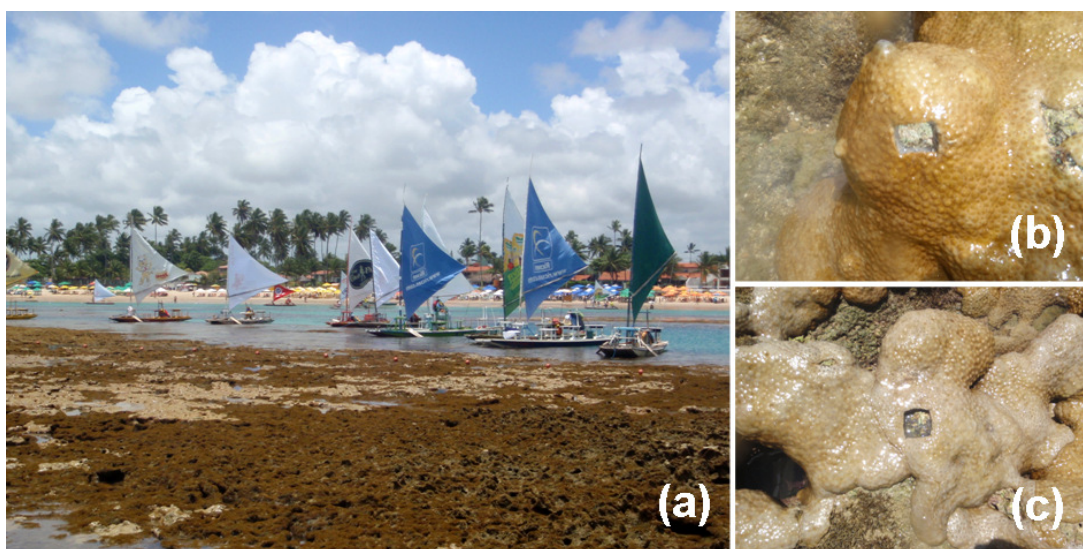


Figura 7: Coleta de material biológico realizada durante a maré baixa. **A** - Área de estudo, localizada na praia de Porto de Galinhas; **B,C** - Respectivamente, local de retirada das amostras de tecido sadio e branqueado de *Palythoa caribaeorum*. (Fotos: Liany Melo)

3.2 OBTENÇÃO DO RNA

De modo a diminuir a contaminação por ribonucleases (RNase), todo o material utilizado (água, soluções – exceto Tris-HCl, equipamentos, vidrarias, reagentes, etc.) foi tratado com dietilpirocarbonato (DEPC) e autoclavado, além de serem observados alguns procedimentos laboratoriais como o uso de luvas.

3.2.1 Extração do RNA total

3.2.1.1 Maceração do tecido, homogeneização e separação de fases

A extração do RNA total foi feita pelo método do fenol/isotiocianato de guanidina, de acordo com o protocolo para o reagente TRIzol[®] (Invitrogen, EUA).

Cerca de 1 g de tecido foi diretamente macerado em nitrogênio líquido com auxílio de pistilo e almofariz estéreis por calor (200 °C por três horas), tomando-se cuidado para não deixar o material descongelar. Em seguida, o pó foi transferido para um tubo de polipropileno estéril contendo 10 mL de reagente TRIzol[®], o qual foi homogeneizado por inversão e incubado à temperatura ambiente por cinco minutos.

Foi feita uma centrifugação² a 12000 x g por dez minutos a 4 °C para remoção de materiais insolúveis da amostra. O sobrenadante foi recuperado e em seguida foram adicionados 2 mL de clorofórmio ao tubo, que foi agitado vigorosamente por 15 segundos e incubado à temperatura ambiente por três minutos.

Seguiu-se uma nova centrifugação (12000 x g, 15 minutos, 4 °C) que resultou na separação da amostra em três fases: uma inferior avermelhada (lisado celular + fase fenol-clorofórmio), uma interfase flocular (DNA de alto peso molecular) e uma superior aquosa e transparente (RNA total). A fase aquosa foi recuperada e repetiu-se o processo de adição de clorofórmio e centrifugação para limpeza da amostra.

3.2.1.2 Precipitação, lavagem e ressuspensão do RNA total

A fase aquosa foi transferida para um novo tubo estéril. Foram adicionados 2,5 mL de isopropanol e 2,5 mL de uma solução contendo citrato de sódio 0,8 M e cloreto de sódio 1,2 M para retirada de polissacarídeos e precipitação do RNA. Após

² Para as etapas de centrifugação, foram utilizadas a centrífuga refrigerada NT 805 e a microcentrífuga Eppendorf MiniSpin[®].

homogeneização e incubação à temperatura ambiente por dez minutos, o material foi centrifugado a 12000 x g por dez minutos a 4 °C.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi lavado com 10 mL de etanol 75%. O material foi homogeneizado e centrifugado a 7500 x g por cinco minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e o tubo foi deixado aberto para evaporação do álcool e secagem do precipitado. Foram adicionados ao tubo 100 µL de água estéril livre de RNase, o qual foi incubado entre 55 °C e 60 °C por dez minutos.

3.2.1.3 Análise e quantificação do RNA total

A concentração e a pureza do RNA total foram determinadas por espectrofotometria (GeneQuant, GE Biosciences, EUA), através do cálculo de absorbância para os comprimentos 260 nm e 280 nm em amostra diluída (1:10) com água DEPC estéril. O grau de pureza, verificado pela razão de absorbância A_{260nm}/A_{280nm} , foi considerado bom acima de 1,6.

A integridade e qualidade do RNA obtido foram avaliadas por eletroforese em condição desnaturante (MASEK et al., 2005). Foi preparada uma mistura adicionando-se 12 µL de formamida (60%), 3 µL de *loading dye* 6X e 5 µL da amostra de RNA, totalizando um volume de 20 µL. A reação foi desnaturada em termobloco a 65 °C por cinco minutos e imediatamente colocada em gelo por mais cinco minutos, sendo em seguida aplicada no gel.

A eletroforese foi realizada a 100 V em gel de agarose 1% e tampão TAE 1X e a visualização das bandas feita com brometo de etídio (10 mg/mL) em transiluminador de luz ultravioleta (UV). As imagens foram registradas por câmera fotográfica digital acoplada a filtro laranja.

3.2.2 Purificação do RNA mensageiro

O RNA mensageiro (RNAm) foi purificado a partir do RNA total utilizando-se o

PolyATtract[®] mRNA Isolation Systems (Promega, EUA), de acordo com instruções do fabricante (Figura 8).

O sistema usa um primer oligo(dT) biotilado para hibridizar com alta eficiência a cauda poli(A⁺) da região 3' do RNAm. Em seguida, adiciona-se estreptavidina (acoplada a partículas paramagnéticas) que se liga fortemente à biotina. Os híbridos são então capturados utilizando-se um suporte magnético e finalmente o RNAm é eluído da fase sólida pela adição de água deionizada livre de RNase.

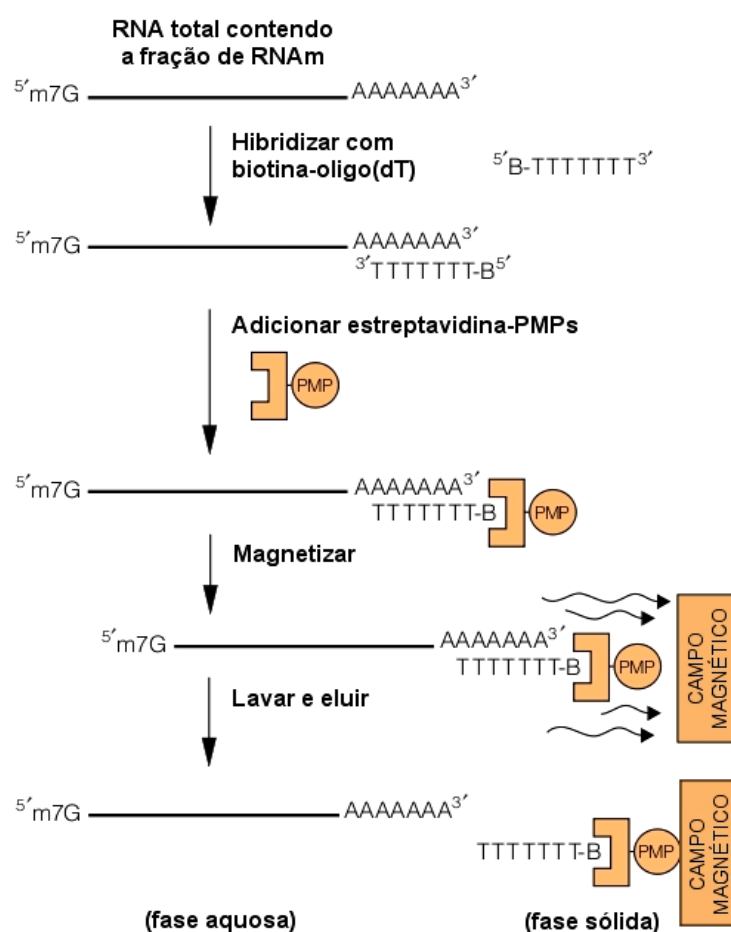


Figura 8: Diagrama esquemático para o procedimento de purificação do RNA mensageiro. PMP: Partículas Paramagnéticas; B: Biotina. (Fonte: Promega, com modificações)

3.2.2.1 Pareamento da sonda

O RNA total (1 mg, em volume inferior a 0,5 mL) foi transferido para um tubo estéril e o volume corrigido para 500 µL com água livre de RNase. O tubo foi

incubado em termobloco a 65 °C por dez minutos. Em seguida, foram adicionados ao RNA 3 µL da sonda oligo(dT)-biotina e 13 µL de solução SSC 20X. O tubo foi homogeneizado e mantido à temperatura ambiente até esfriar completamente.

3.2.2.2 Lavagem das partículas paramagnéticas acopladas à estreptavidina

As partículas paramagnéticas acopladas à estreptavidina (SA-PMPs) são fornecidas em uma concentração de 1 mg/mL, armazenadas em uma solução contendo tampão fosfato-salino (PBS), 1 mg/mL de albumina de soro bovino (BSA) e azida sódica 0,02%.

As SA-PMPs foram ressuspensas por uma leve agitação do fundo do tubo, o qual foi então colocado em um suporte magnético até que as partículas estivessem completamente aderidas à lateral do mesmo. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e as partículas foram lavadas três vezes com 300 µL de SSC 0,5X (a cada lavagem, o suporte magnético foi usado para captura das partículas, permitindo o descarte do sobrenadante). As SA-PMPs foram ressuspensas em 100 µL de SSC 0,5X.

3.2.2.3 Captura e lavagem dos híbridos oligo(dT)-RNAm

Todo o conteúdo da reação de pareamento (etapa 3.2.2.1) foi adicionado ao tubo contendo as partículas SA-PMPs lavadas. O tubo foi incubado à temperatura ambiente por dez minutos, sendo levemente homogeneizado por inversão a cada dois minutos.

As SA-PMPs foram capturadas usando-se o suporte magnético e o sobrenadante foi descartado. As partículas foram então lavadas quatro vezes com 300 µL de SSC 0,1X, agitando-se levemente o fundo do tubo para ressuspensão das mesmas. O sobrenadante foi descartado.

3.2.2.4 Eluição do RNA mensageiro

O precipitado de SA-PMPs foi ressuspendido em 100 µL de água livre de RNase, agitando-se levemente o fundo do tubo. As partículas foram capturadas usando-se o suporte magnético, e o material eluído (RNAm) foi transferido para um tubo estéril. Foi feita uma nova eluição com 150 µL de água livre de RNase e ambos os eluatos foram combinados no mesmo tubo, totalizando um volume de 250 µL.

3.2.2.5 Análise e quantificação do RNA mensageiro

A quantificação e análise do RNAm foram realizadas, respectivamente, por espectrofotometria e por eletroforese em condição desnaturante do mesmo modo descrito para o RNA total (etapa 3.2.1.3).

3.3 ESTRATÉGIA 1: SÍNTESE E AMPLIFICAÇÃO DE cDNA POR RT-PCR

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando-se o *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega, EUA), de acordo com instruções do fabricante. Esse sistema usa a enzima transcriptase reversa e uma série de outros reagentes (descritos abaixo) para sintetizar uma fita de DNA complementar (cDNA) ao RNA molde através de uma reação em cadeia de polimerase (PCR).

3.3.1 Combinação de RNAm-*Primer* e desnaturação

Os *primers* utilizados nesta etapa foram fornecidos no sistema ImProm-II™, a saber: Oligo(dT)₁₅, que se liga à cauda poli(A⁺) do RNAm, e hexâmeros randômicos, que se ligam a regiões internas ao RNA.

Em um tubo previamente resfriado, foram adicionados 1 µL de *primer* (0,5 µg/µL) e 9 µL de RNAm. Este foi incubado a 70 °C por cinco minutos e imediatamente colocado em gelo por cinco minutos. O material retido na parede do tubo foi coletado com uma breve centrifugação (*spin*) por dez segundos e o tubo foi mantido em gelo.

3.3.2 Transcrição reversa (RT-PCR)

Em um tubo previamente resfriado, foram combinados 1 µL de água DEPC, 4 µL de tampão de reação ImProm-II™ 5X, 2 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂) 25 mM, 1 µL de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) 10 mM, 1 µL de *Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor* (Promega, EUA) e 1 µL de transcriptase reversa ImProm-II™, totalizando uma reação 10 µL.

Em seguida, foram acrescidos os 10 µL da mistura RNA-*primer* (etapa 3.3.1). O material foi incubado em termociclador (MJ Research PTC-200) a 25 °C por cinco minutos para pareamento do *primer*, 42 °C por uma hora para extensão da cadeia e 70 °C por 15 minutos para inativação da transcriptase reversa.

3.3.3 Amplificação por PCR

Em tubos estéreis mantidos em gelo, foram combinados 14,5 µL de água DEPC, 2 µL de tampão de reação *Green GoTaq®* 5X (Promega, EUA), 0,4 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,2 µL de dNTPs 10 mM, 0,4 µL de *primer* senso (SE) 10 µM, 0,4 µL de *primer* antissenso (AS) 10 µM (ver Tabela 3), 0,1 µL de *GoTaq® DNA Polymerase* (5 U/µL) (Promega, EUA) e 2 µL de cDNA fita simples (etapa 3.3.2), totalizando 20 µL por reação. Os tubos foram transferidos para o termociclador pré-aquecido a 95 °C.

Os parâmetros utilizados para a reação foram: 95 °C por cinco minutos para desnaturação inicial; 24 ciclos de 95 °C por 50 segundos (desnaturação), 48 °C por 45 segundos (pareamento do *primer*) e 72 °C por um minuto (extensão da cadeia). A

reação foi encerrada com uma extensão final a 72 °C por oito minutos, sendo posteriormente mantida a 4 °C.

3.3.3.1 Oligonucleotídeos (“primers”) utilizados

A amplificação dos cDNAs fita simples foi feita utilizando-se *primers* específicos (porém degenerados), desenhados com base em sequências disponíveis na literatura para genes que codificam moléculas da imunidade inata em alguns cnidários (Apêndice B; Anexos A, B e C). Foram selecionadas sequências para lectina do tipo C (CTL), lectina ligante de manose (MBL) e componente 3 (C3) do sistema complemento (Tabela 3).

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos cDNAs fita simples (Estratégia 1). As letras em negrito indicam as bases degeneradas. SE – *Primer Senso*; AS – *Primer Antissenso*.

NOME	SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS	ORGANISMOS
CTL-SE	5'-ACT SGG MGG AGA CCT GGT-3' (S : G ou C; M : A ou C)	<i>Pocillopora damicornis</i> <i>Nematostella vectensis</i>
CTL-AS	5'-CAA GGS AGR TCA TTC CAG T-3' (S : G ou C; R : A ou G)	
MBL-SE	5'-TGG CAA AGA TCA ACA GCA AGG A-3'	<i>Acropora millepora</i>
MBL-AS	5'-TCA CAG ACC TCA TCA TTC CAA T-3'	
C3-SE	5'-ACS GGD TGT GGY GAG CAA AC-3' (S : G ou C; D : A, G ou T; Y : C ou T)	<i>Swiftia exserta</i> <i>Nematostella vectensis</i>
C3-AS	5'-GTT TGC TCR CCA CAH CCS GT-3' (R : A ou G ; H : A, C ou T; S : G ou C)	

Um *primer* degenerado é desenhado e sintetizado a partir do alinhamento de uma série de sequências praticamente idênticas, cujas bases diferem em uma ou mais posições. Na sequência final do *primer*, as posições que tiverem múltiplas alternativas de bases serão indicadas por letras (bases degeneradas) que representam um tipo de variação específica (por exemplo, ver tabela 3).

3.3.4 Análise do cDNA

Um gel de agarose 1,5% foi carregado com 5 µL da amostra de cDNA acrescidos de 3 µL de *loading dye* 6X. A eletroforese foi realizada a 100 V em tampão TAE 1X e a visualização das bandas feita com brometo de etídio (10 mg/mL) em transiluminador de luz UV. As imagens foram registradas por câmera fotográfica digital acoplada a filtro laranja.

3.4 ESTRATÉGIA 2: CONSTRUÇÃO E *SCREENING* DA BIBLIOTECA DE cDNA

A construção de uma biblioteca parcial de cDNA foi realizada utilizando-se o *Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit* (Clontech, EUA), de acordo com instruções do fabricante (Figura 9).

Esse sistema usa um primer oligo(dT) modificado (CDS III/3' PCR Primer) que atua na síntese da primeira fita, e um oligo (SMART IV) que serve como um pequeno molde no terminal 5' do RNAm.

Após pareamento do *primer*, a síntese da primeira fita é iniciada. Quando a enzima transcriptase reversa atinge a região 5' do RNAm, adiciona alguns nucleotídeos extras (primariamente deoxicitidina) à região 3' do cDNA. O Oligo SMART IV, que possui uma sequência de oligo(G) na porção 3', se liga às deoxicitidinas adicionais, criando um molde estendido. A enzima troca de molde e continua replicando até o final do oligonucleotídeo.

O cDNA de fita simples possui, então, a região 5' completa do RNAm, bem como a sequência complementar ao Oligo SMART IV, o qual serve como um sítio de pareamento “universal” nas subseqüentes amplificações por reação de polimerase em cadeia de longa distância (LD-PCR).

Apenas os cDNAs que apresentam essas características são amplificados, eliminando as chances de contaminação por outros tipos de produtos. Isso permite a obtenção de uma biblioteca final rica em cDNAs de tamanho completo.

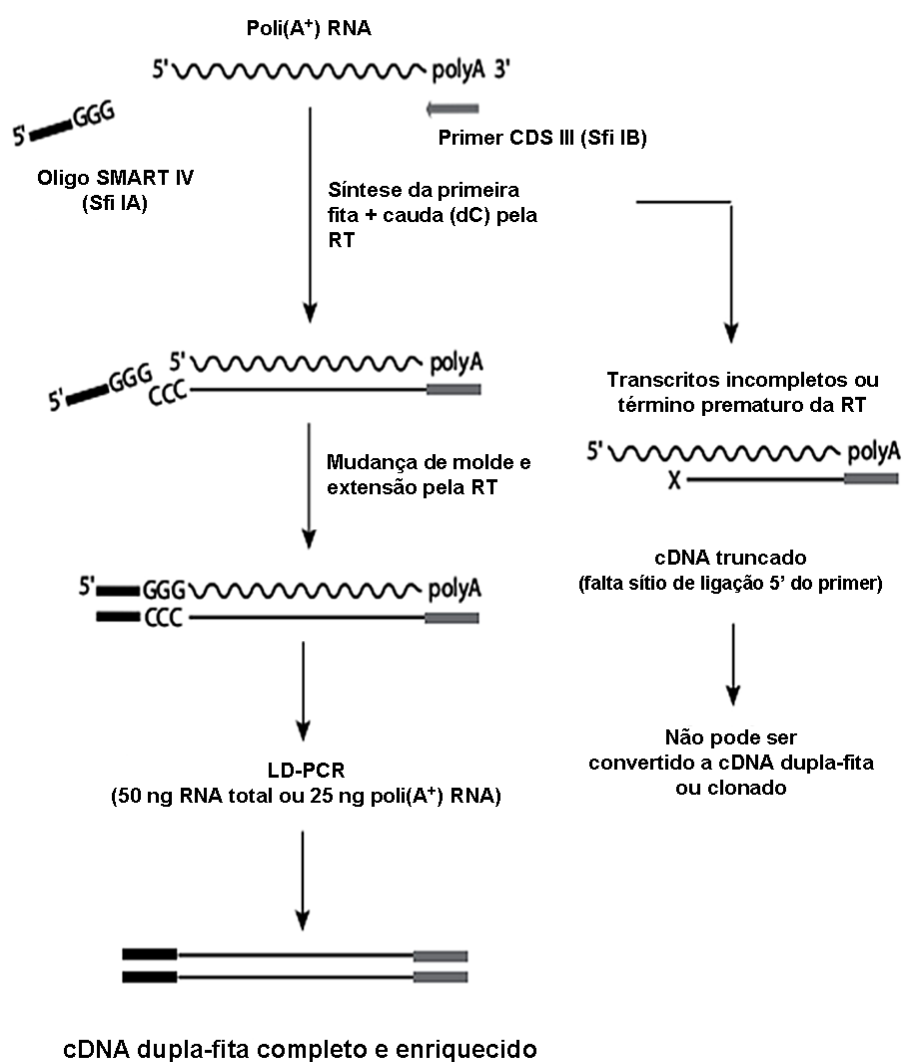


Figura 9: Esquema de síntese de cDNA através do sistema SMART™. RT: Transcriptase Reversa; dC: deoxicitidina. (Fonte: Clontech, com modificações)

3.4.1 Síntese de cDNA

3.4.1.1 Síntese da primeira fita de cDNA

Em um microtubo (capacidade: 0,5 mL) estéril previamente resfriado, foram combinados 3 µL de RNAm (etapa 3.2.2.4), 1 µL do oligonucleotídeo SMART IV 10 µM e 1 µL de CDS III/3' PCR Primer 10 µM (Tabela 4).

Para o controle positivo, foram utilizados 5 µL de *Control Poly A⁺ RNA* (placenta humana, 1 µg/µL), acrescido de 1 µL dos *primers* acima mencionados.

Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados na síntese da primeira fita de cDNA (Estratégia 2).

NOME	SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS
SMART IV	5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC ATT ACG GCC GGG-3'
CDC III / 3' PCR	5'-ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG-d(T) ₃₀ N₁N -3' (N = A, G, C ou T; N ₁ = A, G ou C)

Fonte: *Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit User Manual* (Clontech, EUA).

O material foi homogeneizado e brevemente centrifugado (*spin*). Os tubos foram incubados a 72 °C por dois minutos, depois mantidos em gelo por mais dois minutos e em seguida novamente centrifugados.

Foram adicionados 2 µL de tampão de reação 5X, 1 µL de ditioneitol (DTT) 20 mM, 1 µL de dNTPs 10 mM e 1 µL de transcriptase reversa *PowerScript™*, totalizando um volume de 10 µL. O material foi homogeneizado e brevemente centrifugado (*spin*). Os tubos foram incubados a 42 °C por uma hora em termociclador com tampa aquecida e posteriormente colocados em gelo para finalização da síntese da primeira fita.

3.4.1.2 Amplificação do cDNA por LD-PCR

Em um novo microtubo previamente resfriado, foram combinados 2 µL do cDNA sintetizado (etapa 3.4.1.1), 80 µL de água deionizada, 10 µL de tampão de reação *Advantage® 2 PCR Buffer* 10X (Clontech, EUA), 2 µL de dNTPs 50X, 2 µL de 5' PCR *Primer* 10 µM, 2 µL de CDS III/3' PCR *Primer* 10 µM (Tabela 5) e 2 µL de *Advantage® 2 Polymerase Mix* 50X (Clontech, EUA), totalizando um volume de 100 µL.

Após homogeneização e breve centrifugação, o material foi transferido ao termociclador o qual foi previamente aquecido a 95 °C. A LD-PCR foi realizada sob os seguintes parâmetros: 95 °C por um minuto; e 23 ciclos a: 95 °C por 15 segundos e 68 °C por seis minutos.

Ao final do processo, os amplicons (produtos de PCR) foram analisados por eletroforese a 100 V em gel de agarose 1,1% com brometo de etídio (10 mg/mL) e tampão TAE 1X. O gel foi carregado com 5 µL da amostra de cDNA e 3 µL do

marcador de DNA 1 kb (0,1 µg), ambos acrescidos de 1 µL de *loading dye* 6X. A visualização foi feita em transiluminador de luz UV acoplado à câmera digital.

Tabela 5: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do cDNA por LD-PCR.

NOME	SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS
5' PCR	5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3'
CDS III / 3' PCR	5'-ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG-d(T) ₃₀ N ₋₁ N-3' (N = A, G, C ou T; N ₋₁ = A, G ou C)

Fonte: *Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit User Manual* (Clontech, EUA).

3.4.1.3 Digestão com proteinase K

Em um tubo de PCR estéril, foram aliquotados 50 µL dos cDNAs dupla-fita amplificados (etapa 3.4.1.2) e adicionados 2 µL de proteinase K (20 µg/µL). O material restante foi estocado a -20 °C.

Após homogeneização e breve centrifugação (*spin*), o tubo foi incubado a 45 °C por 20 minutos e novamente centrifugados (*spin*). Foram adicionados 50 µL de água deionizada e posteriormente 100 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamil (25:24:1), homogeneizando-se por inversão durante dois minutos.

O material foi centrifugado a 5478 x g por cinco minutos para separação das fases. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, ao qual foram adicionados 100 µL de clorofórmio:álcool isoamil (24:1), seguido de homogeneização por inversão durante dois minutos.

Após centrifugação (5478 x g, cinco minutos) recuperou-se o sobrenadante, ao qual foram adicionados 10 µL de acetato de sódio 3 M (pH 4,8), 1,3 µL de glicogênio (20 µg/µL) e 260 µL de etanol 95%. O material foi imediatamente centrifugado a 5478 x g por 20 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado com pipeta e o precipitado de cDNA foi lavado com 100 µL de etanol 80%. Os tubos foram deixados abertos para evaporação do etanol residual. O precipitado foi ressuspenso em 79 µL de água deionizada.

3.4.1.4 Digestão com Sfi I

Em um novo microtubo, foram adicionados 79 µL de cDNA (etapa 3.4.1.3), 10 µL de tampão Sfi 10X, 10 µL de enzima Sfi I (20 U/µL) e 1 µL de BSA 100X, totalizando um volume de 100 µL. O material foi homogeneizado e incubado a 50 °C por duas horas. Foram adicionados 2 µL de corante xileno cianol 1%, seguido de homogeneização.

3.4.1.5 Fracionamento de cDNA por tamanho

O fracionamento de cDNA foi feito em coluna cromatográfica *CHROMA SPIN-400 Column*. A coluna foi invertida várias vezes até a completa ressuspensão da matriz, sendo usada também uma pipeta de 1 mL para a mesma finalidade, tomando-se o cuidado para retirar quaisquer bolhas formadas.

A coluna foi aberta, fixada em suporte e deixada gotejar para que todo o tampão de armazenamento passasse através da mesma até que a superfície exposta da matriz estivesse na marca de 1 mL na parede da coluna. Foi assegurado que o fluxo fosse de aproximadamente uma gota a cada 40-60 segundos, sendo cada gota equivalente a um volume aproximado de 40 µL.

Após a completa eliminação do tampão de armazenamento, cuidadosamente foram adicionados 700 µL do tampão de coluna pela parede da mesma, deixando-o gotejar naturalmente até completa eliminação.

Em seguida, foram adicionados cerca de 100 µL de cDNA digerido (etapa 3.4.1.4) à superfície da matriz, no centro, esperando-se até que a amostra fosse completamente absorvida. O tubo que continha o cDNA foi lavado com 100 µL de tampão de coluna e esse conteúdo foi então colocado sobre a superfície da matriz. Deixou-se a coluna gotejar até que não houvesse líquido sobre a matriz.

Foram nomeados 16 tubos de polipropileno (capacidade: 1,5 mL), os quais foram ordenados em uma estante posicionada abaixo da coluna para coleta das frações. À coluna foram adicionados 600 µL de tampão de coluna e imediatamente frações de uma gota começaram a ser coletadas individualmente em cada tubo.

O perfil das frações foi analisado em gel de agarose 1,1% com brometo de etídio (10 mg/mL). Foram utilizados 3 µL de cada fração e 1 µL de marcador de DNA 1 kb. A eletroforese foi realizada a 100 V por dez minutos e as bandas foram visualizadas em transiluminador UV acoplado à câmera digital.

As quatro primeiras frações que continham cDNA foram misturadas em um novo tubo, totalizando um volume de aproximadamente 140 µL. Foram adicionados 14 µL de acetato de sódio 3 M (pH 4,8), 1,3 µL de glicogênio (20 mg/mL) e 350 µL de etanol 95% a -20 °C. O tubo foi gentilmente homogeneizado por inversão e mantido a -20 °C por 16 horas.

Após centrifugação (5478 x g, 20 minutos) à temperatura ambiente, o sobrenadante foi completamente removido. O precipitado foi então ressuspenso em 7 µL de água deionizada.

3.4.2 Ligação do cDNA dupla-fita ao vetor plasmidial pDNR-LIB

Com a finalidade de garantir uma razão ótima entre as quantidades de cDNA e de vetor usadas na construção da biblioteca, foram realizadas três diferentes ligações (A, B, C) (Tabela 6). O vetor utilizado foi o pDNR-LIB (Figura 10), digerido com Sfi IA e Sfi IB.

Tabela 6: Ligações usando três diferentes razões entre cDNA e o vetor pDNR-LIB.

COMPONENTES	Ligações (µL)		
	A	B	C
cDNA	0,5	1	1,5
pDNR-LIB (0,1 µg/µL)	1	1	1
Tampão de ligação 10X	0,5	0,5	0,5
ATP (10 mM)	0,5	0,5	0,5
T4 DNA Ligase (400 U/µL)	0,5	0,5	0,5
Água deionizada	2	1,5	1
Volume total (µL)	5	5	5

Fonte: *Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit User Manual* (Clontech, EUA).

Em tubos previamente nomeados (capacidade: 0,5 mL), foram adicionados os componentes de cada reação conforme descrito na tabela 6. Os reagentes foram homogeneizados, evitando-se a formação de bolhas.

Após breve centrifugação (*spin*), os tubos foram incubados a 16 °C por 16 horas. Em cada um deles foram adicionados 95 µL de água DEPC estéril, seguidos de 1,5 µL de glicogênio. Após homogeneização, foram adicionados 280 µL de etanol 95% gelado. Os tubos foram homogeneizados por inversão e mantidos a -70 °C por duas horas.

O material foi centrifugado a 6289 x g por 20 minutos à temperatura ambiente. O etanol foi cuidadosamente removido e os tubos foram deixados abertos para secagem dos precipitados. Cada um destes foi ressuspendido em 5 µL de água DEPC estéril.

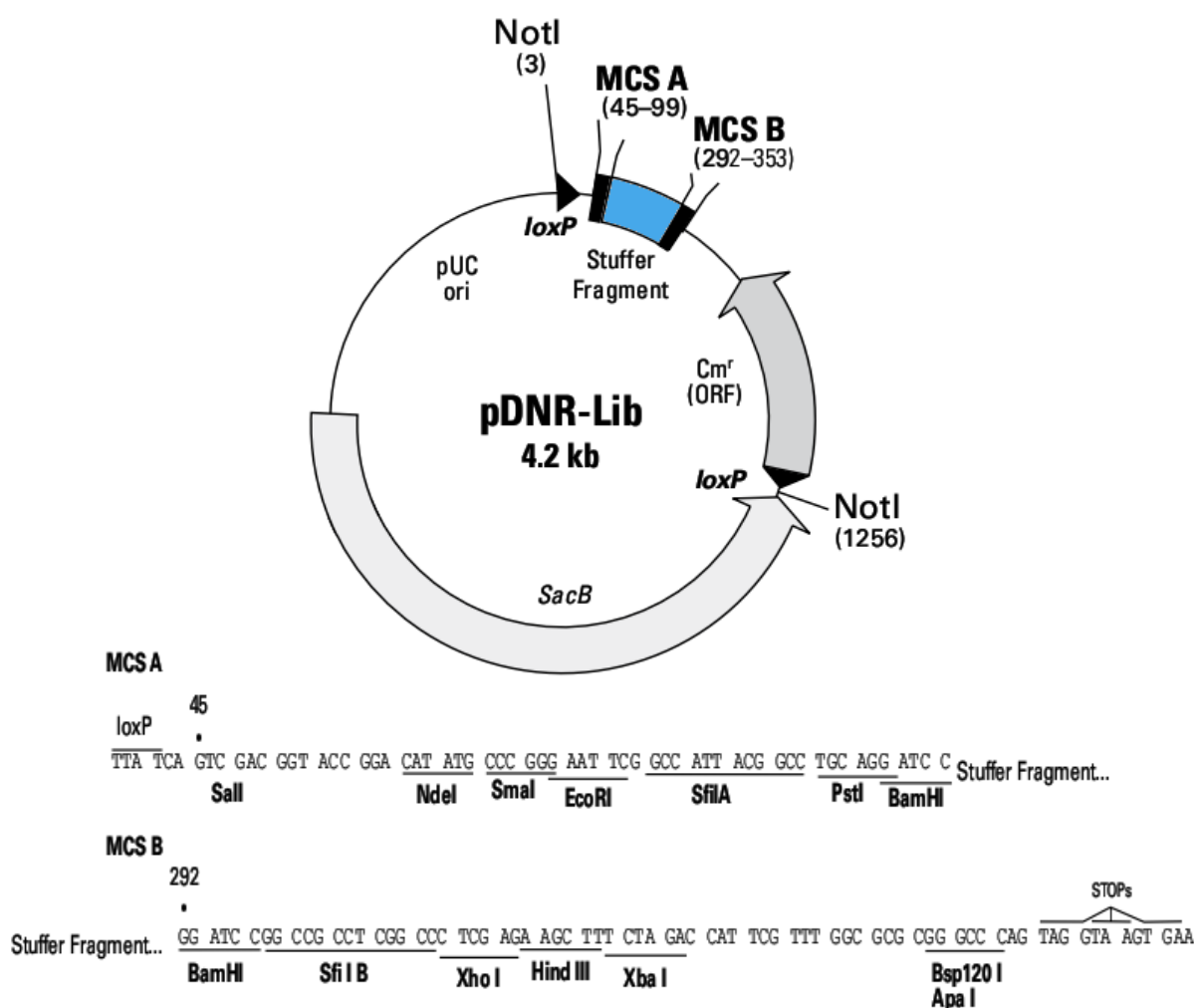


Figura 10: Mapa do vetor pDNR-LIB usado para construção da biblioteca de cDNA SMARTTM. São indicados os sítios múltiplos de clonagem (MCS) e de restrição, bem como os genes contidos. A área em azul representa um fragmento a ser substituído pelo inserto de cDNA. (Fonte: Clontech, com modificações)

3.4.3 Transformação de células de *Escherichia coli* NovaBlue

3.4.3.1 Preparação de células eletrocompetentes

A metodologia para o preparo das células foi feita segundo Seidman e colaboradores (2003), com modificações.

Uma colônia de *Escherichia coli* da linhagem NovaBlue (Novagen, EUA) foi inoculada em 3 mL de meio Luria-Bertani (LB) e então submetida a crescimento sob agitação (150 rpm) a 37 °C durante 18 horas.

Em seguida, 2,5 mL dessa cultura foram inoculados em 250 mL de meio LB e as células foram deixadas crescer sob agitação (200 rpm) a 37 °C. O crescimento das culturas foi monitorado em espectrofotômetro até que estas atingissem uma densidade óptica (DO_{600nm}) entre 0,5~0,7.

As células foram resfriadas em gelo por dez a 15 minutos e transferidas para tubos de polipropileno (capacidade: 50 mL) previamente resfriados. Foi realizada uma centrifugação a 4000 x g por 15 minutos a 4 °C em uma centrífuga Excelsa 4 280R (Fanem, Brasil). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspensionado em 5 mL de água gelada estéril.

Adicionaram-se mais 250 mL de água gelada estéril e, após homogeneização, o material foi centrifugado a 4000 x g por 15 minutos a 4 °C. Desprezou-se o sobrenadante rapidamente e o precipitado foi ressuspensionado no líquido remanescente. Esses procedimentos foram repetidos uma segunda vez.

O precipitado foi ressuspensionado no líquido remanescente e em seguida transferido para tubos de polipropileno (capacidade: 50 mL) previamente resfriados. Foram adicionados 20 mL de glicerol 10% resfriado e após homogeneização, o material foi centrifugado (4000 x g, 10 minutos, 2 °C). As células foram novamente suspensas em glicerol 10%.

Uma alíquota de 200 µL foi transferida para tubos de microcentrífuga previamente resfriados e o material foi estocado a -80 °C até a etapa de transformação.

3.4.3.2 Transformação por eletroporação

O processo de eletroporação consiste em aplicar sobre as células bacterianas um pulso elétrico de alta voltagem em um curto espaço de tempo. Este pulso faz com que as células mudem sua conformação, havendo uma formação transitória de poros na sua membrana, os quais permitem a entrada dos plasmídeos recombinantes (SHIGEKAWA; DOWER, 1988, citado por SEIDMAN et al., 2003).

As células eletrocompetentes foram transferidas de -80 °C a um recipiente contendo gelo para que descongelassem e se mantivessem resfriadas. Foram adicionados 25 µL dessas células em cada um dos três tubos contendo a reação de ligação (etapa 3.4.2) e em dois outros tubos para os controles.

O controle positivo do método foi feito transformando-se células eletrocompetentes com uma solução contendo 100 ng de um plasmídeo intacto (pUC19), enquanto o controle negativo foi feito com células competentes eletroporadas sem DNA.

Após homogeneização, os materiais foram separadamente transferidos para uma cubeta previamente resfriada, os quais foram submetidos a um pulso de 2500 mV durante cinco milissegundos no eletroporador (*MicroPulser electroporation apparatus*, BioRad, EUA). Em seguida, foram transferidos completamente para cinco tubos de polipropileno (capacidade: 14 mL), os quais continham 970 µL de meio LB cada. Os tubos foram incubados sob agitação (225 rpm) a 37 °C por uma hora.

Foram nomeados outros cinco tubos de polipropileno (capacidade: 1,5 mL), aos quais foram adicionados 50 µL de meio LB. Ao final da incubação, 1 µL de cada transformação foi adicionado ao tubo correspondente contendo meio LB, seguido de homogeneização. Os volumes restantes da transformação foram estocados a 4 °C.

Alíquotas de 50 µL foram distribuídas em placas (90 mm) contendo meio LB-ágar acrescido de cloranfenicol (30 µg/mL). Após um período de espera de dez minutos para absorção do inóculo, as placas foram invertidas e incubadas em estufa a 37 °C por 18 horas.

3.4.3.3 Porcentagem de clones e tamanho médio dos insertos de cDNA

A porcentagem de clones recombinantes foi determinada por contagem do número de unidades formadoras de colônias (cfu) para cada transformação (A, B e C). O tamanho médio dos insertos de cDNA foi verificado através de PCR Colony usando um par de *primers* flanqueadores do inserto para o vetor pDNR-LIB, denominados M13 senso e antissenso (Clontech, EUA) (Tabela 7).

Tabela 7: *Primers* universais M13 para o vetor pDNR-LIB utilizados para determinação da porcentagem de clones recombinantes após transformação de células de *Escherichia coli* NovaBlue por eletroporação. SE = senso; AS = antissenso.

NOME	SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS
M13 – SE	5'–CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3'
M13 – AS	5'–TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C-3'

De cada transformação, foram selecionadas 15 colônias isoladas com auxílio de palitos estéreis, as quais foram inoculadas individualmente em microtubos (capacidade: 1,5 mL) contendo 50 µL de água. Os tubos foram incubados a 95 °C por cinco minutos para lisar as células e liberar os plasmídeos.

As reações de amplificação foram preparadas utilizando-se 2,5 µL de lisado de colônias, 3 µL de tampão de reação *Green GoTaq* 5X (Promega, EUA), 0,6 µL de dNTPs 10 mM, 0,3 µL de *primer* M13-SE 10 µM, 0,3 µL de *primer* M13-AS 10 µM, 0,08 µL de *GoTaq DNA polimerase* (5 U/µL) (Promega, USA) e água deionizada estéril para completar um volume final de reação de 15 µL.

Em um termociclador (MJ Research PTC-200) com tampa aquecida, as amostras foram submetidas a um ciclo inicial a 94 °C por 30 segundos; 30 ciclos a: 94 °C por 30 segundos e 68 °C por três minutos; e um ciclo final a 68 °C por cinco minutos. Foi feita uma eletroforese para análise de 5 µL dos amplicons em um gel de agarose 1,2% e tampão TAE 1X, com marcador de DNA 1 kb.

Se pelo menos dez dos 15 clones contivessem inserto, as transformações poderiam ser combinadas de modo a formar a biblioteca de cDNA original e não amplificada. Após a combinação, a biblioteca foi mantida a 4 °C até a etapa de amplificação.

3.4.4 Titulação da biblioteca de plasmídeos

Inicialmente, placas contendo meio seletivo LB-cloranfenicol (LB-Cm) foram incubadas a 37 °C por uma hora.

Foram então preparadas duas diluições da biblioteca para se proceder com a titulação. Para a diluição A (1:10³), uma alíquota de 1 µL da biblioteca foi adicionada em um tubo (capacidade: 1,5 mL) contendo 1 mL de meio LB, sendo em seguida homogeneizado. A diluição B (1:10⁶) foi feita usando-se 1 µL da diluição A, o qual foi adicionado em um tubo contendo 1 mL de meio LB, sendo em seguida homogeneizado. As diluições foram então plaqueadas.

Para a diluição A, foram combinados 1 µL desta diluição e 50 µL de meio LB. Após homogeneização, todo o conteúdo foi distribuído em uma placa contendo LB-Cm pré-aquecida.

Para a diluição B, foram utilizadas duas alíquotas, 50 µL e 100 µL, as quais foram diretamente distribuídas em duas placas distintas (LB-Cm, pré-aquecidas).

As placas foram mantidas à temperatura ambiente por 20 minutos para completa absorção do inóculo, sendo em seguida invertidas e incubadas a 37 °C por 18 horas. O número de colônias foi contado a fim de se determinar o título em unidades formadoras de colônias por mililitro (cfu/mL). Este foi calculado da seguinte forma:

- **Diluição A:**

Número de colônias da diluição A $\times 10^3 \times 10^3$

- **Diluição B:**

(Número de colônias da diluição B $\div$ volume de plaqueamento) $\times 10^3 \times 10^3 \times 10^3$

3.4.5 Amplificação das bibliotecas de plasmídeos

A biblioteca foi diretamente plaqueada em meio seletivo LB-Cm. Procurou-se utilizar uma alta densidade de modo que as colônias resultantes alcançassem entre 20000 a 30000 cfu por placa (150 mm), a fim de se obter pelo menos o dobro do número de clones independentes presentes na biblioteca original.

Os inóculos foram distribuídos na superfície das placas até que todo o líquido fosse absorvido. As placas foram mantidas à temperatura ambiente por 20 minutos, sendo em seguida incubadas a 37 °C por 18 horas.

Foram adicionados 5 mL de meio LB acrescido de glicerol 25% na superfície de cada placa. As colônias foram raspadas e ressuspensas nesse líquido, sendo então combinadas em um único recipiente.

Após homogeneização, cinco alíquotas de 1 mL foram separadas e mantidas a -80 °C caso uma reamplificação se fizesse necessária. O restante da cultura foi dividido em alíquotas de 50 mL, das quais uma foi utilizada para *screening* da biblioteca, sendo as demais mantidas a -80 °C.

3.4.6 *Screening* da biblioteca (PCR Colony)

Uma alíquota de 50 µL foi distribuída em uma placa (90 mm) contendo meio LB-ágar acrescido de cloranfenicol (30 µg/mL). Após um período de espera de dez minutos para absorção do inóculo, a placa foi invertida e incubada em estufa a 37 °C por 18 horas.

Com auxílio de um palito estéril, colônias isoladas foram retiradas da placa e inoculadas individualmente em tubos contendo 15 µL de meio LB acrescido de ampicilina (50 mg/mL) (LB-Amp).

Foram preparadas reações de amplificação utilizando-se 3 µL de tampão de reação 5X, 1,2 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,3 µL de dNTPs 10 mM, 1,5 µL de *primer* M13-SE 2 µM, 1,5 µL de *primer* M13-AS 2 µM (Tabela 7), 0,075 µL de *GoTaq[®] DNA Polymerase* (5 U/µL), 1 µL do molde (colônia inoculada) e 6,425 µL de água destilada e deionizada estéril para completar um volume final de 15 µL por reação.

Os parâmetros seguidos foram: desnaturação inicial a 95 °C por três minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 50 segundos, associação do *primer* a 50 °C por 50 segundos e extensão da cadeia a 72 °C por um minuto; e uma extensão final a 72 °C por oito minutos.

Foi feita uma eletroforese para análise de 5 µL dos amplicons em um gel de agarose 1% e tampão TAE 1X, com marcador de DNA 1 kb. A eletroforese foi realizada a 100 V e a visualização das bandas feita com brometo de etídio

(10 mg/mL) em transiluminador de luz UV. As imagens foram registradas por câmera fotográfica digital acoplada a filtro laranja.

Os clones positivos (com inserto) foram propagados sob agitação (150 rpm) em 3 mL de meio LB contendo ampicilina (50 mg/mL) (LB-Amp), a 37 °C por 18 horas. Foram preparados estoques dessas culturas adicionando-se 500 µL de células crescidas e 500 µL de glicerol 50%, os quais foram mantidos a -80 °C. O restante do material foi destinado à lise alcalina.

3.4.7 Extração dos plasmídeos

A extração dos plasmídeos foi realizada pelo método de lise alcalina (ENGEBRECHT; BRENT; KADERBHAI, 2003), com modificações.

Em tubos de polipropileno, foram adicionados 1,5 mL das culturas propagadas na etapa anterior. Seguiu-se uma centrifugação a 14676 x g por um minuto. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido em 100 µL de solução GTE, sendo deixado em repouso à temperatura ambiente por 5 minutos.

Foram adicionados 200 µL da solução de lise NaOH/SDS preparada imediatamente antes do uso. Após homogeneização, o material foi mantido em gelo por cinco minutos.

Em seguida, foram adicionados 150 µL de acetato de potássio 5 M (pH 4,8), agitando-se os tubos em vórtex por dez segundos. Os mesmos foram mantidos em gelo por cinco minutos.

Seguiu-se uma centrifugação a 14676 x g por três minutos a 4 °C, a fim de precipitar restos celulares e DNA cromossomal. O sobrenadante foi transferido para novos tubos de polipropileno estéreis (capacidade: 1,5 mL) aos quais foram acrescentados 800 µL de etanol 95%. O material foi mantido à temperatura ambiente por dois minutos para precipitação dos ácidos nucleicos e em seguida centrifugado a 14676 x g por um minuto, à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% e posteriormente secado a vácuo no aparelho *SpeedVac Concentrator* a 30 °C por cinco minutos. O precipitado foi ressuspendido em 30 µL de tampão TE 1X. Foi acrescentado 1 µL de RNase (10 µg/µL) em cada tubo.

O material foi incubado sob agitação (150 rpm) a 37 °C por 40 minutos, quantificado através de leitura em espectrofotômetro a 260 nm e posteriormente estocado a -20 °C.

A etapa de lise alcalina foi verificada por eletroforese a 100 V em gel de agarose a 1% e tampão TAE 1X. O gel foi carregado com 5 µL das amostras, acrescidas de 1 µL de *loading dye* 6X, e marcador de DNA 1 kb. A visualização das bandas foi feita com brometo de etídio (10 mg/mL) em transiluminador de luz UV acoplado à câmera digital.

3.4.8 Amplificação dos plasmídeos purificados

A partir dos plasmídeos purificados na etapa anterior, foram preparadas reações de amplificação utilizando-se 3 µL de tampão de reação 5X, 1,2 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,3 µL de dNTPs 10 mM, 1,5 µL de *primer* M13-SE 2 µM, 1,5 µL de *primer* M13-AS 2 µM (Tabela 7), 0,075 µL de *GoTaq[®] DNA Polymerase* (5 U/µL), 1 µL do molde (plasmídeo purificado) e 6,425 µL de água destilada e deionizada estéril para completar um volume final de 15 µL por reação.

Os parâmetros seguidos foram: desnaturação inicial a 95 °C por três minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 50 segundos, associação do *primer* a 50 °C por 50 segundos e extensão da cadeia a 72 °C por um minuto; e uma extensão final a 72 °C por oito minutos.

3.5 SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO DE NUCLEOTÍDEOS

3.5.1 Purificação das amostras de cDNA

Previamente ao sequenciamento, as amostras de cDNA (etapas 3.3.3 e 3.4.8) foram purificadas e quantificadas. A purificação foi feita de acordo com instruções

para o sistema *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, EUA), a fim de remover excessos de *primers* e nucleotídeos.

3.5.1.1 Amplificação por PCR e recorte das bandas do gel

Inicialmente, foram preparadas reações de amplificação de 100 µL, combinando-se 20 µL de tampão de reação *Green GoTaq 5X*, 2 µL de dNTPs 10 mM, 2 µL de $MgCl_2$ 25 mM, 2 µL de *primer* senso 10 µM, 2 µL de *primer* antissenso³ 10 µM, 4 µL do produto de PCR, 0,5 µL de *GoTaq[®] DNA Polymerase* (5 U/µL) e 67,5 µL de água livre de nucleases.

Os parâmetros seguidos foram: desnaturação inicial a 95 °C por três minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 50 segundos, associação do *primer* a 50 °C por 50 segundos e extensão da cadeia a 72 °C por um minuto; e uma extensão final a 72 °C por oito minutos.

Todo o conteúdo das reações de amplificação (100 µL) foi aplicado em gel de agarose a 1% e submetido a eletroforese a 100 V em TAE 1X. A visualização das bandas feita com brometo de etídio (10 mg/mL) em transiluminador de luz UV acoplado à câmera digital.

Para cada fragmento a ser isolado, foram nomeados e pesados microtubos (capacidade: 1,5 mL). As bandas de interesse foram recortadas diretamente do gel com auxílio de uma lâmina de bisturi e colocadas individualmente em cada tubo. Estes foram novamente pesados para determinação do peso da banda de gel.

Foi adicionada aos tubos a solução de ligação da membrana em uma razão de 10 µL de solução para cada 10 mg da banda de gel de agarose. Os tubos foram homogeneizados em vórtex e incubados entre 50 °C e 65 °C até que o gel estivesse completamente dissolvido. Seguiu-se uma breve centrifugação (*spin*) para coletar o conteúdo no fundo do tubo.

³ Os *primers* utilizados nessa etapa encontram-se listados na tabela 3 (para amplicons obtidos na estratégia 1) e na tabela 7 (para amplicons obtidos na estratégia 2).

3.5.1.2 Purificação do cDNA por centrifugação

As bandas dissolvidas foram transferidas para colunas *SV Minicolumn* acopladas a tubos coletores. Após incubação à temperatura ambiente por um minuto, o conjunto foi submetido à centrifugação a 16000 x g por um minuto. Os tubos coletores foram retirados para descarte do líquido coletado, sendo em seguida acoplados novamente às minicolunas.

As colunas foram lavadas adicionando-se 700 µL da solução de lavagem da membrana (previamente diluída com 15 mL etanol 95%). O sistema foi novamente centrifugado a 16000 x g por um minuto, descartando-se o líquido coletado. Foi feita uma nova lavagem com 500 µL da solução, seguida de centrifugação a 16000 x g por cinco minutos e descarte do líquido coletado. Os tubos foram centrifugados por mais um minuto com tampa aberta para completa evaporação do etanol residual.

As minicolunas foram transferidas para novos microtubos (capacidade: 1,5 mL), às quais foram adicionadas 50 µL de água livre de nucleases. Após incubação à temperatura ambiente por um minuto, as amostras foram centrifugadas (16000 x g; um minuto). As colunas foram descartadas e o material coletado foi armazenado a -20 °C.

3.5.2 Quantificação dos cDNAs

A concentração dos cDNAs obtidos foi determinada por espectrofotometria, através do cálculo de absorbância para os comprimentos 260 nm e 280 nm em amostra diluída contendo 5 µL de cDNA e 95 µL de água DEPC estéril.

Alíquotas de 5 µL de cDNA foram utilizadas para carregar um gel de agarose 2%. A eletroforese foi realizada a 100 V e tampão TAE 1X e a visualização das bandas feita com brometo de etídio (10 mg/mL) em transiluminador de luz UV. As imagens foram registradas por câmera fotográfica digital acoplada a filtro laranja.

3.5.3 Reação de sequenciamento e injeção das amostras

O sequenciamento de nucleotídeos foi realizado pelo Centro de Estudos do Genoma Humano (Instituto de Biociências – USP, <http://genoma.ib.usp.br/servicos/sequenciamento.php>), utilizando o sistema *BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, EUA).

Reações de 10 µL preparadas para cada clone foram dispostas em uma placa de 96 poços. As reações foram feitas utilizando 2 µL de *BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Mix*, 1 µL de *BigDye[®] Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer*, 1 µL de *primer*⁴ (5 µM), X µL do produto de PCR⁵ (Figura 11) e água ultrapura para completar o volume final.

O controle de qualidade das reações foi feito utilizando-se o pGEM[®]-3Zf(+) e o *primer* M13 (-21), fornecidos já prontos para uso pelo próprio kit de sequenciamento.

A placa foi selada, homogeneizada e levada ao termociclador, sendo submetida a 96 °C por um minuto e 25 ciclos a: 96 °C por dez segundos, 50 °C por cinco segundos e 60 °C por quatro minutos, finalizando a 4 °C. Ao final do processo, a placa foi envolta em papel alumínio, pois os reagentes ali contidos são fotossensíveis.

Posteriormente à reação, o cDNA foi purificado através de precipitação com Etanol/EDTA. Após breve centrifugação da placa (*spin*), foram adicionados a cada poço 2,5 µL de EDTA 125 mM e 30 µL de etanol 100%. A placa foi selada e homogeneizada por inversão quatro vezes.

Após incubação à temperatura ambiente por 15 minutos, o material foi centrifugado a 3000 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão rápida da placa, a qual foi invertida e novamente centrifugada a 185 x g.

Foram adicionados 30 µL de etanol 70% a cada poço, seguindo-se uma centrifugação 1650 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e a

⁴ Para o sequenciamento, foram utilizados os mesmos *primers* da etapa de amplificação dos fragmentos (tabela 3 e tabela 7).

⁵ A quantidade de produto de PCR (em nanogramas) a ser adicionada em cada reação varia de acordo com o tamanho do fragmento (ver figura 11).

placa foi novamente invertida e centrifugada a 185 x g por um minuto.

Ao término do processo, foram adicionados 10 µL de solução de formamida (*injection buffer*) para ressuspensão do cDNA.

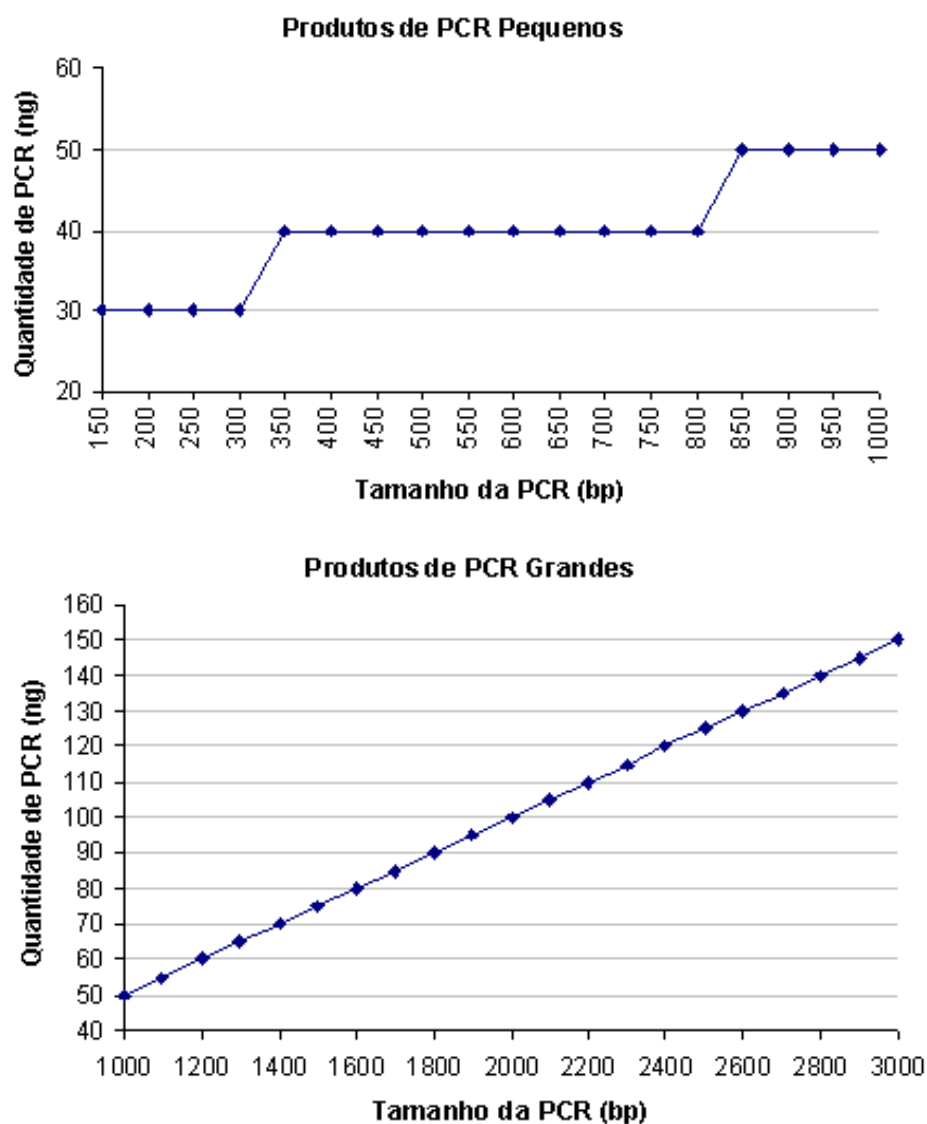


Figura 11: Relação entre o tamanho do fragmento a ser sequenciado e a quantidade de produto de PCR necessária para a reação. (Adaptado de: http://genoma.ib.usp.br/servicos/pop_pcr-opA.htm)

O equipamento utilizado para o sequenciamento foi o ABI 3730 *DNA Analyser* (Applied Biosystems, EUA), que realiza uma eletroforese por capilaridade utilizando o polímero POP-7™.

Inicialmente foi realizada uma pré-corrida com água miliQ estéril para lavagem dos capilares. A injeção das amostras foi feita com uma carga de 1,2 kV durante 15 segundos e a corrida foi realizada a 8,5 kV durante 2450 segundos.

3.5.4 Análise das sequências de nucleotídeos

Os dados obtidos diretamente do sequenciador foram analisados pelo *software Sequencing Analysis* 5.3.1, utilizando o *Base Caller KB*.

As sequências nucleotídicas foram salvas em formato FASTA (arquivo de texto) e em seguida traduzidas *in silico* por uso das ferramentas disponíveis pelo *Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB, <http://www.expasy.ch/tools>).

Ambas as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos foram comparadas com um banco de dados de genes e proteínas mantido pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através da ferramenta BLAST.

Foi utilizada também a ferramenta CLUSTAL W 2.0.12 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) para alinhamento múltiplo das sequências.

3.6 ENSAIO DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL PARA CTL

Nessa etapa, foi feita uma comparação da expressão do gene codificador da CTL entre colônias sadias e branqueadas de *P. caribaeorum*, usando-se a técnica de RT-PCR.

Os métodos para extração do RNA total a partir dos tecidos sadio e branqueado foram feitos conforme descritos na etapa 3.2.1, usando o reagente TRIzol® (Invitrogen, EUA) de acordo com instruções do fabricante.

A primeira fita de cDNA foi preparada a partir de 1 µg de RNA total utilizando-se o *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega, EUA), conforme detalhado nas etapas 3.3.1 e 3.3.2. O produto dessa reação foi posteriormente diluído (1:10).

Em seguida, foi realizada uma reação de PCR convencional utilizando os *primers* CTL-SE, como iniciador senso, e Q0 (interno a QT), como iniciador antissenso (Tabela 8).

Em tubos estéreis mantidos em gelo, foram combinados 20 µL de água DEPC, 2 µL de tampão de reação *Green GoTaq®* 5X (Promega, EUA), 0,4 µL de

MgCL₂ 25 mM, 0,2 µL de dNTPs 10 mM, 0,4 µL de *primer* CTL-SE 10 µM, 0,4 µL de *primer* QT 10 µM (ver Tabela 8), 0,1 µL de *GoTaq® DNA Polymerase* (5 U/µL) (Promega, EUA) e 1,5 µL de cDNA fita simples, totalizando 25 µL por reação. Os tubos foram transferidos para o termociclador pré-aquecido a 95 °C.

Tabela 8: *Primers* utilizados no ensaio de expressão diferencial do gene CTL para amostras de tecidos sadios e branqueados de *Palythoa caribaeorum*. As letras em **negrito** indicam as bases degeneradas e as regiões sublinhadas correspondem à sequência do *primer* Q0, interno a QT.

NOME	SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS
CTL – SE	5'-ACT SGG MGG AGA CCT GGT-3' (S : G ou C; M : A ou C)
QT – IDT*	5'- <u>CAGTGAGCAGAGTGACGAGG</u> ACTCGAGCTCAAGC(T ₁₈)-3'
QT – IVG*	5'- <u>CAGTGAGCAGAGTGACGAGG</u> ACTCGAGCTCAAGC(T ₁₈)-3'
Q0	5'- <u>CCAGTGAGCAGAGTGACGA</u> -3'

* Mesma sequência de *primer*, apenas fabricantes diferentes: IDT – *Integrated DNA Technologies* (EUA); IVG – *Invitrogen Life Technologies* (EUA)

Um gel de agarose 1,5% foi carregado com 5 µL da amostra de cDNA acrescidos de 3 µL de *loading dye* 6X. A eletroforese foi realizada a 100 V em tampão TAE 1X e a visualização das bandas feita com brometo de etídio (10 mg/mL) em transiluminador de luz UV.

As imagens foram registradas por câmera fotográfica digital acoplada a filtro laranja. Em seguida, foram analisadas usando-se a função *gel analysis* do programa *ImageJ*, versão 1.43u (*National Institutes of Health*, EUA), através do qual as áreas correspondentes às bandas foram selecionadas e quantificadas por densitometria.

Os valores obtidos (em *pixels*) foram utilizados no programa *Excel* 2003 da *Microsoft Corporation* para calcular a diferença (em porcentagem) dos níveis de expressão de CTL entre colônias sadias e branqueadas, através da fórmula:

$$=(A2-A1)/ABS(A1)$$

Onde:

A1 = valor da área das bandas referentes às colônias sadias

A2 = valor da área das bandas referentes às colônias branqueadas

ABS = função do *Excel* para retornar o valor absoluto de um número

3.7 NORMATIZAÇÃO DO TEXTO

A estruturação do trabalho foi realizada segundo as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) para apresentação do texto (NBR 14724:2005), numeração das seções (NBR 6024:2003), citações (NBR 10520:2002), referências (NBR 6023:2002), resumo (NBR 6028:2003) e sumário (NBR 6027:2003).

Para as tabelas, foram utilizadas as normas recomendadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1993).

O texto foi elaborado utilizando-se o programa *Word* 2003 da *Microsoft Corporation*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 QUALIDADE E QUANTIFICAÇÃO DO RNA

Através de eletroforese em gel de agarose, a qualidade do RNA total extraído foi verificada pela integridade das subunidades do RNA ribossomal: a banda referente à subunidade 28S deve ter aproximadamente o dobro da intensidade da banda 18S (*RNA: a guide to analytical gels*, QIAGEN, p. 1). No gel também pode ser visualizado um arraste típico que corresponde ao RNA mensageiro e ao RNA transportador (Figura 12a).

Uma vez purificado a partir do RNA total, o RNAm se apresenta como uma mancha difusa no gel (Figura 12b) que corresponde a inúmeros transcritos de diferentes tamanhos. Por esse motivo não são observadas bandas individualizadas.

As amostras de RNA foram diluídas (1:10) e então quantificadas por espectrofotometria (Tabela 9). A concentração do RNA total nas amostras foi de 546,8 µg/mL (ou 546,8 ng/µL), enquanto a concentração do RNAm foi de 10 µg/mL (ou 10 ng/µL). Esses dados foram utilizados para o cálculo de reagentes nas etapas seguintes.

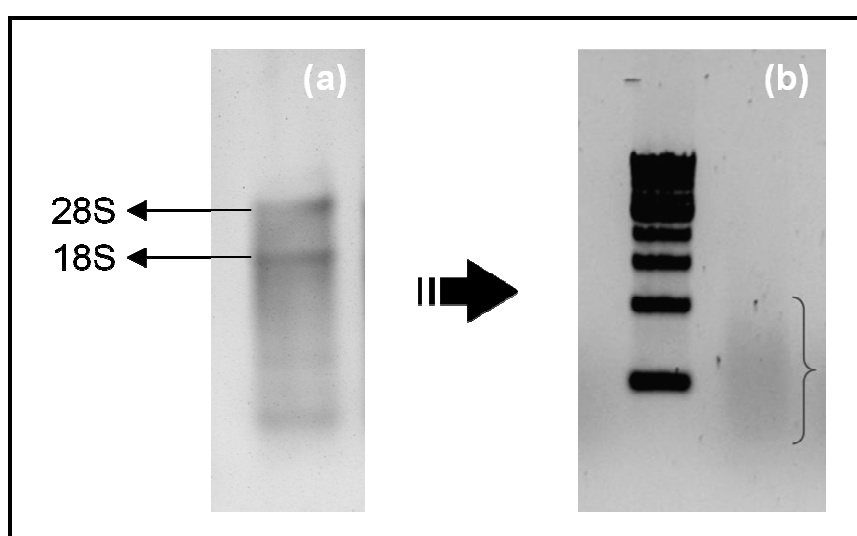


Figura 12: Gel de eletroforese em condição desnaturante para os RNAs obtidos de *Palythoa caribaeorum*. **A** - RNA total: as setas indicam as bandas correspondentes às subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal; **B** - RNA mensageiro purificado a partir do RNA total: em destaque, o arraste característico correspondente aos inúmeros transcritos de RNAm de diferentes tamanhos.

Tabela 9: Quantificação dos RNAs total e mensageiro por espectrofotometria de luz ultravioleta.

RNA	A _{260nm}	A _{280nm}	Concentração*	Ratio (A _{260nm} / A _{280nm})
Total	1,367	0,675	546,8 µg/mL	2,025
Mensageiro	0,025	0,017	10 µg/mL	1,47

* Concentração = (A_{260nm} / 0,025) x Diluição

No processo de busca por moléculas bioativas, são inúmeros os métodos disponíveis, cada qual enriquecendo os resultados de uma maneira diferente. Com a finalidade de maximizar os resultados almejados, foram utilizadas duas estratégias distintas para síntese de cDNA.

Na metodologia descrita para o sistema *Improm-II*TM (estratégia 1), a síntese de cDNA é feita diretamente a partir do RNA mensageiro por uma reação de PCR acoplada à transcriptase reversa (RT-PCR). Por sua vez, aquela referente ao sistema *SMART*TM (estratégia 2) usa adaptadores acrescidos às sequências para garantir a qualidade do cDNA produzido, importante na construção de uma biblioteca permanente.

4.2 ESTRATÉGIA 1: SÍNTESE E AMPLIFICAÇÃO DE cDNA POR RT-PCR

Nesta etapa, foram utilizados *primers* hexâmeros randômicos e Oligo(dT)₁₅ para síntese de cDNA. Uma vez que o cDNA é sintetizado a partir de um RNAm molde, as bandas dispostas no gel também formam um rastro, correspondendo aos fragmentos de diferentes tamanhos (Figura 13).

A partir de sequências de genes disponíveis na literatura para os cnidários *Nematostella vectensis*, *Pocillopora damicornis*, *Acropora millepora* e *Swiftia exserta*, foram sintetizados *primers* para investigar a expressão de três elementos da imunidade inata em *Palythoa caribaeorum*, a saber: complemento C3, lectina do tipo C (CTL) e lectina ligante de manose (MBL) (Apêndice B; Anexos A, B e C).

Os cDNAs sintetizados foram amplificados por RT-PCR usando-se os *primers* específicos degenerados (Tabela 3). Dos três genes testados, apenas o complemento C3 e a CTL foram amplificados, sendo obtidos cinco clones dos quais

três foram sequenciados (Figura 14).

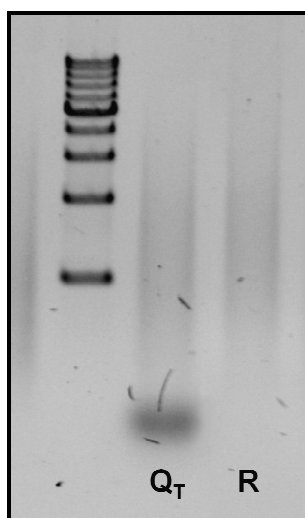


Figura 13: Síntese da primeira fita de cDNA por RT-PCR usando-se os *primers* Oligo(dT)₁₅ (**Q_T**) e hexâmeros randômicos (**R**) a partir do RNA mensageiro (Estratégia 1). Os rastros correspondem aos vários cDNAs de diferentes tamanhos.

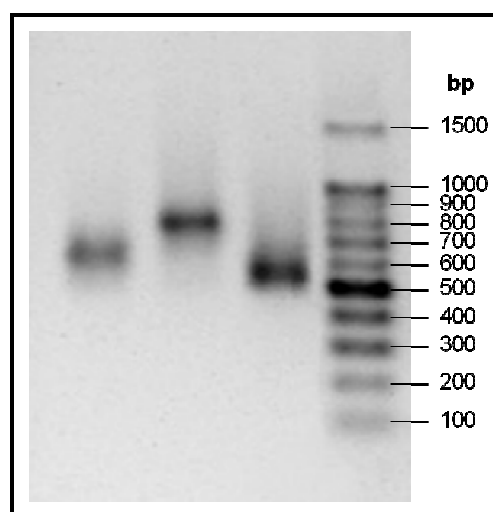


Figura 14: Amplicons de C3 e CTL de *Palythoa caribaeorum* obtidos na estratégia 1. Da esquerda para a direita: CTL-1, CTL-2, C3-1 e marcador 100 bp DNA ladder (Promega).

4.3 ESTRATÉGIA 2: CONSTRUÇÃO E *SCREENING* DA BIBLIOTECA DE cDNA

Para a segunda estratégia, a síntese de cDNA foi feita com os *primers* SMART IV e CDS III/3' PCR *Primer*. Novamente, os rastros no gel são referentes aos vários tamanhos de cDNA obtidos a partir de um RNAm molde (Figura 15).

Seguiu-se o fracionamento por tamanho dos cDNAs através de cromatografia em coluna. Foram obtidas 16 frações, das quais quatro foram agrupadas conforme indicado na figura 16. Esse material foi então empregado para clonagem em vetores plasmidiais (pDNR-LIB) e para transformação de células bacterianas eletrocompetentes, que foram posteriormente utilizadas para a manutenção (estocagem) da biblioteca de cDNA.

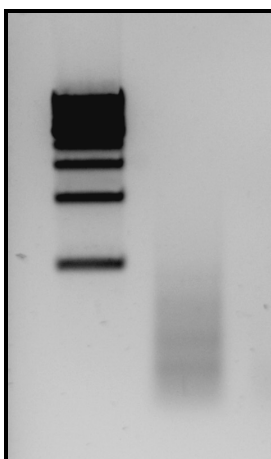


Figura 15: Síntese da primeira fita de cDNA por LD-PCR usando-se os *primers* SMART IV e CDS III/3' PCR Primer (Estratégia 2). O rastro corresponde aos vários cDNAs de diferentes tamanhos.

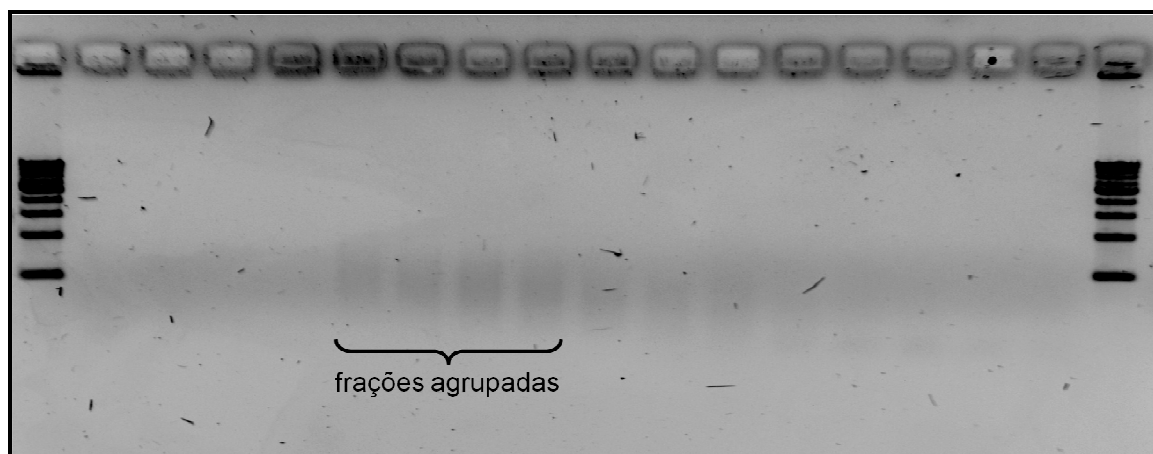


Figura 16: Fracionamento do cDNA por cromatografia em coluna. As quatro frações em destaque foram agrupadas.

Para que a biblioteca de cDNA representasse fielmente o grupo de genes expressos por *P. caribaeorum* nas condições particulares em que os tecidos foram coletados, era necessário obter pelo menos 10^6 cfu após as etapas de transformação. No entanto, a porcentagem dos clones recombinantes obtidos ficou

duas ordens de grandeza abaixo do esperado, resultando em 10^4 cfu. Esse resultado se deve possivelmente à incompatibilidade das células bacterianas utilizadas para clonagem. Dessa forma, assume-se que a biblioteca construída represente parcialmente o grupo de todos os genes expressos pelo cnidário.

A figura 17 mostra o perfil de distribuição dos insertos por tamanho na biblioteca, que varia entre 400 a 1500 pares de base.

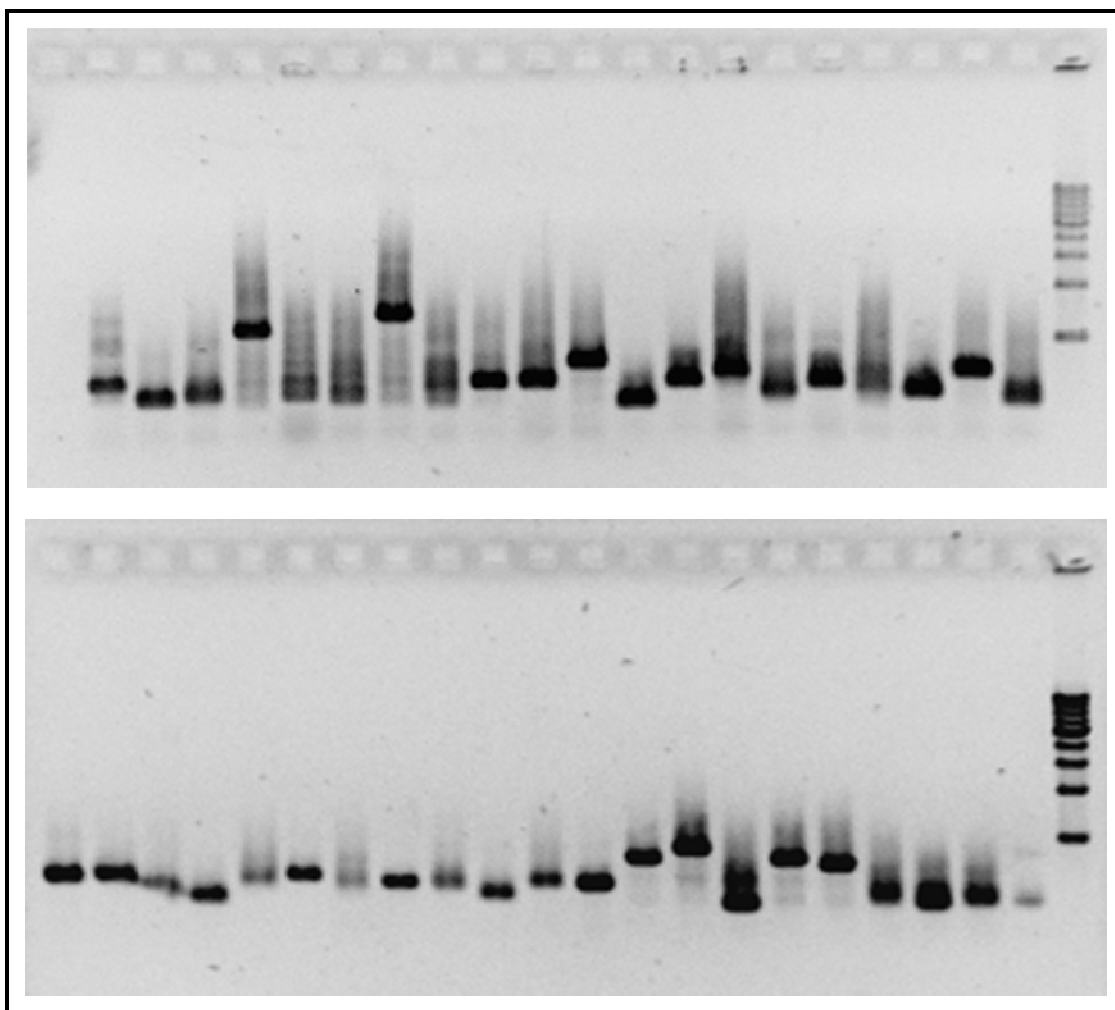


Figura 17: Distribuição de tamanhos de insertos clonados no vetor pDNR-LIB contidos na biblioteca parcial de cDNA de *Palythoa caribaeorum*. Marcador 1 kb (Promega).

A etapa seguinte consistiu no *screening* (triagem por homologia) da biblioteca parcial de cDNA por genes da imunidade inata através da técnica de PCR, usando um primer específico do gene (senso) e um do vetor pDNR-M13 (antissenso).

O sistema de seleção dos clones de interesse envolve um gene de resistência ao cloranfenicol (Cm^r) que está presente no vetor pDNR-LIB (Figura 10). Esse gene confere resistência às bactérias que receberam o plasmídeo e permite que cresçam

em meios acrescidos de Cm^r. Ao final do processo, foram obtidos seis clones dos quais cinco foram sequenciados (Figura 18).

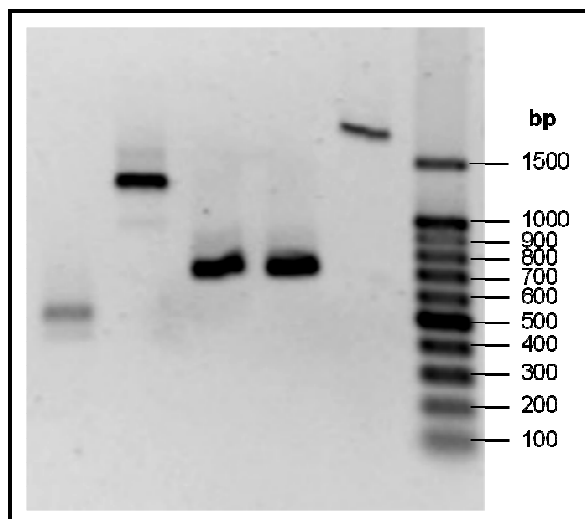


Figura 18: Amplicons de C3, CTL e MBL de *Palythoa caribaeorum* obtidos na estratégia 2. Da esquerda para a direita: C3-2, C3-3, MBL-1, MBL-2, CTL-3 e marcador 100 bp DNA ladder (Promega).

4.4 SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS

As duas estratégias utilizadas resultaram na amplificação de 11 clones, dos quais oito foram encaminhados ao sequenciamento por sempre amplificarem bem e por apresentarem banda única (Figuras 14 e 18). Ao todo são três clones do tipo CTL, três do tipo C3 e dois do tipo MBL. Os nomes e uma estimativa do tamanho dos amplicons podem ser visualizados na tabela 10.

Inicialmente, quando confrontadas com o banco de dados genéticos GenBank mantido pelo NCBI, nenhuma das oito sequências apresentou o resultado esperado, possivelmente devido à contaminantes dos produtos de PCR⁶.

No entanto, após uma análise utilizando as ferramentas de bioinformática para tradução virtual das sequências e blastp (ambas disponíveis no endereço ExPASy, mantido pelo SIB), foi identificado um domínio de 240 nucleotídeos (80

⁶ Em razão desses resultados, todos os amplicons obtidos foram clonados em plasmídeo pGEM T-easy (Promega, EUA) para fins de novo sequenciamento.

aminoácidos) (Figura 19) para o clone denominado C3-2. Esse domínio apresentou similaridade com duas sequências do banco de dados correspondentes a um receptor semelhante à imunoglobulina de células *Natural Killer* (KIR) de gorilas (Figura 20). Uma lista dos aminoácidos e suas abreviações pode ser visualizada no apêndice C.

Tabela 10: Amplicons encaminhados ao sequenciamento de nucleotídeos, seguidos de seus tamanhos aproximados em pares de base (pb). As diferentes cores agrupam os clones pelo tipo de gene.

ESTRATÉGIA 1		ESTRATÉGIA 2	
Amplicom	Tamanho	Amplicom	Tamanho
CTL-1	650 pb	C3-2	500 pb
CTL-2	800 pb	C3-3	1500 pb
C3-1	550 pb	MBL-1	750 pb
-	-	MBL-2	750 pb
-	-	CTL-3	2200 pb

↑

ATG	TTT	ATT	TCC	TCA	CGG	GAC	GGA	CCA	ACA
M	F	I	S	S	R	D	G	P	T
ACT	CGT	CKA	CCG	AGT	GCT	CTC	ACA	AGA	TTA
T	R	-	P	S	A	L	T	R	L
AGT	CTC	CAC	TGG	ACC	GGC	AGR	TGC	GTC	CCC
S	L	H	W	T	G	-	C	V	P
ACT	AAC	CYC	TCC	TTA	TTC	AAA	GAA	STG	AAA
T	N	-	S	L	F	K	E	-	K
CTC	TCT	TTT	CCC	ATA	CTA	CAC	TAT	TCT	ATT
L	S	F	P	I	L	H	Y	S	I
TTC	AAA	GGT	TCC	CAT	CTT	CCT	CAT	CCA	TTG
F	K	G	S	H	L	P	H	P	L
CAC	TTR	RAA	CCR	CAC	TGC	TTC	GCC	TTG	TCC
H	-	-	-	H	C	F	A	L	S
TTT	ATT	CTA	GTT	TCT	CYW	MCW	WCC	CAC	TCT
F	I	L	V	S	-	-	-	H	S

↓

Figura 19: Sequência parcial de um domínio relacionado ao receptor semelhante à imunoglobulina de células *Natural Killer* (KIR) obtido de *Palythoa caribaeorum*. As letras em vermelho indicam bases degeneradas – **K:** G,T; **R:** A,G; **Y:** C,T; **S:** G,C; **W:** A,T; **M:** A,C e marcadas em azul estão as bases correspondentes ao *primer* senso (KIR-SE) utilizado para amplificação desse fragmento. Abaixo de cada códon estão indicados os aminoácidos correspondentes obtidos por tradução *in silico*.

```

VIRT861          -----MFISSRDGPTRX-----PSALTRLSLHWGXCVP----TN
tr|Q7YRY8|Q7YRY8_9PRIM  MACVGFFLVQRACPHMRGQGKPFLSARPSAMVPRGGHVTLQCHYRGGFNN
tr|Q7YRY7|Q7YRY7_9PRIM  MACVGFFLVQRACPHMRGQGKPFLSAQPSAMVPRGGHVTLQCHYRGGFNN
                        *: . * * *          ***: . . * * * . *

VIRT861          XSLFKEXKLSFPILHYSIFKG-----
tr|Q7YRY8|Q7YRY8_9PRIM  FTLYKEDRIHVPIFHGRIFQGSFVMGPVTPAHAGTYRCRGSRPHSPTRWS
tr|Q7YRY7|Q7YRY7_9PRIM  FTLYKEDRIHVPIFHGRIFQGSFVMGPVTPAHAGTYRCRGSRPHSPTRWS
                        :*: ** :: .*: *  **:*

VIRT861          -----SHLPHPLHXXX-----
tr|Q7YRY8|Q7YRY8_9PRIM  VPSNPLVIMVTGVHRKPSLLALPGHLVKSEETVILQCWSDVMFEHFLHHR
tr|Q7YRY7|Q7YRY7_9PRIM  APSNPLVIMVTGVHRKPSLLALPGHLVKSEETVILQCWSDVMFEHFLHHR
                        * * . * *

VIRT861          -----HCFALSFILVSXXXHS-----
tr|Q7YRY8|Q7YRY8_9PRIM  EGKVEDTLRLIGELHDGVFKANFSIGPMTHVRAGTYRCYGSVPHFRYQLS
tr|Q7YRY7|Q7YRY7_9PRIM  EGKVEDTLRLIGELHDGVFKANFSIGPMTHVLAGTYRCYGSVPHFRYQLS
                        * * :: . *

VIRT861          -----
tr|Q7YRY8|Q7YRY8_9PRIM  APSDPLDIVITGLYEKPSLSAQPGPTVQAGESVTLSCSSRSSFHMYHLRS
tr|Q7YRY7|Q7YRY7_9PRIM  APSDPLDIVITGLYEKPSLSAQPGPTVQAGESVTLSCSSRSSIHMYHLRS

VIRT861          -----
tr|Q7YRY8|Q7YRY8_9PRIM  EGGAHERRLPAVRKVNRTFQADFPLGPATHGGTYRCFGSFRGLPYMWSNS
tr|Q7YRY7|Q7YRY7_9PRIM  EGGARERRLPAVRKVNRTFQADFPLGPATHRGTYRCFGSFRGLPYVWSNS

VIRT861          -----
tr|Q7YRY8|Q7YRY8_9PRIM  SDPLLVSVTGNPSSSWPSPTEPSSKSGIARHLHVLIGTSVVIFLFIILLF
tr|Q7YRY7|Q7YRY7_9PRIM  SDPLLVSVTG-----IARHLHVLIGTSVVIFLFIILLF

VIRT861          -----
tr|Q7YRY8|Q7YRY8_9PRIM  FLLYRWCSNKKNAAVTDQEPAGDRTVNRQDSDEQDPQEVTYAQLDHCVFT
tr|Q7YRY7|Q7YRY7_9PRIM  FLLYRWCSNKKNAAVTDQEPAGDRTVNRQDSDEQDPQEVTYAQLDHCVFI

VIRT861          -----
tr|Q7YRY8|Q7YRY8_9PRIM  QRKISRPSQRPKTPPTDTSVYTELPNAEPRSKVVS CPRAPQSGPEGIF
tr|Q7YRY7|Q7YRY7_9PRIM  QRKISRPSQRPKTPPTDTRVYTELPNAEPRSKVVS CPRAPQSGPEGIF

```

Figura 20: Alinhamento múltiplo (CLUSTAL W) entre a sequência de aminoácidos obtida de *Palythoa caribaeorum* (VIRT861) e duas outras que codificam um receptor semelhante à imunoglobulina de células *Natural Killer* (KIR) em gorila.

A sequência encontrada serviu então de molde para desenhar um *primer*-senso específico denominado KIR-SE (Figura 19), apresentando a sequência: 5'-ATG TTT ATT TCC TCA CGG GAC GGA-3'.

O KIR-SE foi utilizado em um novo *screening* da biblioteca parcial de *P. caribaeorum*, resultando na detecção de uma sequência de aproximadamente 350 pares de base (Figura 21). Esse fragmento foi amplificado, clonado em plasmídeo e

está em fase de conclusão da etapa de sequenciamento de nucleotídeos.

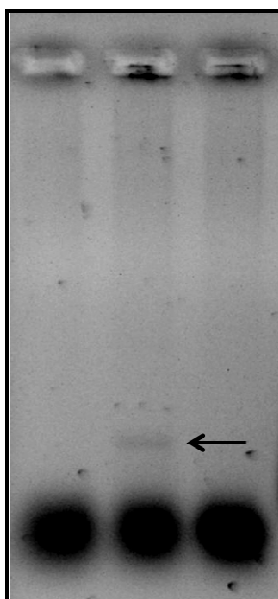


Figura 21: Primeira amplificação do domínio KIR obtido a partir da biblioteca parcial de cDNA de *Palythoa caribaeorum*.

Os receptores KIR são uma família de glicoproteínas transmembrana do tipo I, altamente polimórficas e pertencentes à família das imunoglobulinas (Ig) (DU PASQUIER, 2009). Em vertebrados, esses receptores agem reconhecendo moléculas de classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (MORETTA; MORETTA, 2004), as quais, quando expressas, impedem que células saudáveis sejam lisadas⁷.

Os KIRs estão relacionados às células NK, elementos da imunidade inata que atuam na destruição de células tumorais e infectadas por vírus. A função citolítica dessas células é regulada pela integração de sinais positivos e negativos recebidos através de receptores de superfície celular (dentre os quais estão os KIRs), que agem inibindo ou ativando as mesmas (CANNON et al., 2010; LANIER, 2001; MORETTA; MORETTA, 2004).

Por esse motivo essas moléculas têm sido amplamente investigadas, sobretudo no tocante à sua associação com doenças autoimunes e infecções virais (BOYTON; ALTMANN, 2007; WILLIAMS; BATEMAN; KHAKOO, 2005).

⁷ Tipicamente, células tumorais ou infectadas por vírus apresentam um baixo nível de MHC de classe I nas suas superfícies, e isso serve como sinalização ao organismo de que essas células precisam ser eliminadas (RADAEV; SUN, 2003).

Embora moléculas Ig sejam típicas de vertebrados, algumas moléculas Ig-semelhantes foram encontradas em invertebrados como esponjas (PANCER et al., 1998), moluscos (ZHANG et al., 2004), insetos (WATSON et al., 2005) e cnidários (NICOTRA et al., 2009).

Sabe-se também que moléculas MHC estão ausentes nos invertebrados, embora alguns organismos (como cnidários do gênero *Hydractinia*) apresentem reações de histocompatibilidade (LITMAN; CANNON; DISHAW, 2005).

A grande importância da obtenção de um domínio Ig em *P. caribaeorum* é o seu possível significado evolutivo para os receptores KIR, uma vez que os cnidários encontram-se na base dos metazoários, sugerindo que o surgimento dessas moléculas tenha sido anterior à origem dos vertebrados. Além disso, a presença desse domínio em um invertebrado constitui-se numa evidência a favor da existência de formas alternativas de imunidade antecipatória nesses organismos (LITMAN; CANNON; DISHAW, 2005).

O estudo comparativo entre os sistemas imunológicos de vertebrados e invertebrados fornece importantes dados sobre como o reconhecimento de reações imunes passou de uma condição generalizada para altamente específica, além de contribuir para a compreensão de como as interligações entre esses sistemas têm sido estabelecidas e mantidas.

4.5 ENSAIO DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL PARA CTL

O objetivo desse experimento foi comparar a expressão do gene CTL entre colônias saudáveis e branqueadas de *P. caribaeorum* através de uma reação de PCR convencional, com posterior análise das imagens dos géis pelo programa *ImageJ*.

Os resultados da RT-PCR demonstraram que houve uma diferença nos níveis de expressão de CTL (Figura 22), sendo esta aumentada em mais de 63% em colônias branqueadas (Figura 23; Tabela 11). Um detalhe interessante é que apesar de terem sido utilizados dois sistemas distintos (sistema 1: *primers* CTL-SE/QT-IDT e sistema 2: *primers* CTL-SE/QT-IVG) na realização da RT-PCR, os resultados mantiveram o mesmo padrão de aumento da expressão gênica.

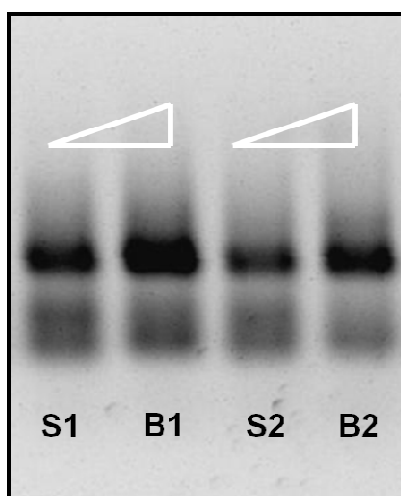


Figura 22: Ensaio de expressão diferencial de CTL entre colônias sadias e branqueadas de *Palythoa caribaeorum* realizado por PCR acoplado à transcrição reversa (RT-PCR). **S1** - Colônia sadia (*primers* CTL-SE / Q0 [QT-IDT]); **B1** - Colônia branqueada (*primers* CTL-SE / Q0 [QT-IDT]); **S2** - Colônia sadia (*primers* CTL-SE / Q0 [QT-IVG]); **B2** - Colônia branqueada (*primers* CTL-SE / Q0 [QT-IVG]).

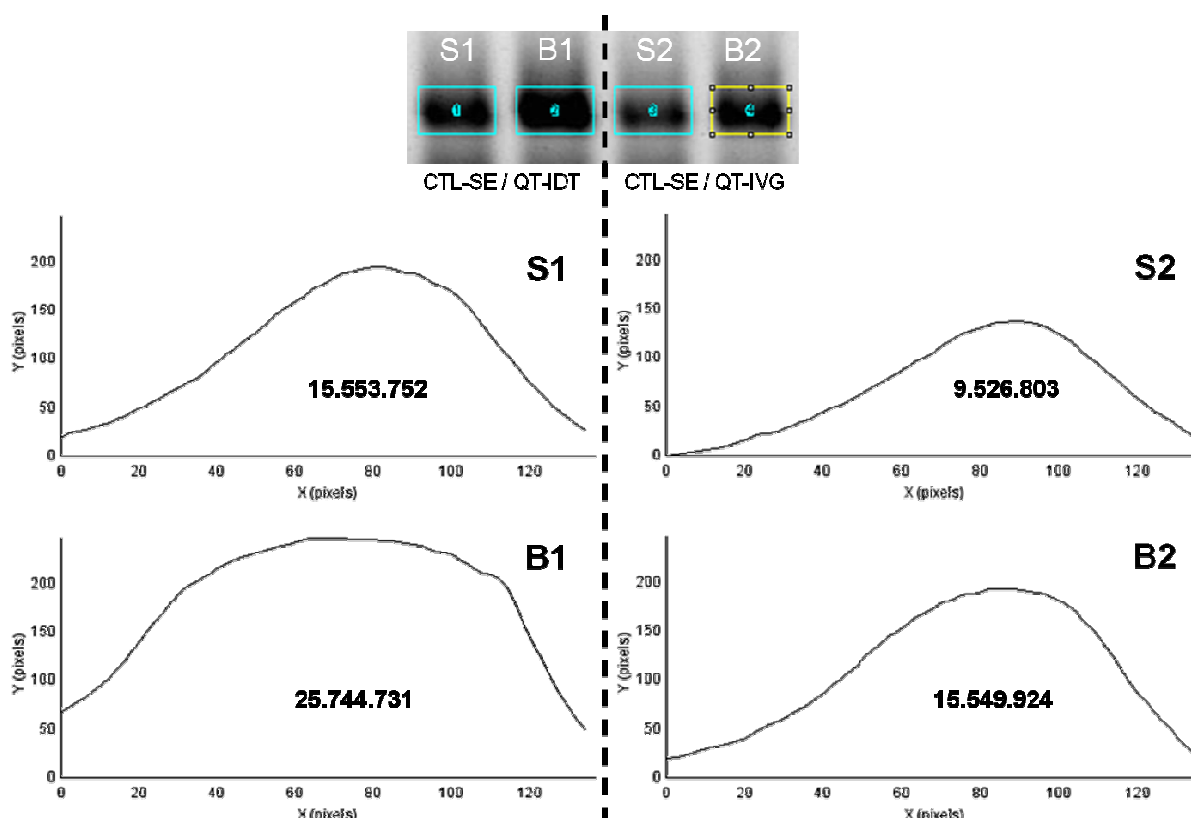


Figura 23: Curvas densitométricas resultantes da análise quantitativa das bandas referentes ao gel do ensaio de expressão diferencial da CTL, realizada através do programa *ImageJ*. São apresentados os valores correspondentes à área de cada gráfico (dada em *pixels*). **S1** - Colônia sadia (*primers* CTL-SE / Q0 [QT-IDT]); **B1** - Colônia branqueada (*primers* CTL-SE / Q0 [QT-IDT]); **S2** - Colônia sadia (*primers* CTL-SE / Q0 [QT-IVG]); **B2** - Colônia branqueada (*primers* CTL-SE / Q0 [QT-IVG]).

Tabela 11: Quantificação por densitometria das bandas referentes ao gel do ensaio de expressão diferencial da CTL, realizada através do programa *ImageJ*. São apresentados os valores correspondentes à área de cada banda (em *pixels*), bem como o resultado da diferença entre os valores (dada em porcentagem) para cada sistema. **S1** - Colônia sadia (*primers* CTL-SE / Q0 [QT-IDT]); **B1** - Colônia branqueada (*primers* CTL-SE / Q0 [QT-IDT]); **S2** - Colônia sadia (*primers* CTL-SE / Q0 [QT-IVG]); **B2** - Colônia branqueada (*primers* CTL-SE / Q0 [QT-IVG]).

BANDAS	ÁREA (<i>pixels</i>)	DIFERENÇA*
S1	15.553.752	65,52%
B1	25.744.731	
S2	9.526.803	63,22%
B2	15.549.924	

* Cálculo realizado no *Excel* (ver detalhes na seção 3.6 ENSAIO DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL PARA CTL).

Como já mencionado, as CTLs compõem uma família de lectinas cuja principal função é o reconhecimento de açúcares na superfície celular (MEYER-WENTRUP et al., 2005), participando assim de importantes processos celulares como o reconhecimento entre células de hospedeiros e simbioses (WOOD-CHARLSON; WEIS, 2009). Isso implica dizer que essas moléculas também estão envolvidas no fenômeno de branqueamento, como foi demonstrado em algumas pesquisas recentes.

Vidal-Dupiol e colaboradores (2009), em um estudo com colônias de *Pocillopora damicornis* submetidas a estresse térmico em condições laboratoriais, mostraram que um gene que continha um domínio CTL para manose estava envolvido na fase pré-branqueamento. Os autores verificaram que esse gene teve seus níveis de transcrição diminuídos durante o período de estresse, mantendo-se baixos durante o processo de branqueamento propriamente dito.

Uma possível interpretação para esses dados é que durante o período de estresse pré-branqueamento, a atuação de fatores intrínsecos ou extrínsecos inicialmente causaria em uma diminuição dos níveis de expressão de CTL, culminando em uma alteração na eficiência de recrutamento e de manutenção dos simbioses no tecido hospedeiro.

Entretanto, uma vez que o organismo já se encontra branqueado, a expressão de CTL poderia aumentar, conforme demonstrado por Seneca e colaboradores (2009). Em um estudo sobre mudanças de expressão gênica utilizando colônias de *Acropora millepora* em processo natural de branqueamento, esses pesquisadores demonstraram que um homólogo da CTL tinha sua regulação significativamente

aumentada como uma consequência do branqueamento. Curiosamente, os resultados do sequenciamento mostraram que esse homólogo apresentava uma alta similaridade à sequência previamente descrita por Vidal-Dupiol e colaboradores (2009), sugerindo a participação dessa molécula tanto antes quanto depois do branqueamento.

Assim como verificado por Seneca e colaboradores (SENECA et al., 2009), no presente trabalho foi observado um aumento da expressão de CTL em colônias já branqueadas. Esse resultado nos leva a refletir sobre a função de reconhecimento celular das lectinas em Cnidaria.

Vias de sinalização celular em cnidários sugerem que esses organismos respondem de forma similar tanto no reconhecimento de simbiontes quanto na formação de uma resposta imune a patógenos (DUNN; SCHNITZLER; WEIS, 2007). Sendo assim, após o branqueamento, os níveis de CTL poderiam ser aumentados como uma resposta do hospedeiro a duas realidades distintas:

- 1) Visto que alguns cnidários são capazes de se recuperar após o branqueamento, o aumento na expressão de CTL poderia estar envolvido no reconhecimento e recrutamento de novos simbiontes, os quais são selecionados da mesma espécie/linhagem ou de um grupo distinto (BAKER, 2001; LEWIS; COFFROTH, 2004);
- 2) Com a perda de simbiontes, o hospedeiro começa a “definhar” e se torna vulnerável à infecção (BOURNE et al., 2008; ROSENBERG; KUSHMARO, 2011; WEIL; ROGERS, 2011), apresentando grandes chances de mortalidade (DOUGLAS, 2003). O aumento na expressão de CTL seria então uma tentativa do hospedeiro de se proteger contra patógenos, evidenciando a função dessa molécula na defesa imunológica.

A grande maioria das doenças estudadas em cnidários refere-se àquelas descritas para corais (ROSENBERG; KUSHMARO, 2011; WEIL; ROGERS, 2011), tendo em vista sua grande importância nos recifes biogênicos. Para zoantídeos, além do branqueamento e de um crustáceo parasita pertencente à família Lauridae (GRYGIER, 1985), pouco se conhece sobre os fatores que podem afetar a integridade física desses organismos (ACOSTA, 2001).

Em *P. caribaeorum*, esses dados são ainda mais escassos, apesar de sua grande relevância ecológica e de ser o invertebrado sésil mais abundante nos recifes de arenito do litoral brasileiro (ACOSTA, 2001; ACOSTA; GONZÁLEZ, 2007; ACOSTA; SAMMARCO; DUARTE, 2001; BOSCOLO; SILVEIRA, 2005; CHAVES, 2006; FADLALLAH; KARLSON; SEBENS, 1984; PÉREZ; VILA-NOVA; SANTOS, 2005).

Em 2001, Acosta descreveu uma nova doença que acomete colônias de *P. caribaeorum* no litoral São Paulo, detectando ocorrências da mesma também no Rio de Janeiro e em Pernambuco. Essa doença possui uma relação direta com temperaturas elevadas e é caracterizada, entre outras coisas, por perda e alteração na coloração de tecidos, com visível diminuição na produção de muco. Embora o patógeno (possivelmente espécie-específico) não tenha sido isolado, o autor especula que bactérias sejam os causadores primários dessa infecção, e que fungos e outros organismos seriam invasores secundários.

Recentemente, foram isoladas de colônias de *P. caribaeorum* bactérias do gênero *Vibrio* (CHIMETTO et al., 2009; CHIMETTO et al., 2008; CHIMETTO et al., 2010; CHIMETTO et al., 2011). Esse gênero contém espécies que provocam doenças infecciosas em corais, incluindo dois patógenos que causam branqueamento, a saber: *V. shiloi* (que afeta *Oculina patagonica*) e *V. coralliilyticus* (que afeta *Pocillopora damicornis*) (ROSENBERG; KUSHMARO, 2011).

Do mesmo modo que observado por Acosta (2001), o sucesso da infecção nestes corais só foi observado em temperaturas elevadas (acima de 24 °C) (ROSENBERG; KUSHMARO, 2011). Esses dados ressaltam a interação entre fatores como micro-organismos patogênicos, estresse ambiental e enfraquecimento das defesas imunes inatas do hospedeiro como necessária para o desenvolvimento da doença (BOURNE et al., 2008; ROSENBERG; KUSHMARO, 2011; WEIL; ROGERS, 2011).

Por outro lado, vale ressaltar também que alguns víbrios podem estabelecer relações mutualísticas com corais, provendo a estes alguns nutrientes importantes ao seu metabolismo (CHIMETTO et al., 2008).

Chimetto e colaboradores (2008) demonstraram que bactérias do gênero *Vibrio* isoladas de alguns cnidários (dentre eles *P. caribaeorum*) são capazes de fixar nitrogênio, um nutriente muito importante para o metabolismo desses organismos. Esses dados sugerem que os víbrios isolados teriam um efeito positivo na saúde dos

hospedeiros, principalmente para aqueles que vivem em ambientes oligotróficos. No entanto, os autores alertam para a necessidade de pesquisas realizadas em aquários de modo a confirmar se as mesmas linhagens podem tanto fixar nitrogênio quanto causar infecções nos organismos.

Embora não tenhamos identificado a verdadeira causa do branqueamento das colônias de *P. caribaeorum* (se o mesmo ocorreu por disposição do hospedeiro ou por fatores extrínsecos), é possível que micro-organismos patogênicos estejam envolvidos nesse fenômeno. Contudo, seriam necessários estudos mais aprofundados para verificar a presença de representantes do gênero *Vibrio* nas colônias e qual sua participação no processo de branqueamento nas populações pernambucanas de *P. caribaeorum*, além de investigar de que modo a presença desses micro-organismos poderia influenciar a expressão de CTL.

Frente ao exposto, faz-se necessário o investimento em pesquisas de caráter multidisciplinar a fim de se desvendar os parâmetros bioquímicos e imunológicos que regem os processos de reconhecimento celular pelas lectinas em cnidários e quais as consequências da ação dessas moléculas em nível fisiológico e ecológico.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ecossistemas marinhos em todo o mundo estão ameaçados de desaparecer devido aos crescentes impactos causados por poluição, pesca predatória e mudanças climáticas.

Nos ambientes costeiros, e sobretudo nos recifes, uma das grandes consequências desses impactos é o aparecimento de doenças que afetam a integridade de cnidários bentônicos, comprometendo também a sobrevivência de uma gama de organismos que deles dependem, inclusive o homem.

Dessa forma, a caracterização de moléculas imunes em cnidários assume uma importância fundamental tanto na pesquisa de base quanto naquela aplicada.

Ao mesmo tempo em que fornece dados sobre o repertório imunológico ancestral dos animais e a evolução de suas reações imunes, esse tipo de investigação também contribui para uma série de aplicações de caráter científico e biotecnológico. Estas vão desde o monitoramento e conservação de espécies ameaçadas até bioprospecção para descoberta e desenvolvimento de compostos com emprego biotecnológico e farmacológico, além de estudos voltados ao tratamento e cura de doenças que acometem vertebrados superiores.

Nosso trabalho representou os primeiros passos de um programa de pesquisa mais amplo, direcionado ao estudo da imunidade e de processos ecológicos mediados quimicamente em Cnidaria. Além da conclusão do sequenciamento dos amplicons encontrados, sobretudo o domínio KIR, é de nosso interesse proceder com técnicas de hibridização *in situ* para identificar o local de expressão dos genes e inferir sobre funções dos mesmos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Section I: Introduction to the immune system. In: _____. **Cellular and Molecular Immunology**. 6. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007. cap. 1-3, p. 3-71.

ACEVEDO-SOTO, V. **Effects of sedimentation on the distribution and ecology of the reef zoanthid *Palythoa caribaeorum***. 2007. 83 f. Dissertação (conclusão do curso de mestrado em Ciências Marinhas) - Departamento de Ciências Marinhas, University of Puerto Rico, Mayagüez, 2007. Disponível em: <<http://grad.uprm.edu/tesis/acevedosoto.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2009.

ACOSTA, A. Disease in zoanthids: dynamics in space and time. **Hydrobiologia**, v. 460, p. 113-130, 2001.

ACOSTA, A.; GONZÁLEZ, A. M. Fission in the zoantharia *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing and Michelotii, 1860) populations: a latitudinal comparison. **Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras**, v. 36, p. 151-165, 2007.

ACOSTA, A.; SAMMARCO, P. W.; DUARTE, L. F. Asexual reproduction in a zoanthid by fragmentation: the role of exogenous factors. **Bulletin of Marine Science**, v. 68, n. 3, p. 363-381, 2001.

Advantage® 2 PCR Enzyme System User Manual. Clontech, EUA. Disponível em: <<http://www.clontech.com/images/pt/PT3281-1.pdf>>.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, p. 783-801, 2006.

ALVES, A. L.; GOMES, P. B. Variação sazonal na dieta do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria: Anthozoa) no litoral sul de Pernambuco. JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX, X., 2010. Recife: UFRPE. Disponível em: <<http://www.sigeventos.com.br/jepex/inscricao/resumos/0001/R0843-1.PDF>>.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Informação e documentação - citações em documentos - apresentação**: NBR 10520. Rio de Janeiro: ABNT, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Informação e documentação - referências - elaboração**: NBR 6023. Rio de Janeiro: ABNT, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Informação e documentação - numeração progressiva das seções de um documento escrito - apresentação**: NBR 6024. Rio de Janeiro: ABNT, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Informação e documentação - resumo - apresentação**: NBR 6028. Rio de Janeiro: ABNT, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Informação e documentação - sumário - apresentação**: NBR 6027. Rio de Janeiro: ABNT, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Informação e documentação - trabalhos acadêmicos - apresentação**: NBR 14724. Rio de Janeiro: ABNT, 2005.

BAKER, A. C. Reef corals bleach to survive change. **Nature**, v. 411, p. 765-766, 2001.

BAKER, A. C. Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: diversity, ecology, and biogeography of *Symbiodinium*. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 34, p. 661-689, 2003.

BARRETO, A. M. F.; ASSIS, H. M. B.; BEZERRA, F. H. R.; SUGUIO, K. Arrecifes, a calçada do mar de Recife, PE: importante registro holocênico de nível relativo do mar acima do atual. In: WINGE, M.;SCHOBENHAUS, C.;SOUZA, C. R. G.;FERNANDES, A. C. S.;BERBERT-BORN, M.;SALLUN FILHO, W.; QUEIROZ, E. T. (Eds.). **Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil**. 2010. Disponível em: <<http://www.unb.br/ig/sigep/sitio040/sitio040.pdf>>.

BELDA-BAILLIE, C. A.; BAILLIE, B. K.; MARUYAMA, T. Specificity of a model cnidarian-dinoflagellate symbiosis. **The Biological Bulletin**, v. 202, p. 74-85, 2002.

BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Applied Biosystems, EUA. Disponível em: <<http://corefac.imcb.a-star.edu.sg:8080/imcbdsf/protocols/BDv3.1Terminatorprotocol.pdf>>.

BOEHM, T. Quality control in self/nonself discrimination. **Cell**, v. 125, p. 845-858, 2006.

BOSCH, T. C. G. The path less explored: innate immune reactions in cnidarians. In: HEINE, H. (Ed.). **Innate immunity of plants, animals and humans**: nucleic acids and molecular biology. v. 21. Heidelberg: Springer, 2008. cap. 2, p. 27-42.

BOSCOLO, H. K.; SILVEIRA, F. L. Reproductive biology of *Palythoa caribaeorum* and *Protopalythoa variabilis* (Cnidaria, Anthozoa, Zoanthidea) from the southeastern coast of Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 65, n. 1, p. 29-41, 2005.

BOURNE, D.; IIDA, Y.; UTHICKE, S.; SMITH-KEUNE, C. Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event. **International Society for Microbial Ecology**, v. 2, p. 350-363, 2008.

BOYTON, R. J.; ALTMANN, D. M. Natural killer cells, killer immunoglobulin-like receptors and human leucocyte antigen class I in disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 149, p. 1-8, 2007.

CADAVID, L. F. Self-discrimination in colonial invertebrates: genetic control of allorecognition in the hydroid *Hydractinia*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, p. 871-879, 2004.

CANNON, J. P.; DISHAW, L. J.; HAIRE, R. N.; LITMAN, R. T.; OSTROV, D. A.; LITMAN, G. W. Recognition of additional roles for immunoglobulin domains in immune function. **Seminars in Immunology**, v. 22, p. 17-24, 2010.

CHANGYUN, W.; HAIYAN, L.; CHANGLUN, S.; YANAN, W.; LIANG, L.; HUASHI, G. Chemical defensive substances of soft corals and gorgonians. **Acta Ecologica Sinica**, v. 28, n. 5, p. 2320-2328, 2008.

CHAPMAN, J. A.; KIRKNESS, E. F.; SIMAKOV, O.; HAMPSON, S. E.; MITROS, T.; WEINMAIER, T.; RATTEI, T.; BALASUBRAMANIANA, P. G.; BORMAN, J.; BUSAM, D.; DISBENNETT, K.; PFANNKUCH, C.; SUMIN, N.; SUTTON, G. G.; VISWANATHAN, L. D.; WALENZ, B.; GOODSTEIN, D. M.; HELLSTEN, U.; KAWASHIMA, T.; PROCHNIK, S. E.; PUTNAM, N. H.; SHU, S.; BLUMBERG, B.; DANA, C. E.; GEE, L.; KIBLER, D. F.; LAW, L.; LINDGENS, D.; MARTINEZ, D. E.; PENG, J.; WIGGE, P. A.; BERTULAT, B.; GUDER, C.; NAKAMURA, Y.; OZBEK, S.; WATANABE, H.; KHALTURIN, K.; HEMMRICH, G.; FRANKE, A.; AUGUSTIN, R.; FRAUNE, S.; HAYAKAWA, E.; HAYAKAWA, S.; HIROSE, M.; HWANG, J. S.; IKEO, K.; NISHIMIYA-FUJISAWA, C.; OGURA, A.; TAKAHASHI, T.; STEINMETZ, P. R. H.; ZHANG, X.; AUFSCHNAITER, R.; EDER, M. K.; GORNY, A. K.; SALVENMOSER, W.; HEIMBERG, A. M.; WHEELER, B. M.; PETERSON, K. J.; BÖTTGER, A.; TISCHLER, P.; WOLF, A.; GOJOBORI, T.; REMINGTON, K. A.; STRAUSBERG, R. L.; VENTER, J. C.; TECHNAU, U.; HOBMAYER, B.; BOSCH, T. C. G.; HOLSTEIN, T. W.; FUJISAWA, T.; BODE, H. R.; DAVID, C. N.; ROKHSAR, D. S.; STEELE, R. E. The dynamic genome of *Hydra*. **Nature**, v. 464, p. 592-596, 2010.

CHAVES, L. C. T. **Estrutura das comunidades de peixes recifais em três localidades no Estado do Rio de Janeiro, Brasil**. 2006. 57 f. Dissertação (Conclusão do curso de mestrado em Biologia Marinha) - Departamento de Biologia Marinha, Universidade Federal Fluminense, Niteroi, 2006. Disponível em:

<http://www.bdttd.ndc.uff.br/tde_arquivos/18/TDE-2006-10-20T141823Z-506/Publico/laischaves-b.pdf>.

CHIMETTO, L. A.; BROCCHI, M.; GONDO, M.; THOMPSON, C. C.; GOMEZ-GIL, B.; THOMPSON, F. L. Genomic diversity of vibrios associated with the Brazilian coral *Mussismilia hispida* and its sympatric zoanthids (*Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Zoanthus solanderi*). **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 6, p. 1818-1826, 2009.

CHIMETTO, L. A.; BROCCHI, M.; THOMPSON, C. C.; MARTINS, R. C. R.; RAMOS, H. R.; THOMPSON, F. L. Vibrios dominate as culturable nitrogen-fixing bacteria of the Brazilian coral *Mussismilia hispida*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 312-319, 2008.

CHIMETTO, L. A.; CLEENWERCK, I.; ALVES Jr, N.; SILVA, B. S.; BROCCHI, M.; WILLEMS, A.; DE VOS, P.; THOMPSON, F. L. *Vibrio communis* sp. nov. isolated from marine animals (*Mussismilia hispida*, *Phyllogorgia dilatata*, *Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Litopenaeus vannamei*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2010. doi: 10.1099/ijs.0.019729-0.

CHIMETTO, L. A.; CLEENWERCK, I.; MOREIRA, A. P. B.; BROCCHI, M.; WILLEMS, A.; DE VOS, P.; THOMPSON, F. *Vibrio variabilis* sp. nov. and *Vibrio marinus* sp. nov., isolated from *Palythoa caribaeorum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2011. doi: 10.1099/ijs.0.026997-0.

COLLEY, N. J.; TRENCH, R. K. Cellular events in the reestablishment of a symbiosis between a marine dinoflagellate and a coelenterate. **Cell and Tissue Research**, v. 239, p. 93-103, 1985.

Competent cells. Novagen, EUA. Disponível em: <http://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/NVG_/714003.20040729.pdf>.

COSTA Jr, O. S.; NIMMO, M.; ATTRILL, M. J. Coastal nutrification in Brazil: a review of the role of nutrient excess on coral reef demise. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 25, p. 257-270, 2008.

Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit User Manual. Clontech, EUA. Disponível em: <<http://www.clontech.com/images/pt/PT3577-1.pdf>>.

DALY, M.; BRUGLER, M. R.; CARTWRIGHT, P.; COLLINS, A. G.; DAWSON, M. N.; FAUTIN, D. G.; FRANCE, S. C.; MCFADDEN, C. S.; OPRESKO, D. M.; RODRIGUEZ, E.; ROMANO, S. L.; STAKE, J. L. The phylum Cnidaria: a review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. **Zootaxa**, v. 1668, p. 127-182, 2007.

DISHAW, L. J.; SMITH, S. L.; BIGGER, C. H. Characterization of a C3-like cDNA in a coral: phylogenetic implications. **Immunogenetics**, v. 57, p. 535-548, 2005.

DOUGLAS, A. E. Coral bleaching - how and why? **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 385-392, 2003.

DRICKAMER, K.; TAYLOR, M. E. Biology of animal lectins. **Annual Review of Cell Biology**, v. 9, p. 237-264, 1993.

DUNN, S. R. Immunorecognition and immunoreceptors in the Cnidaria. **Invertebrate Survival Journal**, v. 6, p. 7-14, 2009.

DUNN, S. R.; SCHNITZLER, C. E.; WEIS, V. M. Apoptosis and autophagy as mechanisms of dinoflagellate symbiont release during cnidarian bleaching: every which way you lose. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 274, p. 3079-3085, 2007.

DU PASQUIER, L. Diversification des immunorécepteurs au cours de l'évolution des métazoaires. **Médecine Sciences**, v. 25, n. 3, p. 273-280, 2009.

ENGEL, S.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Chemical ecology of marine microbial defense. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 10, p. 1971-1985, 2002.

ENGEBRECHT, J.; BRENT, R.; KADERBHAI, M. Minipreps of plasmid DNA, basic protocol. In: AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Eds.). **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2003. cap. 1, p. 1.6.1-1.6.2.

ESCHE, C.; STELLATO, C.; BECK, L. A. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 125, p. 615-628, 2005.

FABRICIUS, K. Tissue loss and mortality in soft corals following mass-bleaching. **Coral Reefs**, v. 18, n. 1, p. 54, 1999.

FADLALLAH, Y. H.; KARLSON, R. H.; SEBENS, K. P. A comparative study of sexual reproduction in three species of Panamanian zoanthids (Coelenterata: Anthozoa). **Bulletin of Marine Science**, v. 35, n. 1, p. 80-89, 1984.

FAUTIN, D. G. Reproduction of Cnidaria. **Canadian Journal of Zoology**, v. 80, n. 10, p. 1735-1754, 2002.

FAUTIN, D. G. Structural diversity, systematics and evolution of cnidae. **Toxicon**, v. 54, n. 8, p. 1054-1064, 2009.

GILD, S.; FRANK, U.; MOKADY, O. Allogeneic interactions in *Hydractinia*: is the transitory chimera beneficial? **International Journal of Developmental Biology**, v. 47, p. 433-438, 2003.

GoTaq® DNA Polymerase. Promega, EUA. Disponível em:
<http://www.promega.com/tbs/9pim300/_row/9pim300_row.pdf>.

GRYGIER, M. J. Lauridae: taxonomy and morphology of ascothoracid crustacean parasites of zoanthids. **Bulletin of Marine Science**, v. 36, p. 278-303, 1985.

HAINE, E. R. Symbiont-mediated protection. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 275, p. 353-361, 2008.

HAUTON, C.; SMITH, V. J. Adaptive immunity in invertebrates: a straw house without a mechanistic foundation. **BioEssays**, v. 29, p. 1138-1146, 2007.

HAYWICK, D. W.; MUELLER, E. M. Sediment retention in encrusting *Palythoa* spp. - a biological twist to a geological process. **Coral Reefs**, v. 16, n. 1, p. 39-46, 1997.

HEMMRICH, G.; MILLER, D. J.; BOSCH, T. C. G. The evolution of immunity: a low-life perspective. **TRENDS in Immunology**, v. 28, n. 10, p. 449-454, 2007.

HILDEMAN, W. H.; LINTHICUM, D. S.; VANN, D. C. Transplantation and immunoincompatibility reactions among reef-building corals. **Immunogenetics**, v. 2, p. 269-284, 1975.

HOEBE, K.; JANSSEN, E.; BEUTLER, B. The interface between innate and adaptive immunity. **Nature Immunology**, v. 5, n. 10, p. 971-974, 2004.

HYMAN, L. H. Metazoa of the tissue grade of construction: the Radiate phyla - phylum Cnidaria. In: _____. **The invertebrates: Protozoa through Ctenophora**. New York: McGraw-Hill Book Company Inc., 1940. cap. 7, p. 365-661.

ImProm-II™ Reverse Transcription System. Promega, EUA. Disponível em:
<<http://www.promega.com/tbs/tm236/tm236.pdf>>.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Normas de apresentação tabular**: 1993. Rio de Janeiro: IBGE, 3.

IWAKI, D.; KANNO, K.; TAKAHASHI, M.; ENDO, Y.; LYNCH, N. J.; SCHWAEBLE, W.; MATSUSHITA, M.; OKABE, M.; FUJITA, T. Small mannose-binding lectin-associated protein plays a regulatory role in the lectin complement pathway. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 8626-8632, 2006.

IWANAGA, S.; LEE, B. L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 2, p. 128-150, 2005.

KASAHARA, S.; BOSCH, T. C. G. Enhanced antibacterial activity in *Hydra* polyps lacking nerve cells. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 27, p. 79-85, 2003.

KELMAN, D.; KASHMAN, Y.; ROSENBERG, E.; KUSHMARO, A.; LOYA, Y. Antimicrobial activity of Red Sea corals. **Marine Biology**, v. 149, p. 357-363, 2006.

KEMP, D. W.; COOK, C. B.; LAJEUNESSE, T. C.; BROOKS, W. R. A comparison of the thermal bleaching responses of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* from three geographically different regions in south Florida. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 335, p. 266-276, 2006.

KHALTURIN, K.; BOSCH, T. C. G. Self/nonself discrimination at the basis of chordate evolution: limits on molecular conservation. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, p. 4-9, 2007.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 187-197, 2002.

KIMURA, A.; SAKAGUCHI, E.; NONAKA, M. Multi-component complement system of Cnidaria: C3, Bf, and MASP genes expressed in the endodermal tissues of a sea anemone, *Nematostella vectensis*. **Immunobiology**, v. 214, p. 165-178, 2009.

KORTSCHAK, R. D.; SAMUEL, G.; SAINT, R.; MILLER, D. J. EST analysis of the cnidarian *Acropora millepora* reveals extensive gene loss and rapid sequence divergence in the model invertebrates. **Current Biology**, v. 13, p. 2190-2195, 2003.

KURTZ, J. Specific memory within innate immune systems. **TRENDS in Immunology**, v. 26, n. 4, p. 186-192, 2005.

KURTZ, J.; FRANZ, K. Evidence for memory in invertebrate immunity. **Nature**, v. 425, p. 37-38, 2003.

KVENNEFORS, E. C. E.; LEGGAT, W.; HOEGH-GULDBERG, O.; DEGNAN, B. M.; BARNES, A. C. An ancient and variable mannose-binding lectin from the coral *Acropora millepora* binds both pathogens and symbionts. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, p. 1582-1592, 2008.

LA BARRE, S. C.; COLL, J. C.; SAMMARCO, P. W. Competitive strategies of soft corals (Coelenterata: Octocorallia): III. Spacing and aggressive interactions between alcyonaceans. **Marine Ecology - Progress Series**, v. 28, p. 147-156, 1986.

LAJEUNESSE, T. C. Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. **Marine Biology**, v. 141, p. 387-400, 2002.

LANIER, L. L. Face off - the interplay between activating and inhibitory immune receptors. **Current Opinion in Immunology**, v. 13, p. 326-331, 2001.

LEWIS, C. L.; COFFROTH, M. A. The acquisition of exogenous algal symbionts by an octocoral after bleaching. **Science**, v. 304, p. 1490-1492, 2004.

LITMAN, G. W.; CANNON, J. P.; DISHAW, L. J. Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 866-879, 2005.

LITTLE, T. J.; O'CONNOR, B.; COLEGRAVE, N.; WATT, K.; READ, A. F. Maternal transfer of strain-specific immunity in an invertebrate. **Current Biology**, v. 13, p. 489-492, 2003.

MARQUES, A. C.; COLLINS, A. G. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. **Invertebrate Biology**, v. 123, n. 1, p. 23-42, 2004.

MASEK, T.; VOPALENSKY, V.; SUCHOMELOVA, P.; POSPISEK, M. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. **Analytical Biochemistry**, v. 336, p. 46-50, 2005.

MAYER, G. Immunology - Innate (non-specific) Immunity. In: _____. **Microbiology and Immunology On-Line Textbook**. University of South Carolina School of Medicine, 2006. cap. 1, Disponível em: <<http://pathmicro.med.sc.edu/ghaffar/innate.htm>>. Acesso em: 8 ago. 2009.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY Jr, C. A. Innate Immunity. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 5, p. 338-344, 2000.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY Jr, C. A. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, v. 296, p. 298-300, 2002.

MENDONÇA-NETO, J. P.; FERREIRA, C. E. L.; CHAVES, L. C. T.; PEREIRA, R. C. Influence of *Palythoa caribaeorum* (Anthozoa, Cnidaria) zonation on site-attached reef fishes. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 3, p. 495-513, 2008.

MENDONÇA-NETO, J. P.; GAMA, B. A. P. The native *Palythoa caribaeorum* overgrows on invasive species in the intertidal zone. **Coral Reefs**, v. 28, p. 497, 2009. doi: 10.1007/s00338-008-0449-5.

MEYER-WENTRUP, F.; CAMBI, A.; ADEMA, G. J.; FIGDOR, C. G. "Sweet Talk": closing in on C type lectin signaling. **Immunity**, v. 22, p. 399-400, 2005.

MILLER, D. J.; HEMMRICH, G.; BALL, E. E.; HAYWARD, D. C.; KHALTURIN, K.; FUNAYAMA, N.; AGATA, K.; BOSCH, T. C. G. The innate immune repertoire in Cnidaria - ancestral complexity and stochastic gene loss. **Genome Biology**, v. 8, n. 4, p. R59.1-R59.13, 2007.

MOBERG, F.; FOLKE, C. Ecological goods and services of coral reef ecosystems. **Ecological Economics**, v. 29, p. 215-233, 1999.

MORET, Y.; SIVA-JOTHY, M. T. Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, p. 2475-2480, 2003.

MORETTA, L.; MORETTA, A. Killer immunoglobulin-like receptors. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, p. 626-633, 2004.

NETEA, M. G.; van der GRAAF, C.; der MEER, J. W. M. V.; KULLBERG, B. J. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, p. 749-755, 2004.

NICOTRA, M. L.; POWELL, A. E.; ROSENGARTEN, R. D.; MORENO, M.; GRIMWOOD, J.; LAKKIS, F. G.; DELLAPORTA, S. L.; BUSS, L. W. A hypervariable invertebrate allodeterminant. **Current Biology**, v. 19, p. 583-589, 2009.

OTERO-GONZÁLEZ, A. J.; MAGALHÃES, B. S.; GARCIA-VILLARINO, M.; LÓPEZ-ABARRATEGUI, C.; SOUSA, D. A.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L. Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. **The FASEB Journal**, v. 24, p. 1320-1334, 2010.

OVCHINNIKOVA, T. V.; BALANDIN, S. V.; ALESHINA, G. M.; TAGAEV, A. A.; LEONOVA, Y. F.; KRASNODEMBSKY, E. D.; MEN'SHENING, A. V.; KOKRYAKOV, V. N. Aurelin, a novel antimicrobial peptide from jellyfish *Aurelia aurita* with structural

features of defensins and channel-blocking toxins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 348, p. 514-523, 2006.

OWENS III, D. E.; PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, p. 93-102, 2006.

ÖZBEKA, S.; BALASUBRAMANIANA, P. G.; HOLSTEIN, T. W. Cnidocyst structure and the biomechanics of discharge. **Toxicon**, v. 54, n. 8, p. 1038-1045, 2009.

PANCER, Z.; COOPER, M. D. The evolution of adaptive immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 24, p. 497-518, 2006.

PANCER, Z.; SKOROKHOD, A.; BLUMBACH, B.; MÜLLER, W. E. G. Multiple Ig-like featuring genes divergent within and among individuals of the marine sponge *Geodia cydonium*. **Gene**, v. 207, p. 227-233, 1998.

PAPAMICHAIL, M.; PEREZ, S. A.; GRITZAPIS, A. D.; BAXEVANIS, C. N. Natural killer lymphocytes: biology, development, and function. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, v. 53, p. 176-186, 2004.

PAUSTIAN, T.; ROBERTS, G. Animal defenses against microbes. In: _____. **Through the microscope**. 2006. cap. 15, Disponível em: <http://www.microbiologytext.com/index.php?module=Book&func=displaychapter&chap_id=74&theme=Printer>. Acesso em: 15 nov. 2009.

PÉREZ, C. D.; VILA-NOVA, D. A.; SANTOS, A. M. Associated community with the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860) (Cnidaria, Anthozoa) from littoral of Pernambuco, Brazil. **Hydrobiologia**, v. 548, p. 207-215, 2005.

PINTO, M. R.; MELILLO, D.; GIACOMELLI, S.; SFYROERA, G.; LAMBRIS, J. D. Ancient origin of the complement system: emerging invertebrate models. In: LAMBRIS, J. D. (Ed.). **Current topics in innate immunity: advances in experimental medicine and biology**. v. 598. New York: Springer, 2007. cap. 26, p. 372-388.

PolyATtract[®] mRNA Isolation Systems. Promega, EUA. Disponível em: <<http://www.promega.com/tbs/tm021/tm021.pdf>>.

PUTNAM, N. H.; SRIVASTAVA, M.; HELLSTEN, U.; DIRKS, B.; CHAPMAN, J.; SALAMOV, A.; TERRY, A.; SHAPIRO, H.; LINDQUIST, E.; KAPITONOV, V. V.; JURKA, J.; GENIKHOVICH, G.; GRIGORIEV, I. V.; LUCAS, S. M.; STEELE, R. E.;

FINNERTY, J. R.; TECHNAU, U.; MARTINDALE, M. Q.; ROKHSAR, D. S. Sea anemone genome reveals ancestral eumetazoan gene repertoire and genomic organization. **Science**, v. 317, p. 86-94, 2007.

RADAEV, S.; SUN, P. D. Structure and function of natural killer cell surface receptors. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, p. 93-114, 2003.

RASBAND, W. ImageJ. Versão 1.43u. National Institutes of Health, EUA. Disponível em: <<http://rsbweb.nih.gov/ij/>>.

Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor. Promega, EUA. Disponível em: <<http://www.promega.com/tbs/9pin251/9pin251.pdf>>.

REIDLING, J. C.; MILLER, M. A.; STEELE, R. E. *Sweet Tooth*, a novel receptor protein-tyrosine kinase with C-type lectin-like extracellular domains. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 14, p. 10323-10330, 2000.

REINHEIMER, G. **Aquatic Microbiology**. 4. ed. New York: Wiley, 1992.

RINKEVICH, B. Allorecognition and xenorecognition in reef corals: a decade of interactions. **Hydrobiologia**, v. 530/531, p. 443-450, 2004.

RNA: A guide to analytical gels. QIAGEN, USA. Disponível em: <<http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=23577>>.

RNAlater® Tissue Collection: RNA Stabilization Solution. Ambion, EUA. Disponível em: <http://www.ambion.com/techlib/prot/bp_7020.pdf>.

ROSENBERG, E.; KUSHMARO, A. Microbial diseases of corals: pathology and ecology. In: DUBINSKY, Z.; STAMBLER, N. (Eds.). **Coral reefs: an ecosystem in transition**. Netherlands: Springer, 2011. p. 451-464.

ROWLEY, A. F.; POWELL, A. Invertebrate immune systems – specific, quasi-specific, or nonspecific? **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 7209-7214, 2007.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. C. Cnidaria. In: _____. **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. 7. ed. São Paulo: Roca, 2005. cap. 7, p. 130-207.

SADD, B. M.; SCHMID-HEMPEL, P. Insect immunity shows specificity in protection

upon secondary pathogen exposure. **Current Biology**, v. 16, p. 1206-1210, 2006.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, p. 163-189, 2004.

SCHULENBURG, H.; BOEHNISCH, C.; MICHIELS, N. K. How do invertebrates generate a highly specific innate immune response? **Molecular Immunology**, v. 44, p. 3338-3344, 2007.

SCHWARZ, R. S.; CADAVID, L. F. Dynamics of somatic cell-lineage competition in chimeras of *Hydractinia symbiolongicarpus* (Cnidaria: Hydrozoa). **Acta Biológica Colombiana**, v. 12 S, p. 13-26, 2007.

SEIDMAN, C. E.; STRUHL, K.; SHEEN, J.; JESSEN, T. Introduction of plasmid DNA into cells, basic protocol 2. In: AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Eds.). **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2003. cap. 1, p. 1.8.4-1.8.5.

SENECA, F. O.; FORÊT, S.; BALL, E. E.; SMITH-KEUNE, C.; MILLER, D. J.; van OPPEN, M. J. H. Patterns of gene expression in a scleractinian coral undergoing natural bleaching. **Marine Biotechnology**, 2009.

SHAPO, J. L.; MOELLER, P. D.; GALLOWAY, S. B. Antimicrobial activity in the common seawhip, *Leptogorgia virgulata* (Cnidaria: Gorgonaceae). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 148, p. 65-73, 2007.

SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 5, p. 2753-2764, 2007.

SHER, D.; FISHMAN, Y.; ZHANG, M.; LEBENDIKER, M.; GAATHON, A.; MANCHEÑO, J. M.; ZLOTKIN, E. Hydralysins, a new category of β -pore-forming toxins in Cnidaria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 24, p. 22847-22855, 2005.

SHIGEYAKAWA, K.; DOWER, W. J. Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. **BioTechniques**, v. 6, p. 742-751, 1988.

SOARES, C. L. R. S.; PÉREZ, C. D.; MAIA, M. B. S.; SILVA, R. S.; MELO, L. F. A. Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860). **Revista**

Brasileira de Farmacognosia, v. 16, n. 4, p. 463-468, 2006.

STEINERT, M.; HENTSCHEL, U.; HACKER, J. Symbiosis and pathogenesis: evolution of the microbe-host interaction. **Naturwissenschaften**, v. 87, p. 1-11, 2000.

SUCHANEK, T. H.; GREEN, D. J. Interspecific competition between *Palythoa caribaeorum* and other sessile invertebrates on St. Croix reefs, U.S. Virgin Islands. In: INTERNATIONAL CORAL REEF SYMPOSIUM, 4., 1982, Manila. **Anais...** Quezon City: Proceedings of the Fourth International Coral Reef Symposium, 1981. p. 679-684

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2005.

TAUBER, A. The biological notion of self and non-self. In: ZALTA, E. N. (Ed.). **The Stanford Encyclopedia of Philosophy**. 2009. Disponível em: <<http://plato.stanford.edu/archives/sum2009/entries/biology-self/>>.

TELFORD, M. J. Animal evolution: once upon a time. **Current Biology**, v. 19, n. 8, p. R339-R341, 2009.

TINCUI, J. A.; TAYLOR, S. W. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3645-3654, 2004.

TOLLER, W. W.; ROWAN, R.; KNOWLTON, N. Repopulation of zooxanthellae in the Caribbean corals *Montastraea annularis* and *M. faveolata* following experimental and disease-associated bleaching. **The Biological Bulletin**, v. 201, n. 3, p. 360-373, 2001.

TRIzol[®] Reagent. Invitrogen, EUA. Disponível em: <<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/15596018%20pps%20Trizol%20Reagent%20061207.pdf>>.

VASTA, G. R.; AHMED, H.; TASUMI, S.; ODOM, E. W.; SAITO, K. Biological roles of lectins in innate immunity: molecular and structural basis for diversity in self/non-self recognition. In: LAMBRIS, J. D. (Ed.). **Current topics in innate immunity: advances in experimental medicine and biology**. v. 598. New York: Springer, 2007. cap. 27, p. 389-406.

VIDAL-DUPIOL, J.; ADJEROUD, M.; ROGER, E.; FOURE, L.; DUVAL, D.; MONE, Y.; FERRIER-PAGES, C.; TAMBUTTE, E.; TAMBUTTE, S.; ZOCCOLA, D.; ALLEMAND, D.; MITTA, G. Coral bleaching under thermal stress: putative involvement of host/symbiont recognition mechanisms. **BMC Physiology**, v. 9:14, 2009.

VILLAMIZAR, E.; CAMISOTTI, H.; RODRÍGUEZ, B.; PÉREZ, J.; ROMERO, M. Impacts of the 2005 Caribbean bleaching event at Archipélago de Los Roques National Park, Venezuela. **Revista de Biología Tropical**, v. 56, p. 255-270, 2008.

WATSON, F. L.; PÜTMANN-HOLGADO, R.; THOMAS, F.; LAMAR, D. L.; HUGHES, M.; KONDO, M.; REBEL, V. I.; SCHMUCKER, D. Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. **Science**, v. 309, p. 1874-1878, 2005.

WEIL, E.; ROGERS, C. S. Coral reef diseases in the Atlantic-Caribbean. In: DUBINSKY, Z.; STAMBLER, N. (Eds.). **Coral reefs: an ecosystem in transition**. Netherlands: Springer, 2011. p. 465-491.

WEIS, V. M. Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. **The Journal of Experimental Biology**, v. 211, p. 3059-3066, 2008.

WEIS, V. M.; DAVY, S. K.; HOEGH-GULDBERG, O.; RODRIGUEZ-LANETTY, M.; PRINGLE, J. R. Cell biology in model systems as the key to understanding corals. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 23, n. 7, p. 369-376, 2008.

WILLIAMS, A. P.; BATEMAN, A. R.; KHAKOO, S. I. Hanging in the balance: KIR and their role in disease. **Molecular Interventions**, v. 5, n. 4, p. 226-240, 2005.

WILSON, A. C. C.; GROSBERG, R. K. Ontogenetic shifts in fusion–rejection thresholds in a colonial marine hydrozoan, *Hydractinia symbiolongicarpus*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 57, p. 40-49, 2004.

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Promega, EUA. Disponível em: <<http://www.promega.com/tbs/tb308/tb308.pdf>>.

WOOD-CHARLSON, E. M.; WEIS, V. M. The diversity of C-type lectins in the genome of a basal metazoan, *Nematostella vectensis*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, p. 881-889, 2009.

ZHANG, S. M.; ADEMA, C. M.; KEPLER, T. B.; LOKER, E. S. Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. **Science**, v. 305, p. 251-254, 2004.

ZIPFEL, P. F.; MIHLAN, M.; SKERKA, C. The alternative pathway of Complement: a pattern recognition system. In: LAMBRIS, J. D. (Ed.). **Current topics in innate immunity: advances in experimental medicine and biology**. v. 598. New York: Springer, 2007. cap. 7, p. 80-92.

APÊNDICE A – Composição de alguns reagentes, soluções e tampões utilizados.

NOME	COMPOSIÇÃO
Advantage[®] 2 PCR Buffer	Tricine-KOH 400 mM, pH 8,7/25°C; KOAc 150 mM; Mg(Oac) ₂ 35 mM; BSA 37,5 µg/mL; Tween 20 0,05%; Nonidet-P40 0,05%
Advantage[®] 2 Polymerase Mix	Glicerol 50%; Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; KCl 75 mM; EDTA 0,05 mM
Loading Dye	Tris-HCl 10 mM, pH 7,6; Azul de bromofenol 0,03%; Orange G 0,15%; Glicerol 60%; EDTA 60 mM
Meio LB	Triptona 10 g/L; Extrato de levedura 5 g/L; NaCl 5 g/L; pH 7,0
Solução de lavagem da membrana (Wizard [®])	Acetato de potássio 10 mM, pH 5,0; Etanol 80%; EDTA 16,7 µM
Solução de ligação da membrana (Wizard [®])	Isotiocianato de guanidina 4,5 M; Acetato de potássio 0,5 M
Solução de lise (extração de plasmídeos)	NaOH 0,2 N; SDS 1%
Solução GTE	Glicose 50 mM; Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM
SSC 20X	NaCl 3 M; Citrato de sódio 0,3 M
TAE 1X	Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM
Tampão de reação (SMART [™])	Tris 250 mM, pH 8,3; MgCl ₂ 30 mM; KCl 375 mM
Tampão de ligação (pDNR-LIB)	Tris-HCl 500 mM, pH 7,8; MgCl ₂ 100 mM; DTT 100 mM; BSA 0,5 mg/mL
TE 1X	Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM

APÊNDICE B – Genes da imunidade inata de cnidários utilizados para o desenho dos *primers* (Estratégia 1). São apresentados os números de acesso das sequências no banco de dados NCBI bem como os organismos de origem.

GENES	Nº DE ACESSO (NCBI)	ORGANISMOS
Componente 3 do Complemento	gi 223670953_92-5218	<i>Nematostella vectensis</i>
	gi 27357202_102-5288	<i>Swiftia exserta</i>
Lectina do tipo C	gi 156400891 ref XM_001638976.1	<i>Nematostella vectensis</i>
	gi 156400893 ref XM_001638977.1	
	gi 156386384 ref XM_001633843.1	
	gi 224498005_105-593	<i>Pocillopora damicornis</i>
Lectina ligante de manose	gi 193081149 gb EU717900.1	<i>Acropora millepora</i>
	gi 193081151 gb EU717901.1	
	gi 193081147 gb EU717899.1	
	gi 193081141 gb EU717896.1	
	gi 193081145 gb EU717898.1	
	gi 193081143 gb EU717897.1	
	gi 193081153 gb EU717902.1	
	gi 193081157 gb EU717904.1	
	gi 193081155 gb EU717903.1	
	gi 193081159 gb EU717905.1	
	gi 193081139 gb EU717895.1	
	gi 193081163 gb EU717907.1	
	gi 193081161 gb EU717906.1	
	gi 193081165 gb EU717908.1	

APÊNDICE C – Lista dos 20 aminoácidos encontrados em proteínas, juntamente com suas abreviações e códons de DNA correspondentes. São apresentados também os códons de término da tradução (*stop codons*).

AMINOÁCIDO	ABREVIÇÃO		CÓDONS DE DNA*
	1 letra	3 letras	
Alanina	A	Ala	GCT, GCC, GCA, GCG
Arginina	R	Arg	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Asparagina	N	Asn	AAT, AAC
Ácido aspártico	D	Asp	GAT, GAC
Cisteína	C	Cis	TGT, TGC
Ácido glutâmico	E	Glu	GAA, GAG
Glutamina	Q	Gln	CAA, CAG
Glicina	G	Gli	GGT, GGC, GGA, GGG
Histidina	H	His	CAT, CAC
Isoleucina	I	Ile	ATT, ATC, ATA
Leucina	L	Leu	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
Lisina	K	Lis	AAA, AAG
Metionina	M	Met	ATG
Fenilalanina	F	Fen	TTT, TTC
Prolina	P	Pro	CCT, CCC, CCA, CCG
Serina	S	Ser	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
Treonina	T	Tre	ACT, ACC, ACA, ACG
Triptofano	W	Trp	TGG
Tirosina	Y	Tyr	TAT, TAC
Valina	V	Val	GTT, GTC, GTA, GTG
Stop Codons	Stop	TAA, TAG, TGA	

*A – Adenina, T – Timina, G – Guanina, C – Citosina

ANEXO A – Alinhamento múltiplo de sequências de C3 para *Swiftia exserta* e *Nematostella vectensis* provenientes do banco de dados NCBI. Em destaque, primer C3-SE.

```

gi | 223670953_92-5218      -----ATGTTGCGG----TGTGTAGTACTGATGCTAGCAATAGGATGCTCCTACGCTGT 50
gi | 27357202_102-5288      ATGAAGATGCTTCGAGCCTTGATGGCTTTGCTTTGCTCTTATGTTTGAACCAATGTTAT 60
                        *** * **      * * * *      * * * *      * * * *

gi | 223670953_92-5218      GCAGAGATATATGGTAATATCACCCGATGTTT--TCCATGTGGGAGAACCTGAAAGAGTG 108
gi | 27357202_102-5288      GCGGCGAAGTATTTTCATCGCTGCTCCAAATCTGCTCCGTGTTGGTGTGAAGAACAGTA 120
                        * * * *      * * * *      * * * *      * * * *

gi | 223670953_92-5218      TCAATCGCCGCTCTACGATGTCCCTCTCCTGTGACCGTCAAGGTCTATTTGCAGGATTAT 168
gi | 27357202_102-5288      TCGATTGCCGTGTTTGTATGTAACGTTGATGTCAACGTCCATTGGCTCTTCAAGATTTT 180
                        * * * *      * * * *      * * * *      * * * *

gi | 223670953_92-5218      CCGAACAGGCGGAAGACATTCTCACAGCA-CAAGCCGATTTGCTAAAGATAATCCTGG 227
gi | 27357202_102-5288      CCAACAGGAGGAAGACGTTTTCTCAAGTTCTGGAAACGTAGAGCACAACAA-CCTGG 239
                        * * * *      * * * *      * * * *      * * * *

gi | 223670953_92-5218      TTACCTGACAGTAAAGGTAGACCCCGCTGACCTACCTGACCAGGGCTCACAAGACAAGCA 287
gi | 27357202_102-5288      TATTTTGAATAAAGGTGAATGCCAAGATCTTACGACCAGCAATCTCTGGACAAACA 299
                        * * * *      * * * *      * * * *      * * * *

gi | 223670953_92-5218      ATACGTGTACCTAGTGGCCCAATGCGATGATCCGAACTAAAGTCAAAAAAGAAGTCAA 347
gi | 27357202_102-5288      ATATGTCTACCTGATAGCAAGCTCAAGCACAGCTGGCTTTCAATTGAGAGACGAAATCAA 359
                        * * * *      * * * *      * * * *      * * * *

gi | 223670953_92-5218      AGTGTGCTGAGCTACAGGGATGGGGTCATACTTATTCAAACAGACAAACCACTCTACAC 407
gi | 27357202_102-5288      AATCTGCTGAGTATCGAAGTGCCATGGTCTTTATTGAGACCGATAAACCAATATACAA 419
                        * * * *      * * * *      * * * *      * * * *

gi | 223670953_92-5218      GCCGGACCAACAGTCAAATTCGTGTGATTCCTAGGATTCGACCTGAAGCCTTCAGC 467
gi | 27357202_102-5288      TCCTGGACAGACAGTCAATCTGCGAGTGGTTCCTCTCAGTCTTGATTTGAAGGCATCCGT 479
                        * * * *      * * * *      * * * *      * * * *

gi | 223670953_92-5218      AAAGAAGGTGAATGTTGTGTGAAGAATCCCAAAATATCCGTGTTCAACAGTGGAACTC 527
gi | 27357202_102-5288      CGATAATGTAACAATAGAAGTTATGAATCCTCAAGGTATTCGCGTGGAGAGATGGAGCAA 539
                        * * * *      * * * *      * * * *      * * * *

gi | 223670953_92-5218      CATGTCGACCTCCACGGGATTCATCTCCGAGACCATCAGCCTCGGTTCTTTGCGCATGCT 587
gi | 27357202_102-5288      CCTGAATACAAAAGCAGGCTTTTCTCACGTCGTTGGATTATCGGAAAACGTTTGGCT 599
                        * * * *      * * * *      * * * *      * * * *

gi | 223670953_92-5218      CGGGAACTGGACAGTGGAGGCTTCTACGGTACGGGTTGTGCATAACACGTCGACGCA 647
gi | 27357202_102-5288      TGGCTTGTGGACATTAGTGCCCTGTATGGCCATGGGAAAGTGCAAAACGCCTCGATACA 659
                        * * * *      * * * *      * * * *      * * * *

gi | 223670953_92-5218      GTTCGAAGTTCGGGAGTATGTGCTTCCAAGATTCACGTCAAAATTGAGGACATCCGCT 707
gi | 27357202_102-5288      ATTTGAAGTTCGAAAATATGTGTTGCCAAGTCTCTGTGAAATTGAAAGGACCATC--- 716
                        * * * *      * * * *      * * * *      * * * *

gi | 223670953_92-5218      GAAGAATTACATTCTGAGGAAAACAACCCATT-ATC-CAATTTCTATCAGTGCAAGGTAC 765
gi | 27357202_102-5288      -----CTACATTTTA--GAAAGTGACCCGTCGATCACAATAAAAGTTACATCAAAGTAC 768
                        * * * *      * * * *      * * * *      * * * *

gi | 223670953_92-5218      ACATACGATAAGCCAGTCGAAGGGCCAGTCAACGTAAGACTGTCTATTGTGGGAAGAAAA 825
gi | 27357202_102-5288      ACGTATGGTAAGGCTGTCATTGGGTGAGTTCGAGTGAATCTTGGCTCCTTG-ATGATGC 827
                        * * * *      * * * *      * * * *      * * * *

gi | 223670953_92-5218      CAGGAATCCAAGCTGCTCATGGACGTAACATA-ATTCTGAATGATGGTAGCTGTAGCCT 884
gi | 27357202_102-5288      TGGTAAAGTTGAAAGATTTAGTACTTCATACACACGCTACGTAAAGGAGAGCCGATGT 887
                        * * * *      * * * *      * * * *      * * * *

gi | 223670953_92-5218      CAATTTCAAGCCTGCCATTATAAAGGATCTACCAGACAAAACCTGTGGTTCCCGACGG 944
gi | 27357202_102-5288      TATCGTATCGACAGACCTACGTAAGG---CACATGCTAAGATTCCGTGGTTTCCTGATGG 944
                        * * * *      * * * *      * * * *      * * * *

gi | 223670953_92-5218      CTTCCGGCTCCAGATCGAGGCTACGGTTCATCGAAAAGGCGACAGGGCTCAGGGAGAGCGT 1004
gi | 27357202_102-5288      CAAGCGTCTAGTTATCGAAGCTAAAGTTATTGAACAAGCAACAGGACACGAAGAAAGGC 1004
                        * * * *      * * * *      * * * *      * * * *

```

gi 223670953_92-5218	TACTGACAACCTCCATTCACTTTACCACCACGCGTTCGTCACTCAAGTACCAGGAACTGC	1064
gi 27357202_102-5288	TTTGGACAATACGATATACCTTCACAAACACCTCCTCTGAAGATCA-GCTTTAAGAGATCAC	1063
	* ***** * * ***** * * ***** * ***** * ***** *	
gi 223670953_92-5218	CGAG-TACTTTAGACCAGGCCTACCTTTTCTGTCAAGGTCAAGGTAACCTTACCCTAATG	1123
gi 27357202_102-5288	CAAGATTTTTCAAACCTGGAGTCCCCTTTGAAATTAAGTGGATGTAAGTATATGAATG	1123
	* * * * * * * * * * ***** * ***** * * * *	
gi 223670953_92-5218	GGGTACCCGCGGTTAGAAATCCCGATGAAGCTAAGCGCCAAGGCCACCAAGCGTGACGGTA	1183
gi 27357202_102-5288	GACAGCCAGCAACGAGATTCCCATTTCAAAATTGATGCAAAAACCAACGA-TGGAAACAGTT	1182
	* * * * * * * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	AAGAGGTCGACGTGGGGCTGATGGCTAATGCGGCCAACATGGACCAGACCGGACCGG--A	1241
gi 27357202_102-5288	GTGCGAG-AACGCCTGGTGCCGGGCAAGTCGGTGGAGACAAAACGAACGAACATTGGTCA	1241
	* * * * ***** * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	AGGAAAGGCCGAGTTTATGTGTCACATACCACGTGATGTTGCTACACTCAGAGTCAAGGT	1301
gi 27357202_102-5288	CGGAAGATTTGTGGTGTATATCCCAAACGTTTACCATAGC-ACATTTGG----TTGTT	1296
	* * * * * * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	GAGGACCGAAGAAAAAGACGTCCAGCCCGAAGAGA-----ACGCGGTGAAAGAGTTAAT	1355
gi 27357202_102-5288	AAAGTCCGTGCGACGATCAGTCAGGAGGAAAAGATATCATATCAGAAGGAAGATTCCAG	1356
	* * * * * * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	CGCGCGTGCGTACACGCTCAATCCGGGGACTTCTCATGGTCAGACAGCTGAGAAAAGC	1415
gi 27357202_102-5288	C-CGTCAAAGTACAGATCCAGTGGCAATAATTATTGTTGCTTTCCTAACCAAACC	1415
	* * * ***** * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	CACGGTTGGCAAGAATATCATCTGTGAGGCATTT-CTCAACAGCAAGGACG--TGGATCG	1472
gi 27357202_102-5288	TAAAGTTGGACAACTGTTGATGCAGAGGCGTTTGCTCTTTCTGAAGGAAAACCAAAATTC	1475
	* ***** * * * * ***** * * * * ***** * *	
gi 223670953_92-5218	CCTCACTTACGCGATCATCGCACGCGGTAAATCCTCCACCAAGACACCATTGTTCTGTGA	1532
gi 27357202_102-5288	ACTGACTTATATGGTTCATCGCAAATGGCAAGGTCGTGTTTCAAGGTCAAATCAACAGAGA	1535
	* * ***** * ***** * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	GTTTGGTATCGTTACCACTATACGGTTTCGCGCCACAGCAATGATGTCACCATCAGCTCG	1592
gi 27357202_102-5288	CCTTGGTGTGCTAACAACAGTCAGGATTCGAGTGACCTCAGCAATGATTCCCGAGGCAAG	1595
	* ***** * * * * * ***** * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	GCTGATTGGTTACTATATCTCCAAGACAACCGGTGAAGTGGTGACAGACAGCATCCTATT	1652
gi 27357202_102-5288	ATTTGTAGCTTATATATCGC-----GTGAATAATGAACTTGGTTGCTGACAGCACCATCAT	1649
	* * * * * * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	GGATGTGGAAGACGAACCTGCCAAACAAGGTGAGACTCAG-GGATGCCGACACAGGCGTAC	1711
gi 27357202_102-5288	GGAAAGTGAAGAAGAATTGCCCAATCAGGTCTCATTTTTCGGGGACCAACA----TTCCC	1705
	* ***** * * * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	AGACGTTTCCCGGTACTGATTATGAGATCACTGTGTTGCGGGAGCCTGGTACGAGGGTAG	1771
gi 27357202_102-5288	AGAAAAATACCAGGCGATTGCGATGCGATTACAATACAAAGCAGTCCACATTCCAACGTTG	1765
	* * * * * * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	GATGTGTTGGCCGTTGACATGAGCGTGTATCTGCTGAGAAATGACAACAGACTCACTAAAG	1831
gi 27357202_102-5288	GTATACTGGCTGTAGACCAAAGTGTATTATTGTTGCGGAAATGATAAACATCTCACTAGTG	1825
	* * * * * * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	ACAGCGTGTATAAAGAAGCTGGAGGAGCTCGACCTTGCGTGTGGCGTGGGAAGCGGCAAG	1891
gi 27357202_102-5288	ATGAGGTGTATAAAGGATGAAATCCCACGACCTGGGGTGTGGTTCGGGAGCAGGCGCGG	1885
	* ***** * * * * * ***** * ***** * ***** *	
gi 223670953_92-5218	ACAGCAAGGACGTTGTCAAGAAATGCAGGC---GCTGTTATGATGCTCGGAACATTGTCTA	1948
gi 27357202_102-5288	ACAACAAAGATGTTTAAATCGTGGTGGTCTTGCGGTAATGACAACATATCAATAATCTTAA	1945
	* * * * * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	GT---GATGGCCGACAAAACATATGGCTGCGAAGCTGCTGTGGAGCGAAGAAAAAGGCGTT	2005
gi 27357202_102-5288	AGACAGATACCCGAGCAGAAATATTCGTGTGCGGCTGATGAAAG---AGAAAAAGGCGAA	2002
	* * * * * * * * * * * * ***** *	
gi 223670953_92-5218	CTCTTCCAATTCTTCAAGAAATGAACAACAGTGTTGTGCGCTTGGCAAGGAACCTGG--	2063
gi 27357202_102-5288	GC--ACAGATGCCCTCT	

```

gi | 223670953_92-5218      ATCCCCATGGATAAGGC-CGACGGAGCTC---AAACAGTGCTACAAGACTTTCATTTACT 2179
gi | 27357202_102-5288      ATTGCTTTGACGCATGCATCATAGAGTTCATATAAATGTTGTACAGGAAGTTTGAAATGG 2176
      * * * * *      * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *
      * * * * *      * * *      * * *      * * *      * * * * *

gi | 223670953_92-5218      GTTGCCAAAGCCCGCTACGGCAAATCAGATATGGGTTTGTGGCGAGGAGTATAGACTT-- 2237
gi | 27357202_102-5288      ATTGGAGGACTCGATCTGGGAGATGCCAT--TCCAAATAATGTGTGGATGAACTTCC 2234
      * * *      * * *      * * *      * * *      * * *      * * * * *

gi | 223670953_92-5218      TGGCGATTTCGGTCCAGCGACGAGGAATTAATGGAAAACACACAAGTCCGCACCTATTT 2297
gi | 27357202_102-5288      TTTTGAAGATGAAGAAATTCCTTAAGTTGACTTTGGATGAAGCACAAGTGCGAACAAATTT 2294
      *      * *      *      *      * *      * * * * *      * * * * *

gi | 223670953_92-5218      CCCCGAAACTTGGATCTACCGAGAGGAACAGATAGGTGCTGATAGACA-GTCCCGCGTCT 2356
gi | 27357202_102-5288      TCCCGAGACGTGGTTGTACGAACATATGAAGCTGACAAAGACGGTCGTGTTTCGT-TCC 2353
      * * * * *      * * *      * *      *      *      * *      * * * * *

gi | 223670953_92-5218      TCGCCACCATTCTGACACAATCACCACGTGGGTAGTACAAGCCGTGTCAGTGTCTAACT 2416
gi | 27357202_102-5288      GTGTTACAGTACCAGATACGATCAGCACTTGGATCATGCAAGCCATCGCCGTTTCAAAATA 2413
      *      * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

gi | 223670953_92-5218      CAACTGGCCTTGGGATTGCTAAGCCGTACATCTGAAGGCGTTCAAGTCGTGTTTCGTAC 2476
gi | 27357202_102-5288      CGACAGGATTTGGTTAACTCCGCCTTCAACTTGAAGCCTTAAAGCTTTCTTCGTGTT 2473
      * * * * *      * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

gi | 223670953_92-5218      ACCTCACCTCCCTACTCAGTACAAAGAGGCGAGCAGATACAAGTGTGGCCACGGTCT 2536
gi | 27357202_102-5288      CCTTGAACTGCCCTTACTCAGCAGCGGTGGCGAACAAGTCTCCGTGATAGCTACCGTTT 2533
      * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

gi | 223670953_92-5218      ATAACATACAG-CCAAACAATAAGGAT-GAATGTGTACCTTGTGG--GTCA--TGAAA 2590
gi | 27357202_102-5288      TCAACTATAAAGACCAAGCCGAAATGGTCAGAATTATCTCTTCAAGAAGCCAAACGACG 2593
      * * * * *      * * * * *      * *      * * * * *      * * *      * * * * *

gi | 223670953_92-5218      AGTTTTGTAGCAAGGTGAAGCCCGTGCCGACAGTTGATCGAGCGATTACCA-TGAAA 2649
gi | 27357202_102-5288      ATTCTGTA-CGTATCAAAATACGGCTCGGGCAGCTCACTTATGAAGTTCTAGTTGAT 2652
      * * * * *      *      * * *      * * * * *      * *      * * * * *

gi | 223670953_92-5218      GCCCAGAGTTCTCAGACCGTCTCCATCCTTATCTACCCAAGGAGATCGGGCTATTCCCT 2709
gi | 27357202_102-5288      GCTCATGGCGGACTTCCGTATCTTCCCTATTTGTTCCCACTGAACCTGGGGATATTCCC 2712
      * * * *      *      * * * * *      * * * * *      * * *      * * * * *

gi | 223670953_92-5218      ATCCAGGT---GTTTGCAGTGCCTGGAAAGCGACAGCGAATCCAGAAATCTGCTT 2766
gi | 27357202_102-5288      ATCCAGGTCAAGATTATTCAAGAAATTTGACAATGATGGTGAACAACGAATATTAATA 2772
      * * * * *      * *      * *      * * *      * * *      * * *      *

gi | 223670953_92-5218      GTTGTGCCCGAAGGTGTGGGACAGATCAAGACGCAATCGTTGTTCCGTCGATCCAGCAGGT 2826
gi | 27357202_102-5288      GTGGTGCCCGAGGGTATTGAAAGACGAGAACTCATTCAAGTGGTTCAGATCCATTAGAT 2832
      * * * * * * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

gi | 223670953_92-5218      GTTCTGAAGGACAACCAACAAATTGGCGAGCGCGCGAAAAATAAAACGGGACGGCTTTT 2886
gi | 27357202_102-5288      GTCTTGCGGGAT--CCATCAGAT-----GCCAAACCAAGTCAGCACCG--ACGACTCCA 2883
      * *      * * *      * * * * *      *      * * *      * * * * *      * * * * *

gi | 223670953_92-5218      AAGAGCAACAGGTTGTTTGATATCCAAGATGGCAAGAAAAAGCAGATAGATAACATTCTT 2946
gi | 27357202_102-5288      TCGAAAATACAGTCGTCG-----CCAAAGGGAAATGGAGAACAGAACAATCGACTGAGC 2937
      * *      *      * * *      * * * * *      * * * * *      * *      *

gi | 223670953_92-5218      TTGGAAGTCCCGAAAACCGCAGTTCAGGTTCCGTTGGGGCATCTTTGGCTTTTACAGGG 3006
gi | 27357202_102-5288      CTCAAACTTCCATAATCTGCCATCCCTGAATCAGAGTACGCCATGCTCACAGTGATCGGC 2997
      *      * * * * *      * * *      * * *      * *      * *      * * * * *

gi | 223670953_92-5218      AACTTAATAGGCCCTGTTGTAACCAACCTCATAAATGGC--GGACTTGATAACCTACTG 3063
gi | 27357202_102-5288      ACCCTCATCGGCCCCATCTGTATCGAACATCATTTGGCGGTGAGGACTGGATTCATCATC 3057
      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * *      * * * * *      *

gi | 223670953_92-5218      CGCATGCCCTACCGGATGTGGCGAGCAACCTTGATCTATATGTCACCTAATGTCTATGTT 3123
gi | 27357202_102-5288      AAGATGCCCTACGGGTGTGGTGAGCAACTATGTTGAACTCGCCCCCAATGTGTTTGTA 3117
      * * * * * * * * * *      * * * * *      * * *      * * * * *      * * *
      5'-ACSGDGTGGYGAGCAAC-3' (C3-SE)

gi | 223670953_92-5218      CTGGAATACCTGTCAAACACACACCAAGTGACGGCTAGCGTCGAGGCGAAGGCATACAAG 3183
gi | 27357202_102-5288      TTCAACTATCTGAGAGCACCAGCAGGTACACAACAGATTGAAGCAACTGCGTTCAAT 3177
      *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *

gi | 223670953_92-5218      TTCATACAACAAGGCTACCTACGAGAGCTGAATTATAGGCGAAATGATAAATCCTTTAGT 3243
gi | 27357202_102-5288      TTTATACGGTCTGGCTATCAACGTGAGTTGAATATCGTAGAAGTGATAATTCGTTCAAGT 3237
      * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * *      * * * * *

```

gi 223670953_92-5218	CGCTGGGGTAAACAGCACCCTGGGAGTACATGGCTTCACAGCGTTCCGCGATGAAAGATTT	3303
gi 27357202_102-5288	CGCTTTGGAAACAGCAGAGCTGGAAGTACTTGGCTTACAGCGTTTGTTCATCAAGACATTC	3297
	**** ** ***** **** * * * * *	
gi 223670953_92-5218	TGCAAGGCTAGTAAGTTTGATGGCGTTCAAATCGACTCCAATCTGTTTGTGACTCCGTT	3363
gi 27357202_102-5288	TGCGCGATTAAAAAACTCGACGGAATGATATGATCAGAATGTGATCAACACAGCAATT	3357
	*** * ** * * * * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	AGCTGGCTTGTACAGAAATCAGCGTGCAGATGGGGCCTTCCAGAGGTCCATGCGGTCATT	3423
gi 27357202_102-5288	AACTGGTTTTCGTACGACAGCGTGTCTGATGTGCTATATCAGAAAGTAGTCCTGTTATA	3417
	* **** * ***** * * * * *	
gi 223670953_92-5218	CACCGTGAGATGGTGGGAGGGGTCTATCAAAGTGACGTTGCTATGACAGCATTCGTGGTA	3483
gi 27357202_102-5288	CATCAAGAAATGAATGGTGATATTACT--GGTGACATAGCAATGACAGCATACGTTGTT	3474
	** * ** * ** * * * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	ACAACACTACTCGAGTGTAGCTGTAACAACGTGATCAACACGGCGGCCATTTCGGAGGT	3543
gi 27357202_102-5288	ACAGCGTTCTTGAATGCGAGAGTGTCGCACCAAATTCGTCCAACCTGTGAAACGCGCC	3534
	*** * * * * * * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	GTCACCTTACTTGGAGAAGGCTATCCCAACAGTCAATGGGCCCTATGTGCTATCCCTAACA	3603
gi 27357202_102-5288	GTGGCATACTTGGAGAACATGCAGCCAAATGTCGGCCGTGTTTACGTAAAGGCTGTGATT	3594
	** * * ***** * * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	ACGTACGCGCTGGCCTTAGCCAAACAGCCAAA-GAGATACGAGGCGAACACGAACTTGC	3662
gi 27357202_102-5288	GCATACGCTTTGGCATTAGCCGATAGTCCTCTTGAAGTTAAACGCCAATCAAGAAGCTGTT	3654
	* ***** * * * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	CAACATGGCCTTATATAACCAAATCAAATCCACT--CGTCATTGGAAC----GCTGGAG	3715
gi 27357202_102-5288	GAACAGTGCTCGTTATTATGTCAGGCAAGAACACCGCCGTACTGGCACCAGCGTCAGGG	3714
	**** * * * * * * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	GGCA-TGCTCTTAA--TATCGAAACCG-CAAGCTATGCACT-GCTGGCTCAGATGGCTTT	3770
gi 27357202_102-5288	GGTAATGCTATCGAACCGTCGAAACGAACATCTTATGCACTTGCTAACACAAATGGTTCT	3774
	** * * * * * * * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	GAACAAGCTCAAGTACGCAGGTCCAATCGTGGTGTGGCTGACAGAACAGAAAACTCGGG	3830
gi 27357202_102-5288	GAACAGGCGTGGTTACGCAGGAGCTATCGTTGCTGGCTGACGGAAACAAGAGAGGTGG-	3833
	***** ** ***** * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	CGGGGGATTCAAGTCAACAACGGATACCTGTGTTGCTCTGCAAGCGCTGGCCAAATACAG	3890
gi 27357202_102-5288	CGGTGGGTTCAATTCAACTCAGGATACATCGTGGCTCTACAAGCGTTGGCTGCCATACAG	3893
	*** ** * * * * * * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	TGAGCAGACTGCTGGCTCACAGCTCGATCTAACCGTCAGCCTTCGATCCGAAATCGGCGG	3950
gi 27357202_102-5288	CGAGAAACTGGAGGAGATCAAATGGACCTTCGATTGAAGTC--TCTACAGCGGAGA	3950
	*** * * * * * * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	TCTTAACAGAAAGATTACAATCAACAAGAAAAACGCCCTACTACAACAAAAATTGACAT	4010
gi 27357202_102-5288	TTACAAGAAGACTTTGATAGTGAACCAAGAAAAATGCCCTAGTGCAGCAACAGTTAGATAT	4010
	* ** * * * * * * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	GTTTCGACTATCTTGGAGGCAACATCTTTATTGACACCTTAGGCACAGGTGTGGCGCAGAT	4070
gi 27357202_102-5288	TTTCGACCTGATCGGAGATGAAGTGTTCATTAGACAAAAGTTTCGGGAGTAGCTCAACT	4070
	* * * * * * * * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	GCAAGCTGAGGTCCGGTACAATGTCCCATCAGCGAAGAAAGACCGATGTGACTTCGCACT	4130
gi 27357202_102-5288	ACAGGTTCGAGACCAGATACAACACTCCGCCGACGGAGAAAGAAGTGTGCCAGTTCGATTT	4130
	** * * * * * * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	GTCTATTTCGCGTACCGAGGACGGGAGGGGAAGACTCTGTCTGCCCTTCTCAAGGGGA	4190
gi 27357202_102-5288	AAGAGTGATCACCATTGAGCGAGCGA-GAAGGATGTACGACCAGCCGATCAACGACGCAC	4189
	* * * * * * * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	CG---CCGCTCCTTCGCCAT-GAGACGTAATGGTAAG--AAGAACAGAAAGAAATAAGA	4243
gi 27357202_102-5288	CAAAACCGACGAAAGCGCCAAAGAAAAAGAAAAATAGGCCCGGGAGGGAAAGGGCAGAA	4249
	* *** ***** * * * * * * * * * *	
gi 223670953_92-5218	AGTGCAA---ACATGGGAAA-----CGAAAGAACGGA---AAGTGTAGGAAACGCCCAA	4291
gi 27357202_102-5288	AGCGCAACAGAAACAAGAAATGTCGACGAAAGAAAGGACGCGAGGTGAGTGCGTGC--AA	4307

```

gi | 223670953_92-5218      AGAAGGGCAAGGGAAAAAAGGGAAGAAGGGAAAG-----AAAGATAAGAATGAGA-- 4342
gi | 27357202_102-5288      AGGAAGAAGATGTAGAAAGCCCAAGCCACGACAGCTGCTCCACAAGTTACCACGCGTCC 4367
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi | 223670953_92-5218      AGCAACAGAAGATCCAA--GAAGTGAACCTCACTGCGCATCAACGTTTGACACAAGATATAA 4400
gi | 27357202_102-5288      ACCCCCTGAAGATGGACCTGTGCCCACTCGGTATCGATCAAAATCTGTACCAGGTTTAA 4427
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi | 223670953_92-5218      AAAGGCTGGA--AAGACAGGAATGGCTATAATCGATGTTGGTGTGTTACCGGGTTTGC 4457
gi | 27357202_102-5288      GAAAGCAGGGCCAGTGCCGGGATGTCGATCATTTGATGTTGGTATTCTACCGGATTTAG 4487
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi | 223670953_92-5218      AGTGGATGAACGCTCACTGAAAGAGCTGCAGAAAAAGATGGAAGGAAGCATTGGGAAATA 4517
gi | 27357202_102-5288      CGTTAAACAAGAAAGCTTAGTTGAGCTTCAAGAGAAAGTGAAGCCTGGTATTTTGAAATT 4547
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi | 223670953_92-5218      CGAGATCTCAGAAAGATCAGTCGTGTTTTATATTAATGAGATTCGTAATGACCGCGACTT 4577
gi | 27357202_102-5288      CGAGATCTCGGATCGCCATGCAATTCTATACATCGATGAAATACCAAGTGATCAGGAATT 4607
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi | 223670953_92-5218      GTGCGTCGCGTTTTAACGTGACTCGGGTGTTTCGAAGTCGGCACCGTTCAGCCTGTCCCCGT 4637
gi | 27357202_102-5288      ATGTTTCAACTTGAAGTAACGAGAGATTTTTCAGTCGGCATTTGTTACGCCGTGACCGGT 4667
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi | 223670953_92-5218      CAAAGTGTAACGACTATTACGAGCCTGACGACGCTTGTATGACGTTCACGGAGCTAACGA 4697
gi | 27357202_102-5288      AACTGTGTATGACTATTATGAACAGATAACAAAATGCACAAAGTTCTATGGACCCGAACC 4727
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi | 223670953_92-5218      GAACAGCGCACTACGTCATGGGCATCTGTAACGAAGAGGAATGCCGCTGCTTACAAGATAA 4757
gi | 27357202_102-5288      AAACAGTCTCTTAAACTTGGCTACGTGCGAGCACGACACCTGCAAAATGTCCTTAGACAA 4787
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi | 223670953_92-5218      ATGTACCCCTCGAGACCCGACCGATGGA-----GATCTCAGGAGTCTTGTCTGCAAAAA 4811
gi | 27357202_102-5288      ATGTTCCCTCGTGCAAGACATCCGATGATTCTGCTGTTGTAAAGGGACTGTTCTGCACAAC 4847
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi | 223670953_92-5218      CAACTTCTACGCAATCAAAGCAAAAGTTCTCTTGGTGGATGAGGACAGAAGTATGCTAAC 4871
gi | 27357202_102-5288      ATACGATTATGCCTTTAAAGGAAAAATTAATAATCAGCAGGA-AGATCAATGGCTTC 4906
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi | 223670953_92-5218      ATA-CACGGTTCAAGTGCTAGAGGTGTATAACGCAGG-GCGAC--AGAAGGTGA--ATAA 4925
gi | 27357202_102-5288      ATCTCACGTTTGAAGTCGTTGAAGTTATAAAGAAAGCGTAACCAAAAAGATAACCAAAA 4966
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi | 223670953_92-5218      AGGCAACAT-TATCGAGC--TCAAGAAACAGGGATCTTGTCTGGGAGC-CGAATATGAACA 4981
gi | 27357202_102-5288      AAACAGCACGTATCGTGTATTCGAAAAAATCAGTTGCGACTGCCCGTGTGTTGCTGGCA 5026
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi | 223670953_92-5218      AAATGGAAGAATACTTCAATTGCCGGCTCGGGCAAGGGCGG-GGTCTACAGC-ATCGATAG 5039
gi | 27357202_102-5288      AAATTGACCGCATTTCTTTATTA---TGGGAAAGGACGTTGGTCTTCGGGATCCAGCA 5083
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi | 223670953_92-5218      CAGCGGTACGCGCGCGCTGGACGAGACAAAACGATAAGAAGCTGAAGAACTGGCGTC 5099
gi | 27357202_102-5288      AAGTTGTCCTGGGTCACAATGTGTTGTCAAA--GAATGGCCAATGAACGATCCGGTAGA 5141
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

gi | 223670953_92-5218      TAGGATTGATGGGTCGTGCGCAAAATAG 5127
gi | 27357202_102-5288      TTTCTTCAAGAAGTT----- 5156
* * * * *

```


ANEXO B – Alinhamento múltiplo de sequências de CTL para *Pocillopora damicornis* e *Nematostella vectensis* provenientes do banco de dados NCBI. Em destaque, primers CTL-SE e CTL-AS.

```

gi|156400891|ref|XM_001638976. -----
gi|156400893|ref|XM_001638977. -----
gi|156386384|ref|XM_001633843. -----
gi|224498005_105-593 ATGAGAACTTACGCGATTCTTCCACTTTGTATCGTGCTTTTGTCTGCGGC 50

gi|156400891|ref|XM_001638976. -----TGCCCCGCGGGATGGGTGAGACTCAACCGAT 31
gi|156400893|ref|XM_001638977. -----TGCCCCGCGGGATGGGTGAGACTCAACCGAT 31
gi|156386384|ref|XM_001633843. -----TGCCCCGCCAGTTGGGTGATGTTCCGGCGCT 31
gi|224498005_105-593 TGGATGTGTTTCAGCCTATTGCCCTTGGGGATGGAGGCAGCTCGACAGCT 100
                        ***** * *** * ** **

gi|156400891|ref|XM_001638976. CATGCTACAAGGCAGACCAGACTATCATGAATTGGGCTGACGCACGGGCC 81
gi|156400893|ref|XM_001638977. CATGCTACAAGGCAGACCAGACTATTATGAAGTGGGCCGATGCACGGACC 81
gi|156386384|ref|XM_001633843. CTTGCTACAAGTAGTCAAGACAATTGCGAACTGGACTGATGCTAGGGCT 81
gi|224498005_105-593 TTTGCTATTATGCAAGCAGCACATCCATGACTTGGCACCAGGCCCAACGA 150
                        ***** * * * * ** ** *** * **

gi|156400891|ref|XM_001638976. GCCTGTGGCAAACCTCGGCGGAGACCTGGTAAAGATAACGAGCGAACAAGA 131
gi|156400893|ref|XM_001638977. GCCTGTGGTAAACCTCGGCGGAGACCTGGTAAAGATAACGAGCGAACAAGA 131
gi|156386384|ref|XM_001633843. ACCTGTGGTAAACCTCGGCGGAGACCTGGTGAAGATCAAGGCGAAGAGGA 131
gi|224498005_105-593 TTCTGTCTGAAGACTGGGAGGAGACCTGGTAAAGATTACCAATGCGCGGGA 200
                        **** * * **** * **** * * * *
                        5'-ACTSGGMGGAGACCTGGT-3' (CTL-SE)

gi|156400891|ref|XM_001638976. AAACACATTTGTTTATGAGCTGAGCCGCAATCAAGCCCCCTCAAGAAGTT 181
gi|156400893|ref|XM_001638977. AAACACATTTGTGTACGAGCTGAGCCGCAAGCAAGCCCCCTCAAGAAATC 181
gi|156386384|ref|XM_001633843. AAACAAATTATTGTATAACCTTTCGCGCAAGGAGGCTCCATCAGCGCCTC 181
gi|224498005_105-593 AACAGATTTGTCTTAGCCGTCGCGAGGAAGTCTGCACCAACGAAGAAAC 250
                        **** * * * * * * * * * *

gi|156400891|ref|XM_001638976. TAATGTGGATAGGATTAACGGAACCC-AACGACACCCACAAAGTTCTGA 230
gi|156400893|ref|XM_001638977. GCATGTGGATAGGATTAACGCAACCC-AACGACACCCACAAAGTTCTGA 230
gi|156386384|ref|XM_001633843. ATATGTGGATTGGGCTAAAGCGGAACCCTAACGATAA----GAAGTTCTA 227
gi|224498005_105-593 AAGTGTGGATCGGCCTGATGTGGACCGCTAACGAC-----TTTTA 290
                        ***** * * * * * * * * * *

gi|156400891|ref|XM_001638976. GTGGGTTGACGGCTCAAGACCCCTCTATACCAAATGGTGGACAGGTGAAC 280
gi|156400893|ref|XM_001638977. GTGGTTTGACAGCTCAAGACCCCTTTATACCAAATGGTGGACAGGCGAAC 280
gi|156386384|ref|XM_001633843. CTGGGTTGACGGCTCAAGGCCAGGCTACACGAAGTGGATGAAGAATGAGC 277
gi|224498005_105-593 CTGGAGTGATTACTCTGTTCCAGTCTACAAAGCCTGGGCTCCAAATGAAC 340
                        *** ** * * * * * * *

gi|156400891|ref|XM_001638976. CCAAT---GGTCTTGG---GCGTGAGGATTGTGGTCAAATACACACGTT 323
gi|156400893|ref|XM_001638977. CCAAC---AATCATGGTGCGAGTGAGGATTGTGGTGAATATACACGTT 326
gi|156386384|ref|XM_001633843. CGAAT---AACGCCTATGGCAACGAAAACCTGTGCCCACTTTACAGCGT 323
gi|224498005_105-593 CGAATGGAATAATCCCGGAACCATGCAGCAACATGTGGACTGGGTATACT 390
                        * ** * * * * *

gi|156400891|ref|XM_001638976. TTCT----GGATCCG-GC--GCCAAGCACTGGAATGATCTCTCT--TGC 363
gi|156400893|ref|XM_001638977. TCCTCTTCAGACCCGCGT--GCCAAGCACTGGAATGATCTCCCT--TGC 372
gi|156386384|ref|XM_001633843. ACCGGATAATCTGCCTTAC--TTCCAGCAATGGAATGAT-----TAT 363
gi|224498005_105-593 TCCGTTCTGCCAATCAGAGCAAGCGTTACTGGAATGACATGCCTTGATC 440
                        * * * * *
                        (CTL-AS) 3'-TGACCTTACTGASGGAAC-5'

gi|156400891|ref|XM_001638976. GATCAAGGCAACGCCTACAAGTGTGGCTTCATTGCGAAAAATCGGTTTG 413
gi|156400893|ref|XM_001638977. GATCTAGGCAAGTCTTGATGTGTGGCTTCATTGTGAAAAATCGGCTTA 422
gi|156386384|ref|XM_001633843. GATTGCAGTAGA-----AAATGCACCTTTATTGTGAAAAATCTGCTTT 407
gi|224498005_105-593 GGTATCATCTCA--CGTGCCCTTTGGCCTGGGTGTGCAAAAAGCTCGCTTG 488
                        * * * * * * * * * *

gi|156400891|ref|XM_001638976. TGATTAA--- 420
gi|156400893|ref|XM_001638977. TAATAAATGA 432
gi|156386384|ref|XM_001633843. TCTGTGA--- 414
gi|224498005_105-593 A----- 489

```

ANEXO C – Alinhamento múltiplo de sequências de MBL para *Acropora millepora* provenientes do banco de dados NCBI. Em destaque, *primers* MBL-SE e MBL-AS.

```

gi|193081149|gb|EU717900.1 -----
gi|193081151|gb|EU717901.1 -----
gi|193081147|gb|EU717899.1 -----
gi|193081141|gb|EU717896.1 -----
gi|193081145|gb|EU717898.1 -----
gi|193081143|gb|EU717897.1 -----
gi|193081153|gb|EU717902.1 -----
gi|193081157|gb|EU717904.1 -----
gi|193081155|gb|EU717903.1 -----
gi|193081159|gb|EU717905.1 -----
gi|193081139|gb|EU717895.1 CAACTGCTCTGAAGATTCCAAACGATTTCGAGAGCAATCAAGAAACCTTTG 50
gi|193081163|gb|EU717907.1 -----
gi|193081161|gb|EU717906.1 -----
gi|193081165|gb|EU717908.1 -----

gi|193081149|gb|EU717900.1 -----
gi|193081151|gb|EU717901.1 -----
gi|193081147|gb|EU717899.1 -----
gi|193081141|gb|EU717896.1 -----
gi|193081145|gb|EU717898.1 -----
gi|193081143|gb|EU717897.1 -----
gi|193081153|gb|EU717902.1 -----
gi|193081157|gb|EU717904.1 -----
gi|193081155|gb|EU717903.1 -----
gi|193081159|gb|EU717905.1 -----
gi|193081139|gb|EU717895.1 AAAGTTGCACCGCAAAGCGAGTATCCACAACACCCAGGCCAATACAGAGA 100
gi|193081163|gb|EU717907.1 -----
gi|193081161|gb|EU717906.1 -----
gi|193081165|gb|EU717908.1 -----

gi|193081149|gb|EU717900.1 -----CCAGTTATTTTCCTGGTTCTGTGTGCCATC 30
gi|193081151|gb|EU717901.1 -----CCAGTTATTTTCCTGGTTCTGTGTGCCATC 30
gi|193081147|gb|EU717899.1 -----CCAGTTATTTTCCTGGTTCTGTGTGCCATC 30
gi|193081141|gb|EU717896.1 -----CCAGTTATTTTCCTGGTTCTGTGTGCCATC 30
gi|193081145|gb|EU717898.1 -----CCAGTTATTTTCCTGGTTCTGTGTGCCATC 30
gi|193081143|gb|EU717897.1 -----CCAGTTATTTTCCTGGTTCTGTGTGCCATC 30
gi|193081153|gb|EU717902.1 -----CCAGTTATTTTCCTGGTTCTGTGTGCCATC 30
gi|193081157|gb|EU717904.1 -----CCAGTTATTTTCCTGGTTCTGTGTGCCATC 30
gi|193081155|gb|EU717903.1 -----CCAGTTATTTTCCTGGTTCTGTGTGCCATC 30
gi|193081159|gb|EU717905.1 -----CCAGTTATTTTCCTGGTTCTGTGTGCCATC 30
gi|193081139|gb|EU717895.1 TGAAGATTGCCGGAGTTTGGCCAGTTATTTTCCTGGTTCTGTGTGCCATC 150
gi|193081163|gb|EU717907.1 -----CCAGTTATTTTCCTGGTTCTGTGTGCCATC 30
gi|193081161|gb|EU717906.1 -----CCAGTTATTTTCCTGGTTCTGTGTGCCATC 30
gi|193081165|gb|EU717908.1 -----CCAGTTATTTTCCTGGTTCTGTGTGCCATC 30
*****

gi|193081149|gb|EU717900.1 GAATGCAATGTTTCAGCTTTTGGTTTCAGGGGCAAGCCTTTTCCAGGAAA 80
gi|193081151|gb|EU717901.1 GAATGCAATGTTTCAGCTTTTGGTTTCAGGGGCAAGCCTTTTCCAGGAAA 80
gi|193081147|gb|EU717899.1 GAATGCAATGTTTCAGCTTTTGGTTTCAGGGGCAAGCCTTTTCCAGGAAA 80
gi|193081141|gb|EU717896.1 GAATGCAATGTTTCAGCTTTTGGTTTCAGGGGCAAGCCTTTTCCAGGAAA 80
gi|193081145|gb|EU717898.1 GAATGCAATGTTTCAGCTTTTGGTTTCAGGGGCAAGCCTTTTCCAGGAAA 80
gi|193081143|gb|EU717897.1 GAATGCAATGTTTCAGCTTTTGGTTTCAGGGGCAAGCCTTTTCCAGGAAA 80
gi|193081153|gb|EU717902.1 GAATGCAATGTTTCAGCTTTTGGTTTCAGGGGCAAGCCTTTTCCAGGAAA 80
gi|193081157|gb|EU717904.1 GAATGCAATGTTTCAGCTTTTGGTTTCAGGGGCAAGCCTTTTCCAGGAAA 80
gi|193081155|gb|EU717903.1 GAATGCAATGTTTCAGCTTTTGGTTTCAGGGGCAAGCCTTTTCCAGGAAA 80
gi|193081159|gb|EU717905.1 GAATGCAATGTTTCAGCTTTTGGTTTCAGGGGCAAGCCTTTTCCAGGAAA 80
gi|193081139|gb|EU717895.1 GAATGCAATGTTTCAGCTTTTGGTTTCAGGGGCAAGCCTTTTCCAGGAAA 200
gi|193081163|gb|EU717907.1 GAATGCAATGTTTCAGCTTTTGGTTTCAGGGGCAAGCCTTTTCCAGGAAA 80
gi|193081161|gb|EU717906.1 GAATGCAATGTTTCAGCTTTTGGTTTCAGGGGCAAGCCTTTTCCAGGAAA 80
gi|193081165|gb|EU717908.1 GAATGCAATGTTTCAGCTTTTGGTTTCAGGGGCAAGCCTTTTCCAGGAAA 80
*****

```

```

gi|193081149|gb|EU717900.1      GATTCAAAACGATGGATCATTCTTCAACGATGTTTCGTGATGAGCCAGAGG 130
gi|193081151|gb|EU717901.1      GATTCAAAACGATGGATCATTCTTCAACGATGTTTCGTGATGAGCCAGAGG 130
gi|193081147|gb|EU717899.1      GATTCAAAACGATGGATCATTCTTCAACGATGTTTCGTGATGAGCCAGAGG 130
gi|193081141|gb|EU717896.1      GATTCAAAACGATGGATCATTCTTCAACGATGTTTCGTGATGAGCCAGAGG 130
gi|193081145|gb|EU717898.1      GATTCAAAACGATGGATCATTCTTCAACGATGTTTCGTGATGAGCCAGAGG 130
gi|193081143|gb|EU717897.1      GATTCAAAACGATGGATCATTCTTCAACGATGTTTCGTGATGAGCCAGAGG 130
gi|193081153|gb|EU717902.1      GATTCAAAACGATGGATCATTCTTCAACGATGTTTCGTGATGAGCCAGAGG 130
gi|193081157|gb|EU717904.1      GATTCAAAACGATGGATCATTCTTCAACGATGTTTCGTGATGAGCCAGAGG 130
gi|193081155|gb|EU717903.1      GATTCAAAACGATGGATCATTCTTCAACGATGTTTCGTGATGAGCCAGAGG 130
gi|193081159|gb|EU717905.1      GATTCAAAACGATGGATCATTCTTCAACGATGTTTCGTGATGAGCCAGAGG 130
gi|193081139|gb|EU717895.1      GATTCAAAACGATGGATCATTCTTCAACGATGTTTCGTGATGAGCCAGAGG 250
gi|193081163|gb|EU717907.1      GATTCAAAACGATGGATCATTCTTCAACGATGTTTCGTGATGAGCCAGAGG 130
gi|193081161|gb|EU717906.1      GATTCAAAACGATGGATCATTCTTCAACGATGTTTCGTGATGAGCCAGAGG 130
gi|193081165|gb|EU717908.1      GATTCAAAACGATGGATCATTCTTCAACGATGTTTCGTGATGAGCCAGAGG 130
*****

gi|193081149|gb|EU717900.1      AAGACCCCGGGATACTGGAAAAACATCGAACAAGCTGTTGATCCCTGCGGA 180
gi|193081151|gb|EU717901.1      AAGACCCCGGGATACTGGAAAAACATCGAACAAGCTGTTGATCCCTGCGGA 180
gi|193081147|gb|EU717899.1      AAGACCCCGGGATACTGGAAAAACATCGAACAAGCTGTTGATCCCTGCGGA 180
gi|193081141|gb|EU717896.1      AAGACCCCGGGATACTGGAAAAACATCGAACAAGCTGTTGATCCCTGCGGA 180
gi|193081145|gb|EU717898.1      AAGACCCCGGGATACTGGAAAAACATCGAACAAGCTGTTGATCCCTGCGGA 180
gi|193081143|gb|EU717897.1      AAGACCCCGGGATACTGGAAAAACATCGAACAAGCTGTTGATCCCTGCGGA 180
gi|193081153|gb|EU717902.1      AAGACCCCGGGATACTGGAAAAACATCGAACAAGCTGTTGATCCCTGCGGA 180
gi|193081157|gb|EU717904.1      AAGACCCCGGGATACTGGAAAAACATCGAACAAGCTGTTGATCCCTGCGGA 180
gi|193081155|gb|EU717903.1      AAGACCCCGGGATACTGGAAAAACATCGAACAAGCTGTTGATCCCTGCGGA 180
gi|193081159|gb|EU717905.1      AAGACCCCGGGATACTGGAAAAACATCGAACAAGCTGTTGATCCCTGCGGA 180
gi|193081139|gb|EU717895.1      AAGACCCCGGGATACTGGAAAAACATCGAACAAGCTGTTGATCCCTGCGGA 300
gi|193081163|gb|EU717907.1      AAGACCCCGGGATACTGGAAAAACATCGAACAAGCTGTTGATCCCTGCGGA 180
gi|193081161|gb|EU717906.1      AAGACCCCGGGATACTGGAAAAACATCGAACAAGCTGTTGATCCCTGCGGA 180
gi|193081165|gb|EU717908.1      AAGACCCCGGGATACTGGAAAAACATCGAACAAGCTGTTGATCCCTGCGGA 180
*****

gi|193081149|gb|EU717900.1      GACGTTTGGACGAAGTTTGAAGAGTACTGTTATCATGTGGGCGCCAAAAT 230
gi|193081151|gb|EU717901.1      GACGTTTGGACGAAGTTTGAAGAGTACTGTTATCATGTGGGCGCCAAAAT 230
gi|193081147|gb|EU717899.1      GATGTTTGGACGAAGTTTGAAGAGTACTGTTATCATGTGGGCGCCAAAAT 230
gi|193081141|gb|EU717896.1      GATGTTTGGACGAAGTTTGAAGAGTACTGTTATCATGTGGGCGCCAAAAT 230
gi|193081145|gb|EU717898.1      GATGTTTGGACGAAGTTTGAAGAGTACTGTTATCATGTGGGCGCCAAAAT 230
gi|193081143|gb|EU717897.1      GACGTTTGGACGAAGTTTGAAGAGTACTGTTATCATGTGGGCGCCAAAAT 230
gi|193081153|gb|EU717902.1      GATGTTTGGACGAAGTTTGAAGAGTACTGTTATCATGTGGGCGCCAAAAT 230
gi|193081157|gb|EU717904.1      GATGTTTGGACGAAGTTTGAAGAGTACTGTTATCATGTGGGCGCCAAAAT 230
gi|193081155|gb|EU717903.1      GATGTTTGGACGAAGTTTGAAGAGTACTGTTATCATGTGGGCGCCAAAAT 230
gi|193081159|gb|EU717905.1      GATGTTTGGACGAAGTTTGAAGAGTACTGTTATCATGTGGGCGCCAAAAT 230
gi|193081139|gb|EU717895.1      GATGTTTGGACGAAGTTTGAAGAGTACTGTTATCATGTGGGCGCCAAAAT 350
gi|193081163|gb|EU717907.1      GATGTTTGGACGAAGTTTGAAGAGTACTGTTATCATGTGGGCGCCAAAAT 230
gi|193081161|gb|EU717906.1      GACGCTTGGACGAAGTTTGAAGAGTACTGTTATCATGTGGGCGCCAAAAT 230
gi|193081165|gb|EU717908.1      GACGTTTGGACGAAGTTTGAAGAGTACTGTTATCATGTGGGCGCCAAAAT 230
** * *****

gi|193081149|gb|EU717900.1      AATGACTGAGGAACAGGCTCAACAGTACTGTGACCAAGAGATGGACGCAA 280
gi|193081151|gb|EU717901.1      AATGACTGAGGAACAGGCTCAACAGTACTGTGACCAAGAGATGGACGCAA 280
gi|193081147|gb|EU717899.1      AATGACTGAGGAACAGGCTCAACAGTACTGTGACCAAGAGATGGACGCAA 280
gi|193081141|gb|EU717896.1      AATGACTGAGGAACAGGCTCAACAGTACTGTGACCAAGAGATGGACGCAA 280
gi|193081145|gb|EU717898.1      AATGACTGAGGAACAGGCTCAACAGTACTGTGACCAAGAGATGGACGCAA 280
gi|193081143|gb|EU717897.1      AATGACTGAGGAACAGGCTCAACAGTACTGTGACCAAGAGATGGACGCAA 280
gi|193081153|gb|EU717902.1      AATGACTGAGGAACAGGCTCAACAGTACTGTGACCAAGAGATGGACGCAA 280
gi|193081157|gb|EU717904.1      AATGACTGAGGAACAGGCTCAACAGTACTGTGACCAAGAGATGGACGCAA 280
gi|193081155|gb|EU717903.1      AATGACTGAGGAACAGGCTCAACAGTACTGTGACCAAGAGATGGACGCAA 280
gi|193081159|gb|EU717905.1      AATGACTGAGGAACAGGCTCAACAGTACTGTGACCAAGAGATGGACGCAA 280
gi|193081139|gb|EU717895.1      AATGACTGAGGAACAGGCTCAACAGTACTGTGACCAAGAGATGGACGCAA 400
gi|193081163|gb|EU717907.1      AATGACTGAGGAACAGGCTCAACAGTACTGTGACCAAGAGATGGACGCAA 280
gi|193081161|gb|EU717906.1      AATGACTGAGGAACAGGCTCAACAGTACTGTGACCAAGAGATGGACGCAA 280
gi|193081165|gb|EU717908.1      AATGACTGAGGAACAGGCTCAACAGTACTGTGACCAAGAGATGGACGCAA 280
*****

```



```

gi|193081149|gb|EU717900.1| ATTTGGCAAAGATCAACAGCAAGGAAGAAAACAACCTTTGTCTTGGACGTG 330
gi|193081151|gb|EU717901.1| ATTTGGCAAAGATCAACAGCAAGGAAGAAAACAACCTTTGTCTTGGACGTG 330
gi|193081147|gb|EU717899.1| ATTTGGCAAAGATCAACAGCAAGGAAGAAAACAACCTTTGTCTTGGACGTG 330
gi|193081141|gb|EU717896.1| ATTTGGCAAAGATCAACAGCAAGGAAGAAAACAACCTTTGTCTTGGACGTG 330
gi|193081145|gb|EU717898.1| ATTTGGCAAAGATCAACAGCAAGGAAGAAAACAACCTTTGTCTTGGACGTG 330
gi|193081143|gb|EU717897.1| ATTTGGCAAAGATCAACAGCAAGGAAGAAAACAACCTTTGTCTTGGACGTG 330
gi|193081153|gb|EU717902.1| ATTTGGCAAAGATCAACAGCAAGGAAGAAAACAACCTTTGTCTTGGACGTG 330
gi|193081157|gb|EU717904.1| ATTTGGCAAAGATCAACAGCAAGGAAGAAAACAACCTTTGTCTTGGACGTG 330
gi|193081155|gb|EU717903.1| ATTTGGCAAAGATCAACAGCAAGGAAGAAAACAACCTTTGTCTTGGACGTG 330
gi|193081159|gb|EU717905.1| ATTTGGCAAAGATCAACAGCAAGGAAGAAAACAACCTTTGTCTTGGACGTG 330
gi|193081139|gb|EU717895.1| ACTTGGCAAAGATCAACAGCAAGGAAGAAAACAACCTTTGTCTTGGACGTG 450
gi|193081163|gb|EU717907.1| ATTTGGCAAAGATCAACAGCAAGGAAGAAAACAACCTTTGTCTTGGACGTG 330
gi|193081161|gb|EU717906.1| ATTTGGCAAAGATCAACAGCAAGGAAGAAAACAACCTTTGTCTTGGACGTG 330
gi|193081165|gb|EU717908.1| ATTTGGCAAAGATCAACAGCAAGGAAGAAAACAACCTTTGTCTTGGACGTG 330
* *****
* 5-TGGCAAAGATCAACAGCAAGGA-3' (MBL-SE)
* *****

gi|193081149|gb|EU717900.1| GCGAAAAGGCATGCTCCATCGGCGAAAAGGTCTGGATTGGAATGAAGTG 380
gi|193081151|gb|EU717901.1| GCGAAAAGGCATGCTCCATCGGCGAAAAGGTCTGGATTGGAATGAAGTG 380
gi|193081147|gb|EU717899.1| GCGAAAAGGCATGCTCCATCGGCGAAAAGGTCTGGATTGGAATGAAGTG 380
gi|193081141|gb|EU717896.1| GCGAAAAGGCATGCTCCATCGGCGAAAAGGTCTGGATTGGAATGAAGTG 380
gi|193081145|gb|EU717898.1| GCGAAAAGGCATGCTCCATCGGCGAAAAGGTCTGGATTGGAATGAAGTG 380
gi|193081143|gb|EU717897.1| GCGAAAAGGCATGCTCCATCGGCGAAAAGGTCTGGATTGGAATGAAGTG 380
gi|193081153|gb|EU717902.1| GCGAAAAGGCATGCTCCATCGGCGAAAAGGTCTGGATTGGAATGAAGTG 380
gi|193081157|gb|EU717904.1| GCGAAAAGGCATGCTCCATCGGCGAAAAGGTCTGGATTGGAATGAAGTG 380
gi|193081155|gb|EU717903.1| GCGAAAAGGCATGCTCCATCGGCGAAAAGGTCTGGATTGGAATGAAGTG 380
gi|193081159|gb|EU717905.1| GCGAAAAGGCATGCTCCATCGGCGAAAAGGTCTGGATTGGAATGAAGTG 380
gi|193081139|gb|EU717895.1| GCGAAAAGGCATGCTCCATCGGCGAAAAGGTCTGGATTGGAATGAAGTG 500
gi|193081163|gb|EU717907.1| GCGAAAAGGCATGCTCCATCGGCGAAAAGGTCTGGATTGGAATGAAGTG 380
gi|193081161|gb|EU717906.1| GCGAAAAGGCATGCTCCATCGGCGAAAAGGTCTGGATTGGAATGAAGTG 380
gi|193081165|gb|EU717908.1| GCGAAAAGGCATGCTCCATCGGCGAAAAGGTCTGGATTGGAATGAAGTG 380
*****

gi|193081149|gb|EU717900.1| GGTTAATAGTGCCCGAAATTACTACTGGTATGATAACTCCGTCCCAACCT 430
gi|193081151|gb|EU717901.1| GGTTAATAGTGCCCGAAATTACTACTGGTATGATAACTCCGTCCCAACCT 430
gi|193081147|gb|EU717899.1| GGAAAATAGTACCCGAAATTACTACTGGTATGATAACTCCGTCCCAACCT 430
gi|193081141|gb|EU717896.1| GGAAAATAAGTCCCGAAATTACTACTGGTATGATAACTCCGTCCCAACCT 430
gi|193081145|gb|EU717898.1| GGAAAATAAGTCCCGAAATTACTACTGGTATGATAACTCCGTCCCAACCT 430
gi|193081143|gb|EU717897.1| GGAAAATAAGTCCCGAAATTACTACTGGTATGATAACTCCGTCCCAACCT 430
gi|193081153|gb|EU717902.1| GGAAAATAGTACCCGAAATTACTACTGGTATGATAACTCCGTCCCAACCT 430
gi|193081157|gb|EU717904.1| GGAAAATAGTACCCGAAATTACTACTGGTATGATAACTCCGTCCCAACCT 430
gi|193081155|gb|EU717903.1| GGAAAATAGTACCCGAAATTACTACTGGTATGATAACTCCGTCCCAACCT 430
gi|193081159|gb|EU717905.1| GGAAAATAAGTCCCGAAATTACTACTGGTATGATAACTCCGTCCCAACCT 430
gi|193081139|gb|EU717895.1| GGAAAATAAGTCCCGAAATTACTACTGGTATGATAACTCCGTCCCAACCT 550
gi|193081163|gb|EU717907.1| GGAAAATAAGTCCCGAAATTACTACTGGTATGATAACTCCGTCCCAACCT 430
gi|193081161|gb|EU717906.1| GGAAAATAAGTCCCGAAATTACTACTGGTATGATAACTCCGTCCCAACCT 430
gi|193081165|gb|EU717908.1| GGAAAATAGTACCCGAAATTACTACTGGTATGATAACTCCGTCCCAACCT 430
**  ****  *****

gi|193081149|gb|EU717900.1| TCACTAATTGGGCTCCTGGTGAACCAAATGGAAAAGACGAGGAGCCGTGC 480
gi|193081151|gb|EU717901.1| TCACTAATTGGGCTCCTGGTGAACCAAATGGAAAAGACGAGGAGCCGTGC 480
gi|193081147|gb|EU717899.1| TCACTAATTGGGCTCCTGGTGAACCAAATGGAAAAGTCAAGGAGCCGTGC 480
gi|193081141|gb|EU717896.1| TCACTAATTGGGCTCCTGGTGAACCAAATGGAAAAGTCAAGGAGCCGTGC 480
gi|193081145|gb|EU717898.1| TCACTAATTGGGCTCCTGGTGAACCAAATGGAAAAGTCAAGGAGCCGTGC 480
gi|193081143|gb|EU717897.1| TCACTAATTGGGCTCCTGGTGAACCAAATGGAAAAGTCAAGGAGCCGTGC 480
gi|193081153|gb|EU717902.1| TCACTAATTGGGCTCCTGGTGAACCAAATGGAAAAGTCAAGGAGCCGTGC 480
gi|193081157|gb|EU717904.1| TCACTAATTGGGCTCCTGGTGAACCAAATGGAAAAGTCAAGGAGCCGTGC 480
gi|193081155|gb|EU717903.1| TCACTAATTGGGCTCCTGGTGAACCAAATGGAAAAGTCAAGGAGCCGTGC 480
gi|193081159|gb|EU717905.1| TCACTAATTGGGCTCCTGGTGAACCAAATGGAAAAGTCAAGGAGCCGTGC 480
gi|193081139|gb|EU717895.1| TCACTAATTGGGCTCCTGGTGAACCAAATGGAAAAGTCAAGGAGCCGTGC 600
gi|193081163|gb|EU717907.1| TCACTAATTGGGCTCCTGGTGAACCAAATGGAAAAGTCAAGGAGCCGTGC 480
gi|193081161|gb|EU717906.1| TCACTAATTGGGCTCCTGGTGAACCAAATGGAAAAGTCAAGGAGCCGTGC 480
gi|193081165|gb|EU717908.1| TCACTAATTGGGCTCCTGGTGAACCAAATGGAAAAGTCAAGGAGCCGTGC 480
*****

```

```

gi|193081149|gb|EU717900.1      GTTGCATGTATATTGAACGATACGAGTTGCTACCCGTTAGTGCGGCTGG 530
gi|193081151|gb|EU717901.1      GTTGCATGTATATTGAACGATACGAGTTGCTACCCGTTAGTGCGGCTGG 530
gi|193081147|gb|EU717899.1      GTTGCATGTATATTGAACGATACGAGTCGCTACCCGTTAGTGCGGCTGG 530
gi|193081141|gb|EU717896.1      GTTGCATGTATATTGAACGATACGAGTCGCTACCCGTTAGTGCGGCTGG 530
gi|193081145|gb|EU717898.1      GTTGCATGTATATTGAACGATACGAGTCGCTACCCGTTAGTGCGGCTGG 530
gi|193081143|gb|EU717897.1      GTTGCATGTATATTGAACGATACGAGTCGCTACCCGTTAGTGCGGCTGG 530
gi|193081153|gb|EU717902.1      GTTGCATGTATATTCAACAATACGAGTTGCTACCCGTTAAGGCGGCTGG 530
gi|193081157|gb|EU717904.1      GTTGCATGTATATTCAACAATACGAGTTGCTACCCGTTAAGGCGGCTGG 530
gi|193081155|gb|EU717903.1      GTTGCATGTATATTCAACAATACGAGTTGCTACCCGTTAAGGCGGCTGG 530
gi|193081159|gb|EU717905.1      GTTGCATGTATATTCAACAATACGAGTTGCTACCCGTTAAGGCGGCTGG 530
gi|193081139|gb|EU717895.1      GTTGCATGTATATTGAACAATACGAAATGCTACCCGTTATGGCGGCTGG 650
gi|193081163|gb|EU717907.1      GTTGCATGTATATTGAACAATACGAAATGCTACCCGTTATGGCGGCTGG 530
gi|193081161|gb|EU717906.1      GTTGCATGTATATTGAACAATACGAAATGCTACCCGTTATGGCGGCTGG 530
gi|193081165|gb|EU717908.1      GTTGCATGTATATTGAACAATACGAAATGCTACCCGTTATGGCGGCTGG 530
*****

gi|193081149|gb|EU717900.1      TTATTGGAATGACGAGGTCTGTGACGCCCCACACATTGCTGCAGTATGCA 580
gi|193081151|gb|EU717901.1      TTATTGGAATGACGAGGTCTGTGACGCCCCACACATTGCTGCAGTATGCA 580
gi|193081147|gb|EU717899.1      TTATTGGAATGACGAGGTCTGTGACGCCCCACACATTGCTGCAGTATGCA 580
gi|193081141|gb|EU717896.1      TTATTGGAATGACGAGGTCTGTGACGCCCCACACATTGCTGCAGTATGCA 580
gi|193081145|gb|EU717898.1      TTATTGGAATGACGAGGTCTGTGACGCCCCACACATTGCTGCAGTATGCA 580
gi|193081143|gb|EU717897.1      TTATTGGAATGACGAGGTCTGTGACGCCCCACACATTGCTGCAGTATGCA 580
gi|193081153|gb|EU717902.1      TTATTGGAATGATGAGGTCTGTGACGCCCCACACATTGCTGCAGTATGCA 580
gi|193081157|gb|EU717904.1      TTATTGGAATGATGAGGTCTGTGACGCCCCACACATTGCTGCAGTATGCA 580
gi|193081155|gb|EU717903.1      TTATTGGAATGATGAGGTCTGTGACGCCCCACACATTGCTGCAGTATGCA 580
gi|193081159|gb|EU717905.1      TTATTGGAATGATGAGGTCTGTGACGCCCCACACATTGCTGCAGTATGCA 580
gi|193081139|gb|EU717895.1      TTATTGGAATGATGAGGTTGTGACGCCCCACACACTGCTGCAGTATGCA 700
gi|193081163|gb|EU717907.1      TTATTGGAATGATGAGGTCTGTGACGCCCCACACACTGCTGCAGTATGCA 580
gi|193081161|gb|EU717906.1      TTATTGGAATGATGAGGTCTGTGACGCCCCACACACTGCTGCAGTATGCA 580
gi|193081165|gb|EU717908.1      TTATTGGAATGATGAGGTCTGTGACGCCCCACACACTGCTGCAGTATGCA 580
*****
3'-TAACCTTACTACTCCAGACACT-5' (MBL-AS)

gi|193081149|gb|EU717900.1      AGAGGCTG----- 588
gi|193081151|gb|EU717901.1      AGAGGCTG----- 588
gi|193081147|gb|EU717899.1      AGAGGCTG----- 588
gi|193081141|gb|EU717896.1      AGAGGCTG----- 588
gi|193081145|gb|EU717898.1      AGAGGCTG----- 588
gi|193081143|gb|EU717897.1      AGAGGCTG----- 588
gi|193081153|gb|EU717902.1      AGAGGCTG----- 588
gi|193081157|gb|EU717904.1      AGAGGCTG----- 588
gi|193081155|gb|EU717903.1      AGAGGCTG----- 588
gi|193081159|gb|EU717905.1      AGAGGCTG----- 588
gi|193081139|gb|EU717895.1      AGAGGCTGTACTAGTGAGTTTTCACCAGGACTCACCAACAAAAGAAGCCG 750
gi|193081163|gb|EU717907.1      AGAGGCTG----- 588
gi|193081161|gb|EU717906.1      AGAGGCTG----- 588
gi|193081165|gb|EU717908.1      AGAGGCTG----- 588
*****

gi|193081149|gb|EU717900.1      -----
gi|193081151|gb|EU717901.1      -----
gi|193081147|gb|EU717899.1      -----
gi|193081141|gb|EU717896.1      -----
gi|193081145|gb|EU717898.1      -----
gi|193081143|gb|EU717897.1      -----
gi|193081153|gb|EU717902.1      -----
gi|193081157|gb|EU717904.1      -----
gi|193081155|gb|EU717903.1      -----
gi|193081159|gb|EU717905.1      -----
gi|193081139|gb|EU717895.1      AAAGTAGTCTCGTTAACTGATAGAACAAGTTAATGTAATGGATGTGGAAG 800
gi|193081163|gb|EU717907.1      -----
gi|193081161|gb|EU717906.1      -----
gi|193081165|gb|EU717908.1      -----

```

```
gi|193081149|gb|EU717900.1 -----
gi|193081151|gb|EU717901.1 -----
gi|193081147|gb|EU717899.1 -----
gi|193081141|gb|EU717896.1 -----
gi|193081145|gb|EU717898.1 -----
gi|193081143|gb|EU717897.1 -----
gi|193081153|gb|EU717902.1 -----
gi|193081157|gb|EU717904.1 -----
gi|193081155|gb|EU717903.1 -----
gi|193081159|gb|EU717905.1 -----
gi|193081139|gb|EU717895.1 TTACTTTTTTACAATGCAATGAATAGATGTTGCGCCGGCTGCAAATTAAA 850
gi|193081163|gb|EU717907.1 -----
gi|193081161|gb|EU717906.1 -----
gi|193081165|gb|EU717908.1 -----
```

```
gi|193081149|gb|EU717900.1 -----
gi|193081151|gb|EU717901.1 -----
gi|193081147|gb|EU717899.1 -----
gi|193081141|gb|EU717896.1 -----
gi|193081145|gb|EU717898.1 -----
gi|193081143|gb|EU717897.1 -----
gi|193081153|gb|EU717902.1 -----
gi|193081157|gb|EU717904.1 -----
gi|193081155|gb|EU717903.1 -----
gi|193081159|gb|EU717905.1 -----
gi|193081139|gb|EU717895.1 AACTTTAAATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCG 887
gi|193081163|gb|EU717907.1 -----
gi|193081161|gb|EU717906.1 -----
gi|193081165|gb|EU717908.1 -----
```