

Universidade Federal do Ceará
Centro de Ciências
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Doutorado em Bioquímica

FRANCISCO HIRAN FARIAS COSTA

CLONAGEM E MODELAGEM MOLECULAR DE DUAS LECTINAS TIPO C
(LvCTL-br1 e LvCTL-br2) DE *Litopenaeus vannamei*.

FORTALEZA – CEARÁ

NOVEMBRO DE 2009

**CLONAGEM E MODELAGEM MOLECULAR DE DUAS LECTINAS TIPO C
(LvCTL-br1 e LvCTL-br2) DE *Litopenaeus vannamei*.**

FRANCISCO HIRAN FARIAS COSTA

**Tese apresentada à Coordenação do Curso
de Pós-Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal do Ceará como
requisito parcial para a obtenção do grau
de Doutor em Bioquímica.**

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada

FORTALEZA – CEARÁ

NOVEMBRO DE 2009

FRANCISCO HIRAN FARIAS COSTA

**CLONAGEM E MODELAGEM MOLECULAR DE DUAS LECTINAS TIPO C
(LvCTL-br1 e LvCTL-br2) DE *Litopenaeus vannamei*.**

Tese apresentada à coordenação do curso de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

Tese aprovada em 24 de Novembro de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Gandhi Rádis Baptista (Co-Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Walter Moreira Maia Júnior
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

**"Se algum dia vocês forem
surpreendidos pela injustiça ou
pela ingratidão, não deixem de
crer na vida, de engrandecê-la
pela decência, de construí-la
pelo trabalho"**

Edson Queiroz

Aos meus filhos, Hiran e Esther,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Benildo Sousa Cavada, pela orientação deste trabalho, amizade, incentivo nas horas difíceis e exemplo de profissional e ser humano.

Ao Professor Doutor Gandhi Rádis Baptista, pela co-orientação deste trabalho, amizade e ensinamentos no campo da biologia molecular.

Aos demais membros da Banca Examinadora Professores Doutores Alexandre Holanda Sampaio, Walter Moreira Maia Júnior e Rodrigo Bairy Leal, pelas sugestões que contribuíram para o enriquecimento desta Tese.

Aos Professores Doutores Joaquim Albenísio Gomes da Silveira (ex-Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica) e Norma Maria Barros Benevides (atual Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica), pelo apoio para a conclusão desta Tese.

Ao Professor Doutor Márcio Viana Ramos, por ter me incentivado a concluir meu Doutorado.

Aos demais Professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, em especial à Professora Doutora Ana Lúcia Ponte Freitas, pelos ensinamentos prestados.

Ao estudante de doutorado Gustavo Arruda Bezerra da Universidade Karl-Franzens, Áustria, pela colaboração para execução de parte desta Tese, no item relacionado à modelagem tridimensional.

A estudante de biologia Natália Souto Maior Sales Valença, da Universidade Federal de Pernambuco, pela colaboração para execução de parte desta Tese, no item relacionado à biologia molecular.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, em especial ao Professore M.Sc. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha, pela colaboração para execução desta Tese.

Aos Professores do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, em especial ao Professor Doutor Moisés Almeida de Oliveira, pela amizade e compreensão.

ESTE TRABALHO FOI REALIZADO GRAÇAS AO AUXILIO DAS SEGUINTE INSTITUIÇÕES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos convênios estabelecidos com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos constantes auxílios de pesquisa concedidos ao BioMol-Lab (Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará).

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP), pelos constantes auxílios de pesquisa concedidos ao BioMol-Lab (Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará).

Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT/CNPq), pelos constantes auxílios de pesquisa concedidos ao BioMol-Lab (Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará).

Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), pelo financiamento do Laboratório de Diagnóstico de Enfermidades em Organismos Aquáticos (LDEOA).

Universidade Federal do Ceará.

Laboratório de Moléculas Biologicamente ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, onde este trabalho foi realizado.

ÍNDICE

Lista de Tabelas	xi
Lista de Figuras	xii
Resumo	xvi
Abstract	xviii
1. <u>INTRODUÇÃO</u>	1
1.1. A Aqüicultura	1
1.2. A Carcinicultura	4
1.2.1. Espécies Cultivadas de Camarões Peneídeos	7
1.2.2. O Sistema Imunológico de Camarões Peneídeos	11
1.2.3. Enfermidades em Camarões Peneídeos e suas Respostas Imunológicas	17
1.2.3.1. WSSV	19
1.2.3.2. TSV	21
1.2.3.3. IHNV	22
1.2.3.4. IMNV	24
1.2.4. Programas de Cruzamento e Seleção	26
1.3. Lectinas	29
2. <u>OBJETIVOS</u>	35
2.1. Objetivos Gerais	35
2.2. Objetivos Específicos	35
3. <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	36
3.1. Amostras Utilizadas	36
3.2. Isolamento do RNA Total	36
3.2.1. Quantificação do RNA Total	37
3.2.2. Preparo do Gel Desnaturante	37
3.3. Purificação do RNA Mensageiro	37
3.4. Síntese da Primeira Fita de cDNA	38
3.5. Amplificação dos Genes CTL-br1 e CTL-br2	39
3.5.1. Subclonagem em Vetor Plasmidial	39
3.5.2. Preparação de Células Bacterianas Competentes	40

3.5.3. Transformação	40
3.5.4 Seleção das Células Recombinantes	41
3.5.5 Propagação dos clones e purificação dos plasmídeos	41
3.6. Seqüenciamento de Nucleotídeos	42
3.7. Análise das Seqüências	43
3.8. Alinhamento Múltiplo e Análise Filogenética	43
3.9. Modelagem Computacional das Lectinas	44
4. <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	46
4.1. Extração e Quantificação do RNA Total	46
4.2. Verificação da Síntese da Primeira Fita de cDNA	47
4.3. Gradiente de Temperatura	47
4.4. Análise do Produto de PCR Purificado	48
4.5. Análise das Seqüências Obtidas	50
4.6. Alinhamento Múltiplo e Análise Filogenética	52
4.7. Modelagem Molecular	55
5. <u>CONCLUSÕES</u>	64
6. <u>LITERATURA CITADA</u>	65

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Ranking mundial dos dez principais países produtores em aqüicultura, nos anos de 2004 e 2006.	3
Tabela 2 – Principais espécies cultivadas no Brasil, nos anos de 2004 e 2006.	4
Tabela 3 – Ranking mundial dos dez principais países produtores de camarão cultivado, nos anos de 2004 e 2006.	5
Tabela 4 - Patógenos causadores de enfermidades em camarões peneídeos cultivados em países localizados no Oriente e Ocidente.	19
Tabela 5 - Lectinas isoladas e caracterizadas em diferentes espécies de camarões peneídeos*.	32
Tabela 6 - Temperaturas utilizadas na PCR (gradiente), variando de 45°C a 65,6°C.	39

Lista de Figuras

- Figura 1 – Exemplares de *Litopenaeus vannamei*. 7
- Figura 2 – Esquema representativo da morfologia externa de camarões peneídeos. Fonte: BURUKOVSKII (1985). 10
- Figura 3 – Esquema representativo da anatomia interna de camarões peneídeos. Fonte: BURUKOVSKII (1985). 13
- Figura 4 – Exemplares de *Penaeus monodom* infectados com WSSV, apresentando manchas brancas na carapaça e no rostro (Figuras 4.1 e 4.3) e coloração avermelhada (exemplares no alto e a direita) devido à expansão dos cromatóforos (Figura 4.2). Fonte: LIGHTNER (1996a). 21
- Figura 5 – Exemplares de *Litopenaeus vannamei* infectados com TSV, apresentando sistema digestivo vazio (Figura 5.1), cromatóforos expandidos e urópodos avermelhados (Figura 5.2) e exoesqueleto com lesões multifocais melanizadas (Figura 5.3). Fonte: LIGHTNER (1996a). 22
- Figura 6 – Exemplares de *Litopenaeus vannamei* infectados com IHNV, apresentando crescimento reduzido e irregular (Figura 6.1), deformidade no sexto segmento abdominal e telson (Figura 6.2) e deformidade no rostro (Figura 6.3). Fonte: LIGHTNER (1996a). 23
- Figura 7 – Exemplares de *Litopenaeus vannamei* infectados com IMNV, apresentando grau de severidade 1 (Figura 7.1), grau de severidade 2 (indivíduo na posição superior da Figura 7.2), indivíduo sadio (indivíduo na posição inferior da Figura 7.2) e grau de severidade 3 (Figura 7.3). Fonte: POULOS *et al.* (2006). 25
- Figura 8 – Gel de eletroforese de RNA desnaturado, mostrando a integridade das bandas correspondentes às subunidades 28S e 18S, do tecido hepatopâncreas (Hep) de *L. vannamei*. 47
- Figura 9 – Análise da síntese da primeira fita de cDNA por eletroforese em gel de agarose 1%. 1 – Amostra dos produtos da síntese da primeira fita 48

de cDNA (6% do total sintetizado), 2 – Amostra dos produtos da síntese da primeira fita de cDNA (10% do total sintetizado) e 3 – Marcadores de peso molecular (1 kb DNA ladder).

Figura 10 – Gradiente de temperaturas de pareamento para o produto amplificado com 1050 pb. As temperaturas testadas variaram entre 45° e 65,6°C. A – Marcadores de peso molecular (1 kb DNA ladder).

48

Figura 11 – Visualização dos clones 3CN, 3cFXa e 3pFXa com 1050 pb por eletroforese em gel de agarose a 1%. (A) Produtos de amplificação a partir de colônias positivas (clones representativos) e (B) produtos de amplificação a partir de plasmídeos para seqüenciamento. 1 kb DNA ladder representa os marcadores de peso molecular.

49

Figura 12 – Comparação das seqüências deduzidas de aminoácidos das lectinas LvCTL-br1 e LvCTL-br2 de *L. vannamei* em relação a lectina LvLT de *L. vannamei* depositada no GenBank (acesso DQ871245).

51

Figura 13 – Alinhamento múltiplo da lectina tipo C LvCTL-br1 de *L. vannamei*, dos domínios CRD-1 (LvCTL-br1) and CRD-2 (LvCTL-br1) com as lectinas ou lectinas-like de *L. vannamei* (LvLT, Genbank N.º DQ871245; LvLec, Genbank N.º [EF583939](#)), *P. monodon* (PmLT, Genbank N.º DQ871244; PmAV, Genbank N.º AY302750; PmLec, Genbank N.º DQ078266), *P. semisulcatus* (PsLT, Genbank N.º DQ871243), *F. chinensis* (Fc-Lec2, Genbank N.º EU834289, Fc-Lec4, Genbank N.º EU834290, Fc-hsL, Genbank N.º DQ167572, Fclectin, Genbank N.º AY871270), *F. merguensis* (Fm-L, N.º [FJ751773](#)), *Perca flavescens* (CTL-1, Genbank N.º [FJ826550](#), CTL-2, Genbank N.º [FJ826553](#), CTL-3, Genbank N.º [FJ826552](#), CTL-4, Genbank N.º [FJ826548](#), CTL-5, Genbank N.º [FJ826545](#), CTL-6, Genbank N.º [FJ826555](#)), *Drosophila virilis* (GJ18331, Genbank N.º XM_002057763) e *Portunus trituberculatus* (PtLP, Genbank N.º [EU477491](#)).

54

FIGURA 14 – Análise filogenética da lectina tipo C LvCTL-br1 de *L. vannamei*, dos domínios CRD-1 (LvCTL-br1) and CRD-2 (LvCTL-br1) com as

56

lectinas ou lectinas-like de *L. vannamei* (LvLT, Genbank N.º DQ871245; LvLec, Genbank N.º [EF583939](#)), *P. monodon* (PmLT, Genbank N.º DQ871244; PmAV, Genbank N.º AY302750; PmLec, Genbank N.º DQ078266), *P. semisulcatus* (PsLT, Genbank N.º DQ871243), *F. chinensis* (Fc-Lec2, Genbank N.º EU834289, Fc-Lec4, Genbank N.º EU834290, Fc-hsL, Genbank N.º DQ167572, Fclectin, Genbank N.º AY871270), *F. merguensis* (Fm-L, N.º [FJ751773](#)), *Perca flavescens* (CTL-1, Genbank N.º [FJ826550](#), CTL-2, Genbank N.º [FJ826553](#), CTL-3, Genbank N.º [FJ826552](#), CTL-4, Genbank N.º [FJ826548](#), CTL-5, Genbank N.º [FJ826545](#), CTL-6, Genbank N.º [FJ826555](#)), *Drosophila virilis* (GJ18331, Genbank N.º [XM_002057763](#)) e *Portunus trituberculatus* (PtLP, Genbank N.º [EU477491](#)). A árvore filogenética foi construída usando o método de neighbor-joining, baseado no alinhamento das seqüências de aminoácidos (Clustal W) de lectinas tipo C de camarões peneídeos.

FIGURA 15 – Estrutura tridimensional do CRD-1 de LvCTL-br1 (resíduos de aminoácidos entre 37 e 195) com o açúcar $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ modelado no sítio ativo, com ênfase para as cadeias em α -hélice interlaçados por *loops* e uma única folha beta pregueada. A estrutura tridimensional foi calculada usando o programa YASARA.

59

FIGURA 16 – Estrutura tridimensional de parte do CRD-1 de LvCTL-br1 com o açúcar $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ modelado no sítio ativo, com ênfase no domínio QPD (–GlnProAsp–). A estrutura tridimensional foi calculada usando o programa YASARA.

59

FIGURA 17 – Estrutura tridimensional do CRD-1 de LvCTL-br2 (resíduos de aminoácidos entre 37 e 195), com ênfase para as cadeias em α -hélice interlaçados por *loops* e uma única folha beta pregueada. A estrutura tridimensional foi calculada usando o programa YASARA.

60

FIGURA 18 – Estrutura tridimensional de parte do CRD-1 de LvCTL-br2 com o açúcar $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ modelado no sítio ativo, com ênfase nas pontes de

60

hidrogênio formadas entre o aminoácido ASP-109 e o açúcar GlcNAc₂Man₃. A estrutura tridimensional foi calculada usando o programa YASARA.

FIGURA 19 – Estrutura tridimensional de parte do CRD-2 de LvCTL-br1 com o açúcar GlcNAc₂Man₃ modelado no sítio ativo, com ênfase no domínio GTR (–GlyThrArg–). A estrutura tridimensional foi calculada usando o programa YASARA.

61

FIGURA 20 – Sobreposição dos modelos tridimensionais de CRD-1 e CRD-2 de LvCTL-br1. A estrutura tridimensional foi calculada usando o programa YASARA.

61

FIGURA 21 – Estrutura tridimensional de parte do CRD-1 de LvCTL-br1 com o açúcar GlcNAc₂Man₃ modelado no sítio ativo, com ênfase nos aminoácidos GLY109 e ALA150, dificultando a formação de pontes de hidrogênio com o açúcar GlcNAc₂Man. A estrutura tridimensional foi calculada usando o programa YASARA.

62

FIGURA 22 – Estrutura tridimensional de parte do CRD-1 de LvCTL-br1 com o açúcar GlcNAc₂Man₃ modelado no sítio ativo, com ênfase nos aminoácidos ALA91 e GLY109, dificultando a formação de pontes de hidrogênio com o açúcar GlcNAc₂Man. A estrutura tridimensional foi calculada usando o programa YASARA.

62

FIGURA 23 – Sobreposição de parte dos modelos tridimensionais dos CRDs-2 das isoformas LvCTL-br1 e LvCTL-br2. A estrutura tridimensional foi calculada usando o programa YASARA.

63

RESUMO

Lectinas tipo C são proteínas animais com pelo menos 130 aminoácidos, contendo ao menos um único domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) capazes de se ligar a açúcares através de mecanismos cálcio dependentes. O reconhecimento de carboidratos é relacionado diretamente a algumas atividades biológicas, como a adesão célula-célula, regulação dos níveis de glicoproteínas e respostas imune inatas contra patógenos potenciais. Em invertebrados, como insetos e crustáceos, lectinas tipo C funcionam como receptores de reconhecimento padrão (PRRs), através da ligação a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e ativação do sistema de defesa inato. Em adição as funções das PRRs, tem sido demonstrado que em espécies de camarões peneídeos de importância econômica, lectinas tipo C funcionam como proteínas antivirais e antimicrobianas, através de processos de imobilização do patógeno e resposta imune inata. Lectinas tipo C de camarões peneídeos estão divididas em duas classes de proteínas estruturalmente relacionadas, baseadas na presença de um único CRD por molécula de proteína ou dois CRDs justapostos em uma única seqüência espacial. Tem sido determinado que a atividade biológica de uma certa lectina depende não somente da presença dos CRDs e outros domínios conjulgados, mas também da arquitetura global. No presente estudo, foi feita a clonagem de duas novas lectinas tipo C do hepatopâncreas de juvenis de *Litopenaeus vannamei*. Os cDNAs clonados geraram ORFs de 1050 nt e codificam proteínas com dois domínios altamente similares (99,6%) com 347 resíduos de aminoácidos. Foram nomeadas de LvCTL-br1 e LvCTL-br2, com massas moleculares e valores de pI estimados em 38,4 kDa e 4,93 (LvCTL-br1) e 38,5 kDa e 4,87 (LvCTL-br2). Nas duas proteínas, verificou-se uma tríade de aminoácidos consensual capaz de reconhecer galactose (-QPD-), no CRD-1 que é preservado, mas, o sítio de ligação a manose (-EPN-), no segundo domínio, apresentou mutação. As modelagens moleculares computacionais de LvCTL-br1 e LvCTL-br2 revelam domínios estruturais constituídos por cadeias α -hélice interlaçadas por *loops* e uma única β -folha pregueada. Em contraste ao CRD-1 de LvCTL-br1, o CRD-2

apresenta um longo *loop* que pode acomodar açúcares complexos. Os modelos 3-D também apresentam as três substituições de aminoácidos, no CRD-1, que ocorrem sem relação com o sítio de ligação a açúcares. De forma interessante, a substituição de Gly109 por Asp109, observada no CRD1 de LvCTL-br2, indica que três pontes de hidrogênio poderiam ser formadas com carboidratos complexos, o que poderia refletir em uma afinidade maior com o açúcar. O presente trabalho é o primeiro a apresentar a clonagem de duas lectinas tipo C do hepatopâncreas de *L. vannamei* com uma mutação do sítio de ligação à manose e seus respectivos modelos 3-D.

ABSTRACT

C-type lectins are animal proteins of about 130 amino acids long, containing at least one carbohydrate recognition domain (CRD) capable of mediating sugar and calcium binding. The carbohydrate recognition is directly related to some biological activities, like cell-cell adhesion, serum glycoprotein turnover, and innate immune responses against potential pathogens. In invertebrates, like insects and crustaceans, C-type lectins act as pattern recognition receptors (PRRs), by binding to pathogen associated molecular patterns (PAMPs) and activating the innate host defense systems. In addition to their function as PRRs, it has been shown that in economically important penaeid shrimp species, C-type lectins function as antimicrobial and antiviral protein, component of pathogen clearance and innate immune response. The penaeid shrimp C-type lectins fall into two structurally classes of related proteins, based on the presence of a single CRD per molecule of protein or two juxtaposed CRDs with a spacer sequence in between. It has known that a given lectin activity depends not only of the presence of CRDs and other conjugated domains, but also of its global architecture. So far, for structural studies, we have cloned two novel c-type lectins from the hepatopancreas of juvenile *Litopenaeus vannamei*. The cloned cDNAs encompass ORFs of 1044 nt and encode high similar (99.6%) two-domains proteins of 347 residues. Named LvCTL-br1 and LvCTL-br2, their estimated molecular masses and values of pI are 38.4 kDa and 4.93 (LvCTL-br1), and 38.5 kDa and 4.87 (LvCTL-br2). In both proteins the consensus triad that recognizes galactose (-QPD-), in CRD-1 is preserved, but the mannose-binding site (-EPN-), in the second domain, was mutated. Computational molecular modeling of LvCTL-br1 and LvCTL-br2 reveals domain structures constituted by α -helix chain interlaced by loops and a single β -sheet. In contrast to CRD-1 of Lv CTL-br1, the CRD-2 presents a long loop that might accommodate complex sugars. The 3-D models also show that three amino acid substitutions, in CRD-1, occur close to the sugar binding site. Interestingly, a nonsynonymous substitution of Gly109 for Asp109, observed in CRD1 of LvCTL-br2, indicates that three hydrogen bounds might be formed

between complex carbohydrates, what could reflect in a higher affinity by the sugar. The present work is the first to present the cloning of two *L. vannamei* hepatopancreatic C-type lectins with mutated mannose binding site, and their respective molecular 3-D models.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Aqüicultura

A aqüicultura surgiu na China há aproximadamente 4 mil anos e, inicialmente, se baseou, fundamentalmente, no cultivo de algas marinhas e carpas destinadas à alimentação humana (ARANA, 1999).

Segundo RANA (1997), a aqüicultura é o processo de produção em cativeiro de organismos com hábitat predominantemente aquático, em qualquer estágio de desenvolvimento, ou seja, ovos, larvas, pós-larvas, juvenis ou adultos. Existem três componentes que caracterizam essa atividade: 1.º) o organismo produzido é aquático; 2.º) existe um programa de manejo objetivando a produção e 3.º) o organismo cultivado tem um proprietário, não sendo, dessa forma, um recurso coletivo como no caso de recursos explorados pela pesca.

Durante as três últimas décadas, a aqüicultura tem se expandido, diversificado, intensificado e tido avanços tecnológicos. O desenvolvimento desta atividade de reconhecido potencial é capaz de incrementar a produção de alimentos, reduzir a pobreza e melhorar a subsistência rural. A Declaração de Bangkok enfatiza a necessidade do setor aqüícola de continuar a se desenvolver com potencial máximo, tendo uma contribuição líquida para a viabilização do alimento no mundo, da segurança alimentar doméstica, do crescimento econômico e do incremento dos padrões de vida de populações carentes (FAO, 2002a).

No contexto atual, o destaque na produção mundial de pescados é a aqüicultura, atividade zootécnica que nos últimos anos, em contraponto com a estagnação da produção de origem extrativa, vem se desenvolvendo de forma crescente e sustentável, já se constituindo, na atualidade, no segmento mais importante do setor pesqueiro mundial, representando, inclusive, a alternativa de maior viabilidade para o suprimento da crescente demanda de proteína animal de alto valor nutricional (FAO, 2008a).

A aqüicultura está crescendo mais rapidamente que todos os outros setores da produção animal. Mundialmente, o setor tem crescido a uma taxa média

composta de 9,2% ao ano desde 1970, comparado com somente 1,4% para as capturas de pescado e 2,8% para a pecuária (FAO, 2002b).

Segundo a FAO (2008a), a produção mundial de pescados em 2006, envolvendo a produção extrativa (93,2 milhões de toneladas com receitas na ordem de U\$ 91,2 bilhões) e da aquicultura (66,7 milhões de toneladas com receitas na ordem de U\$ 86 bilhões), foi de 159,9 milhões de toneladas, representando um negócio de U\$ 177,2 bilhões em receitas primárias.

A relevância da participação dos produtos pesqueiros no contexto da alimentação humana fica claramente evidenciada quando se tem presente que os mesmos já contribuem com mais de 28,8% do total de proteína animal consumida pela população mundial, com um total de 110,4 milhões de toneladas consumidas, em 2006. Segundo as estatísticas da FAO, a contribuição da aquicultura para o suprimento global de peixes, crustáceos e moluscos tem apresentado crescimento contínuo, tendo tido um aumento na participação da produção mundial de pescado da ordem de 3,9%, em 1970, para 47,0%, em 2006 (FAO, 2008a).

No ano de 2006, a carne de pescados representou a principal fonte de proteína animal consumida pelo ser humano (110,4 milhões de toneladas), seguindo-se da carne de suínos com 105,6 milhões de toneladas, de frangos com 73,1 milhões de toneladas e de bovinos com 61,0 milhões de toneladas (FAO, 2008a; FAO, 2008b).

Considerando, ainda, a projeção de crescimento populacional para as próximas duas décadas, estima-se que no mínimo uma produção adicional de pescados de origem animal de 40 milhões de toneladas em aquicultura deverá ser obtida para que se mantenha o atual consumo *per capita* que é de 16,7 kg (FAO, 2006; FAO, 2008a).

Segunda a FAO (2008a), em 2006, os países da Ásia e do Pacífico contribuíram com 89% da produção aquícola mundial e com 77% das receitas geradas. No ranking dos dez principais países produtores, oito são asiáticos, um latino americano, o Chile, e um europeu, a Noruega. Somente a China produziu 67% do total de pescados cultivados e gerou 49% das receitas primárias (TABELA 1).

O Brasil, mesmo considerando todo o seu potencial e tradição secular nessa área, teve uma participação insignificante, notadamente quando se leva em

conta que as 271,7 mil toneladas produzidas pelo País, em 2006, representaram apenas 0,41% da produção mundial da aqüicultura. Em comparação ao ano de 2004, a produção aqüícola brasileira apresentou um crescimento anual médio de somente 0,35%, extremamente inferior ao crescimento médio da aqüicultura mundial para o biênio 2004-2006 que foi de 6,15% (IBAMA, 2006; IBAMA, 2008; FAO, 2008a).

Tabela 1 – Ranking mundial dos dez principais países produtores em aqüicultura, nos anos de 2004 e 2006.

País	Produção (em toneladas)		Taxa de crescimento anual (%)
	2004	2006	
China	30.614.968	34.429.122	6,05
Índia	2.794.636	3.123.135	5,71
Vietnã	1.198.617	1.657.727	17,60
Tailândia	1.259.983	1.385.801	4,87
Indonésia	1.045.051	1.292.899	11,23
Bangladesh	914.752	892.049	-1,25
Chile	665.421	802.410	9,81
Japão	776.421	733.891	-2,78
Noruega	636.802	708.780	5,50
Filipinas	512.220	623.369	10,32

Os dados não incluem a produção de plantas aquáticas.

Somando-se a produção aqüícola brasileira aos números da pesca extrativa e do saldo da balança comercial de pescados, o brasileiro consumiu 1,2 milhão de toneladas, no ano de 2006, o que representa um consumo per capita de somente 6,3 kg (IBAMA, 2008).

O perfil da aqüicultura brasileira em termos de representatividade por espécie, tendo como referência os dados estatísticos publicados pelo IBAMA para o ano de 2006, está descrito na TABELA 2. No ano de 2006, a tilápia apresentou-se em 1.º lugar no ranking, com 26,23% do total produzido, seguindo-se do camarão marinho com 23,92%, da carpa com 16,87% e do tambaqui com 9,81% (IBAMA, 2006; IBAMA, 2008).

Tabela 2 – Principais espécies cultivadas no Brasil, nos anos de 2004 e 2006.

Espécie	Produção (em toneladas)		Taxa de crescimento anual (%)
	2004	2006	
Tilápia	69.000	71.254	1,63
Camarão	75.000	65.000	-6,67
Carpa	45.400	45.831	0,47
Tambaqui	25.270	26.662	2,75
Mexilhão	10.300	12.083	8,66
Tambacu	10.335	10.990	3,17
Pacu	9.000	10.626	9,03
Piau	3.470	3.543	1,05
Ostra	2.900	3.413	8,84
Outros	19.119	22.295	8,31
Total	269.794	271.697	0,35

No período 2004-2006, a produção aquícola de camarões marinhos, no Brasil, apresentou uma redução de 75.000 para 65.000 toneladas, apresentando um crescimento anual negativo de 6,7%. De acordo com a TABELA 3, esse nível de produção garantiu o Brasil no ranking dos dez principais produtores, contudo com uma produção aquém do seu potencial (FAO, 2006; FAO, 2008a).

1.2. A Carcinicultura

No mercado internacional, o mais importante produto da aquíicultura é o camarão marinho e o seu cultivo tem sido a fonte mais eficaz para incrementar o comércio deste produto durante a última década (WORLD SHRIMP FARMING, 1995). No mundo, o camarão cultivado é a maior agroindústria aquática das áreas tropicais e subtropicais (TACON & FORSTER, 2001), tendo gerado, no ano de 2006, receitas na ordem de U\$ 12,5 bilhões de dólares na base da cadeia produtiva (FAO, 2008a).

Tabela 3 – Ranking mundial dos dez principais países produtores de camarão cultivado, nos anos de 2004 e 2006.

País	Produção (em toneladas)		Taxa de crescimento anual (%)
	2004	2006	
China	789.373	1.242.385	28,7
Tailândia	330.725	500.800	25,7
Vietnã	231.717	349.000	25,3
Indonésia	191.148	339.803	38,9
Índia	82.133	157.585	45,9
Equador	113.240	144.317	13,7
México	45.857	112.495	72,7
Brasil	75.000	65.000	-6,7
Bangladesh	56.503	64.700	7,3
Filipinas	37.033	40.654	4,9
Outros	161.107	147.645	-4,2
Total	2.113.836	3.164.384	24,8

Ao se analisar o segmento da produção mundial de camarão, fica evidente a correlação do desempenho desse setor com o da aquicultura anteriormente analisado. Ressalta-se a evolução da produção entre os anos de 1996 e 2006 que passou de 3,4 milhões de toneladas para 6,6 milhões de toneladas, tendo como destaque o incremento da participação da produção de camarão cultivado, na ordem de 245%, que passou de uma representação de 26% para 48% da produção mundial de camarão, respectivamente (FAO, 2008a).

Esses níveis de crescimento estão associados ao aumento das áreas de cultivo e à intensificação dos processos produtivos, comprometendo a sustentabilidade das unidades de produção, podendo resultar na deterioração da saúde dos ecossistemas (ENG *et al.* 1989; NAYLOR *et al.*, 1998) e aumentar a predisposição dos camarões cultivados à infecção por patógenos (XU *et al.*, 2001).

As doenças em camarões peneídeos cultivados incluem síndromes por doenças infecciosas e não infecciosas (BROCK & LIGHTNER 1990; BROCK 1992;

LIGHTNER & REDMAN, 1998). No presente, as doenças virais são consideradas as que causam impacto mais devastador na indústria de camarões cultivados. No continente americano, doenças virais têm causado perdas econômicas de centenas de milhões de dólares em diversos países (LIGHTNER, 1995; MADRID, 2005).

No Brasil, nos últimos 5 anos, as exportações de camarão marinho totalizaram quase US\$ 1,0 bilhão, tendo como principais mercados o norte-americano e o europeu. Nesse período, o estado do Ceará despontou como o principal exportador de camarão marinho, gerando divisas na ordem de U\$ 300 milhões (MDIC, 2007).

A produção brasileira de camarões cultivados incrementou de 25.000 toneladas, em 2000, para 60.000 toneladas, em 2002 (ROCHA *et al.*, 2004a). Em 2003, a produção de camarão cultivado atingiu um volume de 90.000 toneladas, tendo declinado para 75.000 toneladas, em 2004, mesmo com uma expansão das áreas de cultivo de 14.800 ha em 2003 para 16.500 ha em 2004 (RODRIGUES, 2005). Nos anos de 2005 e 2006, a produção brasileira de camarões apresentou mais um decréscimo, com valores em torno de 65.000 toneladas (IBAMA, 2008).

Esse declínio de produção deveu-se, principalmente, a ocorrência de uma enfermidade causada pelo IMNV (infectious myonecrosis vírus – vírus da mionecrose infecciosa), provocando danos à indústria desde 2003 (LIGHTNER *et al.*, 2004, POULOS *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2007), e de maneira menos impactante a ação "anti-dumping" movida pela aliança norte-americana de pescadores (ABCC, 2004) e a política cambial brasileira nos últimos anos. Como consequência desses problemas, o setor apresentou, nos últimos anos, perdas na ordem de U\$ 440 milhões (MADRID, 2005), tendo ocorrido uma forte retração nos investimentos.

Em síntese, a indústria do camarão cultivado tem sido afetada por diversas enfermidades, principalmente, as de origem viral, o que tem causado inúmeras perdas econômicas nas duas últimas décadas (LUO *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2007). O conhecimento das respostas imunológicas de camarões peneídeos contra patógenos poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias de manejo que possibilitem o controle de enfermidades e, no futuro, a sustentabilidade das fazendas de camarão marinho.

1.2.1. Espécies Cultivadas de Camarões Peneídeos

As espécies de camarões peneídeos apresentam uma ampla distribuição geográfica, sendo encontradas nos oceanos Atlântico, Índico, Pacífico e Mediterrâneo. No Brasil, quatro espécies de camarões peneídeos são encontradas (*Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus subtilis*, *F. paulensis* e *F. brasiliensis*) (GUSMÃO, 2001). Os camarões peneídeos são considerados os camarões marinhos mais importantes do ponto de vista comercial.

Nas últimas décadas, a indústria de cultivo de camarões peneídeos tem se desenvolvido no mundo inteiro, gerando centenas de milhares de empregos, bilhões de dólares em receitas e se credenciando a ser a principal fonte desse alimento de alto valor comercial (LIGHTNER & REDMAN, 1998). Dentre as principais espécies cultivadas, pode-se destacar o *Litopenaeus vannamei* (FIGURA 1), *Penaeus monodon*, *P. chinensis* e *P. merguensis* respondendo pela quase totalidade da produção mundial (FAO, 2008a).



Figura 1 – Exemplos de *Litopenaeus vannamei*.

O *L. vannamei* é a principal espécie de camarão marinho cultivada no Brasil, representando praticamente 100% da produção oriunda da carcinicultura

marinha, tendo sido introduzido a partir de meados da década de 1980, proveniente do México, El Salvador, Panamá, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela (PÉREZ-FARFANTE & KENSLEY, 1997). Esta espécie encontra-se distribuída na costa do Pacífico, desde o Norte do Peru até o Golfo da Califórnia, em águas cuja temperatura está sempre acima de 20°C o ano inteiro (WYBAN & SWEENEY, 1991).

No presente, o *L. vannamei* é a principal espécie de camarão marinho cultivada nas regiões tropicais e subtropicais dos hemisférios norte e sul, contribuindo com mais de 60% da produção de camarão cultivado no mundo (FAO, 2008). Em comparação com outras espécies comerciais (*P. monodon*, *P. chinensis* e *P. merguensis*), *L. vannamei* possui uma alta taxa de crescimento, aceita altas densidades de estocagem (até 400 indivíduos/m²), tolera uma ampla faixa de salinidade (0,5 até 45 ppt), requer baixo nível de proteína nas dietas (20-35%) e pode ser comercializado a partir dos 5-6 g de peso médio (BRIGGS *et al.*, 2005).

Devido à ocorrência do WSSV (white spot syndrome vírus – vírus da síndrome da mancha branca) na América do Norte em 1995, e, em 1999, nas Américas Central e do Sul (JIMENEZ *et al.*, 2000; PÉREZ *et al.*, 2005) e pelo fato deste vírus ser o mais devastador dos patógenos que tem sido descrito na carcinicultura marinha, as importações de *L. vannamei* não mais ocorreram para o Brasil, por conta da Instrução Normativa N.º 39 (Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento/Governo Federal), instituída em 1997 (PINHEIRO *et al.*, 2007), o que impossibilitou, nos últimos anos, a aquisição de material genético de melhor qualidade, principalmente no que diz respeito à velocidade de crescimento e a ausência e/ou resistência a patógenos.

Recentemente, a Associação Brasileira dos Criadores de Camarão (ABCC) elaborou um documento intitulado "Programa de quarentena para a importação de reprodutores de *L. vannamei*" em consonância com a Instrução Normativa N.º 53/2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (ABCC, 2005), abrindo a possibilidade da re-introdução dessa espécie no Brasil. Contudo, até o presente, devido aos preços de importação de reprodutores, preços FOB-EUA entre U\$ 23,00 e 25,00 (BRIGGS *et al.*, 2005), às exigências deste programa, principalmente no que se refere às medidas de biossegurança e ao controle de

patógenos, apenas uma empresa comercial realizou importação de novas linhas melhoradas geneticamente de *L. vannamei*.

Segundo PEREZ-FARFANTE & KENSLEY (1997), a classificação taxonômica para a espécie *Litopenaeus vannamei* é a seguinte:

Reino Animalia

Filo Arthropoda

Subfilo Crustacea **Pennant, 1777**

Classe Malacostraca **Latreille, 1806**

Sub classe Eumalacostraca **Grobben, 1892**

Superordem Eucarida **Calman, 1904**

Ordem Decapoda **Latreille, 1803**

Subordem Dendrobranchiata **Bate, 1888**

Superfamília Penaeoidea **Rafinesque, 1815**

Família Penaeidae **Rafinesque, 1815**

Subamília Penaeinae **Dana, 1852**

Gênero *Penaeus* **Fabricius, 1798**

Subgênero *Litopenaeus* **Pérez-Farfante & Kesley, 1997**

Espécie *Litopenaeus vannamei* **Boone, 1931**

Os camarões peneídeos pertencem ao filo Arthropoda, se caracterizando pela presença de um exoesqueleto e, principalmente, de apêndices articulados. Pertencem ao subfilo Crustacea, sendo, predominantemente, organismos aquáticos, portadores de exoesqueleto calcário e cabeça e tórax fundidos numa estrutura denominada de cefalotórax (NARCHI, 1973).

De acordo com BOWMAN & ABELE (1982), existem cerca de 38.000 espécies de crustáceos, sendo que 8.500 pertencem à ordem Decapoda que inclui os crustáceos mais altamente organizados, como os camarões, as lagostas e os caranguejos. Nesta ordem, os primeiros três segmentos torácicos são fundidos formando o cefalotórax. Os apêndices desses três segmentos são os maxilípedes e

atuam como peças bucais. É no cefalotórax que se localizam os pedúnculos oculares, o rostro, as antenas e os demais cinco pares de apêndices torácicos correspondentes aos dez pereiópodos, dos quais deriva o nome Decapoda. No abdômen, os seis somitos presentes não sofrem processo de fusão. Os pleópodos (segundo conjunto de apêndices) e os urópodos estão localizados na porção abdominal, havendo uma estrutura terminal rígida, denominada de telson. Os camarões peneídeos possuem corpo alongado, lateralmente comprimido, especialmente na região posterior (FIGURA 2).

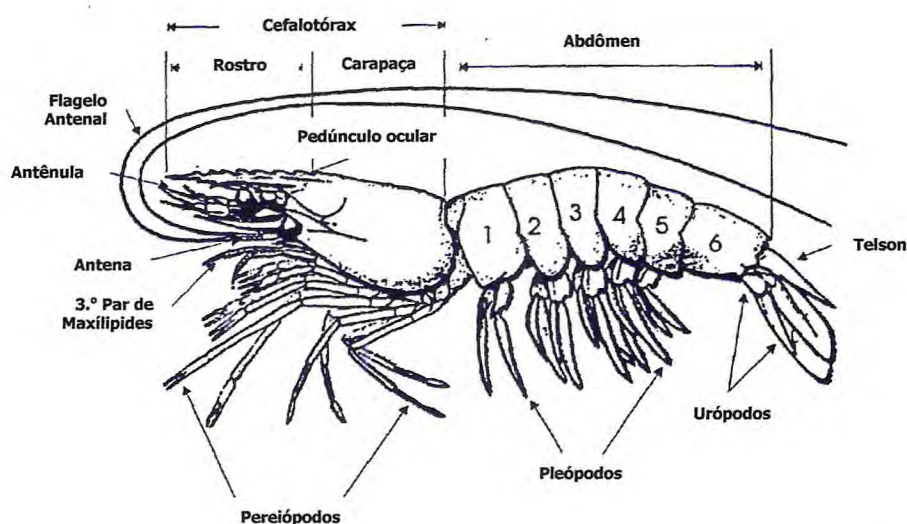


Figura 2 – Esquema representativo da morfologia externa de camarões peneídeos. Fonte: BURUKOVSKII (1985).

A diferença básica entre as diversas espécies de decápodas se baseia na maneira como ocorre a fecundação. Os ovos podem ser incubados no abdômen das fêmeas ou liberados diretamente na água. Nesse último caso, são classificados como pertencentes à subordem Dendrobranchiata, que inclui a família Penaeidae (PINHEIRO & HEBLING, 1998).

A subamília Penaeinae possui 15 gêneros, porém uma classificação mais recente dividiu o gênero *Penaeus* em 6 subgêneros (*Penaeus*, *Litopenaeus*, *Marsupenaeus*, *Farfantepenaeus*, *Fenneropenaeus* e *Melicertus*), com base em

características morfológicas e biogeográficas (PÉREZ-FARFANTE & KESLEY, 1997; BALDWIN *et al.*, 1998).

1.2.2. O Sistema Imunológico de Camarões Peneídeos

As enfermidades, em aquicultura, vêm provocando anualmente perdas de grande magnitude, sendo que a principal estratégia para se evitar esse tipo de problema é a prevenção e o controle de patógenos. Grande parte das enfermidades é causada por agentes virais e bacterianos. Por exemplo, o WSSV tem registrado inúmeras perdas de produção em quase todas as áreas de cultivo das Américas (BERGER, 2000).

De acordo com LIGHTNER (1992), tem havido um interesse crescente no conhecimento dos mecanismos de defesa do sistema imune de camarões peneídeos, devido à necessidade de se minimizar o efeito dos patógenos nas populações infectadas e de se melhorar o controle e a prevenção de enfermidades, principalmente, as de origem viral.

Além de possuírem um exoesqueleto rígido que funciona como uma barreira física protetora contra as agressões e invasões de organismos patogênicos, a integridade corpórea dos camarões peneídeos é mantida por seu sistema imunológico. Assim, como em outros invertebrados, os camarões peneídeos possuem um sistema imune inato ou natural, diferentemente dos vertebrados que possuem também um sistema adaptativo ou adquirido (BARRACO, 2004).

Portanto, os camarões peneídeos não possuem imunidade adaptativa, ou seja, não possuem imunoglobulinas, moléculas que apresentam alta especificidade contra os invasores, nem receptores de células T, não produzindo anticorpos específicos, por isso, não têm um sistema imune semelhante aos vertebrados, embora proteínas semelhantes às imunoglobulinas tenham sido encontradas em alguns invertebrados (WU *et al.*, 2002). Desta forma, a resistência a doenças se baseia no sistema inato de defesa, que inclui uma série de reações celulares e humorais coordenadas (LUO *et al.*, 2003).

O sistema imune inato é filogeneticamente mais antigo e considerado mais simples, sendo encontrado em todos os organismos multicelulares, enquanto o

sistema imune adaptativo, altamente complexo e eficiente, é recente e ocorre apenas nos vertebrados, se caracterizando por uma infinidade de receptores e anticorpos específicos e por células de memória que garantem uma resposta de defesa rápida, eficiente e altamente específica (BACHÈRE, 2000; BARRACO, 2004).

O mecanismo de ativação do sistema imune inato ocorre através de mecanismos de coagulação da hemolinfa pela ativação do sistema profenoloxidase (sistema proPO), fagocitose, encapsulação de corpos estranhos, síntese de peptídeos antimicrobianos e aglutinação celular (SÖDERHÄLL, 1999). O sistema de defesa possui proteínas de reconhecimento que estão aptas a detectar e se ligar aos componentes do patógeno. Uma vez aderidas a um corpo estranho, essas proteínas se ligam à superfície do hemócito ativando o sistema imune, especificamente o sistema profenoloxidase (SRITUNYALUCKSONA & SÖRDEHÄLL, 2000).

Este mecanismo de defesa está intimamente relacionado à hemolinfa que consiste de uma fração celular, representada pelos hemócitos, e de uma fração líquida constituída pelo plasma e outros fatores humorais dissolvidos. As respostas imune celulares e humorais atuam de forma integrada nos camarões peneídeos, protegendo-os contra a invasão de microorganismos patogênicos e parasitários, garantindo sua integridade corpórea (BARRACO, 2004).

As respostas imunocelulares dos camarões peneídeos estão basicamente relacionadas às células hemocitárias e incluem a fagocitose de organismos patogênicos, a formação de nódulos e cápsulas celulares em torno de corpos estranhos e os mecanismos citotóxicos realizados pelos hemócitos para lisar e degradar os microorganismos invasores (BERGER, 2000).

Entre os principais órgãos ligados ao sistema imune inato dos camarões peneídeos estão o hepatopâncreas e o órgão linfóide (FIGURA 3). O hepatopâncreas é um órgão do sistema digestivo, responsável pela síntese e secreção de enzimas digestivas, além, de proteínas relacionadas ao sistema imune. O órgão linfóide, localizado na parte anterior do hepatopâncreas, parece participar nos processos de eliminação e depuração de agentes patogênicos. Não está evidente se o processo de fagocitose ocorre no órgão linfóide ou se os hemócitos contendo microorganismos fagocitados migram para este órgão para realizar a depuração (VAN DE BRAAK *et al.*, 2002).

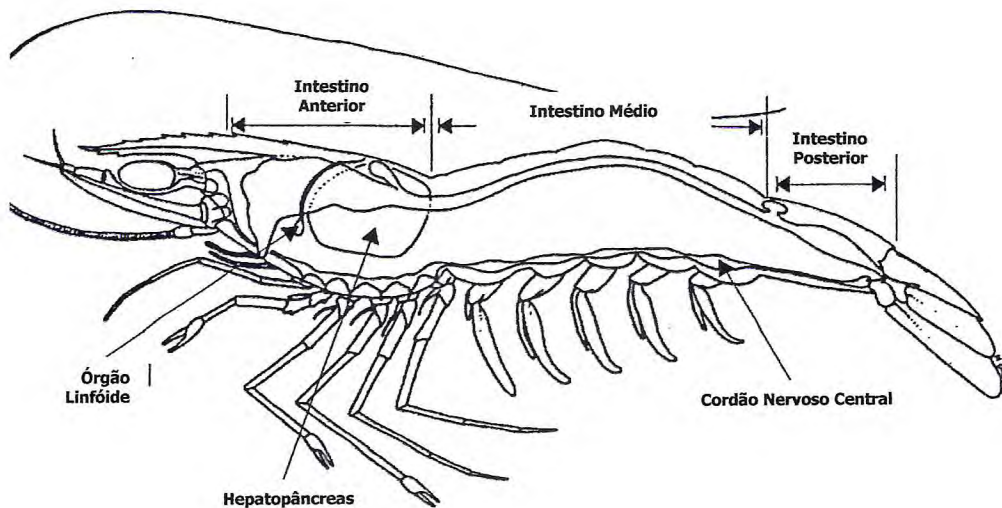


Figura 3 – Esquema representativo da anatomia interna de camarões peneídeos. Fonte: BURUKOVSKII (1985).

Os hemócitos são produzidos nos tecidos hematopoiéticos e usualmente classificados em hemócitos hialinos, hemócitos semi-granulares ou com grânulos pequenos e hemócitos granulares ou com grânulos grandes (SÖDERHÄLL & CERENIUS, 1992). A diferença entre os hemócitos baseia-se tanto em aspectos morfológicos como tamanho celular, estrutura e granularidade, quanto em aspectos funcionais. A ativação dos hemócitos resulta, geralmente, em degranulação, havendo a liberação de uma grande variedade de efetores imunológicos para a hemolinfa (BACHÈRE, 2000).

Os hemócitos hialinos são descritos como os menores hemócitos, com uma alta relação núcleo-citoplasma, havendo ausência ou uma mínima presença de grânulos. Os hemócitos semi-granulares e granulares são descritos como células de citoplasma abundante, ricos em grânulos de diversos tamanhos e conteúdos. Os hemócitos hialinos pertencem a uma linhagem distinta dos hemócitos semi-granulares e granulares, estando relacionados essencialmente aos mecanismos de coagulação. Os hemócitos semi-granulares e granulares estão, principalmente, envolvidos nos mecanismos de fagocitose de microorganismos, na formação de nódulos e cápsulas e na produção de moléculas citotóxicas capazes de lisar e/ou degradar patógenos invasores (DESTOUMIEUX *et al.*, 2000).

As células granulares são consideradas as mais imunocompetentes, uma vez que armazenam a maioria das moléculas imunoefetoras em seus grânulos, como enzimas degradativas e de coagulação, peptídeos antimicrobianos, fatores opsonizantes e moléculas do sistema profenoxidase (HOSE *et al.*, 1990; SÖDERHÄLL & CERENIUS, 1992; BARRACO, 2004).

Como ocorre nos vertebrados, a fagocitose é a primeira linha de defesa contra a invasão de microorganismos patogênicos. Neste processo, o corpo estranho é englobado, interiorizado e destruído intracelularmente pelos hemócitos através de vários mecanismos degradativos e microbicidas, tendo sido largamente descrita em camarões peneídeos (GARGIONI & BARRACO, 1998).

Os hemócitos dos crustáceos possuem estruturas semelhantes aos lisossomos, reativas a uma série de marcadores enzimáticos que se fundem com os vacúolos fagocíticos e promovem a degradação das partículas endocitadas (HOSE *et al.*, 1990; GARGIONI & BARRACO, 1998).

Invertebrados reconhecem microorganismos invasores através de uma família de proteínas denominada de receptores de reconhecimento padrão (pattern recognition receptors – PRRs) (MEDZHITOV & JANEWAY, 2002). Em camarões peneídeos, os PRRs estão presentes na hemolinfa ou na superfície dos hemócitos (BARRACO, 2004).

Os PRRs são capazes de reconhecer moléculas conservadas na superfície de corpos estranhos, tais como os lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas, peptídeoglicanos na parede celular de bactérias Gram-positivas e glicanos de glicolipídeos e glicoproteínas microbianos. Estas moléculas de superfície microbianas são designadas como padrões moleculares associados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns – PAMPs) (JANEWAY, 1989).

Após o reconhecimento, os hemócitos são ativados e desencadeiam uma série de respostas imunológicas, migrando para os sítios de infecção e gerando uma resposta inflamatória clássica, ocorrendo reações celulares como a fagocitose de microorganismos e/ou a formação de agregados celulares densos em torno dos corpos estranhos, denominados de nódulos e cápsulas. Quando a quantidade de microorganismos invasores é muito grande, estes são aprisionados em nódulos celulares que são formados por várias camadas de hemócitos que imobilizam os

microorganismos e impedem a sua disseminação. Por outro lado, quando o invasor é de grande tamanho, como no caso de fungos e nematóides, ocorre uma reação de encapsulamento. As cápsulas se assemelham aos nódulos, uma vez que várias camadas de hemócitos se aderem em torno do microorganismo parasitário, aprisionando-o e segregando-o dos tecidos do hospedeiro. Em ambos os casos, ocorre a liberação de uma variedade de moléculas citotóxicas e microbicidas, com a finalidade de neutralizar e eliminar os patógenos invasores. Nódulos e cápsulas mostram usualmente uma região central caracteristicamente escura e melanizada, devido à liberação e ativação do sistema profenoloxidade (HOSE *et al.*, 1990; SÖDERHÄLL & CERENIUS, 1992; BARRACO, 2004).

A ligação de PRRs a PAMPs é o gatilho de uma série de respostas imunes que torna possível a ativação do sistema de defesa do hospedeiro. Vários grupos de PRRs têm sido identificados em invertebrados, incluindo proteínas que reconhecem peptídeos, proteínas que se ligam a bactérias Gram-negativas, lectinas tipo C, etc. (CHRISTOPHIDES *et al.*, 2004).

Lectinas, também, são proteínas envolvidas no reconhecimento de corpos estranhos, sendo consideradas PRRs (LEE & SÖDERHÄLL, 2002). Por causa de seu reconhecimento específico por determinados açúcares presentes na parede celular de bactérias, tem sido sugerido que lectinas participam da resposta imune inata através da aglutinação induzida de bactérias, ou como opsoninas, incrementando a taxa de fagocitose dos microorganismos por parte dos hemócitos (BAYNE, 1990; LEE & SÖDERHÄLL, 2002).

Dentre as diferentes moléculas imunoefetoras, armazenadas nos grânulos dos hemócitos dos camarões peneídeos, destacam-se as proteínas ou peptídeos antimicrobianos (PAMs), funcionando como antibióticos naturais, de amplo espectro e de baixa especificidade. Os três principais tipos de PAMs identificados nos hemócitos são as peneidinas, as crustinas e os fatores anti-lipopolissacarídeos (SMITH & CHISHOLM, 2001).

As peneidinas constituem uma família de peptídeos que abrangem vários subgrupos e que apresentam uma atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e fungos filamentosos (BACHÈRE *et al.*, 2004). Peneidinas são PAMs que foram primeiramente isoladas do plasma e hemócitos de *Penaeus vannamei*. As 3

primeiras peneidinas foram nomeadas de peneidina-1, -2 e -3, e suas estruturas e atividades antimicrobianas foram estudadas usando proteínas recombinantes (DESTOUMIEUX *et al.*, 1997).

Posteriormente, o peptídeo peneidina-4 foi identificado em *L. vannamei* e sua estrutura e função foram caracterizadas (CUTHBERTSON *et al.*, 2002; CUTHBERTSON *et al.*, 2004). Um número significativo de peneidinas tem sido identificado e seqüenciado de uma variedade de espécies de camarões peneídeos e similaridades têm sido estabelecidas entre as seqüências de aminoácidos (GUEGUEN *et al.*, 2006).

As crustinas têm sido isoladas de hemócitos e constituem, também, uma família de PAMs encontradas em várias espécies de camarões peneídeos, possuindo várias isoformas e atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (VARGAS-ALBORES *et al.*, 2004) e Gram-negativas (SUPUNGUL *et al.*, 2004).

Finalmente, os fatores anti-lipopolissacarídeos ocorrem nos hemócitos de camarões peneídeos e têm sido descritos como as PAMs de maior interesse no presente momento por possuírem atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e fungos filamentosos. Até o presente, seqüências de fatores anti-polissacarídeos têm sido descritas em *P. monodon* (SUPUNGUL *et al.*, 2002), *L. setiferus* (GROSS *et al.*, 2001) e *F. chinensis* (LIU *et al.*, 2005).

O sistema profenoloxidase é um dos sistemas imunofetores mais conhecidos em camarões peneídeos, sendo ativado durante as reações imunocelulares, com a formação de nódulos e cápsulas hemocíticas. Nesses processos, ocorre a formação de um precipitado de coloração escura, denominada de melanização, na região onde os patógenos foram imobilizados. A reação de melanização é observada, também, em processos de cicatrização em camarões peneídeos, quando ocorre migração hemocitária para a região do epitélio com lesão, havendo a formação de um tampão celular até a ocorrência de uma ecdise quando um novo exoesqueleto é formado (CERENIUS & SÖDERHÄLL, 2004).

No sistema de ativação da profenoloxidase, a forma inativa da proPO é sintetizada nos grânulos dos hemócitos e convertida em uma forma ativa denominada de fenoloxidase (PO) por uma proteinase serínica e PO promove a melanização e a produção de espécies reativas de oxigênio para a defesa imune

(SÖDERHÄLL & CERENIUS, 1998; SRITUNYALUCKSANA & SÖDERHÄLL, 2000). O sistema de ativação proPO é estimulado por LPS e β -1,3-glucanas através do sistema de reconhecimento do não próprio (ASPÁN *et al.*, 1995; SÖDERHÄLL & CERENIUS, 1998; JIMÉNEZ-VEJA *et al.*, 2005).

A enzima profenoloxidase tem sido clonada em várias espécies de crustáceos, incluindo alguns camarões peneídeos e a expressão do gene tem sido determinada em hemócitos (SRITUNYALUCKSANA *et al.*, 1999a; WANG *et al.*, 2006). De forma semelhante, a proteínase serínica tem sido clonada em algumas espécies de camarões peneídeos (KAWABATA *et al.*, 1996; JIMÉNEZ-VEJA *et al.*, 2005).

1.2.3. Enfermidades em Camarões Peneídeos e suas Respostas Imunológicas

Uma doença é o resultado final de uma interação complexa entre o camarão cultivado, o ambiente e o patógeno (SNIESZKO, 1973), não sendo possível, em cultivos comerciais evitar esse tipo de interação. Além disso, a carcinicultura marinha é uma atividade recente, com praticamente, um pouco mais de 3 décadas, não tendo havido, ainda, uma completa adaptação dos camarões peneídeos aos sistemas intensivos de produção (COCK *et al.*, 2008). Doenças que possuem um baixo nível de incidência no ambiente natural podem alcançar níveis epidêmicos em sistemas intensivos de produção que praticamente possuem as condições ideais para a propagação de doenças (BIGGS, 1985).

Camarões peneídeos, então, têm sido cultivados sob condições que são favoráveis aos processos infecciosos e têm desenvolvido uma série de mecanismos de defesa que os protegem das doenças infecciosas em seu habitat natural. A resistência as doenças em muitos animais é mediada tanto pela resistência inata como pela adquirida. O sistema imune inato é rápido, não específico e funciona como a primeira linha de defesa, enquanto a resistência adquirida envolve respostas específicas ao antígeno (BISHOP *et al.*, 2002).

Camarões, como os crustáceos, possuem um sistema imune inato que os protege de organismos estranhos. Geralmente, é aceito que os crustáceos não possuem a habilidade de adquirir imunidade e, portanto, não é possível o

desenvolvimento de vacinas para uma doença específica, diminuindo de forma substancial a possibilidade de se prevenir e controlar doenças em camarões peneídeos (BARRACO, 2004).

Entretanto, alguns estudos têm descrito a proteção de camarões peneídeos usando tanto patógenos inativados como proteínas recombinantes contra bactérias (ITAMI *et al.*, 1989; TEUNISSEN *et al.*, 1998; ALABI *et al.*, 1999) ou vírus (WITTEVELDT *et al.*, 2004a; WITTEVELDT *et al.*, 2004b; BRIGHT *et al.*, 2005; VASEEHARAN *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2008), sugerindo que uma resposta protetora pode ser induzida (KURTZ & FRANZ, 2003; LOKER *et al.*, 2004; NAMIKOSHI *et al.*, 2004).

As doenças bióticas de importância econômica com etiologias infecciosas são causadas, principalmente, por vírus, bactérias, rickettsias, fungos, protozoários e metazoários (BROCK & LIGHTNER 1990; LIGHTNER & REDMAN, 1998), sendo classificadas em 3 categorias distintas de acordo com o grau de impacto das perdas econômicas (TABELA 4). Várias infecções virais têm afetado o cultivo de *L. vannamei*, principalmente o WSSV, TSV (taura syndrome virus – vírus da síndrome de Taura), IHNV (infectious hypodermal and haematopoietic necrosis vírus – vírus da necrose hematopoiética e hipodérmica infecciosa) e IMNV.

No presente, os vírus WSSV, IHNV e IMNV têm afetado a carcinicultura marinha no Nordeste do Brasil, sendo que o IMNV tem sido o vírus mais impactante pelo fato de ter atingido, provavelmente, a totalidade das fazendas de produção, causando mortalidades entre 40 e 70% e incrementando a taxa de conversão alimentar nos viveiros infectados, aumentando consideravelmente os custos de produção (ANDRADE *et al.*, 2007).

Outros patógenos, como as bactérias, podem ser igualmente prejudiciais aos camarões peneídeos. A NHP (Necrotizing hepatopancreatitis – hepatopancreatite necrozante) é uma doença de camarões peneídeos causada por uma bactéria gram-negativa intracelular do gênero *Rickettsia* (Necrotizing hepatopancreatitis bacteria – NHPB), que infecta as células epiteliais do hepatopâncreas. Mortalidades podem ser severas variando entre 25% e 95% nos viveiros mais fortemente afetados (LOY *et al.*, 1996).

Tabela 4 - Patógenos causadores de enfermidades em camarões peneídeos cultivados em países localizados no Oriente e Ocidente.

Grupo	Patógeno	Categoria
Virose	WSSV (Nimaviridae)*	C-1
	YHV, GAV, LOV (Roniviridae)*	C-1
	TSV (Dicistroviridae)*	C-1
	IHHNV (Parvoviridae)**	C-2
	IMNV (Totiviridae)**	C-2
Procarionte	NHP – alfa-proteobactéria	C-2
Protozoário	Microsporídeos e haplosporídeos	C-2
	Gregarinas	C-3

C1: Patógenos que podem causar perdas catastróficas em uma ou mais espécies de camarão peneídeo; C2: Patógenos que causam doenças significantes; C3: Patógenos que causam doenças menos significantes e que podem ser erradicadas. *Listado pela OIE (Office International des Epizooties) como uma doença que deve ser notificada desde maio de 1999. **Listado pela OIE como outras doenças que são significantes desde maio de 1999. Fontes: LIGHTNER (2003); ABCC (2005).

Uma síntese dos principais vírus que afetaram ou afetam a indústria de camarões peneídeos no Brasil está descrita a seguir.

1.2.3.1. WSSV

O WSSV, originário na Ásia, com ocorrências na América do Norte a partir de 1995, e, em 1999, nas Américas Central e do Sul (JIMENEZ *et al.*, 2000; PÉREZ *et al.*, 2005) é o vírus mais devastador entre os patógenos que têm sido descrito na carcinicultura marinha, afetando todos os estágios de vida dos camarões peneídeos e causando mortalidades de até 100% em períodos de 3 a 10 dias (CHOU *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1995).

As primeiras perdas de produção causadas pelo WSSV ocorreram com *P. japonicus* no Japão, em 1993 (TAKAHASHI *et al.*, 1994). No mesmo ano,

mortalidades observadas com os mesmos sinais clínicos foram reportadas para *P. japonicus*, *P. monodon* e *P. penicillatus*, em Taiwan e na China (CHOU *et al.*, 1995) e com *P. monodon*, na Tailândia (WONGTEERASUPAYA *et al.*, 1995).

O agente causador desta síndrome é um vírus de DNA de fita dupla (dsDNA) pertencente à família Nimaviridae e ao gênero *Whispovirus*, de formato de barra circular à elíptica com um envelope trilaminar com tamanho de 80-120 nm x 250-380 nm. Três seqüências completas (AF369029 da Tailândia, AF440570 de Taiwan e AF332093 da China) estão depositadas no GenBank. Seu genoma tem varia entre 293.000 e 305.000 pb (Van HULTEN & VLAK, 2001; Van HULTEN *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2001).

O vírus se manifesta de forma endêmica e pandêmica, com transmissão horizontal e vertical. Os principais sinais clínicos desta enfermidade são as calcificações brancas e arredondadas na parte interna do exoesqueleto (FIGURA 4), variando entre 0,5 e 2,0 mm de diâmetro, hipertrofia do órgão linfóide, necrose do hepatopâncreas, letargia causada pela redução do consumo alimentar e camarões com coloração entre rosado e avermelhado, devido à expansão dos cromatóforos (FLEGEL, 2006).

Diversos estudos têm relatado uma correlação evidente entre a virulência do WSSV e a temperatura da água (GUAN *et al.*, 2003; JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2004). VIDAL *et al.* (2001) reportaram que altas temperaturas foram capazes de impedir a virulência do WSSV em *L. vannamei* infectados por WSSV. No Brasil, a primeira ocorrência deste vírus foi em novembro de 2004, quando dizimou uma área de produção de 865 ha no Estado de Santa Catarina. Em 2007, esse vírus apresentou incidência no Sul da Bahia, quando afetou fortemente uma área de produção de aproximadamente 300 ha. Estes fatos estão relacionados com a ocorrência de baixas temperaturas da água durante o período frio, notadamente, inferiores a 22°C. Talvez, por esse fato, as fazendas de camarões do Nordeste do Brasil não tenham tido perdas de produção relacionadas com esse patógeno.



Figura 4 – Exemplos de *Penaeus monodon* infectados com WSSV, apresentando manchas brancas na carapaça e no rostrum (Figuras 4.1 e 4.3) e coloração avermelhada (exemplos no alto e a direita) devido à expansão dos cromatóforos (Figura 4.2). Fonte: LIGHTNER (1996a).

1.2.3.2. TSV

A síndrome da Taura surgiu, primeiramente, em Guayaquil, no Equador, em 1992, mas a etiologia viral somente foi estabelecida em 1994 (HASSON *et al.*, 1995; BROCK *et al.*, 1997). Posteriormente, esse patógeno foi detectado em países asiáticos produtores de camarão marinho (LIGHTNER, 1996b; TU *et al.*, 1999; NIELSEN *et al.*, 2005).

O TSV é um vírus não envelopado, icosaédrico com diâmetro variando de 31 a 32 nm (BONAMI *et al.*, 1997) e tem um genoma que consiste de uma fita única de RNA (ssRNA), linear, com 10.205 nucleotídeos com dois grandes quadros abertos de leitura (ORFs), a ORF 1 que contém as seqüências para proteínas não estruturais como a RNA polimerase e a ORF 2 contém as seqüências para as proteínas estruturais como as do capsídeo (BONAMI *et al.*, 1997; MARI *et al.*, 2002). TSV foi classificado como pertencente à família Dicistroviridae e membro do gênero *Cripavirus* (FAUQUET *et al.*, 2004; MAYO, 2005).

A síndrome da Taura apresenta duas fases distintas, uma fase aguda e uma fase crônica, ocasionando mortalidades cumulativas que variam entre 40 e 95%. Lesões histológicas na fase aguda mostram áreas multifocais no epitélio cuticular. Na fase crônica, pode não haver lesões macro e microscopicamente detectáveis. Macroscopicamente, na fase crônica, camarões infectados apresentam

lesões multifocais melanizadas no exoesqueleto e, na fase aguda, apresentam letargia, exoesqueleto flácido, trato digestivo vazio, cromatóforos expandidos e urópodos com coloração avermelhada (FIGURA 5) (LIGHTNER, 1996a; FLEGEL, 2006).

No Brasil, o TSV afetou fazendas comerciais de *L. vannamei* localizadas no Nordeste do Brasil, entre os anos de 1992 e 1996 (HASSON *et al.*, 1999), sendo que, no presente, não há indícios dessa epizootia ocorrendo no Brasil (PINHEIRO *et al.*, 2007).



Figura 5 – Exemplos de *Litopenaeus vannamei* infectados com TSV, apresentando sistema digestivo vazio (Figura 5.1), cromatóforos expandidos e urópodos avermelhados (Figura 5.2) e exoesqueleto com lesões multifocais melanizadas (Figura 5.3). Fonte: LIGHTNER (1996a).

1.2.3.3. IHNV

O IHNV foi, primeiramente, reportado em *P. vannamei* nas Américas, na década de 1980 (LIGHTNER *et al.*, 1983). Posteriormente, esse vírus foi detectado no camarão tigre *P. monodon* na Ásia (LIGHTNER, 1996b). O IHNV é um vírus não envelopado, icosaédrico com diâmetro variando entre 22–23 nm e tem um genoma que consiste de uma fita única de DNA (ssDNA), linear, de 4.100 nucleotídeos. Oito seqüências completas (AF218266 do Equador, AY362548 de Taiwan, DQ057982 da Tailândia, AY102034 da Tanzânia, AY124937 de Madagascar, AY125423 da Nova Caledônia e AY590120 da Austrália) estão depositadas no GenBank. Esse patógeno é um densovírus da família Parvoviridae, sub-família Densovirinae e do gênero

Brevidensovirus (BONAMI *et al.*, 1990; LIGHTNER, 1996b; TATTERSALL *et al.*, 2005).

Embora, o IHNV ocorra amplamente em várias espécies de camarões peneídeos selvagens ou cultivados, somente em juvenis e sub-adultos de *P. stylirostris* causa epidemia aguda e mortalidade em massa. Em *P. vannamei*, esse vírus tem baixo impacto, com perdas econômicas entre 10 e 50% (LIGHTNER & REDMAN, 1998), causando crescimento reduzido e irregular e deformidades cuticulares (FIGURA 6) que são coletivamente chamadas de RDS (runt-deformity syndrome – síndrome da deformidade e do baixo crescimento) (LIGHTNER, 1996b).

Muitas vezes, reprodutores infectados não apresentam sinais clínicos dessa enfermidade, transmitindo, verticalmente, a enfermidade para larvas e pós-larvas, causando problemas futuros nos cultivos comerciais (MOTE *et al.*, 2003; FLEGEL, 2006).

BRAZ *et al.* (2009), estudando a ocorrência de IHNV em fazendas comerciais de *P. vannamei* no Nordeste do Brasil, verificaram a prevalência desse vírus em indivíduos juvenis e sub-adultos coletados de 26 viveiros de produção de um total de 7 empresas amostradas, com taxas de infecção variando entre 9,4 e 81% da população amostrada. Contudo, análises de prevalência realizadas em pós-larvas recém estocadas não indicaram a presença do IHNV, sugerindo a hipótese de contaminação horizontal pós-estocagem.



Figura 6 – Exemplos de *Litopenaeus vannamei* infectados com IHNV, apresentando crescimento reduzido e irregular (Figura 6.1), deformidade no sexto segmento abdominal e telson (Figura 6.2) e deformidade no rostrum (Figura 6.3). Fonte: LIGHTNER (1996a).

1.2.3.4. IMNV

Em 2002, foi observada a ocorrência de mortalidades em indivíduos juvenis e sub-adultos de *L. vannamei* mantidos em cativeiro em fazendas comerciais no Nordeste do Brasil. Inicialmente, a causa das mortalidades foi associada às condições estressantes de cultivo, incluindo as exposições às baixas temperaturas e baixas salinidades devido ao período chuvoso, e foi identificada como uma enfermidade denominada de necrose muscular idiopática (IMN), baseada na descrição de BROCK (1988).

As primeiras perdas de produção aconteceram em áreas costeiras dos Estados do Piauí, leste do Maranhão e extremo oeste do Ceará, no ano de 2002. No ano de 2003, esta enfermidade continuou a causar perdas de produção, atingindo o litoral leste do Estado do Ceará. Em 2004, atingiu os Estados do Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco (ANDRADE *et al.*, 2007).

Somente em 2004, verificou-se que a enfermidade que afetava as fazendas comerciais de camarão no Nordeste do Brasil tinha origem viral, sendo denominada de mionecrose infecciosa (IMN) (LIGHTNER *et al.*, 2004; TANG *et al.*, 2005; POULOS *et al.*, 2006).

Essa enfermidade é causada por um vírus de RNA dupla fita (dsRNA), não envelopado, icosaedral, com diâmetro de 40 nm e um genoma de 7.560 pb, que compreende dois grandes quadros abertos (ORF1 e ORF2) (LIGHTNER *et al.*, 2004; POULOS *et al.*, 2006). A ORF1 codifica a proteína do capsídeo, enquanto ORF2 codifica a RNA polimerase. A análise filogenética da RNA polimerase revelou que o IMNV é similar aos membros da família Totiviridae ou pode significar uma nova família de vírus de dsRNA que infecta invertebrados. Duas seqüências completas (AY570982 do Brasil e EF061744 da Indonésia) estão depositadas no GenBank.

Camarões infectados por IMNV apresentam como principal sinal clínico perda da transparência do músculo abdominal, devido ao tecido muscular necrosado. As lesões causadas por essa enfermidade podem ser classificadas em 3 tipos, de acordo com o grau de severidade. Para o grau 1, a perda de transparência acontece em pequenos focos no músculo abdominal, não atingindo, porém, todos os seguimentos abdominais. Para o grau 2, as lesões se estendem progressivamente

em direção ao telson, havendo vários seguimentos abdominais necrosados. Para o grau 3, verifica-se o músculo abdominal fortemente necrosado, apresentando coloração avermelhada, típica de apodrecimento (FIGURA 7). As mortalidades podem ocorrer independentemente do grau de severidade (TANG *et al.*, 2005).

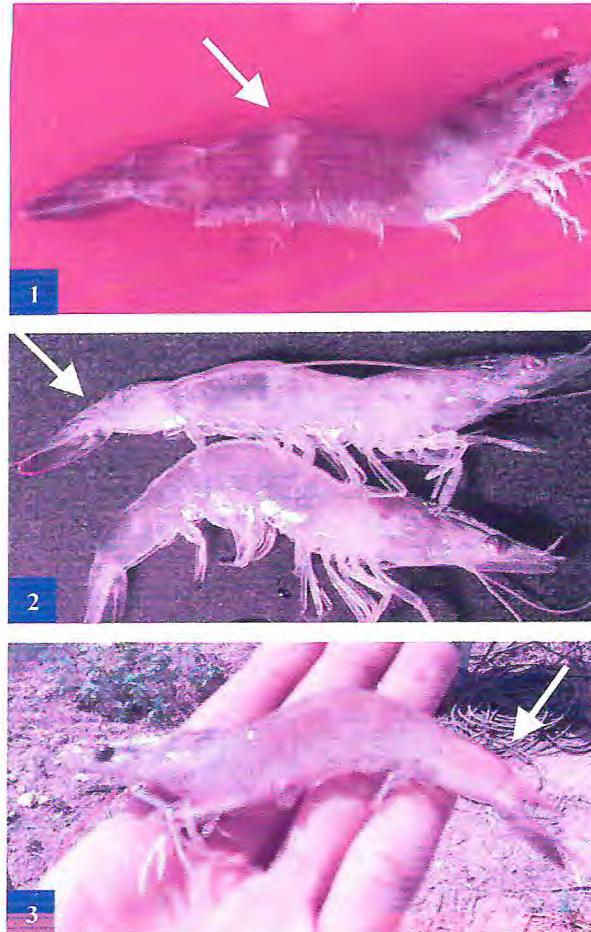


Figura 7 – Exemplos de *Litopenaeus vannamei* infectados com IMNV, apresentando grau de severidade 1 (Figura 7.1), grau de severidade 2 (indivíduo na posição superior da Figura 7.2), indivíduo sadio (indivíduo na posição inferior da Figura 7.2) e grau de severidade 3 (Figura 7.3). Fonte: POULOS *et al.* (2006).

Histologicamente, lesões podem ser observadas no tecido muscular, corpos de inclusão viral nos tecidos muscular e conjuntivo e nos hemócitos. Através da técnica de hibridização *in situ* foi verificado que o IMNV infecta, principalmente, o tecido muscular, órgão linfóide e intestino posterior (LIGHTNER *et al.*, 2004; TANG *et al.*, 2005; POULOS *et al.*, 2006).

Nos cultivos comerciais de *L. vannamei*, mortalidades progressivas variando entre 40 e 70% podem ser observadas, causando alto consumo de ração, com taxas de conversão alimentar que podem atingir 4,4:1 (ANDRADE *et al.*, 2007). Em 2006, mortalidades excessivas em cultivos comerciais de *L. vannamei* foram verificadas na Indonésia, sendo a enfermidade diagnosticada como mionecrose infecciosa (SENAPIN *et al.*, 2007).

1.2.4. Programas de Cruzamento e Seleção

Os avanços na biologia reprodutiva de muitas espécies de organismos aquáticos de importância econômica nas últimas duas décadas têm tornado possível a obtenção de ciclos de vida completos em condições de cultivo e possibilitado domesticações e seleção artificial (BENTSEN & OLESEN, 2002). Entretanto, somente na última década, incrementos genéticos substanciais e aumento na eficiência de produção têm sido alcançados para alguns peixes cultivados como salmonídeos e tilápias (HULATA, 2001).

Em camarões peneídeos, trabalhos genéticos recentes têm relatado a domesticação e cultivo em ciclos fechados e, ultimamente, esforços têm sido concentrados na seleção artificial para características relacionadas como crescimento e resistência à infecção viral (ARGUE *et al.*, 2002; GOYARD *et al.*, 2002).

Nos últimos anos, tem se documentado o uso de linhagens melhoradas geneticamente. Um dos primeiros programas de cruzamento seletivo para *L. vannamei* foi iniciado, em 1995, no Oceanic Institute, no Hawai. O trabalho original foi baseado em um programa de seleção focado equitativamente nas características de crescimento e resistência ao TSV. Verificou-se que estas duas características apresentavam uma resposta satisfatória ao processo de seleção, contudo foi evidenciada uma correlação genética negativa entre estas duas características (ARGUE *et al.*, 2002).

Por outro lado, trabalhos em desenvolvimento nos EUA têm reportado o desenvolvimento de linhagens de *L. vannamei* SPF (specific pathogen free – livre de um patógeno específico) e SPR (specific pathogen resistant – resistente a um patógeno específico) para TSV com taxas de crescimento de 2 g/semana, não

havendo correlação negativa entre crescimento e sobrevivência (BRIGGS *et al.*, 2005). PEINADO-GUEVARA & LÓPEZ-MEYER (2006), monitorando a ocorrência do WSSV em fazendas comerciais no México, verificaram crescimentos entre 1,2 e 1,6 g/semana, em sistemas de produção semi-intensivos.

No Brasil, as taxas de crescimento semanais são inferiores a 1,1 g/semana, com média em torno de 0,7 g/semana, independente do grau de intensificação do processo produtivo, o que indica a necessidade do estabelecimento de um programa de melhoramento genético com foco no crescimento, mas com o cuidado de se produzir pós-larvas SPF. Por conta desses baixos índices zootécnicos, em 2006, o laboratório comercial Aquatec Ltda realizou importações de uma linhagem de *L. vannamei* SPF do laboratório Syaqua, Kentucky, EUA (ABCC, 2005).

No mundo inteiro, várias infecções virais têm afetado o cultivo de *L. vannamei*, principalmente o WSSV, TSV e IHNV. Em 2002/2003, a indústria de camarões marinhos do Nordeste do Brasil foi afetada por uma enfermidade viral, denominada IMN. Conseqüentemente, a maior parte dos trabalhos relacionados com o melhoramento genético de camarões marinhos busca a produção de linhas de camarões SPF e SPR para patógenos de origem viral (ARGUE *et al.*, 2002; HENNIG *et al.*, 2005; PANTOJA *et al.*, 2005). Por conta dessa problemática, a aplicação de técnicas clássicas de melhoramento genético e de biotecnologia na indústria de camarões cultivados têm incrementado em importância no sentido de se estabelecer, principalmente, linhagens de camarões SPF e SPR.

A seleção artificial pode significar um incremento na performance de animais cultivados, contudo uma das principais estratégias em programas genéticos é o endocruzamento, que pode afetar características relacionadas para uma determinada aptidão, podendo ter um impacto negativo significativo na produção (DONATO *et al.*, 2005). Esse impacto negativo, resultante de perda de variabilidade genética pode afetar a sobrevivência, a reprodução e o crescimento, aumentando, inclusive a presença de deformidades e a susceptibilidade a patógenos.

Em programas de cruzamento e seleção, o monitoramento da variabilidade genética com marcadores moleculares geração após geração é recomendado para revelar alterações na variabilidade por pressão genética, endocruzamento ou seleção (ALLENDORF & RYMAN, 1987).

A seleção massal tem sido a técnica mais comum utilizada para a seleção artificial em aquicultura devido a sua simplicidade, mas os resultados não têm sido sempre satisfatórios (DOYLE, 2002). Entretanto, em cultivos de camarões peneídeos, existem alguns casos bem-sucedidos de ganhos zootécnicos por seleção massal, mas existem contradições quanto a herdabilidade (h^2) em relação à resistência a patógenos (PÉREZ *et al.*, 2005).

Durante o período 1995-1998, ARGUE *et al.* (2002) selecionaram, a partir de reprodutores de *L. vannamei*, uma linhagem para crescimento com um incremento de 21% na taxa de crescimento em relação ao grupo controle e uma linha resistente ao TSV com um aumento na sobrevivência de 18,4% em relação ao grupo controle. Contudo, as estimativas de herdabilidade foram moderadas em relação à resistência ao TSV.

DONATO *et al.* (2005) monitorando um programa de seleção massal durante 11 gerações, observaram ganhos significativos na sobrevivência e no crescimento e reduções na taxa de conversão alimentar e no percentual de deformidades relacionados ao IHHN. Por outro lado, em um programa de seleção de indivíduos resistentes ao WSSV, durante 3 gerações, foi observada uma redução de 11,0% para 3,9% na taxa de sobrevivência entre as gerações F_0 e F_3 , respectivamente (GITTERLE *et al.*, 2006).

No Brasil, a obtenção de reprodutores de *L. vannamei* é baseada em critérios clássicos de seleção genética, sendo que a escolha individual de cada reprodutor é feita quando o camarão se encontra em idade reprodutiva, apresenta uma performance zootécnica acima da média em cultivos comerciais, um bom padrão de sanidade e não possui deformidades (BARBIERI-JÚNIOR & OSTRENSKY-NETO, 2001). Como consequência, práticas de cruzamento não orientadas podem favorecer a incidência de endocruzamento entre reprodutores nas larviculturas, causando efeitos genéticos negativos (FREITAS & GALETTI JR, 2002).

Iniciativas objetivando o melhoramento genético do *L. vannamei* raramente têm sido realizadas por empresas comerciais brasileiras e os resultados não se encontram bem definidos. ROCHA *et al.* (2004b) relataram o desenvolvimento de uma linha denominada de "speed line" pela empresa Aquatec Ltda, mas, comercialmente, os resultados ainda não são conclusivos.

No Brasil, a Potiporã Aquacultura Ltda tem sido o único laboratório de produção de pós-larvas de *L. vannamei* a desenvolver pesquisas no sentido de se estabelecer camarões SPF para IMNV, IHHNV e NHPB e SPR para IMNV, através de protocolos de detecção altamente sensíveis para diversos patógenos que empregam métodos de amplificação de DNA baseados na reação em cadeia de polimerase (PCR).

Portanto, em programas de cruzamento e seleção visando a obtenção de linhagens SPR, o estabelecimento de marcadores moleculares é essencial no sentido de se realizar, geração após geração ($F_0, F_1, F_2, \dots, F_n$), o monitoramento de genes relacionados com a resistência viral (WOLFUS *et al.*, 1997).

1.3. Lectinas

O termo lectina é derivado do latim, *legere*, que significa capacidade de escolher e tem sido usado devido ao aspecto seletivo de ligação dessas proteínas aos eritrócitos humanos (BOYD & SHAPLEIGH, 1954). Atualmente, o conceito mais empregado define esta molécula como sendo uma proteína de origem não-imune com pelo menos um sítio de ligação não catalítico que reconhece e interage de forma reversível a carboidratos (PEUMANS & VAN DAMME, 1995), sendo encontrada em todos os seres vivos, desde vírus até mamíferos (SHARON & LIS, 1989).

As lectinas foram primeiramente relacionadas por sua capacidade de aglutinar células sanguíneas através de ligações cruzadas dos resíduos de açúcar presentes na superfície dessas células. Elas são classicamente consideradas um grupo heterogêneo de proteínas com propriedades bioquímicas e atividades biológicas acentuadamente diferentes, e apresentam funções em processos importantes como infecções, fertilização, câncer, transporte protéico e embriogênese (GABIUS & GABIUS, 1997), sendo consideradas ferramentas importantes na biologia, histologia e medicina (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Nos animais, lectinas se apresentam como uma classe de moléculas heterogêneas, que exibem uma alta diversidade estrutural. Inicialmente, estas proteínas têm sido classificadas em dois grupos distintos: lectinas dos tipos C e S, baseado nas similaridades das seqüências de aminoácidos, particularmente no

domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD, carbohydrate recognition domain) e em algumas propriedades físico-químicas, como a dependência por cátions divalentes e o requerimento por grupos sulfidríla (DRICKAMER, 1988). A dependência por cálcio é a principal propriedade associada com as lectinas tipo C, enquanto que a dependência por grupos sulfidríla é a principal característica do grupo tipo S.

Recentemente, como uma consequência dos estudos de estruturas tridimensionais e a análise de dados adicionais de seqüências primárias, uma classificação mais completa tem sido utilizada. Como consequência, lectinas tipo C têm sido, adicionalmente, caracterizadas em dois sub-grupos distintos e as lectinas tipo S têm sido re-classificadas como galectinas, contudo a existência de novas categorias têm sido estabelecidas (DRICKAMER, 1995; VASTA *et al.*, 1996; VASTA *et al.*, 1999).

As lectinas tipo C são divididas em selectinas e colectinas de acordo com suas similaridades estruturais e diferenças funcionais. As selectinas têm uma função principal na mediação da adesão celular e migração (HAYASHIDA *et al.*, 2002), e as colectinas possuem uma função chave na primeira linha de defesa contra os processos infecciosos (EPSTEIN *et al.*, 1996).

Várias lectinas têm sido descritas em invertebrados aquáticos, incluindo caranguejos e outros crustáceos, moluscos e tunicatos (IWAKI *et al.*, 1999; MARQUES & BARRACCO, 2000; LEE & SÖDERHÄLL, 2002; QUESENBERRY *et al.*, 2003). Estas descrições estão baseadas na análise das seqüências genéticas e/ou no isolamento das proteínas baseado na especificidade por carboidratos. Em alguns casos, os níveis destas lectinas na hemolinfa, ou suas taxas de transcrição, respondem (aumentando ou diminuindo) quando da presença de agentes infecciosos ou corpos estranhos (ROUX *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2007; MA *et al.*, 2007). Este processo, conhecido como resposta de fase aguda nos vertebrados, ocorre quando a produção hepática de determinadas proteínas, descritas como proteínas de fase aguda, é alterada nas respostas aos mediadores da inflamação nos estágios iniciais do processo inflamatório (GABAY & KUSHNER, 1999).

Algumas lectinas têm sido purificadas e caracterizadas em várias espécies de camarões peneídeos, desempenhando função importante como proteínas de

reconhecimento padrão e nas respostas do sistema imune contra agentes infecciosos (LIU *et al.*, 2007; MA *et al.*, 2007). Estas proteínas têm sido isoladas tanto na hemolinfa como no hepatopâncreas de camarões marinhos (RITTIDACH *et al.*, 2007; MA *et al.*, 2008).

Muitas lectinas de crustáceos, incluindo as de camarões peneídeos, parecem possuir uma especificidade em comum por aminoaçúcares *N*-acetilados, particularmente os ácidos siálicos (MARQUES & BARRACCO, 2000). Ácidos siálicos formam uma família de derivados de *N*-acetil, *O*-acetil ou *N*-glicolil do ácido neuramínico (SCHAUER *et al.*, 1982), entre os quais, o ácido *N*-acetil neuramínico (Neu5Ac) é o mais comum na natureza (MANDAL & MANDAL, 1990).

A maioria das lectinas de camarões peneídeos é do tipo C, requerendo cálcio para exercer a atividade hemaglutinante, como no caso das lectinas isoladas de *L. vannamei* (SUN *et al.*, 2007), *F. merguensis* (RITTIDACH *et al.*, 2007) e *F. chinensis* (SUN *et al.*, 2008a). As principais lectinas isoladas e caracterizadas em camarões peneídeos estão descritas na TABELA 5.

Em *Litopenaeus vannamei* e *L. setiferus*, um grupo de lectinas [ou lectinas ESTs (expression sequence tags lectins)] tem sido encontrado no hepatopâncreas (GROSS *et al.*, 2001; ASTROFSKY *et al.*, 2002), sugerindo a importância das lectinas na detecção inicial da infecção microbiana.

Recentemente, cDNAs de lectinas têm sido caracterizados em camarões peneídeos. Onze genes de lectinas tipo C têm sido descritos, incluindo PmAV (LUO *et al.*, 2003; LUO *et al.*, 2007), PmLec (LUO *et al.*, 2006), PmLT (MA *et al.*, 2008), LvLT (MA *et al.*, 2007), LvLec (ZHANG *et al.*, 2009a), LvCTL1 (ZHAO *et al.*, 2009), Fclectin (LIU *et al.*, 2007), Fc-Lec2 (ZHANG *et al.*, 2009b), Fc-Lec3 (WANG *et al.*, 2009a), Fc-Lec4 (WANG *et al.*, 2009b) e Fc-hsL (SUN *et al.*, 2008b).

Tabela 5 - Lectinas isoladas e caracterizadas em diferentes espécies de camarões peneídeos*.

Espécie	Cátion divalente	Peso molecular (kDa)	Especificidade por carboidratos	Atividade biológica	Citações
<i>P. japonicus</i>	+	330	GlcNAc, GalNAc, NeuAc, Fetuína	Atividade opsônica	1, 2
<i>P. indicus</i>	-	nd	GlcNAc, GalNAc, NeuAc, Fetuína	Nd	3
<i>P. californiensis</i>	+	nd	GlcNAc, GalNAc, NeuAc, Fetuína	Aglutinação de bactérias	4, 5
<i>P. stylirostris</i>	+	30	Nd	Nd	4
<i>P. monodon</i>	+	420	GlcNAc, GalNAc, NeuAc, Fetuína	Aglutinação de bactérias	6
<i>P. paulensis</i>	-	153	GlcNAc, GalNAc, NeuAc, Fetuína	Atividade opsônica	7
<i>L. schmitti</i>	-	153	GlcNAc, GalNAc, NeuAc, Fetuína	Aglutinação de bactérias	8
<i>P. longirostris</i>	+	440	Galactose, GalNAc, NeuAc, Fetuína	Aglutinação de bactérias	9
<i>L. vannamei</i>	+	172	GlcNAc, GalNAc, NeuAc, Fetuína	Aglutinação de bactérias	10
<i>F. merguensis</i>	+	316	GlcNAc, GalNAc, NeuAc, Fetuína, Mucina	Aglutinação de bactérias	11
<i>F. chinensis</i>	+	168	NeuAc, Fetuína, Mucina	Aglutinação de bactérias	12

* Adaptado parcialmente de MARQUES & BARRACCO, 2000; GlcNAc: *N*-acetil-glicosamina; GalNAc: *N*-acetil-galactosamina; NeuAc: ácido *N*-acetil-neuramínico; 1 – KONDO *et al.*, 1992; 2 – KONDO *et al.*, 1998; 3 – MAHESWARI *et al.*, 1997; 4 – VARGAS-ALBORES *et al.*, 1993; 5 – VARGAS-ALBORES, 1995; 6 – SRITUNYALUCKSANA *et al.*, 1999b; 7 – MARQUES & BARRACCO, 2000; 8 – COMINETTI *et al.*, 2002; 9 – FRAGKIADAKIS & STRATAKIS, 1995; 10 – SUN *et al.*, 2007; 11 – RITTIDACH *et al.*, 2007; 12 – SUN *et al.*, 2008a.

PmAV, PmLec e PmLT são encontradas em *Penaeus monodon*. PmAV foi isolada do hepatopâncreas, sendo caracterizada como uma proteína com um único CRD semelhante a uma lectina tipo C, contribuindo para a resistência viral (LUO *et al.*, 2003; LUO *et al.*, 2007), enquanto PmLec é uma lectina tipo C com um único CRD, encontrando-se presente na hemolinfa, funcionando como uma PRR para bactérias Gram-negativas, através da interação com LPS e, também, como uma opsonina por incrementar a eficiência da fagocitose dos hemócitos (LUO *et al.*, 2006). PmLT é uma lectina tipo C com dois CRDs, produzida somente nas células F do hepatopâncreas, podendo agir como uma PRR para patógenos virais e incrementando a encapsulação celular de patógenos bacterianos pelos hemócitos (MA *et al.*, 2008).

Até o presente momento, três lectinas tipo C (LvLT, LvLec e LvCTL1) têm sido expressas em de *L. vannamei*. LvLT é expressa somente no hepatopâncreas, contém dois CRDs e pode estar envolvida com o processo defesa em infecções de WSSV (MA *et al.*, 2007). O cDNA da lectina LvLec foi clonado a partir de hemócitos, sendo que LvLec possui um único CRD e apresenta resposta defensiva contra bactérias Gram-negativas (ZHANG *et al.*, 2009a). O mRNA de LvCTL1 têm sido expresso no hepatopâncreas, sendo que a lectina apresenta um único CRD e é capaz de interagir com proteínas presentes em WSSV, exercendo função antiviral (ZHAO *et al.*, 2009).

Finalmente, Fclectin contém dois CRDs e é expressa nos hemócitos no camarão chinês *Fenneropenaeus chinensis* (LIU *et al.*, 2007). O perfil de expressão de Fclectin nos hemócitos foi fortemente modificado em camarões infectados pelo WSSV ou por bactérias (*Vibrio anguillarum* e *Staphylococcus aureus*) ou quando estimulados por LPS. Com o rápido crescimento no número de lectinas isoladas de camarões peneídeos, a compreensão de suas funções no sistema imune inato, tais como, o reconhecimento de patógenos e as funções opsônicas são importantes para o desenvolvimento de processos que possam prevenir ou minimizar os prejuízos causados na aquicultura devido à ocorrência de enfermidades.

Semelhante a Fclectin, Fc-Lec2 é uma PRR tanto para bactérias Gram-positivas como para Gram-negativas, através da interação com LPS. Esta lectina contém dois CRDs, mas tem sido expressa no hepatopâncreas de *F. chinensis*, de

forma similar a LvLT de *L. vannamei* (ZHANG *et al.*, 2009b). Fc-Lec3 possui um único CRD, é expressa no hepatopâncreas, apresenta uma possível função antiviral contra WSSV, sendo, também, uma PRR tanto para bactérias Gram-positivas como para Gram-negativas (WANG *et al.*, 2009a).

Fc-Lec4 é uma lectina expressa no hepatopâncreas, brânquias, estômago e intestino, com um único CRD, sendo uma PRR tanto para bactérias Gram-positivas como para Gram-negativas, mas não havendo interação com lipopolissacarídeos (WANG *et al.*, 2009b). Fc-hsL é uma lectina específica para o hepatopâncreas, com um único CRD, podendo funcionar como uma PRR para bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas e para fungos e como uma molécula efetora do sistema imune inato contra o WSSV (SUN *et al.*, 2008b).

Portanto, as recentes pesquisas indicando uma possível função antiviral de lectinas presentes no sistema imune inato de camarões peneídeos podem tornar essas moléculas ferramentas essenciais, no sentido de serem utilizadas como marcadores genéticos, indicando resistência a uma enfermidade específica, principalmente, de origem viral, em programas de cruzamento e seleção visando a obtenção de linhagens resistentes a determinados patógenos.

Por outro lado, apesar do número expressivo de lectinas tipo C caracterizadas, em camarões peneídeos, nos últimos anos, não existe nenhum estudo até o presente momento de modelagem molecular da estrutura tridimensional destas proteínas, diferente do que se observa para outras moléculas relacionadas com o sistema imune inato como as peneidinas (HU *et al.*, 2006; CUTHBERTSON *et al.*, 2008) e as crustinas (SMITH *et al.*, 2008). Desta forma, este é o primeiro estudo descrevendo as estruturas tridimensionais dos CRDs de duas lectinas tipo C em *L. vannamei*, denominadas de Lv CTL-br1 e Lv CTL-br2.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Obter a clonagem e modelagem molecular de duas lectinas do tipo C de *Litopenaeus vannamei*, denominadas de LvCTL-br1 e LvCTL-br2.

2.2. Objetivos Específicos

A partir de amostras do hepatopâncreas de *L. vannamei*, isolar o RNA total;

Clonar o fragmento gênico de interesse, tendo como referência *primers* direto e reverso da lectina LvLT presente no hepatopâncreas de *L. vannamei*;

Seqüenciar os clones positivos e, a partir, destes obter as seqüências deduzidas de aminoácidos;

A partir das seqüências deduzidas de aminoácidos, realizar a comparação com proteínas depositadas no Banco de Dados Genômicos do NCBI (GenBank);

Realizar as modelagens moleculares das lectinas presentes no hepatopâncreas de *L. vannamei*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras Utilizadas

Amostras de hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei* foram cirurgicamente obtidas de 10 exemplares com peso médio de 12 g, aparentemente sadios coletados, em uma fazenda comercial no Estado do Ceará, imediatamente imersas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C , até o momento da extração do RNA total.

3.2. Isolamento do RNA Total

O RNA total do tecido foi obtido utilizando-se o reagente TriZol[®] (Invitrogen, Carlsbad, EUA), seguindo o procedimento sucintamente descrito abaixo.

O tecido foi pulverizado na presença de nitrogênio líquido, com o auxílio de almofariz e pistilo. À amostra pulverizada, foi adicionado o reagente TriZol[®] e em seguida, o material foi homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado clorofórmio na proporção de 0,2 mL para cada 1 mL de TriZol[®] utilizado e, após agitação vigorosa, o homogeneizado foi deixado em repouso por 10 minutos, a temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada para separação em três fases: uma aquosa clara (fase superior, contendo RNA total), uma fase intermediária (que contém DNA de alto peso molecular), uma fase fenólica (fase inferior, orgânica, contendo proteínas e fragmentos celulares). A fase aquosa foi transferida para um tubo limpo, para precipitação do RNA total.

Para tanto, foi adicionado álcool isopropílico à fase aquosa, na relação de 1:1 (v/v), seguindo-se uma incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. O material foi centrifugado e o sobrenadante descartado. O *pellet* de RNA total foi submetido a uma lavagem utilizando uma solução de etanol a 75% (1 mL para cada 1 mL de TriZol[®] utilizado inicialmente) e centrifugação a $7500 \times g$ por 5 minutos a

4°C. O *pellet* de RNA foi seco em SpeedVac (Eppendorf concentrator) e, em seguida, hidratado por 10 minutos a 55°C em 100 µL de água livre de RNase.

3.2.1. Quantificação do RNA Total

A quantificação das amostras de RNA foi realizada com a utilização de um espectrofotômetro, sendo considerando que uma unidade de DO_{260nm} é equivalente a 40 µg/mL. O grau de pureza foi verificado com base na relação da absorbância A_{260nm}/A_{280nm} . Para isso, foram utilizados 10 µL de cada amostra em uma diluição de 100 vezes, usando água tratada com DEPC.

3.2.2. Preparo do Gel Desnaturante

A integridade dos RNAs isolados foi comprovada por eletroforese em condição desnaturante e foram tratados de acordo com MASEK *et al.* (2005). Imediatamente antes da eletroforese, foram preparadas as reações, para um volume final de 10 µL, adicionando formamida deionizada, para uma concentração final de 60% (v/v), 1/10 de "loading dye" 10X (50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,25% azul de bromofenol e 60% glicerol), 1 µL de brometo de etídio (1 mg/mL) e 3 µL da amostra de RNA. As reações foram desnaturadas a 65°C durante 5 minutos e colocadas posteriormente no gelo por mais 5 minutos. Em seguida, foram aplicadas em gel de agarose 1,2% em tampão TAE (0,04 M Tris-acetato, 1 mM EDTA) para separação. As bandas correspondentes às subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal foram visualizadas por meio de um transluminador de UV e registradas com câmera digital.

3.3. Purificação do RNA Mensageiro

O RNA mensageiro foi isolado a partir do RNA total usando um primer oligo (dT) biotilado e partículas magnéticas (Promega, Madison, EUA), de acordo com o protocolo abaixo descrito.

Inicialmente, o RNA total foi colocado em um tubo livre de RNase e foi acrescentado 500 µL de água, colocando em seguida no banho-maria a 65°C por 10 minutos. Foram adicionados 3 µL da sonda oligo (dT)-biotilada e 13 µL de solução

20X SSC (3M NaCl, 0,3M Citrato de sódio). Estes foram misturados e deixados à temperatura ambiente até esfriar completamente. Foi feita a homogeneização dos tubos contendo as partículas paramagnéticas - estreptavidina (AS-PMPs), uma solução de 1 mg/mL de albumina do soro bovino e 0,02% de azida sódica até dispersão completa. Em seguida, os tubos foram posicionados no suporte magnético por 30 segundos até que as partículas ficassem aderidas na lateral do tubo. O sobrenadante foi coletado e as AS-PMPs lavadas três vezes usando 300 µL de 0,5X SSC. As partículas lavadas foram suspensas em 100 µL de 0,5X SSC.

A reação contendo RNA total e oligo (dT)-biotinilado foi adicionada no tubo das partículas paramagnéticas lavadas. O material foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e em seguida homogeneizado por 2 minutos. As AS-PMPs foram capturadas usando o suporte magnético e o sobrenadante foi removido. Foi feita uma lavagem das partículas com 300 µL de 0,1X SSC por quatro vezes e o sobrenadante foi novamente removido. O pellet foi ressuspensão com 100 µL de água livre de RNase, as partículas foram capturadas e o mRNA eluído foi transferido para um novo tubo. Essa etapa foi repetida com 150 µL de água e o mRNA eluído foi acrescido ao anterior.

3.4. Síntese da Primeira Fita de cDNA

A primeira fita de cDNA foi sintetizada por meio de uma reação de polimerização, catalisada por uma transcriptase reversa (M-MLV RT, *Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase*, Promega), usando oligonucleotídeos específicos para o gene da lectina LvLT (GenBank DQ871245). Primeiramente, foi adicionado 2 µg de RNAm e 1 µg/mL de primer QT (oligo dT). A reação foi incubada a 70°C durante 5 minutos, e, em seguida, ficou por 5 minutos no gelo. Foram adicionados em cada amostra 10 µL de 5X tampão, 2 µL de 10 mM dNTPs, 40 U/µL de inibidor de RNase, 3 µL de transcriptase reversa M-MLV RT 100 U/µL e água DEPC para completar 25 µL. A reação foi incubada a 42°C por 60 minutos. Uma alíquota foi analisada através de eletroforese em gel de agarose a 1% e os cDNAs sintetizados foram visualizados com brometo de etídio.

3.5. Amplificação dos Genes LvCTL-br1 e LvCTL-br2

Os genes de interesse, denominados LvCTL-br1 e LvCTL-br2, foram amplificados com os *primers* direto LvLT e reverso LvLT específicos para as regiões 5' e 3' do gene que corresponde às seqüências de aminoácidos MMSYLPL e PLCVYTG, respectivamente. A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), sendo que inicialmente foi realizado um gradiente de temperatura para verificar a melhor temperatura de pareamento de *primers* (TABELA 6). Posteriormente, foi feita uma amplificação em volume maior, utilizando a temperatura ideal de pareamento seguindo os seguintes parâmetros: uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos e 30 ciclos subseqüentes de desnaturação a 94°C por 50 segundos, pareamento a 48°C por 50 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos. Após completar os 30 ciclos, procedeu-se uma etapa de extensão final a 72°C por 8 minutos. Os produtos obtidos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados com brometo de etídio em um transluminador UV.

Tabela 6 - Temperaturas utilizadas na PCR (gradiente), variando de 45°C a 65,6°C.

Coluna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Temperatura de pareamento de <i>primers</i> (°C)	45,0	45,3	46,4	48,0	50,4	53,0	55,8	58,5	61,0	63,1	64,7	65,6

3.5.1. Subclonagem em Vetor Plasmidial

Os amplicons foram purificados com o kit "Wizard PCR and gel clean up System" (Promega, Madison, EUA) e a sub-clonagem dos produtos de PCR obtidos foi realizada em um vetor plasmidial utilizando o sistema pGEM-T Easy (Promega, Madison, EUA), seguindo as indicações descritas abaixo. Inicialmente, foi feita a adição de 5 µl de tampão de ligação 2X (60 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 20 mM

ditiotreitól, 2 mM adenosina tri-fosfato, 10% polietilenoglicol), 3 µl de cada gene amplificado, 1 µL da T₄ DNA ligase e 1 µL do plasmídeo pGEM-T-Easy. O material foi incubado por 2 horas à temperatura ambiente (25°C) e por mais 15 horas (*overnight*) a 4°C. O produto de sub-clonagem foi utilizado para transformação de *Escherichia coli* previamente tornadas competentes pelo método do cloreto de cálcio descrito a seguir.

3.5.2. Preparação de Células Bacterianas Competentes

Células bacterianas (*E. coli*, TOP10, Promega, Madison, EUA) foram sensibilizadas através do método do cloreto de cálcio (AUSUBEL *et al.*, 1995). A solução de CaCl₂ utilizada nesta etapa foi constituída de 60 mM de CaCl₂ e 15% de glicerol, pH 7,0. TOP10 foi cultivada por cerca de 15 horas (*overnight*) a 37°C em placa contendo LB-ágar. Bactérias oriundas de uma única colônia foram inoculadas em caldo LB e novamente cultivadas a 37°C, *overnight*. Após a obtenção da DO_{600nm} esperada (~0.6), o meio foi centrifugado e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspensão em solução de CaCl₂ e centrifugado. Após descarte do sobrenadante, as células foram novamente ressuspensas em solução de CaCl₂ a 4°C, deixadas em repouso por 30 minutos e novamente centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão em 2 mL de solução de CaCl₂ a 4°C. Todas as centrifugações foram feitas a 1100 x g por 5 minutos a 4°C.

3.5.3. Transformação

Para a transformação das células competentes foram adicionados 50 µL de células competentes e 3 µL de cada ligação, sendo homogeneizado e incubado no gelo por 10 minutos. Em seguida, o material foi imerso em banho-maria a 42°C ("choque térmico") por 2 minutos e imediatamente colocado em gelo por 2 minutos. Foi feita a adição de 1 mL de meio LB e as bactérias foram cultivadas por 1 hora a 37°C, sob agitação de 250 rpm.

O controle positivo do método foi obtido através de uma reação de transformação de bactérias competentes utilizando uma solução contendo

3.5.4. Seleção das Células Recombinantes

Alíquotas de 25 µL e 50 µL das bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo 50 µg/mL de ampicilina e incubadas à 37°C durante uma noite. Após o crescimento, foram selecionadas algumas colônias para a realização do PCR *colony* utilizando os mesmos *primers* específicos para LvLT e os mesmos parâmetros para a amplificação anterior foram utilizados. Os produtos da reação foram novamente visualizados em gel de agarose 1% e revelados com brometo de etídeo.

3.5.5. Propagação dos clones e purificação dos plasmídeos

Os clones contendo insertos de aproximadamente 1050 pb foram cultivados overnight a 37°C em 4 mL de caldo LB contendo 50 µg/mL de ampicilina sob agitação (~ 200 rpm). Após esse período, os plasmídeos foram extraídos e purificados do cultivo bacteriano utilizando o método de lise alcalina.

Foi centrifugado 1,5 mL de cada cultura selecionada durante 2 minutos a 14000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, sendo o pellet ressuspenso com 100 µL da solução 1 (50 mM glicose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) e assim incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionado 200 µL da solução de lise (0,2 N NaOH, 1% SDS), misturados por inversão e deixando em seguida no gelo por 5 minutos.

Foi acrescentado 150 µL da solução precipitante (acetato de potássio 5 M, pH 4,8), homogeneizando-se no 'vórtex', levando ao gelo por mais 5 minutos. A centrifugação foi feita a 14000 rpm, 4°C, por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos novos e foi adicionado 800 µL de etanol 95%, incubados a temperatura ambiente por 2 minutos. Foi centrifugado a 14000 rpm, 5 minutos a temperatura ambiente, descartando-se o sobrenadante e o pellet lavado com etanol 70%. Uma nova centrifugação foi realizada a 14000 rpm, 25°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o pellet secado no SpeedVac (Eppendorf concentrator). Por último, o pellet foi ressuspenso em 30 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA).

3.6. Seqüenciamento de Nucleotídeos

Foram selecionados alguns clones que contendo insertos do tamanho esperado e a partir daí foi feita uma PCR usando os *primers* “universais” M13 senso e M13 anti-senso. Foi feita, também, uma reação de seqüenciamento direto a partir dos *amplicons* de LvLT, usando os *primers* específicos. O seqüenciamento foi feito pelo método de terminação em cadeia (Dye terminator chemistry) utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator kit (GE, Healthcare, EUA). Inicialmente, os produtos de PCR foram tratados pela adição de 0,5 μL de exonuclease I – exo I (20 U/ μL) e 1 μL de fosfatase alcalina de camarão - SAP (10 U/ μL), para cada 5 μL de reação de PCR. Essa reação foi incubada a 37°C por 15 minutos, seguido de 15 minutos a 80°C. Essas duas enzimas juntas eliminam os restos de dNTPs e oligonucleotídeos não incorporados durante a reação de PCR.

Para a reação de seqüenciamento, foram utilizados 3 μL de cada produto de PCR tratado, 2,5 μL de primer (M13 senso, M13 anti-senso), 1 μL de reagente de seqüenciamento premix, 2,0 μL de tampão “*save money*” e 2,5 μL de água ultra-pura (deionizada) estéril. Essa reação foi preparada em placa contendo 96 poços e posteriormente selada, homogeneizada e colocada no termociclador (Gradient Mastercycler, Eppendorf), seguindo os parâmetros: 30 ciclos de 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Os produtos dessa reação foram precipitados, através da adição de 2 μL de tampão acetato de sódio/EDTA e 40 μL de etanol 95%, havendo a homogeneização em vórtex e em seguida a placa foi centrifugada a 3700 rpm, 4°C por 1 hora. Os materiais precipitados foram lavados, adicionando-se 100 μL de etanol 70% e centrifugados a 3700 rpm, 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, secando-se o pellet. O DNA foi ressuspenso em 20 μL de solução de formamida (“loading solution”) e em seguida submetido à eletroforese em capilar no seqüenciador de nucleotídeos MegaBACE DNA Analysis System (GE Healthcare, EUA).

3.7. Análise das Seqüências

A análise das seqüências foi feita utilizando o programa PSI-BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997), além de outras ferramentas de bioinformática disponíveis na Internet, na página do National Center for Biotechnology Information, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools>) e do Swiss Institute of Bioinformatics, SIB (<http://www.expasy.ch/tools>). Os alinhamentos múltiplos das seqüências de aminoácidos e de DNA foram feitos utilizando-se o programa CLUSTAL W2, através do acesso <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustaw2> (BROOKSBANK *et al.*, 2003) e posteriormente corrigidos manualmente.

As melhores seqüências obtidas (3CN e 3cFXa) foram inicialmente processadas através do programa DNASTar Lasergene versão 6.0, na qual a porção da seqüência referente ao plasmídeo foi eliminada.

Para obtenção da seqüência deduzida de aminoácidos, foram utilizadas as ferramentas de tradução disponíveis no banco de dados público "Expert Protein Analysis System – EXPASY" (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>).

As seqüências deduzidas de aminoácidos, no formato FASTA, foram comparadas com proteínas depositadas no Banco de Dados Genômicos do NCBI (GenBank), através do programa pBLAST, que alinha seqüências de proteína fornecida em relação a seqüências de proteínas já existentes no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

3.8. Alinhamento Múltiplo e Análise Filogenética

Usando o programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), as seqüências deduzidas de aminoácidos obtidas de *L. vannamei* foram comparadas com outras lectinas de camarões peneídeos. A árvore filogenética foi construída usando o método de neighbor-joining, baseado no alinhamento da seqüência de aminoácidos (ClustalW) de lectinas tipo C ou de lectinas-like de camarões peneídeos, caranguejos, insetos e peixes. As seqüências utilizadas foram para *L. vannamei* (LvLT, Genbank N.º DQ871245; LvLec, Genbank N.º EF583939), *P. monodon* (PmLT, Genbank N.º DQ871244; PmAV, Genbank N.º AY302750; PmLec, Genbank N.º

DQ078266), *P. semisulcatus* (PsLT, Genbank N.º DQ871243), *F. chinensis* (Fc-Lec2, Genbank N.º EU834289, Fc-Lec4, Genbank N.º EU834290, Fc-hsL, Genbank N.º DQ167572, Fclectin, Genbank N.º AY871270), *F. merguensis* (Fm-L, N.º FJ751773), *Perca flavescens* (CTL-1, Genbank N.º FJ826550, CTL-2, Genbank N.º FJ826553, CTL-3, Genbank N.º FJ826552, CTL-4, Genbank N.º FJ826548, CTL-5, Genbank N.º FJ826545, CTL-6, Genbank N.º FJ826555), *Drosophila virilis* (GJ18331, Genbank N.º XM_002057763) e *Portunus trituberculatus* (PtLP, Genbank N.º EU477491). A construção da árvore filogenética destas proteínas foi realizada usando o programa MEGA version 4 (TAMURA *et al.*, 2007).

3.9. Modelagem Computacional

O modelo tridimensional (3D) para as seqüências deduzidas de aminoácidos obtidas foi calculado através de modelagem por homologia estrutural, usando-se o programa YASARA (KRIEGER *et al.*, 2002). As buscas por uma seqüência de proteína modelo foram feitas usando o programa PSI-BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Um total de 23 padrões foram identificados e a qualidade estrutural analisada de acordo com o programa WHAT CHECK (HOOFT *et al.*, 1996a), obtido a partir do programa PDBfinder2_database (HOOFT *et al.*, 1996b). Um total de 14 modelos foram gerados baseados nas 5 principais seqüências de proteínas modelo, sendo que alinhamentos alternativos foram usados quando necessário. Depois que as cadeias laterais foram construídas, otimizadas e ajustadas, as partes modeladas foram, novamente, submetidas a etapas combinadas descendentes e minimização estrutural simulada. Então, uma minimização estrutural simulada completa foi feita para toda a molécula. Somente os resíduos de aminoácidos variando entre a posição 37 e 195 foram modelados. O modelo de melhor qualidade foi gerado com uma lectina tipo C presente em células dendríticas (DC-SIGNR), que é encontrada no sistema imune humano, apresentando uma identidade de 32% com a região estudada (código PDB: 1xph, esclarecido por difração de raio X com uma resolução de 1,41 Å). Finalmente, o modelo foi submetido a uma etapa final de minimização estrutural simulada em um solvente específico. O modelo tridimensional para as novas lectinas tipo C de *L. vannamei* C-type foi avaliado e confirmado por

programa Yasara, que faz uso da ferramenta WHAT CHECK associado ao campo de forças dinâmico da molécula.

O segundo domínio (resíduos de aminoácidos variando entre 198 e 347) foi separadamente modelado de acordo com a mesma rotina acima descrita. Os dez melhores modelos foram obtidos de um complexo entre DC-SIGNR e GlcNAc2Man3, apresentando 32% de identidade com a região estudada (PDB code: 1k9J, esclarecido por difração de raio X com uma resolução de 1,90 Å).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração e Quantificação do RNA Total

O hepatopâncreas tem sido descrito como um dos mais importantes órgãos envolvidos no sistema imune inato de camarões peneídeos (GROSS *et al.*, 2001). Os mRNAs de diversas lectinas tipo C têm sido encontrados especificamente no hepatopâncreas. PmAV, uma proteína antiviral (LUO *et al.*, 2003; LUO *et al.*, 2007), e as lectinas PmLT (MA *et al.*, 2008), LvLT (MA *et al.*, 2007), LvCTL1 (ZHAO *et al.*, 2009), Fc-Lec2 (ZHANG *et al.*, 2009b), Fc-Lec3 (WANG *et al.*, 2009a) e Fc-hsL (SUN *et al.*, 2008b) são proteínas que são sintetizadas no hepatopâncreas, enquanto Fc-Lec4 tem sido expressa no hepatopâncreas, brânquias, estômago e intestino (WANG *et al.*, 2009b). Os mRNAs de PmLec (LUO *et al.*, 2006), LvLec (ZHANG *et al.*, 2009a), Fclectin (LIU *et al.*, 2007) são transcritos nos hemócitos. No presente estudo, o RNA total extraído do hepatopâncreas foi utilizado para a clonagem molecular de novos genes de lectinas tipo C de *L. vannamei*, não tendo sido utilizados outros tecidos.

O grau de pureza da extração de RNA total foi avaliado por espectrofotometria na região do ultravioleta. A relação entre as absorbâncias de 260nm/280nm representa o grau de pureza dos ácidos nucleicos em relação às proteínas. Foi obtida uma concentração de 1,74 µg/µL de RNA total do hepatopâncreas de *L. vannamei*. A razão $A_{260/280}$ da amostra foi de 1,66, encontrando-se em conformidade com uma extração de RNA total com bom grau de pureza, que segundo o protocolo de extração de RNA usando TriZol[®], deve estar acima de 1,65.

Através do gel de agarose das amostras de RNA desnaturadas (FIGURA 8), foi possível observar a integridade do RNA total pela visualização das bandas correspondentes às subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal. Também foi possível visualizar um arrasto característico no gel de agarose, representando os mRNAs e RNAs totais de tamanhos variados.

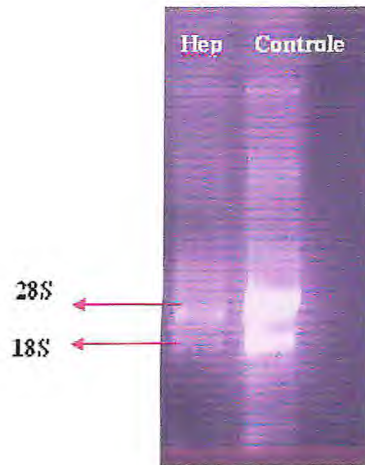


Figura 8 – Gel de eletroforese de RNA desnaturado, mostrando a integridade das bandas correspondentes às subunidades 28S e 18S, do tecido hepatopâncreas (Hep) de *L. vannamei*.

4.2. Verificação da Síntese da Primeira Fita de cDNA

Após a síntese da primeira fita de cDNA, foi feita uma separação em gel de agarose 1% para observação da distribuição de tamanhos dos cDNAs sintetizados e os cDNAs visualizados com brometo de etídio, de acordo com a eletroforese apresentada na FIGURA 9. A distribuição do tamanho dos produtos da síntese da primeira fita de cDNA variou entre 300 a 6000 pb.

4.3. Gradiente de Temperatura

O resultado da PCR, utilizando um gradiente de temperaturas de pareamento (45 a 65,2°C), mostrou uma amplificação de um fragmento de 1050 pb em todas as temperaturas testadas (FIGURA 10). Após a análise do gradiente de temperaturas, decidiu-se pelo uso da temperatura de pareamento de 48°C.

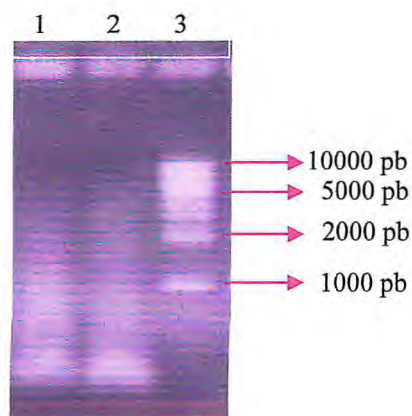


Figura 9 – Análise da síntese da primeira fita de cDNA por eletroforese em gel de agarose 1%. 1 – Amostra dos produtos da síntese da primeira fita de cDNA (6% do total sintetizado), 2 – Amostra dos produtos da síntese da primeira fita de cDNA (10% do total sintetizado) e 3 – Marcadores de peso molecular (1 kb DNA ladder).

A 45,0 45,3 46,4 48,0 50,4 53,0 55,8 58,5 61,0 63,1 64,7 65,6 (°C)

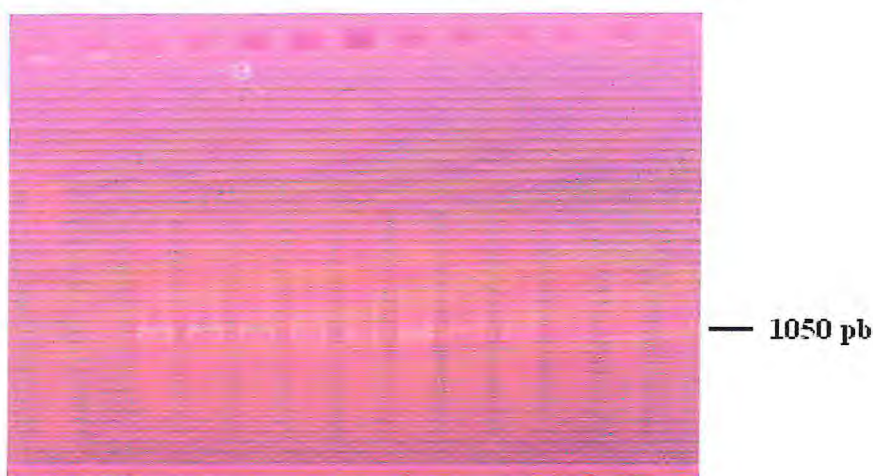


Figura 10 – Gradiente de temperaturas de pareamento para o produto amplificado com 1050 pb. As temperaturas testadas variaram entre 45° e 65,6°C. A – Marcadores de peso molecular (1 kb DNA ladder).

4.4. Análise do Produto de PCR Purificado

Após a seleção de colônias positivas e da extração do gene de interesse dos plasmídeos dos clones positivos, foi observado na eletroforese em gel de

agarose 1% que tanto os clones obtidos das colônias quanto os obtidos dos plasmídeos apresentaram, aproximadamente, 1050 pb, indicando um processo de clonagem eficiente. Os clones positivos, denominados 3CN, 3cFXa e 3pFXa (tanto para colônias como para plasmídeos), foram utilizados para seqüenciamento (FIGURA 11).

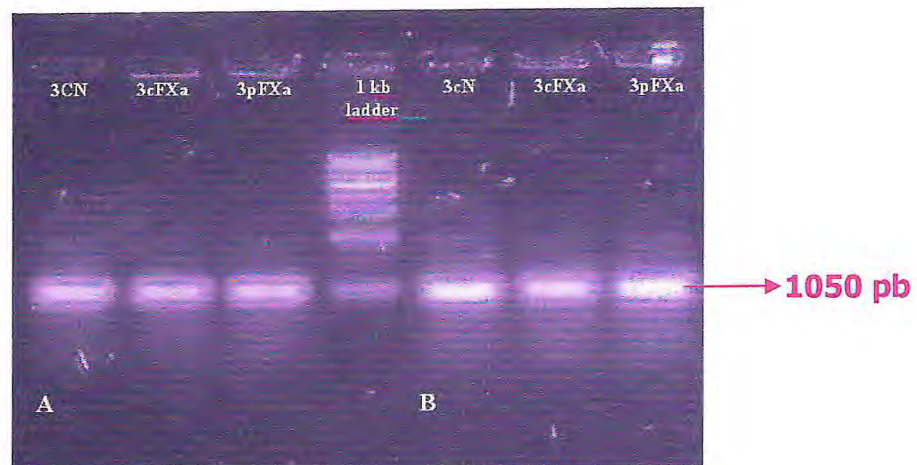


Figura 11 – Visualização dos clones 3CN, 3cFXa e 3pFXa com 1050 pb por eletroforese em gel de agarose a 1%. (A) Produtos de amplificação a partir de colônias positivas (clones representativos) e (B) produtos de amplificação a partir de plasmídeos para seqüenciamento. 1 kb DNA ladder representa os marcadores de peso molecular.

De acordo com MA *et al.* (2007), o cDNA de LvLT de *L. vannamei* possui 1035 pb, codificando uma proteína com 345 aminoácidos e dois domínios de reconhecimento de carboidratos (CRDs), enquanto que os cDNAs de LvLec e LvCTL1, também presentes em *L. vannamei*, possuem 618 e 638 pb, codificando proteínas com um único CRD e com 157 e 156 aminoácidos, respectivamente (ZHANG *et al.*, 2009a; ZHAO *et al.*, 2009). PmLT possui um cDNA com 1249 pb, codificando uma proteína com 333 aminoácidos com dois CRDs (MA *et al.*, 2008), enquanto os cDNAs de PmAV e PmLec têm 510 e 546 pb e codificam proteínas com um único CRD e que possuem 170 e 182 aminoácidos, respectivamente (LUO *et al.*, 2003; LUO *et al.*, 2006). Os cDNAs de FcLectin e Fc-Lec2 têm 1482 e 1219 pb, codificando proteínas com dois CRDs e que possuem 287 e 333 aminoácidos, respectivamente (LIU *et al.*,

2006; ZHANG *et al.*, 2009b). Os cDNAs de Fc-Lec3, Fc-Lec4 e Fc-hsL possuem 739, 1053, 571 pb, codificando proteínas com um único CRD e que possuem 158, 237 e 159 aminoácidos, respectivamente (WANG *et al.*, 2009a; WANG *et al.*, 2009b; SUN *et al.*, 2008b).

4.5. Análise das Seqüências Obtidas

Lectinas tipo C ocorrem em invertebrados e possuem CRDs que são mediadores da ligação a açúcares e desempenham uma função importante no reconhecimento de oligossacarídeos presentes na superfície de patógenos (SÖDERHÄLL & CERENIUS, 1998; ZELENSKY & GREARY, 2005).

A análise das seqüências obtidas dos principais clones gerou uma série de seqüências de nucleotídeos que incluem dois grandes quadros abertos (ORFs). A dedução das seqüências de aminoácidos revelou que ambos os precursores dos cDNAs das lectinas tipo C codificam duas proteínas altamente similares, com 347 resíduos de aminoácidos. Os clones 3cFXa e 3pFXa apresentaram-se idênticos, codificando uma lectina tipo C nomeada de LvCTL-br1, enquanto o clone 3CN codifica uma lectina tipo C nomeada de LvCTL-br2.

As duas lectinas, LvCTL-br1 e LvCTL-br2, diferem somente em cinco resíduos de aminoácidos nas posições 29, 91, 109, 150 e 330 onde as seguintes substituições foram observadas: Leu²⁹ → Ser²⁹, Ala⁹¹ → Thr⁹¹, Gly¹⁰⁹ → Asp¹⁰⁹, Ala¹⁵⁰ → Thr¹⁵⁰, Leu³³⁰ → Phe³³⁰, causando como conseqüência as transições dos tipos timina → citosina para os resíduos de aminoácidos 29, 109 e 330, e guanina → adenosina para os resíduos de aminoácidos 91 e 150 (FIGURA 12). Os valores de massa molecular estimada e de pI foram 38,4 kDa e 4,93 para LvCTL-br1, e 38,5 kDa e 4,87 para LvCTL-br2, semelhante aos valores encontrados para uma outra lectina tipo C de *L. vannamei* (LvLT, GenBank DQ871245) que foram 37,2 kDa e 4,55 (MA *et al.*, 2007).

A comparação direta de LvCTL-br1 e LvCTL-br2 com LvLT apresentou uma similaridade de 81 e 80%, respectivamente, baseada na seqüência de aminoácidos. Semelhante à LvLT, os precursores das lectinas de LvCTL-br1 e LvCTL-br2 incluem

um peptídeo sinal (resíduos de 1 a 20), dois CRDs (CRD-1 e CRD-2) dispostos *in tandem*, quatro seqüências internas repetitivas (–EGVWV– e –GEA/VVPLGTPFW–, no CRD-1, e –EGTWV– e –GEPVPMGTPFW–, no CRD-2), e o mesmo número de resíduos de cisteína e suas posições conservadas (FIGURA 12). De acordo com MA *et al.* (2007), os CRDs 1 e 2 de LvLT estão localizados entre os resíduos de aminoácidos 48 a 180 e 207 a 342, respectivamente, semelhante ao verificado no presente estudo.

```

LvCTL-br2  MMSYLPLIFTFCALFAGKVEGRVTWNRTKSESFQAEVATTTSTPTEQDCPGGYSLVGDKCL 60
LvCTL-br1  MMSYLPLIFTFCALFAGKVEGRVTWNRTKSESFQAEVATTTSTPTEQDCPGGYSLVGDKCL 60
LvLT       MMSYLPLIFTFCALFAGKVEGRVTWNRTKSESFQPGVATTTSTPPEQDCPGGYSLVGDKCL 60
          *****.*****.*****.*****

LvCTL-br2  LFVTFVAEPYGEARQFCHAAKAELAAITTAADFKNLVDYIHGSDFSGADFVLDGSDEAEE 120
LvCTL-br1  LFVTFVAEPYGEARQFCHAAKAELAAITTAADFKNLVDYIHGSDFSGADFVLDGSDEAEE 120
LvLT       LFVTFVAEPYGEARQFCHAAKGELAAITTAADFKNLVDYIHANGLSGTSFVLDGSDEAEE 120
          *****.*****:**** :****...:*. ***** *

LvCTL-br2  GVWVTSSGEAVPLGTPFWAAFGRGQQPDNTHGNEHCLFIPSWWFFYMADNPCSVVKNFIC 180
LvCTL-br1  GVWVTSSGEAVPLGTPFWAAFGRGQQPDNAHGNEHCLFIPSWWFFYMADNPCSVVKNFIC 180
LvLT       GVWVTSSGEVPLGTPFWAAFNGQQPDNAHENEHYLCLSSSWFLYMNDASSAIINFIC 180
          *****.*****.*****:* *** * :.* **:* * ..*.: ****

LvCTL-br2  EATNQMRKETASAALAPFGPSAVGGRVACPVLFIIEVGGCLMFVTWAEETWEDARRACTG 240
LvCTL-br1  EATNQMRKETASAALAPFGPSAVGGRVACPVLFIIEVGGCLMFVTWAEETWEDARRACTG 240
LvLT       EAT--IRKKTASAALAPFGPSAVGGRVSCPVLFIIEVGGCLMFVTWAEETWEDARRACAG 238
          *** :*:*****:*****:*****:*****:*****:

LvCTL-br2  ASAELLAITDVEVFRALYLYIHQDNLSSSHAFWLGGSDLTSEGTWVYTTGEPVPMGTPFWG 300
LvCTL-br1  ASAELLAITDVEVFRALYLYIHQDNLSSSHAFWLGGSDLTSEGTWVYTTGEPVPMGTPFWG 300
LvLT       ASAELLAITDVEVFRALYLYIHQDNLSSSHAFWLGGTDLASEGTWVYTTGEPVPMGTPFWG 298
          *****:*.*****:*****

LvCTL-br2  ISNCRCSYPGTRWRNRSELPCDHWRRYFNLRDYSKASKFNPLCVYTG 347
LvCTL-br1  ISNCRCSYPGTRWRNRSELPCDHWRRYFNLRDYSKASKFNPLCVYTG 347
LvLT       LYAGSASAQEPDGGTNQNCLAITGEGYFNLRDYSKASKFNPLCVYTG 345
          : .* . ...: . . ***:*****

```

Figura 12 – Comparação das seqüências deduzidas de aminoácidos das lectinas LvCTL-br1 e LvCTL-br2 de *L. vannamei* em relação a lectina LvLT de *L. vannamei* depositada no GenBank (acesso DQ871245).

Um contraste relevante entre as lectinas LvCTL-br1, LvCTL-br2 e LvLT está relacionado com o segundo CRD. Os resíduos de aminoácidos presentes no primeiro CRD, determinados como um domínio QPD (–GlnProAsp–), são capazes de se ligar a galactose e são conservados nas três seqüências, mas o domínio EPD (–

GlnProAsp-) presente no CRD-2 em LvLT, que é específico para manose, foi substituído em LvCTL-br1 e LvCTL-br2 pelo tripeptídeo GTR (-GlyThrArg-).

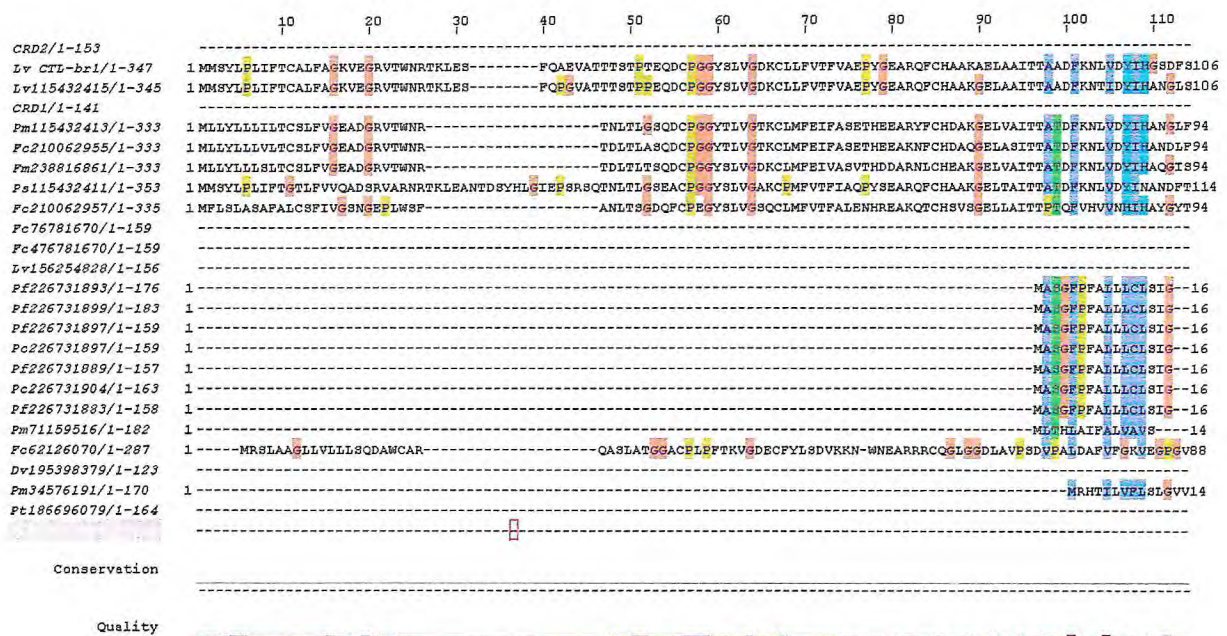
PmLT e Fc-Lec2 possuem os domínios QPD para CRD-1 e EPN (mudando somente o terceiro aminoácido de Asp³¹⁰ → Asn³¹⁰) para CRD-2 conservados de forma idêntica a LvLT (MA *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009b). Por outro lado, FcLectin possui, tanto para o CRD-1 como para o CRD-2, o mesmo domínio QPD (LIU *et al.*, 2006). No caso de lectinas tipo C com um único CRD, verificou-se o sítio de ligação a carboidratos ocorrendo como QPD para PmLec (LUO *et al.*, 2006) e Fc-Lec4 (WANG *et al.*, 2009b), EPN para LvLec (ZHANG *et al.*, 2009a), LvCTL1 (ZHAO *et al.*, 2009) e Fc-hsL (SUN *et al.*, 2008b), e EPS para Fc-Lec3 (WANG *et al.*, 2009a).

Lectinas são proteínas modulares que podem se complexar entre si, podendo apresentar uma atividade biológica distinta para membros de uma determinada família (DOOD & DRICKAMER, 2001). Portanto, pode-se esperar que a mutação verificada para os sítios de ligação a manose nos CRDs-2 de LvCTL-br1 e LvCTL-br1, possa corresponder ao estabelecimento de uma lectina tipo C, onde o CRD-1 para galactose foi preservado e o segundo sofreu mutação para exercer uma determinada atividade biológica.

4.6. Alinhamento Múltiplo e Análise Filogenética

Lectinas tipo C de várias espécies de camarões peneídeos apresentam um único CRD ou dois CRDs dispostos *in tandem*. A comparação das seqüências de aminoácidos de lectinas tipo C homólogas tanto clonadas como purificadas por métodos clássicos de bioquímica de *F. chinensis*, *F. merguensis*, *L. vannemei*, *Penaeus monodon*, *P. semisulcatus*, demonstra que as seqüências de aminoácidos de lectinas tipo C com um único CRD alinham com o CRD-2 de lectinas tipo C com dois CRDs (FIGURA 13). Para uma comparação efetiva do grau de conservação ou diversidade destas lectinas tipo C, o CRD-1 e o CRD-2 de LvCTL-br1 foram divididos e usados em alinhamento múltiplo. Pode-se verificar que CRD-1 e CRD-2 de lectinas tipo C com dois domínios *in tandem*, e lectinas tipo C com um único CRD têm resíduos de aminoácidos invariáveis quando se faz um alinhamento por sobreposição, com ênfase nos resíduos de cisteína conservados que formam pontes dissulfeto.

Outra constante estrutural característica destas seqüências são os tripeptídeos que compõem os sítios de ligação para carboidratos, como QPD/N e EPN/D. As seqüências de aminoácidos de lectinas tipo C com um único CRD alinham com o segundo CRD das lectinas tipo C com dois CRDs, não havendo obrigatoriedade na conservação do domínio QPD, que é característico do CRD-1 em lectinas tipo C com dois CRDs. O tripeptídeo EPD/N está presente, principalmente, no CRD-2 de lectinas tipo C com dois CRDs, sendo que esse domínio pode ocorrer em lectinas tipo C de um único domínio. No CRD-2 de LvCTL-br1 e LvCTL-br2, esse sítio de ligação a carboidratos é substituído pelo domínio GTR. De fato, existe uma seqüência consensual entre os membros das lectinas tipo C de camarões peneídeos, com características estruturais conservadas, o que pode ser demonstrado pela alta similariedade entre LvLT, LvCTL-br1 e LvCTL-br2, com valores acima de 80%. Entretanto, resíduos de aminoácidos importantes que integram o sítio de ligação a carboidratos foram substituídos por resíduos de aminoácidos não semelhantes no CRDs-2 de LvCTL-br1 e LvCTL-br2.



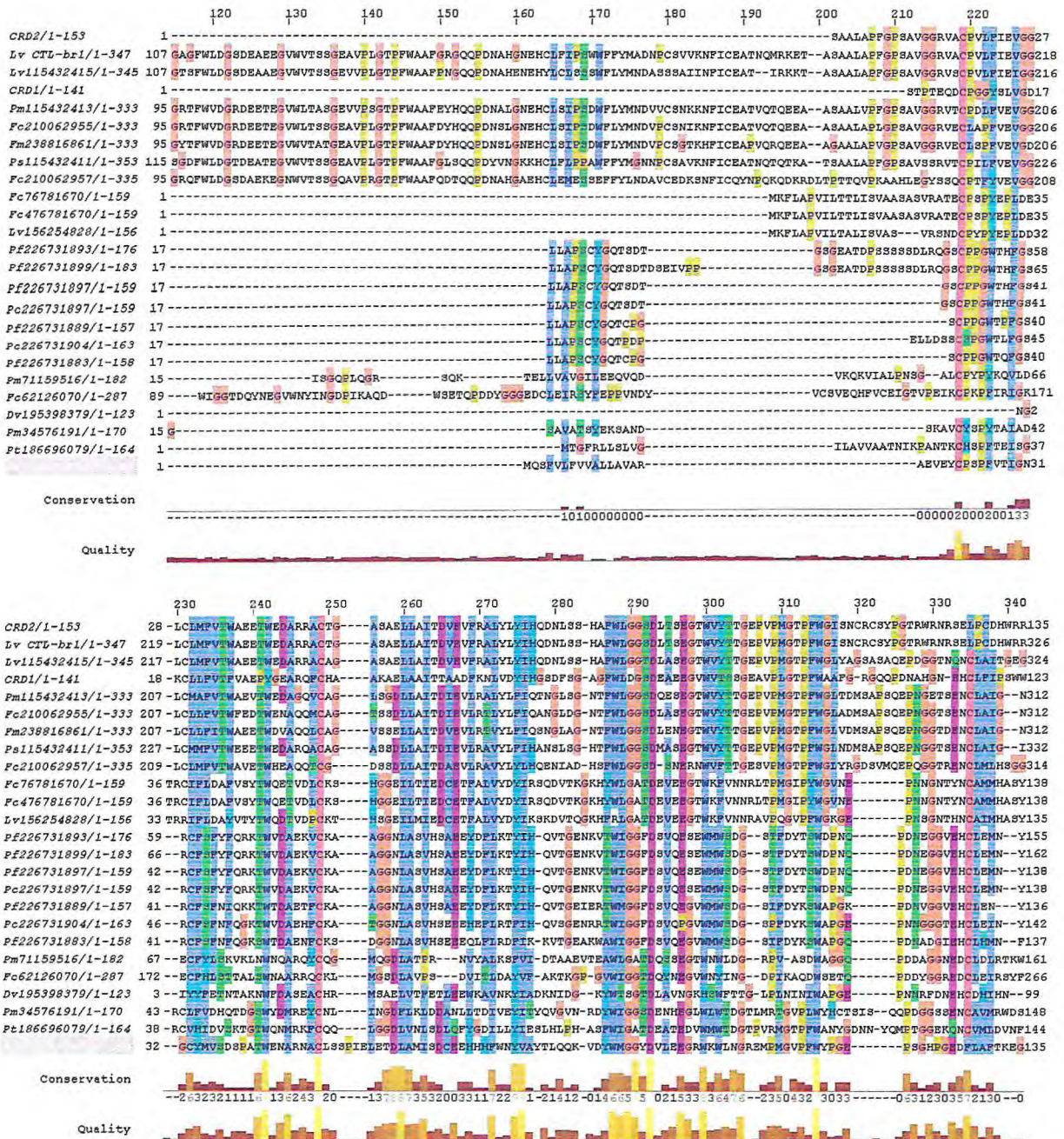


Figura 13 – Alinhamento múltiplo da lectina tipo C LvCTL-br1 de *L. vannamei*, dos domínios CRD-1 (LvCTL-br1) and CRD-2 (LvCTL-br1) com as lectinas ou lectinas-like de *L. vannamei* (LvLT, Genbank N.º DQ871245; LvLec, Genbank N.º EF583939), *P. monodon* (PmLT, Genbank N.º DQ871244; PmAV, Genbank N.º AY302750; PmLec, Genbank N.º DQ078266), *P. semisulcatus* (PsLT, Genbank N.º DQ871243), *F. chinensis* (Fc-Lec2, Genbank N.º EU834289, Fc-Lec4, Genbank N.º EU834290, Fc-hsL, Genbank N.º DQ167572, Fclectin, Genbank N.º AY871270), *F. merguensis* (Fm-L, N.º FJ751773), *Perca flavescens* (CTL-1, Genbank N.º FJ826550, CTL-2, Genbank N.º FJ826553, CTL-3, Genbank N.º FJ826552, CTL-4, Genbank N.º FJ826548, CTL-5, Genbank N.º FJ826545, CTL-6, Genbank N.º FJ826555), *Drosophila virilis* (GJ18331, Genbank N.º XM_002057763) e *Portunus trituberculatus* (PtLP, Genbank N.º EU477491).

Essa alteração crítica e o fato que lectinas tipo C com um único CRD e com um domínio QPD alinham com o CRD-2 de lectinas tipo C de camarões peneídeos com dois CRDs podem sugerir que uma parte da molécula está sob pressão evolutiva, enquanto outra parte está apta a evoluir. Além disso, esse fato, também, sugere que genes de lectinas tipo C em camarões peneídeos foram duplicados uma vez e as seqüências correspondentes a um destes dois domínios possuem uma maior flexibilidade para evoluir, como é o caso das lectinas homólogas LvCTL-br1 e LvCTL-br2. Um fenômeno correspondente do Darvianismo positivo ou evolução acelerada é conhecido por ocorrer em genes que expressam toxinas em animais, como as famílias das fosfolipase A₂ e lectinas tipo C em venenos de cobra (OHNO *et al.*, 2003; OGAWA *et al.*, 2005).

Para se estudar as relações evolucionárias entre LvCTL-br1 e seus CRDs de forma isolada, uma árvore filogenética foi gerada e os resultados indicam um cluster para as lectinas tipo C de camarões peneídeos diferenciado de outros clusters gerados para caranguejos, insetos e peixes (FIGURA 14). O CRD-1 de LvCTL-br1 apresenta-se, do ponto de vista evolutivo, mais conservado, enquanto o CRD-2 apresenta mutações recentes.

4.7. Modelagem Molecular

Até o presente momento, nenhum modelo tridimensional para uma lectina tipo C ocorrendo em camarões peneídeos foi estabelecido. A determinação correta da estrutura tridimensional de uma lectina tipo C, incluindo os sítios de ligação a carboidratos é importante para a realização de estudos relacionados ao mecanismo de reconhecimento e interação com carboidratos presentes em patógenos (HATAKEYAMA *et al.*, 2006).

A primeira etapa na modelagem comparativa é a identificação de estruturas tridimensionais resolvidas, que possam atuar como uma base estrutural para a modelagem da seqüência-alvo (proteína-alvo). Esta identificação pode ser realizada levando-se em consideração vários aspectos, como: conhecimento estrutural, similaridade de função, expressão pelo mesmo grupo de genes, similaridade seqüencial ou até correlação evolutiva (DEANE & BLUNDELL, 2003).

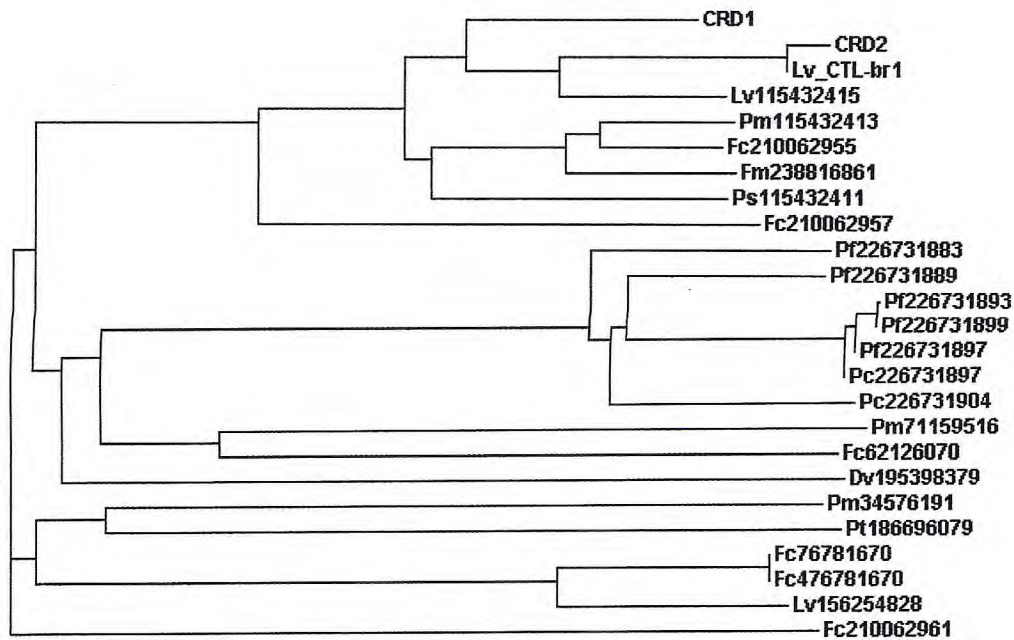


FIGURA 14 – Análise filogenética da lectina tipo C LvCTL-br1 de *L. vannamei*, dos domínios CRD-1 (LvCTL-br1) e CRD-2 (LvCTL-br1) com as lectinas ou lectinas-like de *L. vannamei* (LvLT, Genbank N.º DQ871245; LvLec, Genbank N.º EF583939), *P. monodon* (PmLT, Genbank N.º DQ871244; PmAV, Genbank N.º AY302750; PmLec, Genbank N.º DQ078266), *P. semisulcatus* (PsLT, Genbank N.º DQ871243), *F. chinensis* (Fc-Lec2, Genbank N.º EU834289, Fc-Lec4, Genbank N.º EU834290, Fc-hsL, Genbank N.º DQ167572, Fclectin, Genbank N.º AY871270), *F. merguensis* (Fm-L, N.º FJ751773), *Perca flavescens* (CTL-1, Genbank N.º FJ826550, CTL-2, Genbank N.º FJ826553, CTL-3, Genbank N.º FJ826552, CTL-4, Genbank N.º FJ826548, CTL-5, Genbank N.º FJ826545, CTL-6, Genbank N.º FJ826555), *Drosophila virilis* (GJ18331, Genbank N.º XM_002057763) e *Portunus trituberculatus* (PtLP, Genbank N.º EU477491). A árvore filogenética foi construída usando o método de neighbor-joining, baseado no alinhamento das seqüências de aminoácidos (Clustal W) de lectinas tipo C de camarões peneídeos.

A modelagem molecular por homologia estrutural foi realizada para as lectinas tipo C LvCTL-br1 e LvCTL-br2, no sentido de se identificar a atuação dos diferentes resíduos de aminoácidos nas estruturas tridimensionais. Possíveis diferenças estruturais em uma determinada família de lectinas tipo C podem resultar em uma ampla faixa de funções biológicas (DRICKAMER, 1999).

Os modelos revelam CRDs, típicos de lectinas tipo C, constituídos de cadeias em α -hélice interlaçadas por *loops* e uma única folha beta pregueada. Uma similaridade de 32% entre o CRD-1 de LvCTL-br1 (resíduos de aminoácidos entre

37 e 195) e uma lectina tipo C do sistema imune humano (DC-SIGNR) esclarecida por difração de raio X com uma resolução de 1,41 Å (código PDB: 1xph), possibilitou a obtenção de um modelo tridimensional com o açúcar $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ modelado no sítio ativo com um bom padrão de coerência. Na FIGURA 15, se destaca no CRD-1 de LvCTL-br1 os aminoácidos Ala⁹¹, Gly¹⁰⁹, Ala¹⁵⁰. Os resíduos de aminoácidos presentes no CRD-1, indicando o domínio QPD (–GlnProAsp–), encontram-se representados na FIGURA 16.

A sobreposição dos modelos tridimensionais de LvCTL-br1 e LvCTL-br2, ambos com o açúcar $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ modelado no sítio ativo revelou que dois dos três resíduos diferentes no CRD-1 são importantes na ativação do sítio. A substituição de Gly¹⁰⁹ → Asp¹⁰⁹ e de Ala¹⁵⁰ → Thr¹⁵⁰ possibilitam a formação de pontes de hidrogênio no CRD-1 de LvCTL-br2 (FIGURAS 17 e 18). Isso ocorre pelo fato da asparagina (Asp¹⁰⁹) possuir cadeia lateral, enquanto a glicina (Gly¹⁰⁹) não possui, não formando ponte de hidrogênio, mesmo estando a 3,5 Å de distância do açúcar $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ usado para os estudos de modelagem tridimensional. Pode-se especular, também, que Thr¹⁵⁰ pode formar pontes de hidrogênio com açúcares de maior porte ou mais complexos que $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$, como oligossacarídeos presentes na parede celular de microorganismos patogênicos.

O modelo estrutural para o CRD-2 de LvCTL-br1 (resíduos de aminoácidos 198 a 347) foi baseado na proteína DC-SIGNR interagindo com o açúcar $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$, esclarecido por difração de raio X com uma resolução de 1,9 Å (código PDB: 1k9J). Os resíduos de aminoácidos presentes no CRD-2, determinando o domínio GTR (–GlyThrArg–), encontram-se representados na FIGURA 19. Nesse caso, açúcar $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ não foi utilizado para a modelagem do sítio ativo do CRD-2 de LvCTL-br1.

A sobreposição dos modelos tridimensionais de CRD-1 e CRD-2 de LvCTL-br1 revelou um *loop* extenso (destacado com coloração verde) presente no CRD-2 (FIGURA 20), sugerindo uma possível dificuldade em se cristalizar o domínio CRD-2 desta proteína. De um modo geral, os CRD-1 e CRD-2 de LvCTL-br1 apresentam-se, tridimensionalmente, como modelos semelhantes, corroborando com as informações observadas quando as seqüências desses dois domínios foram sobrepostas (FIGURA 13).

De forma interessante, o acoplamento de GlcNAc₂Man₃ no sítio de ligação de CRD-1 de LvCTL-br1 indica que devido à presença de Gly109, que não possui cadeia lateral, a formação de uma ponte de hidrogênio adicional com o açúcar GlcNAc₂Man₃ não é possível (FIGURAS 21 e 22), diferente do observado para o CRD-1 de LvCTL-br2 (FIGURA 18). Esta mesma acomodação espacial de GlcNAc₂Man₃ no sítio de ligação de CRD-2 de LvCTL-br1 é observada, e da mesma forma, uma ligação extra não é formada (ver comparativo entre FIGURAS 15 e 18). Ainda que a interação de açúcares ocorra, principalmente, devido às forças de Van der Waals, entre os grupos hidroxila de carboidratos e os resíduos de aminoácidos presentes no sítio de ligação (WEIS & DRICKAMER, 1996), a ponte de hidrogênio extra na vizinhança da tríade sugere uma afinidade maior desse sítio pela molécula de açúcar. Os modelos tridimensionais gerados para os CRDs-2 de LvCTL-br1 e LvCTL-br2 indicam modelos semelhantes, mas o CRD-2 de LvCTL-br1 revelou um *loop* extenso (destacado com coloração vermelha) diferente do CRD-2 de LvCTL-br2 (FIGURA 23).

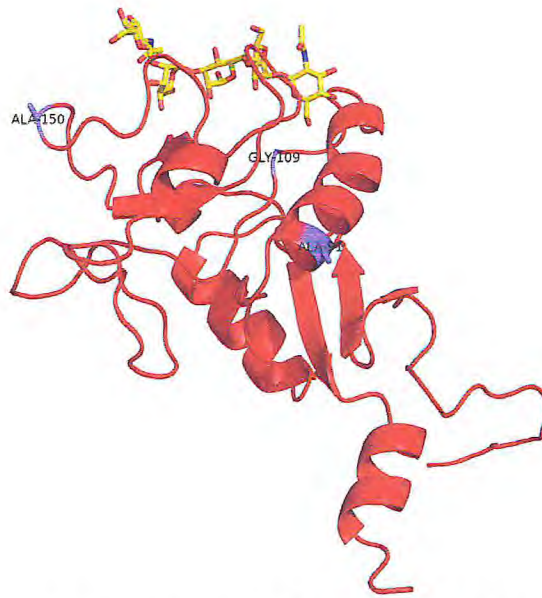


FIGURA 15 – Estrutura tridimensional do CRD-1 de LvCTL-br1 (resíduos de aminoácidos entre 37 e 195) com o açúcar $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ modelado no sítio ativo, com ênfase para as cadeias em α -hélice interlaçadas por *loops* e uma única folha beta pregueada. A estrutura tridimensional foi calculada usando o programa YASARA.

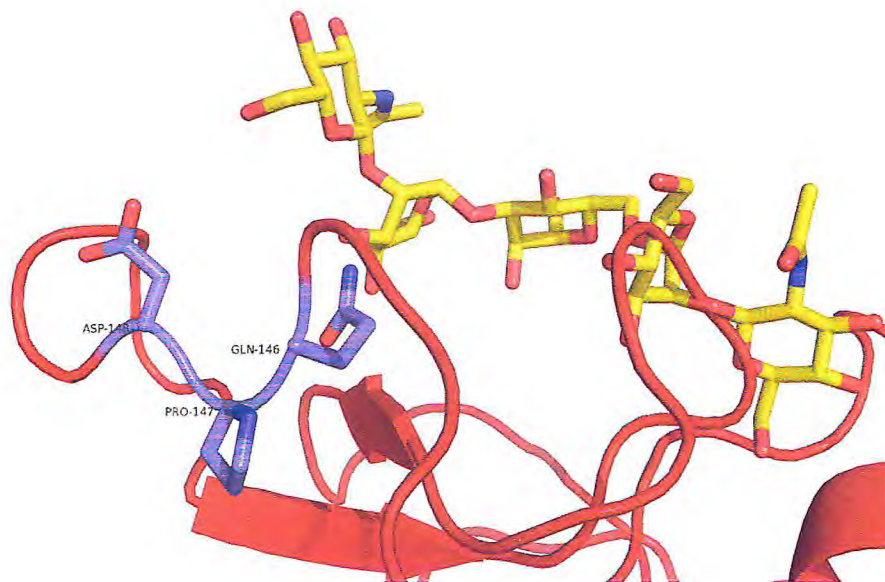


FIGURA 16 – Estrutura tridimensional de parte do CRD-1 de LvCTL-br1 com o açúcar $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ modelado no sítio ativo, com ênfase no domínio QPD (–GlnProAsp–). A estrutura tridimensional foi calculada usando o programa YASARA.

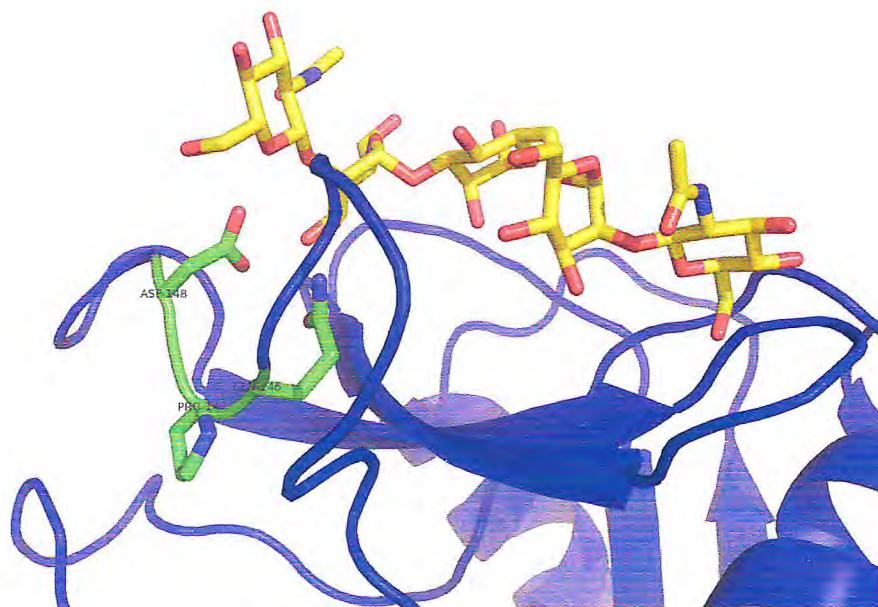


FIGURA 17 – Estrutura tridimensional de parte do CRD-1 de LvCTL-br2 (resíduos de aminoácidos entre 37 e 195), com ênfase para as cadeias em α -hélice interlaçadas por *loops* e uma única folha beta pregueada. A estrutura tridimensional foi calculada usando o programa YASARA.

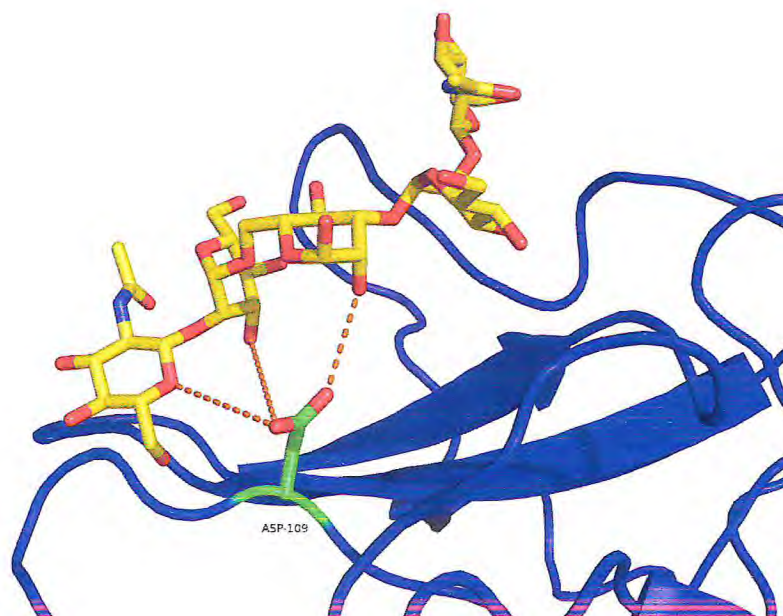


FIGURA 18 – Estrutura tridimensional de parte do CRD-1 de LvCTL-br2 com o açúcar $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ modelado no sítio ativo, com ênfase nas pontes de hidrogênio formadas entre o aminoácido ASP-109 e o açúcar $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$. A estrutura tridimensional foi calculada usando o programa YASARA.

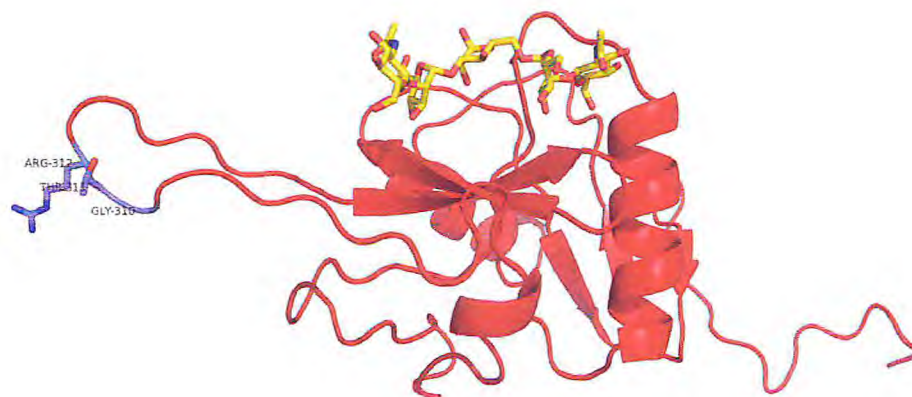


FIGURA 19 – Estrutura tridimensional de parte do CRD-2 de LvCTL-br1 com o açúcar $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ modelado no sítio ativo, com ênfase no domínio GTR (–GlyThrArg–). A estrutura tridimensional foi calculada usando o programa YASARA.



FIGURA 20 – Sobreposição dos modelos tridimensionais de CRD-1 e CRD-2 de LvCTL-br1. A estrutura tridimensional foi calculada usando o programa YASARA.

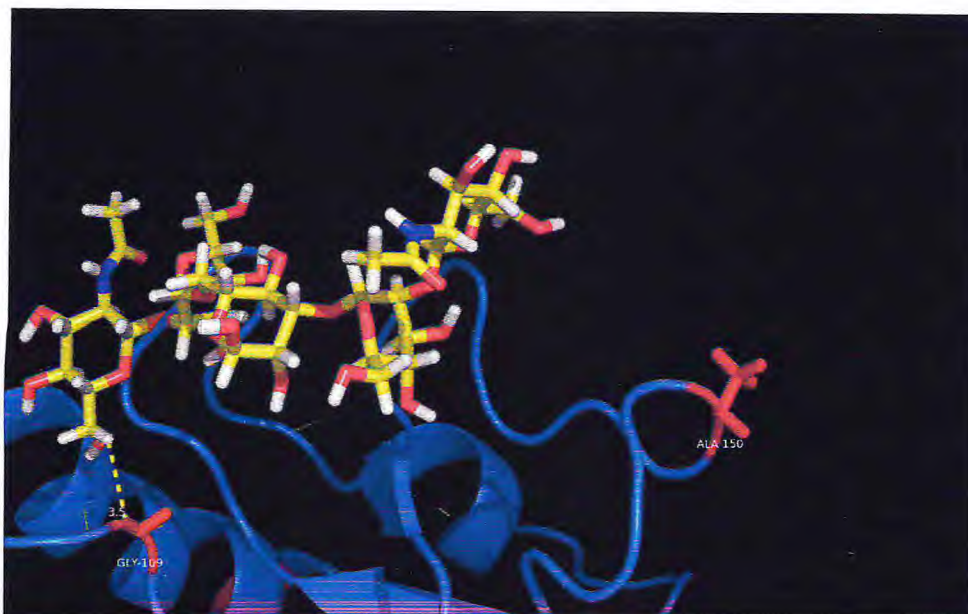


FIGURA 21 – Estrutura tridimensional de parte do CRD-1 de LvCTL-br1 com o açúcar $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ modelado no sítio ativo, com ênfase nos aminoácidos GLY109 e ALA150, dificultando a formação de pontes de hidrogênio com o açúcar $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$. A estrutura tridimensional foi calculada usando o programa YASARA.

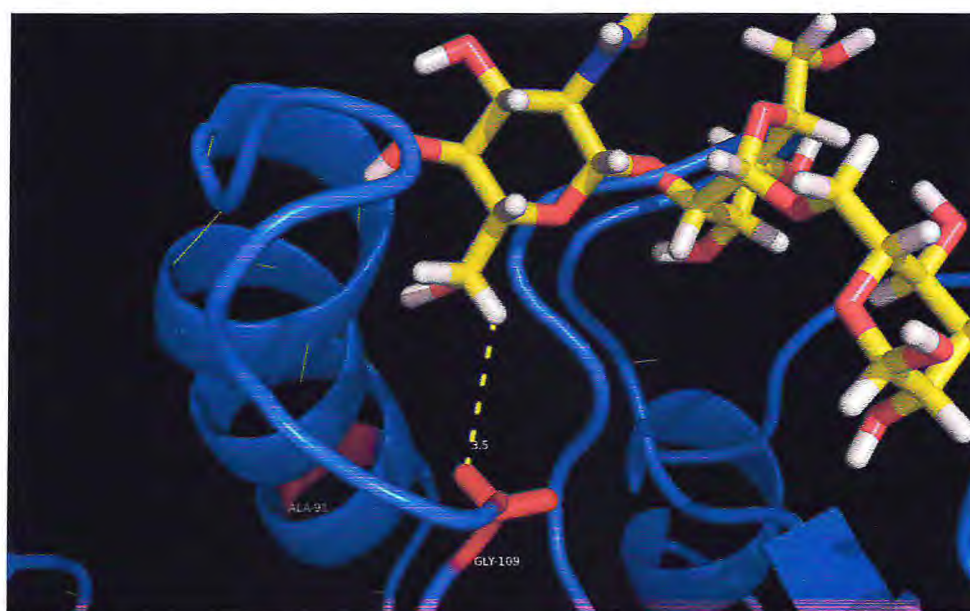


FIGURA 22 – Estrutura tridimensional de parte do CRD-1 de LvCTL-br1 com o açúcar $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ modelado no sítio ativo, com ênfase nos aminoácidos ALA91 e GLY109, dificultando a formação de pontes de hidrogênio com o açúcar $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$. A estrutura tridimensional foi calculada usando o programa YASARA.

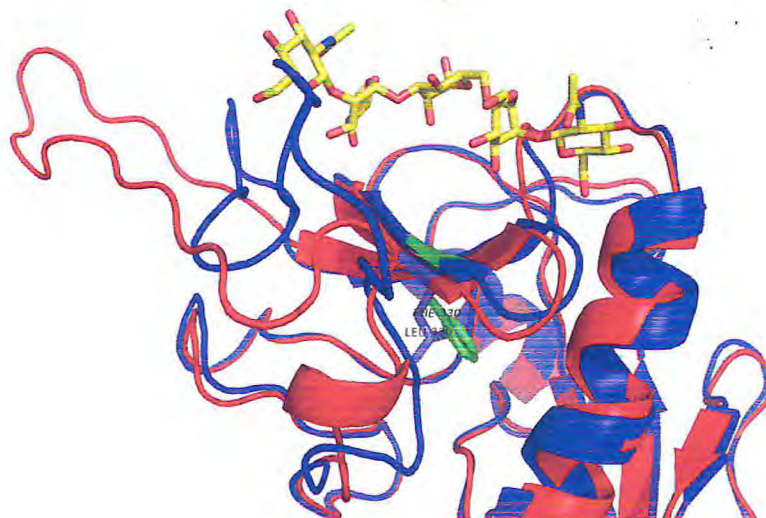


FIGURA 23 – Sobreposição de parte dos modelos tridimensionais dos CRDs-2 das isoformas LvCTL-br1 e LvCTL-br2. A estrutura tridimensional foi calculada usando o programa YASARA.

5. CONCLUSÕES

Estas são as primeiras lectinas tipo C clonadas a partir de camarões peneídeos onde os CRDs-2 apresentam um domínio GTR (-GlyThrArg-), diferente do domínio EPD/N, presente no CRD-2 de outras lectinas tipo C de camarões peneídeos, que é específico para manose. Somente, então, através da produção das lectinas recombinantes LvCTL-br1 e LvCTL-br2 poder-se-á determinar se este sítio, também, apresenta especificidade para o açúcar manose.

As lectinas LvCTL-br1 (depositada no Genbank com o seguinte N.º de acesso GU206551) e LvCTL-br2 (depositada no Genbank com o seguinte N.º de acesso GU206552) são, até o presente momento, as duas únicas lectinas tipo C de camarões peneídeos que tiveram sua estrutura tridimensional parcialmente resolvida.

6. LITERATURA CITADA

ABCC, 2004. Defesa da ABCC no processo antidumping. **Revista da Associação Brasileira dos Criadores de Camarão – ABCC**, 4: 28–30.

ABCC, 2005. **Programa de Quarentena para a Importação de Reprodutores de *Litopeneus vannamei***. Associação Brasileira dos Criadores de Camarão, Pernambuco, Brasil, 31 pp.

ALABI, A.O., JONES, D.A., LATCHFORD, J.W., 1999. The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of *Penaeus indicus* larvae against *Vibrio harveyi*. **Aquaculture**, 178: 1–11.

ALLENDORF, F.W., RYMAN, N., 1987. Genetic management of hatchery stocks. In: **Population Genetics and Fishery Management**. In: RYMAN, N., UTTER, F. (Eds.). Seattle: University of Washington Press, pp. 141–159.

ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAEFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, 25: 3389–3402.

ANDRADE, T.P.D., SRISUVAN, T., TANG, K.F.J., LIGHTNER, D.V., 2007. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of Infectious myonecrosis virus (IMNV). **Aquaculture**, 264: 9–15.

ARANA, L.V., 1999. **Aqüicultura e Desenvolvimento Sustentável: Subsídios para a Formulação de Políticas de Desenvolvimento da Aqüicultura Brasileira**. Editora da UFSC, 1.^a Edição, Florianópolis, SC.

ARGUE, B.J., ARCE, S.M., LOTZ, J.M., MOSS, S.M., 2002. Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. **Aquaculture**, 204: 447–460.

ASPÁN, A., HUANG, T., CERENIUS, L., SÖDERHÄLL, K., 1995. cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 92: 939–943.

ASTROFSKY, K.M., ROUX, M.M., KLIMPEL, K.R., FOX, J.G., DHAR, A.K., 2002. Isolation of differentially expressed genes from white spot virus (WSV) infected Pacific blue shrimp (*Penaeus stylirostris*). **Arch. Virol.**, 147: 1799–1812.

AUSUBEL, F.M., BRENTÉ, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K., 1995. **Currents Protocols in Molecular Biology**, John Wiley and Sons, Inc., New York.

BACHÈRE, E., 2000. Shrimp immunity and disease control. **Aquaculture**, 191: 3–11.

BACHÈRE, E., GUEGUEN, Y., GONZALEZ, M., de LORGERIL, J., GARNIER, J., ROMESTAND, B., 2004. Insights into the antimicrobial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunol. Rev.**, 198: 149–168.

BALDWIN, J.D., BASS, A.L., BOWEN, B.W., CLARK, W.H., 1998. Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*. **Mol. Phylogenet. Evol.**, 10: 399–407.

BARBIERI-JÚNIOR, R.C., OSTRENSKY-NETO, A., 2001. **Camarões Marinhos – Reprodução, Maturação e Larvicultura**. Editora Aprenda Fácil, Viçosa, 243 pp.

BARRACO, M.A., 2004. Mecanismos de resistência a doenças em crustáceos. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T., TAKEMOTO, R.M., LIZAMA, M.A.P. (Eds), **Sanidade de Organismos Aquáticos**, Editora Varela, São Paulo, pp. 51–74.

BAYNE, C.J., 1990. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. **Bioscience**, 40: 723–731.

BENTSEN, H.B., OLESEN, I., 2002. Designing aquaculture mass selection programs to avoid high inbreeding rates. **Aquaculture**, 204: 349–359.

BERGER, C., 2000. Aportes de la biotecnología a la alimentación y a la inmunoestimulación de camarones peneidos. **Asociación Langostina Peruana (ALPE)**, 102–110.

BIGGS, P.M., 1985. Infectious animal disease and its control. **Phil. Trans. R. Soc. London. B.**, 310: 259–274.

BISHOP, S., CHESNAIS, J., STEAR, M.J., 2002. Breeding for disease resistance: issues and opportunities. **Proc. 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**. Montpellier, Communication 13–01, pp. 597–604.

BONAMI, J.R., TRUMPER, B., MARI, J., BREHELIN, M., LIGHTNER, D.V., 1990. Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. **J. Gen. Virol.**, 71: 2657–2664.

BONAMI, J.R., HASSON, K.W., MARI, J., POULOS, B.T., LIGHTNER, D.V., 1997. Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent. **J. Gen. Virol.**, 78: 313–319.

BOWMAN, T.E., ABELE, L.G., 1982. Classification of the recent Crustacea. In: ABELE, L.G. (Ed.), **The Biology of Crustacea: Systematics, the Fossil Record and Biogeography**. Academic Press, Inc., New York, 319 pp.

BOYD, W.C., SHAPLEIGH, E., 1954. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, 119: 419–419.

BRAZ, R.F.S., SILVA, C.P.R.O., REIS, L.G., MARTINS, P.C.C., SALES, M.P., MEISSNER, R.V., 2009. Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Penaeus vannamei* cultured in northeastern Brazil. **Aquaculture**, 288: 143–146.

BRIGGS, M., FUNGE-SMITH, S., SUBASINGHE, R.P., PHILLIPS, M., 2005. **Introductions and movement of two penaeid shrimp species in Asia and the Pacific**. FAO Fisheries Technical Paper, Rome, Italy, 78 pp.

BRIGHT, S.I.S., MANJUSHA, M., SOMNATH, P.S., PHILIP, R., 2005. *Fenneropenaeus indicus* is protected from white spot disease by oral administration of inactivated white spot syndrome virus. **Dis. Aquat. Org.**, 66: 265–270.

BROCK, J.A., 1988. Idiopathic muscle necrosis. In: Sindermann, C.J., Lightner, D.V. (Eds.), **Disease Diagnosis and control in North American Marine Aquaculture**. Elsevier, Amsterdam, pp. 156–158.

BROCK, J.A., 1992. Current diagnostic methods for agents and diseases of farmed marine shrimp. In: FULKS, W., MAIN, K. (Eds.), **Proceedings of the Asian Interchange Program Workshop on the Diseases of Cultured Penaeid Shrimp**. Asian Interchange Program. The Oceanic Institute, Oahu, HI, pp. 209–231.

BROCK, J.A., LIGHTNER, D.V., 1990. Diseases of crustacea diseases caused by microorganisms. In: KINNE, O. (Ed.), **Diseases of Marine Animals vol. 3**. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany, pp. 245–349.

BROCK, J.A., GOSE, R.B., LIGHTNER, D.V., HASSON, K.W., 1997. Recent developments and an overview of Taura Syndrome of farmed shrimp in the

Americas. In: FLEGEL, T.W., MACRAE, I.H. (Eds.), **Diseases in Asian Aquaculture**, vol. III. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 267–283.

BROOKSBANK, C., CAMON, E., HARRIS, M.A., MAGRANE, M., MARTIN, M.J., MULDER, N., O'DONOVAN, C., PARKINSON, H., TULI, M.A., APWEILER, R., BIRNEY, E., BRAZMA, A., HENRICK, K., LOPEZ, R., STOESSER, G., STOEHR, P., CAMERON, G., 2003. The European Bioinformatics Institute's data resources. **Nucleic Acids Res.**, 31: 43-50.

BURUKOVSKII, R.N., 1985. **Key to shrimps and lobsters**. In: KOTHEKAR, V.S. (Ed.), Russian translation series copyright. A.A. Balkema, Rotterdam, 174 pp.

CERENIUS, L., SÖDERHÄLL, K., 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunol. Rev.**, 198: 116–126.

CHOU, H.Y., HUANG, C.Y., WANG, C.H., CHIANG, H.C., LO, C.F., 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. **Dis. Aquat. Org.**, 23: 165–173.

CHRISTOPHIDES, G.K., VLACHOU, D., KAFATOS, F.C., 2004. Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Immunol. Rev.**, 198: 127–148.

COOK, J., GITTERLE, T., SALAZAR, M., RYE, M., 2008. Breeding for disease resistance of Penaeid shrimps. **Aquaculture**, 286: 1–11.

COMINETTI, M.R., MARQUES, M.R.F., LORENZINI, D.M., LÖFGREN, S.E., DAFFRE, S., BARRACCO, M.A., 2002. Characterization and partial purification of a lectin from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schmitti*. **Dev. Comp. Immunol.**, 26: 715–721.

CUTHBERTSON, B.J., SHEPARD, E.F., CHAPMAN, R.W., GROSS, P.S., 2002. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. **Immunogenetics**, 54: 442–445.

CUTHBERTSON, B.J., BULLESBACH, E.E., FIEVET, J., BACHÈRE, E., GROSS, P.S., 2004. A new class (penaeidin class 4) of antimicrobial peptides from the Atlantic white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) exhibits target specificity and independent proline-rich-domain function. **Biochem. J.**, 381: 79–86.

CUTHBERTSON, B.J., DETERDING, L.J., WILLIAMS, J.G., TOMER, K.B., ETIENNE, K., BLACKSHEAR, P.J., BÜLLESBACH, E.E., GROSS, P.S., 2008. Diversity in penaeidin antimicrobial peptide form and function. *Developmental and Comparative Immunology*, 32: 167–181.

DEANE, C.M., BLUNDELL, T.L., 2003. Protein comparative modelling and drug discovery. In WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**. London, Elsevier Academic Press.

DESTOUMIEUX, D., BULET, P., LOEW, D., Van DORESSLAER, A., RODRIGUEZ, J., BACHÈRE, E., 1997. Penaeidins: a new family of antimicrobial peptides in the shrimp, *Penaeus vannamei* (Decapoda). **J. Biol. Chem.**, 272: 28398–28406.

DESTOUMIEUX, D., MUÑOZ, M., COSSEAU, C., RODRIGUEZ, J., BULET, P., COMPS, M., BACHÈRE, M., 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. **J. Cell Sci.**, 113: 461–469.

DODD, R.B., DRICKAMER, K., 2001. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. **Glycobiology**, 11: 71R–79R.

DONATO, M., MANRIQUE, R., RAMIREZ, R., MAYER, L., HOWELL, C., 2005. Mass selection and inbreeding effects on a cultivated strain of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* in Venezuela. **Aquaculture**, 247: 159-167.

DOYLE, R., 2002. Genetic domestication of aquaculture broodstocks: a review. **FAO Workshop on Hatchery Guidelines for Shrimp Domestication and Disease Control**, Mazatlan, Mexico, p. 25.

DRICKAMER, K., 1988. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **J. Biol. Chem.**, 263: 9557-9560.

DRICKAMER, K., 1995. Increasing diversity of animal lectin structures. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, 5: 612-616.

DRICKAMER, K., 1999. C-type lectin-like domains. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, 9: 585-590.

ENG, C.T., PAW, J.N., GUARIN, F.Y., 1989. The environmental impact of aquaculture and the effects of pollution on coastal aquaculture development in Southeast Asia. **Mar. Pollut. Bull.**, 20: 335-343.

EPSTEIN, J., EICHBAUM, Q., SHERIFF, S., EZEKOWITZ, R.A., 1996. The collectins in innate immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, 8: 29-35.

FAO, 2002a. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Rome, Italy, 150 pp.

FAO, 2002b. **Yearbook of Fisheries Statistics 2002**. Rome, Italy. Último acesso em 05 de dezembro de 2008. Disponível em: <http://www.fao.org/fi/statist/summtab/default.asp>.

FAO, 2006. **State of World Aquaculture: 2006**. FAO Fisheries Technical Paper, N.º 500, Rome, FAO, 134 pp.

FAO, 2008a. **The State of World Fisheries and Aquaculture.** FISHSTAT, Rome, Italy. Último acesso em 05 de dezembro de 2008. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstat/en>.

FAO, 2008b. **The State of Food and Agriculture.** FAOSTAT, Rome, Italy. Último acesso em 05 de dezembro de 2008. Disponível em: <http://www.fao.org/corp/statistics/en>.

FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L.A., 2004. **VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.** Elsevier, Amsterdam.

FLEGEL, T.W., 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. **Aquaculture**, 258: 1–33.

FRAGKIADAKIS, G., STRATAKIS, E., 1995. Characterization of hemolymph lectins in the prawn *Parapenaeus longirostris*. **J. Invertebr. Pathol.**, 65: 111–117.

FREITAS, P.D., GALETTI Jr., P.M., 2002. PCR-based VNTR core sequence analysis inferring on genetic diversity of cultured prawn *Litopenaeus vannamei*. **Genet. Mol. Biol.**, 25: 431–434.

GABAY, C., KUSHNER, I., 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **N. Engl. J. Med.**, 340: 448–454.

GABIUS H.J., GABIUS S., (Eds.) 1997. **Glycoscience Status and Perspectives.** Chapman and Hall, Weinheim, Germany.

GARGIONI, R., BARRACO, M.A., 1998. Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosebergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. **Journal of Morphology**, 236: 209–221.

GITTERLE, T., ØDEGÅRD, J., GJERDE, B., RYE, M., SALTE, R., 2006. Genetic parameters and accuracy of selection for resistance to White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* using different statistical models. **Aquaculture**, 251: 210–218.

GOYARD, E., PATROIS, J., PEIGNON, J.M., VANAA, V., DUFOUR, R., VIALON, J., BÉDIER, E., 2002. Selection for better growth of *Penaeus stylirostris* in Tahiti and New Caledonia. **Aquaculture**, 204: 461–468.

GROSS, P.S., BARTLETT, T.C., BROWDY, C.L., CHAPMAN, R.W., WARR, G.W., 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of haemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. **Dev. Comp. Immunol.**, 25: 565–577.

GUEGUEN, Y., GARNIER, J., ROBERT, L., LEFRANC, M.P., MOUGENOT, I., de LORGERIL, J., JANECH, M., GROSS, P.S., WARR, G.W., CUTHBERTSON, B., BARRACCO, M.A., BULET, P., AUMELAS, A., YANG, Y., BO, D., XIANG, J., TASSANAKAJON, A., PIQUEMAL, D., BACHÈRE, E., 2006. PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: sequence-base classification and recommended nomenclature. **Dev. Comp. Immunol.**, 30: 283–288.

GUAN, Y., YU, Z., LI, C., 2003. The effect of temperature on white spot syndrome infections in *Marsupenaeus japonicus*. **J. Invertebr. Pathol.**, 83:257–260.

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

HASSON, K.W., LIGHTNER, D.V., POULOS, B.T., REDMAN, R.M., WHITE, B.L., BROCK, J.A., BONAMI, J.R., 1995. Taura Syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. **Dis. Aquat. Org.**, 23: 115–126.

HASSON, K.W., LIGHTNER, D.V., MOHNEY, L.L., REDMAN, R.M., POULOS, B.T., WHITE, B.L., 1999. Taura syndrome virus (TSV) lesion development and the diseases cycle in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. **Dis. Aquat. Org.**, 36: 81–93.

HATAKEYAMA, T., HOZAWA, T., HIROTANI, I., TSUDA, N., KUSUNOKI, M., SHIBA, K., 2006. Characterization of a recombinant C-type lectin, rCEL-IV, expressed in *Escherichia coli* cells using a synthetic gene. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1760: 318–325.

HAYASHIDA, K., KUME, N., MINAMI, M., KITA, T., 2002. Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) supports adhesion of mononuclear leukocytes and a monocyte-like cell line THP-1 cells under static and flow conditions. **FEBS Lett.**, 511: 133–138.

HENNIG, O.L., ARCE, S.M., MOSS, S.M., PANTOJA, C.R., LIGHTNER, D.V., 2005. Development of a specific pathogen free population of the Chinese fleshy prawn, *Fenneropenaeus chinensis* Part II. Secondary quarantine. **Aquaculture**, 250: 579–585.

HOOFT, R.W.W., VRIEND, G., SANDER, C., ABOLA, E.E., 1996a. Errors in protein structures. **Nature**, 381: 272.

HOOFT, R.W.W., SANDER, C., VRIEND, G., 1996b. The PDBFINDER database: A summary of PDB, DSSP and HSSP information with added value. **CABIOS/Bioinformatics**, 12: 525–529.

HOSE, J.E., MARTIN, G.G., GERARD, A.S., 1990. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry and function. **Biol. Bull.**, 178: 33–45.

HU, S.Y., HUANG, J.H., HUANG, W.T., YEH, Y.H., CHEN, M.H.C., GONG, H.Y., CHIOU, T.T., YANG, T.H., CHEN, T.T., LU, J.K., WU, J.L., 2006. Structure and function of

antimicrobial peptide penaeidin-5 from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, 260: 61–68.

HULATA, G., 2001. Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. **Genetica**, 111: 155–173.

IBAMA, 2006. **Estatística da Pesca no Brasil – 2004**. Ibama, Brasília–DF, 98 pp.

IBAMA, 2008. **Estatística da Pesca no Brasil – 2006**. Ibama, Brasília–DF, 180 pp.

ITAMI, T., TAKAHASHI, Y., NAKAMURA, Y., 1989. Efficacy of vaccination against vibriosis in cultured kuruma prawns *Penaeus japonicus*. **J. Aquat. Anim. Health**, 1: 238–242.

IWAKI, D., OSAKI, T., MIZUNOE, Y., WAI, S.N., IWANAGA, S., KAWABATA, S., 1999. Functional and structural diversities of C-reactive proteins present in horseshoe crab hemolymph plasma. **Eur. J. Biochem.**, 264: 314–26.

JANEWAY Jr., C.A., 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, 54: 1–13.

JIMENEZ, R., BARNIOL, R., BARNIOL, L., MACHUCA, M., 2000. Periodic occurrence of epithelial viral necrosis outbreaks in *Penaeus vannamei* in Ecuador. **Dis. Aquat. Org.**, 42: 91–99.

JIMÉNEZ-VEGA, F., VARGAS-ALBORES, F., SÖDERHÄLL, K., 2005. Characterisation of a serine proteinase from *Penaeus vannamei* haemocytes. **Fish Shellfish Immunol.**, 18: 101–108.

JIRAVANICHPAISAL, P., SÖDERHÄLL, K., SÖDERHÄLL, I., 2004. Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish. **Fish Shellfish Immunol.**, 17: 265–275.

KAWABATA, S., TOKUNAGA, F., KUGI, Y., MOTOYAMA, S., MIURA, Y., HIRATA, M., 1996. Limulus factor D, a 43-kDa protein isolated from horseshoe crab hemocytes, is a serine protease homologue with antimicrobial activity. **FEBS Lett.**, 398: 146–150.

KONDO, M.H., MATSUYAMA, H., YANO, T., 1992. The opsonic effect of lectin on the phagocytosis by hemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. **Fish Pathol.**, 27: 217–222.

KONDO, M., ITAMI, T., TAKAHASHI, Y., 1998. Preliminary characterization of lectins in the hemolymph of kuruma prawn. **Fish Pathol.**, 33: 429–435.

KRIEGER, E., KORAIMANN, G., VRIEND, G., 2002. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA – a self parameterizing force field. **Proteins**, 47: 393–402.

KUMAR, S.R., AHAMED, V.P.I., SARATHI, M., BASHA, A.N., HAMEED, A.S.S., 2008. Immunological responses of *Penaeus monodon* to DNA vaccine and its efficacy to protect shrimp against white spot syndrome virus (WSSV). **Fish Shellfish Immunol.**, 24: 467–478.

KURTZ, J., FRANZ, K., 2003. Innate defence: evidence for memory in invertebrate immunity. **Nature**, 425: 37–38.

LEE, S.Y., SÖDERHÄLL, K., 2002. Early events in crustacean innate immunity. **Fish Shellfish Immunol.**, 12: 421–437.

LIGHTNER, D.V., REDMAN, R.M., BELL, T.A., 1983. Detection of IHNV virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. **J. World Maric. Soc.**, 14: 212–225.

LIGHTNER, D.V., 1992. Shrimp virus diseases: diagnosis, distribution and management. In: WYBAN, J. (Ed.), **Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming**, World Aquaculture Society, Florida, USA, pp. 238–253.

LIGHTNER, D.V., 1995. Taura Syndrome: an economically important viral disease impacting the shrimp farming industries of the Americas including the United States. In: **Proceedings of the Annual Meeting of the United States Animal Health Association**, Reno, Nevada, USA, pp. 1–12.

LIGHTNER, D.V., 1996a. **A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

LIGHTNER, D.V., 1996b. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. **Rev. Sci. Tech.**, 15: 579–601.

LIGHTNER, D.V., 2003. Exclusion or specific pathogens for disease prevention in a penaeid shrimp biosecurity program. In: LEE, C.S., O'BRYEN, P.J. (Eds.), **Biosecurity in Aquaculture Production Systems: Exclusion of Pathogens and Other Undesirables**. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, pp. 81–116.

LIGHTNER, D.V., REDMAN, R.M., 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture**, 164: 201–220.

LIGHTNER, D.V., PANTOJA, C.R., POULOS, B.T., TANG, K.F.J., REDMAN, R.M., ANDREAS, T., BONAMI, J.R. 2004. Infectious myonecrosis (IMN): a new virus disease of *Litopenaeus vannamei*. In: **Abstract Book of Aquaculture 2004**. Honolulu, Hawaii, EUA, p. 353.

LIU, F.S., LIU, Y.C., LI, F.H., DONG, B., XIANG, J.H., 2005. Molecular cloning and expression profile of putative antilipopolysaccharide factor in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). **Mar. Biotechnol.**, 7: 600–608.

LIU, Y.C., LI, F.H., DONG, B., WANG, B., LUAN, W., ZHANG, X.J., ZHANG, L.S., XIANG, J.H., 2007. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (Fclectin) gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. **Mol. Immunol.**, 44: 598–607.

LOKER, E.S., ADEMA, C.M., ZHANG, S.M., KEPLER, T.B., 2004. Invertebrate immune systems not homogeneous, not simple, not well understood. **Immunol. Rev.**, 198: 10–24.

LOY, J.K., DEWHIRST, F.E., WEBER, W., FRELIER, P.F., TEMPLETON, J.W., 1996. Molecular phylogeny and in situ detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. **Appl. Environ. Microbiol.**, 62: 3439–3445.

LUO, T., ZHANG, X., SHAO, Z., XU, X., 2003. PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. **FEBS Lett.**, 551: 53–57.

LUO, T., YANG, H., LI, F., ZHANG, X., XU, X., 2006. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. **Dev. Comp. Immunol.**, 30: 607–617.

LUO, T., LI, F., LEI, K., XU, X., 2007. Genomic organization, promoter characterization and expression profiles of an antiviral gene PmAV from the shrimp *Penaeus monodon*. **Mol. Immunol.**, 44: 1516–1523.

MA, T.H.T., TIU, S.H., HE, J.G., CHAN, S.M., 2007. Molecular cloning of a C-type lectin (LvLT) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: early gene down-regulation after WSSV infection. **Fish Shellfish Immunol.**, 23: 430–437.

MA, T.H.T., BENZIE, J.A.H., HE, J.G., CHAN, S.M., 2008. PmLT, a C-type lectin specific to hepatopancreas is involved in the innate defense of the shrimp *Penaeus monodon*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 99: 332–341.

MADRID, R.M., 2005. A crise econômica da carcinicultura. **Panorama da Aquicultura**, 90: 22–29.

MAHESWARI, R., MULLAINADHAN, P., ARUMUGAM, M., 1997. Characterisation of a natural haemagglutinin with affinity for acetylated aminosugars in the serum of the marine prawn, *Penaeus indicus* (H Milne Edwards). **Fish Shellfish Immunol.**, 7: 17–28.

MANDAL, C., MANDAL, C., 1990. Sialic acid binding lectins. **Experientia**, 46: 433–441.

MARI, J., BONAMI, J.R., LIGHTNER, D.V., 1998. Taura syndrome of penaeid shrimp: cloning of viral genome fragments and development of specific gene probes. **Dis. Aquat. Org.**, 33: 11–17.

MARQUES, M.R.F., BARRACCO, M.A., 2000. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. **Aquaculture**, 191: 23–44.

MASEK, T., VOPALENSKY, V., SUCHOMELOV, P., POSPISEK, M., 2005. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. **Analytical Biochemistry**, 336: 46–50.

MAYO, M.A., 2005. Changes to virus taxonomy. **Arch. Virol.**, 150: 189–198.

MDIC, 2007. **Balança Comercial por Unidades da Federação**. Último acesso em 08 de maio de 2007. Disponível em: http://www.desenvolvimento.gov.br/sitio/secex/depPlaDesComExterior/indEstatisticas/balCom_uniFederacao.php.

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

MOTTE, E., YUGCHA, E., LUZARDO, J., CASTRO, F., LECLERCQ, G., RODRÍGUEZ, J., MIRANDA, P., BORJA, O., SERRANO, J., TERREROS, M., MONTALVO, K., NARVÁEZ, A., TENORIO, N., CEDEÑO, V., MIALHE, E., BOULO, V., 2003. Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, 219: 57–70.

NAMIKOSHI, A., WU, J.L., YAMASHITA, T., NISHIZAWA, T., NISHIOKA, T., ARMOTO, M., 2004. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. **Aquaculture**, 229: 25–35.

NAYLOR, R.L., GOLDBURG, R.J., MOONEY, H., BEVERIDGE, M., CLAY, J., FOLKE, C., KAUTSKY, N., LUBCHENCO, J., PRIMAVERA, J., WILLIAMS, M., 1998. Nature's subsidies to shrimp and salmon farming. **Science**, 282: 883–884.

NARCHI, W., 1973. **Crustáceos**. Editora Polígono/EDUSP. São Paulo, SP, 116 pp.

NIELSEN, L., SANG-OUM, W., CHEEVADHANARAK, S., FLEGEL, T.W., 2005. Taura syndrome virus (TSV) in Thailand and its relationship to TSV in China and the Americas. **Dis. Aquat. Org.**, 63: 101–106.

OGAWA, T., CHIJIWA, T., ODA-UEDA, N., OHNO, M., 2005. Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom. **Toxicon.**, 45: 1–14.

OHNO, M., CHIJIWA, T., ODA-UEDA, N., OGAWA, T., HATTORI, S., 2003. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A2 from snake venom. **Toxicon.**, 42: 841–854.

PANTOJA, C.R., SONG, X., XIA, L., GONG, H., WILKENFELD, J., NOBLE, B., LIGHTNER, D.V., 2005. Development of a specific pathogen-free (SPF) population of the Chinese fleshy prawn *Fenneropenaeus chinensis* Part 1: Disease Pre-screening and Primary Quarantine. **Aquaculture**, 250: 573–578.

PEINADO-GUEVARA, L.I., LÓPEZ-MEYER, M., 2006. Detailed monitoring of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp commercial ponds in Sinaloa, Mexico by nested PCR. **Aquaculture**, 251: 33–45.

PÉREZ, F., VOLCKAERT, F.A.M., CALDERÓN, J., 2005. Pathogenicity of white spot syndrome virus on postlarvae and juveniles of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. **Aquaculture**, 250: 586–591.

PÉREZ-FARFANTE, I., KENSLEY, B., 1997. **Penaeid and sergestoid shrimps and prawns of the world: keys and diagnoses**. Mémoires du Muséum National D'Histoire Naturelle, Paris, 233 pp.

PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.M., 1995. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, 109: 347–352.

PINHEIRO, M.A.A., HEBLING, N.J., 1998. Biologia de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). In: Valenti, W.C. (Ed.), **Carcinicultura de Água Doce: Tecnologia para a Produção de Camarões**. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Brasília, 383 pp.

PINHEIRO, A.C.A.S., LIMA, A.P.S., SOUZA, M.E. DE, NETO, E.C.L., ADRIÃO, M., GONÇALVES, V.S.P., COIMBRA, M.R.M., 2007. Epidemiological status of Taura syndrome and Infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil). **Aquaculture**, 262: 17–22.

POULOS, B.T., TANG, K.F.J., PANTOJA, C.R., BONAMI, J.R., LIGHTNER, D.V., 2006. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. **J. Gen. Virol.**, 87: 987–996.

QUESENBERRY, M., AHMED, H., ELOLA, M.T., O'LEARY, N., VASTA, G.R., 2003. Diverse lectin repertoires in tunicates mediate broad recognition and effector innate immune responses. **Integr. Comp. Biol.**, 43: 323–330.

RANA, K.J., 1997. **Guidelines on the collection of structural aquaculture statistics. Supplement to the Programme for the world census of agriculture 2000.** FAO Statistical Development Series, 5b, FAO, Rome, Italy, 56 pp.

RITTIDACH, W., PAIJIT, N., UTARABHAND, P., 2007. Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* hemolymph. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1770: 106–114.

ROCHA, I.P., RODRIGUES, J., AMORIM, L., 2004a. A carcinicultura brasileira em 2003. **Revista da Associação Brasileira dos Criadores de Camarão – ABCC**, 1: 30–36.

ROCHA, J.L., GUERRELHAS, A.C., JIANG, D., CIOBANU, D., MILEHAM, A., KINGHORN, B., STEEN, H. van der, 2004b. Acelerando o progresso genético do seu camarão: a “speed line” da Aquatec. **Revista da Associação Brasileira dos Criadores de Camarão – ABCC**, 3: 72–80.

RODRIGUES, J., 2005. Carcinicultura marinha – Desempenho em 2004. **Revista da Associação Brasileira dos Criadores de Camarão – ABCC**, 2: 38–44.

ROUX, M.M., PAIN, A., KLIMPEL, K.R., DHAR, A.K., 2002. The lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). **J. Virol.**, 76: 7140–7149.

SCHAUER, R., 1982. Chemistry, metabolism and biological function of sialic acid. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, 40: 131–235.

SENAPIN, S., PHEWSAIYA, K., BRIGGS, M., FLEGEL, T.W., 2007. Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. **Aquaculture**, 266: 32–38.

- SHARON, N., LIS, H., 1989. **Lectins**. Chapman and Hall, London, 126 pp.
- SMITH, V.J., CHISHOLM, J.R., 2001. Antimicrobial proteins in crustaceans. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 484: 95–112.
- SMITH, V.J., FERNANDES, J.M.O., KEMP, G.D., HAUTON, C., 2008. Crustins: Enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. **Dev. Comp. Immunol.**, 32: 758–772.
- SNIESZKO, S.F., 1973. Diseases of fishes and their control in the U.S. In: **The Two Lakes Fifth Fishery Management Training Course Report**. Jansen, London, pp. 55–66.
- SÖDERHÄLL, K., 1999. Editorial. Invertebrate immunity. **Dev. Comp. Immunol.**, 23: 263–266.
- SÖDERHÄLL, K., CERENIUS, L., 1992. Crustacean immunity. **Ann. Rev. Fish. Dis.**, 2: 3–23.
- SÖDERHÄLL, K., CERENIUS, L., 1998. Role of prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, 10: 23–28.
- SRITUNYALUCKSANA, K., SITHISARN, P., WITHAYACHUMNARNKUL, B., FLEGEL, T.W., 1999b. Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants. **Fish Shellfish Immunol.**, 9: 21–30.
- SRITUNYALUCKSANA, K., CERENIUS, L., SÖDERHÄLL, K., 1999a. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Dev. Comp. Immunol.**, 23: 179–186.

SRITUNYALUCKSANA, K., SÖDERHÄLL, K., 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. **Aquaculture**, 191: 53–69.

SUN, J., WANG, L., WANG, B., GUO, Z., LIU, M., JIANG, K., LUO, Z., 2007. Purification and characterisation of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol.**, 23: 292–299.

SUN, J., WANG, L., WANG, B., GUO, Z., LIU, M., JIANG, K., TAO, R., ZHANG, G., 2008a. Purification and characterisation of a natural lectin from the plasma of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish Shellfish Immunol.**, 25: 290–297.

SUN, Y.D., FU, L.D., JIA, Y.P., DU, X.J., WANG, Q., WANG, Y.H., ZHAO, X.F., YU, X.Q., WANG, J.X., 2008b. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. **Mol. Immunol.**, 45: 348–361.

SUPUNGUL, P., KLINBUNGA, S., PICHYANGKURA, R., JITRAPAKDEE, S., HIRONO, I., AOKI, T., TASSANAKAJON, A., 2002. Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Mar. Biotechnol.**, 4: 487–494.

SUPUNGUL, P., KLINBUNGA, S., PICHYANGKURA, R., HIRONO, I., AOKI, T., TASSANAKAJON, A., 2004. Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. **Dis. Aquat. Organ.**, 61: 123–35.

TACON, A.G.J., FORSTER, I.P., 2001. Global trends and challenges to aquaculture and aquafeed development in the new millennium. **International Aquafeed Directory and Buyers' Guide**. Turret Rai Group, Rickmansworth, UK, pp. 4–25.

TAKAHASHI, Y., ITAMI, T., KONDO, M., MAEDA, M., FUJII, R., TOMANAGA, S., SUPAMATTAYA, K., BOONYARATPALIN, S., 1994. Electron microscope evidence of

bacilliform virus infection in kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). **Fish Pathol.**, 29: 121–125.

TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M., KUMAR, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.**, 24: 1596–1599.

TANG, K.F.J., PANTOJA, C.R., POULOS, B.T., REDMAN, R.M., LIGHTNER, D.V., 2005. In situ hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). **Dis. Aquat. Org.**, 63: 261–265.

TATTERSALL, P., BERGOIN, M., BOOM, M. E., BROWN, K. E., LINDEN, R. M., MUZYCSKA, N., PARRISH, C. R., TIJSSEN, P. 2005. Family Parvoviridae. In: FAUQUET, C. M., MAYO, M. A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L. A. (Eds.), **Virus Taxonomy**. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 353–369.

TEUNISSEN, O.S.P., FABER, R., BOOMS, G.H.R., LATSCHA, T., BOON, J.H., 1998. Influence of vaccination on vibriosis resistance of the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). **Aquaculture**, 164: 359–366.

THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. AND HIGGINS, D.G., 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, 25: 4876–4882.

TU, C., HUANG, H.T., CHUANG, S.H., HSU, J.P., KUO, S.T., LI, N.J., HSU, T.L., LI, M.C., LIN, S.Y., 1999. Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. **Dis. Aquat. Org.**, 38: 159–161.

XU, Z., PRIMAVERA, J.H., DE LA PEÑA, L.D., PETTIT, P., BELAK, J., ALCIVAR-WARREN, A., 2001. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp

(*Penaeus monodon*) in the Phillipines using microsatellites. **Aquaculture**, 199: 13–40.

VAN DAMME, E.J.M., PEUMANS, W.J., BARRE, A., ROUGÉ, P., 1998. Plant Lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Science**, 17: 575–692.

VAN DE BRAAK, C.B.; BOTTERBLOM, M.H.A.; TAVERNE, N.; VAN MUISWINKEL, W.B.; ROMBOUT, J.H.W.M.; VAN DER KNAAP, W.P.W. 2002 The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. **Fish Shellfish Immunol.**, 13: 293–309.

VAN HULTEN, M.C., VLAK, J.M., 2001. Identification and phylogeny of a protein kinase gene of white spot syndrome virus. **Virus Genes**, 22: 201–207.

VAN HULTEN, M.C., WITTEVELDT, J., PETERS, S., KLOOSTERBOER, N., TARCHINI, R., FIERS, M., SANDBRINK, H., LANKHORST, R.K., VLAK, J.M., 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. **Virology**, 286: 7–22.

VARGAS-ALBORES, F., GUZMÁN-MURILLO, M.A., OCHOA, J.L., 1993. A lipopolysaccharide-binding agglutinin isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) haemolymph. **Comp. Biochem. Physiol.**, 104A: 407–413.

VARGAS-ALBORES, F., 1995. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): humoral recognition and cellular responses. **J. Mar. Biotechnol.**, 3: 153–156.

VARGAS-ALBORES, F., YEPIZ-PLASCENCIA, G., JIMENEZ-VEGA, F., ÁVILA-VILLA, A., 2004. Structural and functional differences of *Litopenaeus vannamei* crustins. **Comp. Biochem. Phys. B.**, 138: 415–422.

VASEEHARAN, B., PREM, A.T., MURUGAN, T., CHEN, J.C., 2006. Shrimp vaccination trials with the VP292 protein of white spot syndrome virus. **Lett. Appl. Microbiol.**, 43: 137–142.

VASTA, G.R., AHMED, H., QUESENBERRY, M.S., 1996. Invertebrate C-types lectins and pentraxins as non-self recognition molecules. In: SÖDERHÄLL, K., IWANAGA, S., VASTA, G.R. (Eds.), **New Directions in Invertebrate Immunology**. SOS Publications, Fair Haven, NJ, pp. 189–227.

VASTA, G.R., QUESENBERRY, M., AHMED, H., O'LEARY, N., 1999. C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. **Dev. Comp. Immunol.**, 23: 401–420.

VIDAL, O.M., GRANJA, C.B., ARANGUREN F., BROCK, J.A., SALAZAR, M, 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. **J. World. Aquacult. Soc.**, 32: 364–372.

WANG, C.H., LO, C.F., LEU, J.H., CHOU, C.M., YEH, P.Y., CHOU, H.Y., TUNG, M.C., CHANG, C.F., SU, M.S., KOU, G.H., 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat. Org.**, 23: 239–242.

WANG, Y.C., CHANG, P.S., CHEN, H.Y., 2006. Tissue distribution of prophenoloxidase transcript in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol.**, 20: 414–418.

WANG, X.W., XU, W.T., ZHANG, X.W., ZHAO, X.F., YU, X.Q., WANG, J.X., 2009a. A C-type lectin is involved in the innate immune response of Chinese white shrimp. **Fish Shellfish Immunol.**, 27: 556–562.

WANG, X.W., ZHANG, X.W., XU, W.T., ZHAO, X.F., WANG, J.X., 2009b. A novel C-type lectin (FcLec4) facilitates the clearance of *Vibrio anguillarum* in vivo in Chinese White shrimp. **Dev. Comp. Immunol.**, 33: 1039–1047.

WEIS, W.I., DRICKAMER, K., 1996. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annu. Rev. Biochem.**, 65: 441–473.

WITTEVELDT, J., CIFUENTES, C., VLAK, J.M., VAN HULTEN, M.C.W., 2004a. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. **J. Virol.**, 78: 2057–2061.

WITTEVELDT, J., VLAK, J.M., VAN HULTEN, M.C.W., 2004b. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. **Fish Shellfish Immunol.**, 16: 571–579.

WOLFUS, G.M., GARCIA, O.K., ALCIVAR-WARREN, A., 1997. Application of the microsatellite technique for analyzing genetic diversity in shrimp breeding programs. **Aquaculture**, 152: 35–47.

WONGTEERASUPAYA, C., VICKERS, J.E., SRIURAIRATANA, S., NASH, G.L., AKARAJAMORN, A., BONSAENG, V., PANYIM, S., TASSANAKAJON, A., WITHYACHUMNARNKUL, B., FLEGEL, T.W., 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in the cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Dis. Aquat. Org.**, 21: 69–77.

WORLD SHRIMP FARMING, 1995. In: ROSENBERRY, B. (Ed.), **Shrimp News International**, 9434 Kearny Road, San Diego, CA, USA.

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

WYBAN, J.A., SWEENEY, J.N., 1991. **Intensive shrimp production technology.** High Health Aquaculture Inc., Hawaii. 158 pp.

YANG, F., HE, J., LIN, X., LI, Q., PAN, D., ZHANG, X., XU, X., 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. **J. Virol.**, 75: 11811–11820.

YANG, H., LUO, T., LI, F., LI, S., XU, X., 2007. Purification and characterisation of a calcium-independent lectin (PjLec) from the haemolymph of the shrimp *Penaeus japonicus*. **Fish Shellfish Immunol.**, 22: 88–97.

ZELENSKY, A.N., GREASY, J.E., 2005. The C-type lectin-like domain superfamily. **FEBS J.**, 272: 6179–6217.

ZHANG, Y., QIU, L., SONG, L., ZHANG, H., ZHAO, J., WANG, L., YU, Y., LI, C., LI, F., XING, K., HUANG, B., 2009a. Cloning and characterization of a novel C-type lectin gene from shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol.**, 26:183–192.

ZHANG, X.W., XU, W.T., WANG, X.W., MU, Y., ZHAO, X.F., YU, X.Q., WANG, J.X., 2009b. A novel C-type lectin with two CRD domains from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* functions as a pattern recognition protein. **Molecular Immunology**, 46: 1626–1637.

ZHAO, Z.Y., YIN, Z.X., XU, X.P., WENG, S.P., RAO, X.Y., DAI, Z.X., LUO, Y.W., YANG, G., LI, Z.S., GUAN, H.J., LI, S.D., CHAN, S.M., YU, X.Q., HE, J.G., 2009. A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-white spot syndrome virus activity. **J. Virol.**, 83: 347–356.

ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

Cloning and molecular modeling of hepatopancreatic *Litopenaeus vannamei* C-type lectins with a mutated mannose binding domain-2

Francisco Hiran Farias Costa^a, Natália Souto Maior Sales Valença^b, Gustavo Arruda Bezerra^{c,d}, Benildo Sousa Cavada^d, Gandhi Rádis-Baptista^{*b,e}

^aDepartment of Fish Engineering, Federal University of Ceara, Fortaleza – CE, Brazil

^bLaboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Recife – PE, Brazil

^cInstitute of Molecular Biosciences, Karl-Franzens University of Graz, Austria

^dLaboratory of Bioactive Molecules, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceara, Fortaleza – CE, Brazil

^eInstitute of Marine Sciences, Federal University of Ceara, Fortaleza - CE, Brazil.

*Corresponding authors:

G. Radis-Baptista. Laboratory of Biochemistry and Biotechnology, Institute of Marine Sciences, Federal University of Ceara, Fortaleza - CE, Brazil. Av Abolição 3207, Fortaleza – CE, 60185-060. Brazil. Phone +55 85 3366 7007. E-mail: gandhi.radis@ufc.br

Abstract

C-type lectins are animal proteins of about 130 amino acids long, containing at least one carbohydrate recognition domain (CRD) capable of mediating sugar and calcium binding. The carbohydrate recognition is directly related to some biological activities, like cell-cell adhesion, serum glycoprotein turnover, and innate immune responses against potential pathogens. In invertebrates, like insects and crustaceans, C-type lectins act as pattern recognition receptors (PRRs), by binding to pathogen associated molecular patterns (PAMPs) and activating the innate host defense systems. In addition to their function as PRRs, it has been shown that in economically important penaeid shrimp species, C-type lectins function as antimicrobial and antiviral protein, component of pathogen clearance and innate immune response. The penaeid shrimp C-type lectins fall into two structurally classes of related proteins, based on the presence of a single CRD per molecule of protein or two juxtaposed CRDs with a spacer sequence in between. It has known that a given lectin activity depends not only of the presence of CRDs and other conjugated domains, but also of its global architecture. So far, for structural studies, we have cloned two novel c-type lectins from the hepatopancreas of juvenile *Litopenaeus vannamei*. The cloned cDNAs encompass ORFs of 1044 nt and encode high similar (99.6%) two-domains proteins of 347 residues. Named Lv CTL-br1 and –br2, their estimated molecular masses and values of pI are 38.4 kDa and 4.93 (Lv CTL-br1), and 38.5 kDa and 4.87 (Lv CTL-br2). In both proteins the consensus triad that recognizes galactose (-QPD-), in CRD-1 is preserved, but the mannose-binding site

(-EPN-), in the second domain, was mutated. Computational molecular modeling of Lv CTL-br1 and -br2 reveals domain structures constituted by α -helix chain interlaced by loops and a single β -sheet. In contrast to CRD-1 of Lv CTL-br1, the CRD-2 presents a long loop that might accommodate complex sugars. The 3-D models also show that three amino acid substitutions, in CRD-1, occur close to the sugar binding site. Interestingly, a nonsynonymous substitution of Gly109 for Asp109, observed in CRD1 of LvCTL-br2, indicates that three hydrogen bonds might be formed between complex carbohydrates, what could reflect in a higher affinity by the sugar. The present work is the first to present the cloning of two *L. vannamei* hepatopancreatic C-type lectins with mutated mannose binding site, and their respective molecular 3-D models.

1. Introduction

Lectins are proteins or glycoproteins, mostly without catalytic activity, with one or more conserved carbohydrate recognition domains (CRDs), capable of discriminating and reversely binding to mono and oligosaccharides in solution or on surface of cells. Distinct families of lectin are recognized based on the structures of their CRDs. For instance, an β -sandwich with more than 230 amino acid residues, with ability to bind various types of sugars and sort proteins in the endoplasmic reticulum of animal cells, characterize the L-type lectins (Dodd and Drickamer, 2001). C-type lectins encompass another group of modular proteins, in which the CRDs (> 115 amino acids), in number of one or more mixed α/β -folds, compose the most diverse family of animal lectins. The CRDs of C-type lectins particularly recognize a variety of sugar in a Ca^{2+} -dependent basis, while the other additional modules of lectin molecule, connected to the CRDs, respond to distinct biological activities, like cell adhesion, glycoprotein clearance and pathogen neutralization (Drickamer and Taylor, 1995, Dodd and Drickamer, 2001).

A number of C-type lectins, from vertebrate and invertebrates, act as pattern recognition receptors (PRRs), binding to pathogen associated molecular patterns (PAMPs) and activating the innate host defense systems. For instance, in vertebrates, transmembrane proteins that possess C-type lectin-like domains (CTLs), like mannose-binding receptor, DCL-1, dectin-1, and dendritic cell-specific

ICAM grabbing non-integrin receptor (DC-SIGNR), as well as soluble collectins that have CTLDs in their structure, are all involved in phagocytosis (Kerrigan & Brown, 2009).

In invertebrates, like *Anopheles gambiae*, C-type lectins also figure among various PRR proteins and contribute to defend the insect against pathogens (Christophides et al., 2004, Schnitger et al., 2009). In silkworm, three homologues were found to be expressed in testis and ovary and they play a role as primary PRRs in *Bombix mori* cellular immunity (Takasi et al., 2009). C-type lectins with two CRD arranged *in tandem* also function as pattern recognition receptor in the cotton bollworm, promoting hemocyte phagocytosis of pathogens, and protecting the insect from bacterial infection (Tian et al., 2009). In marine invertebrates, C-type lectins and CTLD-containing proteins have been identified in crustaceans, like barnacles (Matsubara et al., 2007), crabs (Kong et al., 2008) and shrimps (Luo et al., 2006; Liu et al., 2007), as well in cnidarians (Wood-Charlson et al., 2009) and mollusks (Yamaura et al., 2008; Zhang et al., 2009).

The penaeid shrimps encompass species which are commercially cultivated, as *Litopenaeus vannamei* and *Peneaus monodon*, and due to the large production worldwide and their aquatic nature, these organisms suffer from usually fatal viral and bacterial infection. Like all invertebrates, penaeid shrimps lack adaptive immunity and, consequently, rely their defense against pathogens solely on components of innate immunity system, such as CTLD-containing PRRs (Hofmann et al., 1999).

In penaeid shrimp, C-type lectins have shown to function as antimicrobial and antiviral protein (Sun et al., 2008, Zhao et al., 2009), proteins of pattern recognition (Ji et al., 2009, Zhang, 2009), pathogen clearance (Wang et al., 2009a), and proved to participate in the innate immune response (Ma et al., 2007; Wang et al., 2009b). It has been also documented that in the hemolymph and other tissues of penaeid shrimps, C-type lectins have their expression regulated at transcriptional and transduction levels after bacterial and viral infection (Leu et al., 2007; Ma et al., 2008a; Soonthornchai et al., 2009).

The cloned and purified penaeid shrimp C-type lectins fall into two structurally classes of related proteins: those containing a single CTLD with a spacer region between the signal peptide (Ma

et al., 2008b; Sun et al., 2008; Zhang et al., 2009), and members with two CRD disposed in tandem with spacer regions between the signal peptide and CRD1, and intervening the CRD1 and CRD2 (Ma et al., 2008a; Zhang et al., 2009). These shrimp C-type lectins were shown to recognize and bind with high affinity to galactose, mannose, N-acetyl glucosamine, N-acetyl galactosamine and N-acetyl mannosamine, and in some degree to disaccharides such as maltose and trehalose (Rittidach et al., 2007; Ma et al., 2008a; Wang et al., 2009; Zhang et al., 2009).

Although each of C-type lectin CRDs self recognize and specifically bind to carbohydrates in a Ca^{2+} -dependent fashion, the global architecture of a given C-type lectin results from the combination of conjugated domains, and such modular disposition of CTLD-containing proteins determines the diversity of lectin activities (Drickamer *et al.*, 1995).

In the present work, we report the cloning of two divergent hepatopancreatic *L. vannamei* C-type lectin cDNA precursors and the molecular modeling of one of the two homologues, which have mutated mannose carbohydrate recognition domain-2. By analysis of docking with N-acetyl glucosamine oligosaccharides the mutated CRD-2 seems, unexpectedly to bind to $\text{GlcNac}_7\text{Man}_2$ as does the conserved CRD1. This is the first reported study on the tridimensional structure assumed by the two carbohydrate recognition domains of one penaeid shrimp *L. vannamei* C-type lectin members.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of mRNAs from *L. vannamei* hepatopancreas and first strand cDNA synthesis

Frozen hepatopancreas of ten *L. vannamei* juveniles (not exposed to microbial or viral infection) were finely powdered in a mortar and pestle under liquid nitrogen, and total RNA was purified using the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad-CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The quality and yield of total RNA were verified by the integrity of 28S and 18S rRNA, through denaturing agarose gel electrophoresis, and spectrophotometrically using the ratio 260/280 nm.

Poly(A⁺)-RNA was purified from total RNA by a complex of oligo(dT)-biotin and streptavidin-

MagneSphere paramagnetic particles (PolyAtract system, Promega, Madison-WI, USA). The mRNAs were quantified and used for cDNA synthesis. ImProm-II reverse transcriptase (Promega, Madison, WI-USA) was used to prepare the full length cDNA, as follow: mRNA (1.2 µg) from *L. vannamei* hepatopancreas were mixed with 500 ng/µl oligo-dT primer (Promega, Madison-WI, USA), in a final volume of 14 µl, heated to 70°C for 10 min, to disrupt possible secondary structures, and quickly cold on ice. Thereafter, a total of 100 U of reverse transcriptase were combined with 1 mM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTPs), 40 U/µl of RNase inhibitor, and RNase-free water to make a final reaction volume of 25 µl. The reverse transcription was conducted at 42°C for 60 min, and finally heated to 70°C for 15 min.

2.2. Molecular cloning of hepatopancreatic *Litopaneaus vannamei* C-type lectin homologues

For molecular cloning of hepatopancreatic *L. vannamei* C-type lectin, gene specific primers were synthesized based on previously reported LvLT sequences (Ma et al., 2006), and used for high fidelity PCR amplification, as follow: each reaction, in a final volume of 50 µl, was constituted by 2.5 U of Platinum Taq DNA polymerase, 2.0 mM of MgCl₂, dNTPs, of 0.2 µM of each forward (5' - 3') and reverse primer (5' - 3'), in High fidelity PCR buffer (60 mM Tris-SO₄, pH 8.4, 18 mM ammonium sulfate, 2.5 mM MgSO₄). The PCR conditions were composed of a initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by 32 cycles of denaturation at 95°C for 1 min, annealing at 58°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min. A final step at 72°C for 8 min was processed for ending of DNA synthesis. The efficiency of gene amplification was confirmed by agarose gel analysis, after staining with ethidium bromide.

2.3. Nucleotide sequencing, multi-alignment and phylogenetic analysis

The cloned hepatopancreatic *L. vannamei* C-type lectin cDNA precursors were sequenced by

the dideoxy chain termination method, using the Dye terminator chemistry (DYEnamic ET Dye Terminator kit, GE Healthcare, Piscataway, USA) and the MegaBACE 750 DNA Analysis System (GE Healthcare, Piscataway, USA). Each clone was sequenced twice with both sense and antisense 5'- and 3'-flanking primers and the contig sequence was assembled with the software SeqMan (Lasergene, DNASTar Inc, Madison-WI, USA). The annotated nucleotide sequences were submitted to GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and received the following sequential accession numbers: GU206551 and GU206552.

The *L. vannamei* C-type lectin cDNAs were *in silico* translated, and the deduced amino acid sequences were compared against all entries in the GenBank database, using the BLASTp program (Altschul et al., 1997). Multiple sequence alignment was conducted by the ClustalW2 program, available at <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustaw2> (Brooksbank et al., 2003), and the phylogram of *L. vannamei* C-type lectins was automatically inferred by using default parameters and the multialignment visualized by the program JalView version 2 (Waterhouse et al., 2009).

2.4. Molecular Modeling

The CTL-br1 3D model was calculated by Homology Modeling with the Yasara [1] program. The search for the template was done using built-in PSI-BLAST [2]. About 20 hits were identified and the structural quality analyzed according to WHAT CHECK [3] obtained from the PDBfinder2 database [4]. A total of 18 models were generated based on the top 5 ranked templates, alternative alignments were used when it was necessary. After the side-chains had been built up, optimized and fine-tuned, newly modeled parts were subjected to a combined steepest descent and simulated annealing minimization. Then a full unrestrained simulated annealing minimization was performed for the entire molecule. Only the segments ranging from residues 37 to 195 (CRD 1) and 198 to 347 (CRD-2) were used for the 3-D structure calculation. The best CRD-1 CTL-br1 model (residues 37 to 195) was generated from the human Tetranectin, a plasminogen kringle 4-binding

protein, sharing 25% identity with the covered region (PDB code: 1htn, x-ray solved at 2.8 Å resolution). The final model was evaluated and validated by Yasara twinset.

The second domain of the CTL-br1 (CRD-2, residues ranging from position 198 to 347) was separately modeled according to the same procedure described above. The best model was obtained from the dendritic cell-specific ICAM grabbing non-integrin (DC-SIGNR) in complex with GlcNAc2Man3. Such template and CTL-br1 CDR-2 share 32% of identity, respect to the covered region (PDB code: 1k9J, x-ray solved at 1.9 Å resolution).

3. Results and discussion

3.1. Molecular cloning of C-type lectin cDNA precursors from hepatopancreas of *L. vannamei*

Based on homology screening coupled to polymerase chain reaction, conducted with gene specific oligonucleotides, a product of 1044 base pairs were amplified from the cDNAs library prepared from *L. vannamei* hepatopancreas. The amplicon was cloned into a plasmid vector and propagated in *E. coli*, according to current protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., 1995). The automatic sequence analysis of 30 independent clones generated sets of nucleotide sequences which encompassed two open reading frames (ORFs). Prediction of amino acid sequences revealed which both C-type lectin cDNA precursors encode two highly similar proteins, with 347 amino acid residues. Named *Lv* CTL-br1 and *Lv* CTL-br2, they differ by only five residues where the following substitutions were observed: Leu²⁹ → Ser²⁹, Ala⁹¹ → Thr⁹¹, Gly¹⁰⁹ → Asp¹⁰⁹, Ala¹⁵⁰ → Thr¹⁵⁰, Leu³³⁰ → Phe³³⁰, caused as consequence of transitions cytosine → thymine and adenosine → guanosine, in their respective codons (Fig. 1). The estimated molecular masses and pI values are 38.4 kDa and 4.93 for *Lv* CTL-br1, 38.5 kDa e 4.87 for *Lv* CTL-br2.

Direct comparison of *Lv*CTL-br1 and -br2 with their closest homologue C-type lectin from *L. vannamei* (*Lv*LT, GenBank DQ871245) shows a similarity of 81 and 80%, based on amino acid

identity. Like LvLT, Lv CTL-br1 and CTL-br2 precursors encompass a peptide signal (residues from 1 to 20), two carbohydrate recognition domains (CRD-1 and -2) disposed *in tandem*, four repetitive internal sequences (-EGVWV- and -GEA/VVPLGTPFW-, in CRD-1, and -EGTWV- and -GEPVPMGTPFW-, in CRD-2), and conserved positions and number of cysteine residues (Fig. 1). A relevant contrast between Lv CTL-br1/-br2 and LvTL is related to the second CRD. The amino acid residues in the first CRD-1, namely -GluProAsp-, which is known to bind galactose, are conserved in these sequences, but the tripeptide (-GlnProAsp-) related to the CRD-2 in LvLT, which is specific for mannose, was replaced by the triad (-GlyThrArg-). These annotated Lv CTL-br1 and -br2 precursors are queried by the GenBank accession numbers GU206551 and GU206552.

Lectins are modular proteins, in which the CTDL can be connected to other CTDLs or to several kinds of domains and modules, resulting in distinct biological activity of the members of a given lectin family (Dood and Drickamer, 2001). So, it would be expected that the mutated mannose binding site detected in the second domain of Lv CTL-br1, could correspond to a fast evolving C-type lectin, in which the first domain preserve its galactose binding property and the second domain might show an unrelated or null biological activity. As one can see by comparing the molecular models of CRD-1 and -2 of Lv CTL-br1, it is less probable that the mutated mannose binding domain can bind to complex oligosaccharides, due to the presence of a long loop with the mutated CRD triad in the tip.

3.2. Multi-alignment and phylogenetic analysis

The characterized C-type lectins from several species of penaeid shrimp are either C-type lectins with a single CRD or with two CRD domains arranged in tandem. Thus, comparison of amino acid sequences of cloned or purified C-type lectin homologues from *Fenneropenaeus chinensis*, *F. merguensis*, *L. vannemei*, *Penaeus monodoni*, *P. semisulcatus*, shows that single domain penaeid shrimp CTLs align with the second domain of two CRD-containing CTLs (Fig 2A). To compare effectively how conserved or how diverse these C-type lectins are, the CRD-1 and CRD-2 of Lv CTL-

br1 were split and used in the multi-alignment. As one can also observe, CRD-1 and CRD-2 which compose those C-type lectins with two domains *in tandem*, and CRD in single domain C-type lectins have invariant amino acids when aligned together, as well as conserved cysteine residues that form the multiple S-S bonds.

Another constant structural characteristic in these sequences is the conserved tri-peptides which compose the binding sites for carbohydrates, like -QPD/N- and EPD/N. Single CRD CTL amino acid sequences align with the second CRD of two domain CTLs, but most constantly present is the triad -QPD-, which is characteristic of the CRD-1. The triad EPD/N appears mainly in the CRD-2 of two domains CTLs, despite of being present in one homologue of single domain CTL from *P. chinensis*. In CRD-2 of Lv CTL-br1 and -br2, such carbohydrate binding site was replaced by the unusual triad -GTR-. In fact, there are a consensus sequence among the members of shrimp C-type lectins, with conserved structural characteristics, and the similarity shared by LvLT and Lv CTL-br1 and -br2 is high (>80%). However, the crucial residues that make the motif for carbohydrate binding were replaced by nonsynonymous substitutions in Lv CTL-br1 CRD-2.

This critical change, and the fact that single domain CTLs with -QPD- triad align with CRD-2 of two domain shrimp CTLs, might indicate that some part of molecule is under evolutionary constraint, while others are allowed to evolve. Moreover, this also suggests that penaeid shrimp C-type lectin genes were once duplicated and the sequences corresponding to one of these two domains turned more free to evolve, as seen for the Lv CTL-br1 and -br2 homologues.

A correspondent phenomenon, namely positive Darwinianism or accelerated evolution, is known to operate in animal toxin genes belonging, among others, to the families of snake venom phospholipases A₂ and C-type lectins (Ohno et al., 2003; Ogawa et al., 2005). Thus far, such modular arrangement of proteins and their genes seems to offer flexible templates for the diversity of some active family of proteins.

3.3. Molecular Modeling

Since any crystal structure of shrimp C-type lectin is presently known and the interaction between sugar and residues in the binding site of a carbohydrate domain can reveal and reflect the way in which the interaction does occur, we have performed homology modeling of Lv CTL-br1 and -br2 proteins in order to identify where the mutated residues lie in the respective 3-D structures.

The models reveal a typical CTLDs constituted by α -helix chain interlaced by loops and a single β -sheet, in case of CRD-1, or two (CRD-2). The characteristic mannose binding even mutated in the CRD-2 of Lv CTL-br1 displays a conserved calcium binding site, which is responsible for stabilizing the main loop of such domain (Figure 3). Superimposition of CRD-1 and -2 of Lv CTL-br1 shows clearly the longer loop of CDR-2, where the mutate mannose binding site –GTR- triad is located (Figure 4). Additionally, the longer loops in the second domains are in a region highly probable to accommodate more complex carbohydrates. That also would explain the reason why there is no crystal structure available for the second domain. Longer loops must prevent the crystallization process by increase the vibration scattering, which can definitely interfere in crystallization process. Moreover, the superimposition between the first Domain of Lv CTL-br2 and DC-SIGNR complexed to GlcNAc₂Man₃ (PDB code: 1K9J) reveals that two of its mutated residues in the sequence are close to the active site (data not shown).

Curiously, analyzing the replacement of Thr150 by an Alanine in the CRD-1 of Lv CTL-br1, and the Aspartic Acid-109 by a Glycine, in comparison with CRD-1 of Lv CTL-br2, seems to reduce the number of hydrogen bonds, which would be formed in Lv CTL-br2 CRD-1 binding site and its sugar but not in Lv CTL-br1 CRD-1 (figure 6). Thus the model of Lv CTL-br2 first domain indicates which the formation hydrogen bonds with its sugar only might occur with Ala-91 and Gly-109, so the substitution of these critical residues (for Thr-91 and Asp-109) makes this interaction impossible. Although it is known that interaction of sugars occurs mainly by forces of Van der Waals between the

hydroxyl groups of carbohydrate and the amino acid residues at the binding site (WEIS & DRICKAMER, 1996), this substitution may cause a difference in the affinities presented by the two isoforms towards the receptors.

Concerning to the second domain (CRD-2) of Lv CTL homologues (isoforms), the only amino acid difference between the structures relies in the position 141, a Leucine in Lv CTL-br1 and a Phenylalanine in the CTL-br2 (Figure 6). Again, this substitution is located close to the binding site, and also it might cause a local conformation change, probably resulting in a different network of interactions, reflecting directly in the affinity of the proteins by specific carbohydrates. This is in agreement with the assumption that changes at key positions are responsible for the wide difference in affinity and specificity observed among lectins (Drickamer, 1998).

The alterations in first and second domains seen in the models make us to hypothesize about the lack of function or alteration in the affinity of these C-type lectin CRDs. These are consequence of the amino acid substitutions occurring close to the carbohydrate binding sites, which is clearly observed by grazing these modeling data.

In all of the available CRD–ligand structures, carbohydrate is complexed to the protein by forming coordination bonds with a conserved Ca^{2+} , as well as by hydrogen bonding with acid and amide sidechains that also coordinate to the Ca^{2+} (Weis and Drickamer, 1996). Binding of sugars such as mannose and N-acetylglucosamine, which display equatorial 3- and 4-hydroxyl groups, is associated with a specific arrangement of acid and amide coordination ligands, binding of galactose and N-acetylgalactosamine to C-type CRDs through equatorial 3-hydroxyl and axial 4-hydroxyl groups is associated with an alternative arrangement of Ca^{2+} ligands.

At first glance this is all that can be observed by 3-D model comparison. For other significant/reliable differences and more detailed considerations about shrimp C-type lectins, efforts towards the crystallographic structure with recombinant proteins are currently been made. However, these hypothetical models offer, at the present moment, some clues of how the *Litopenaeus vanamei*

CTLs might be evolving to bind complex sugars in the intricate invertebrates-pathogen interactions.

Acknowledgements

We are indebted to The National Brazilian Council for the Scientific and Technological Development (CNPq) for the financial support to this work. We also thank Georg Steinkellner (Centre of Molecular Biosciences, University of Graz) for the use and support of the program Yasara.

B.S.B and G.R.B. are members of the Scientific Committee of The National Council for the Scientific and Technological Development (CNPq).

References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaeffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Ausubel, F.M., Brente, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., 1995. *Currents Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Dodd, R.B., Drickamer, K., 2001. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology* 11, 71R–79R.
- Drickamer, K., 1995. Increasing diversity of animal lectin structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 612–616.
- Hofmann, J.A., Kafatoa, F.C., Janeway Jr., C.A., Ekekwitz, R.A.B., 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313–1318.
- Hooft, R.W.W., Vriend, G., Sander, C., Abola, E.E., 1996a. Errors in protein structures. *Nature* 381: 272.
- Hooft, R.W.W., Sander, C., Vriend, G., 1996b. The PDBFINDER database: A summary of PDB, DSSP and HSSP information with added value. *CABIOS/Bioinformatics* 12, 525–529.
- Ji, P.F., Yao, C.L., Wang, Z.Y., 2009. Immune response and gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns. *Fish Shellfish Immunol.*, Epub ahead of print.
- Kerrigan, A.M., Brown, G.D., 2009. C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology*, Epub ahead of print.
- Krieger, E., Koraimann, G., Vriend, G., 2002. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA – a self parameterizing force field. *Proteins* 47, 393–402.

- Kong, H.J., Park, E.M., Nam, B.H., Kim, Y.O., Kim, W.J., Park, H.J., Lee, C.H., Lee, S.J., 2008. A C-type lectin like-domain (CTLTD)-containing protein (PtLP) from the swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 311–314.
- Leu, J.H., Chang, C.C., Wu, J.L., Hsu, C.W., Hirono, I., Aoki, T., Juan, H.F., Lo, C.F., Kou, G.H., Huang, H.C., 2007. Comparative analysis of differentially expressed genes in normal and white spot syndrome virus infected *Penaeus monodon*. *BMC Genomics* 8, art. no. 120.
- Liu, Y.C., Li, F.H., Dong, B., Wang, B., Luan, W., Zhang, X.J., Zhang, L.S., Xiang, J.H., 2007. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (Fclectin) gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol. Immunol.* 44, 598–607.
- Luo, T., Yang, H., Li, F., Zhang, X., XU, X., 2006. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 607–617.
- Ma, T.H.T., Tiu, S.H., He, J.G., Chan, S.M., 2007. Molecular cloning of a C-type lectin (LvLT) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: early gene down-regulation after WSSV infection. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 430–437.
- Ma, T.H.T., Benzie, J.A.H., He, J.G., Chan, S.M., 2008. PmLT, a C-type lectin specific to hepatopancreas is involved in the innate defense of the shrimp *Penaeus monodon*. *Journal of Invertebrate Pathology* 99, 332–341.
- Marques, M.R.F., Barracco, M.A., 2000. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture* 191, 23–44.
- Ogawa, T., Chijiwa, T., Oda-Ueda, N., Ohno, M., 2005. Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom. *Toxicon.* 45, 1–14.
- Ohno, M., Chijiwa, T., Oda-Ueda, N., Ogawa, T., Hattori, S., 2003. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A2 from snake venom. *Toxicon.* 42, 841–854.
- Rittidach, W., Paijit, N., Utarabhand, P., 2007. Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* hemolymph. *Biochimica et Biophysica Acta* 1770, 106–114.
- Schnitger, A.K., Yassine, H., Kafatos, F.C., Osta, M.A., 2009. Two C-type lectins cooperate to defend *Anopheles gambiae* against Gram-negative bacteria. *J. Biol. Chem.* 284, 17616–17624.
- Soonthornchai, W., Rungrasamee, W., Karoonuthaisiri, N., Jarayabhand, P., Klinbunga, S., Kenneth Söderhäll, K., Jiravanichpaisal, P., 2009. Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi*. *Dev. Comp. Immunol.*, E-pub ahead of print.

- Sun, J., Wang, L., Wang, B., Guo, Z., Liu, M., Jiang, K., TAo, R., ZHANG, G., 2008a. Purification and characterisation of a natural lectin from the plasma of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 290–297.
- Sun, Y.D., Fu, L.D., Jia, Y.P., Du, X.J., Wang, Q., Wang, Y.H., Zhao, X.F., Yu, X.Q., Wang, J.X., 2008b. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. *Mol. Immunol.* 45, 348–361.
- Takase, H., Watanabe, A., Yoshizawa, Y., Kitami, M., Sato, R., 2009. Identification and comparative analysis of three novel C-type lectins from the silkworm with functional implications in pathogen recognition. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 789–800.
- Tian, Y.Y., Liu, Y., Zhao, X.F., Wang, J.X., 2009. Characterization of a C-type lectin from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 772–779.
- Vriend, G., 1990. WHAT IF: A molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* 8, 52–56.
- Wang, X.W., Xu, W.T., Zhang, X.W., Zhao, X.F., Yu, X.Q., Wang, J.X., 2009a. A C-type lectin is involved in the innate immune response of Chinese white shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 556–562.
- Wang, X.W., Zhang, X.W., Xu, W.T., Zhao, X.F., Wang, J.X., 2009b. A novel C-type lectin (FcLec4) facilitates the clearance of *Vibrio anguillarum* in vivo in Chinese White shrimp. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 1039–1047.
- Weis, W.I., Drickamer, K., 1996. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 441–473.
- Wood-Charlson, E.M., Weis, V.M., 2009. The diversity of C-type lectins in the genome of a basal metazoan, *Nematostella vectensis*. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 881–889.
- Yamaura, K., Takahashi, K.G., Suzuki, T., 2008. Identification and tissue expression analysis of C-type lectin and galectin in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 149, 168–175.
- Zhang, H., Wang, H., Wang, L., Song, X., Zhao, J., Qiu, L., Li, L., Cong, M., Song, L., 2009. A novel C-type lectin (Cflec-3) from *Chlamys farreri* with three carbohydrate recognition domains. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 707–715.
- Zhang, Y., Qiu, L., Song, L., Zhang, H., Zhao, J., Wang, L., Yu, Y., Li, C., Li, F., Xing, K., Huang, B., 2009a. Cloning and characterization of a novel C-type lectin gene from shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 183–192.
- Zhang, X.W., Xu, W.T., Wang, X.W., Mu, Y., Zhao, X.F., Yu, X.Q., Wang, J.X., 2009b. A novel C-type

lectin with two CRD domains from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* functions as a pattern recognition protein. *Molecular Immunology* 46, 1626–1637.

Zhao, Z.Y., Yin, Z.X., Xu, X.P., Weng, S.P., Rao, X.Y., Dai, Z.X., Luo, Y.W., Yang, G., Li, Z.S., Guan, H.J., Li, S.D., Chan, S.M., Yu, X.Q., He, J.G., 2009. A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-white spot syndrome virus activity. *J. Virol.* 83, 347–356.

Figure Legends