

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GABRIELLE AZEVEDO RIZZATO

**DETECÇÃO POR ABORDAGEM MOLECULAR DE
UMA LECTINA TIPO-C NA VIEIRA *Nodipecten nodosus*
(BIVALVIA: PECTINIDAE)**

FLORIANÓPOLIS

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA APLICADA À AQUICULTURA

GABRIELLE AZEVEDO RIZZATO

**DETECÇÃO POR ABORDAGEM MOLECULAR DE
UMA LECTINA TIPO-C NA VIEIRA *Nodipecten nodosus*
(BIVALVIA: PECTINIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Santa Catarina
como requisito parcial para a obtenção do título
de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Margherita Anna Barracco

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Patricia Mirella da Silva Scardua

Florianópolis

2009

Dedico este trabalho a minha mãe, por sempre ter se empenhado e batalhado tanto para poder me fornecer uma educação de alta qualidade, permitindo que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

“Foi o tempo que perdeste com a tua rosa que a fez tão importante”

Antoine de Saint-Exupéry

Primeiramente, agradeço a minha mãe Neli. A pessoa mais importante da minha vida, quem eu mais confio e mais amo nesse mundo. Agradeço por todo seu amor, seu carinho, sua dedicação, sua confiança e sua amizade. Por tudo que me ensinou durante esses anos, sem nunca mentir e sempre com uma paciência infinita. Por ter sempre confiado e acreditado em mim, em todos os momentos e em todas as decisões da minha vida. Por ter sido sempre meu exemplo de mãe, amiga, professora, mulher e ser humano. Obrigado por tudo. Eu te amo muito.

À professora Margherita, que me orientou nos últimos dois anos. Por ter me aceito em seu laboratório, por tudo que me ensinou durante esses anos e por sua confiança em mim. Por sua enorme paciência com todos os meus erros e defeitos, por seus bons conselhos e por tudo o mais que resultou em meu amadurecimento científico e pessoal. Por suas aulas maravilhosas no início da graduação, que me conquistaram, e que foram fundamentais no meu encaminhamento dentro da faculdade. Por ser um grande exemplo de bióloga e cientista que eu admiro muito.

À Mirella, minha co-orientadora por ter me ensinado todas as técnicas que me permitiram realizar esse trabalho e por confiar na minha capacidade de realizá-las. Por sua amizade, dedicação e paciência comigo.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA), principalmente à Paulinha, Cris, Dani, Mírian, Liege, Pri, Pedro e à professora Luciane que estiveram presentes durante todo o meu tempo de estágio. Obrigada por tudo que me ensinaram, pela camaradagem e por estarem sempre dispostos a ajudar. Obrigada em especial à Paulinha por sua ajuda na realização desse trabalho, e ao Rafa que também ajudou um monte mesmo estando do outro lado do Atlântico.

Aos membros da banca, Paulinha, Cris e Delano por terem aceitado meu convite.

À minha tia Neiva, meu avô Elziário e em à minha avó Josephina. Por sempre terem acreditado em mim, me incentivado em todos os momentos e sentido orgulho de cada sucesso que eu obtive. Por todo o amor, carinho e dedicação durante toda minha vida.

Às minhas melhores e mais queridas amigas nesses últimos quatro anos e meio de faculdade, Kika e Luli. Por serem mais que amigas, serem minhas irmãs. Por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos. Pelos conselhos, pelo carinho e preocupação, pela amizade sincera, pela confiança e paciência. Amo vocês.

Aos grandes amigos e amigas que fiz nesses últimos anos na Biologia. Ao Celso, meu melhor amigo *ever* que conhece todos os meus defeitos e ainda assim gosta de mim, adóóóro. À Jéssika, Tici, May e Elis por serem amigas maravilhosas e queridas. À Flavinha, Ana, Fêr, Nina, Dé e as outras gurias da minha sala que eu adoro. Ao Poca, meu irmão de coração que eu amo muito. Adoro muito todos vocês.

À Cíntia por ser essa pessoa alegre e divertida, parceira pra tudo, principalmente pras baladas. Por ser uma grande amiga, compreensível e sempre disposta a ouvir, conversar e a aconselhar. Te adoro gata.

Ao pessoal do Chopp do Gus, por terem mantido minha sanidade ao me distraírem com assuntos absolutamente nada relacionados à biologia. Obrigada pela amizade de todos vocês.

À minhas melhores amigas de Pirassununga, que apesar de distantes continuam no meu coração e nas minhas lembranças. Agradeço a vocês pela amizade, pelo carinho, por tudo que vivemos juntas e por terem compartilhado comigo aqueles anos incríveis da infância e adolescência. À Ísis, Naira, Carol e Fêr, minha família do xadrez, que eu sinto tanta falta. Às minhas estrelas, literalmente, Dé e Tati, por termos construído uma amizade tão maravilhosa, sólida e inesquecível, que distância ou tempo algum vai conseguir nos separar.

Aos órgãos de fomento CNPq e FINEP, pelo apoio financeiro.

“Viva o hoje, pois o ontem já se foi e o amanhã talvez não venha”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Lectinas tipo-C ou CTLs são proteínas dependentes de Ca^{2+} , capazes de reconhecer açúcares específicos da superfície de células e causar sua aglutinação. Estas proteínas podem estar associadas ao sistema imune, funcionando como proteínas de reconhecimento padrão (PRPs) que se ligam a padrões moleculares específicos associados a patógenos (PAMPs), os quais estão presentes em muitos vertebrados e invertebrados. Usualmente, as CTLs são compostas por diferentes subunidades proteicas e possuem um único domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) por subunidade. O objetivo deste estudo foi o de detectar, clonar e sequenciar, através de técnicas de biologia molecular, uma lectina da hemolinfa da vieira *Nodipecten nodosus*, espécie de importância comercial no litoral de Santa Catarina. Através de iniciadores específicos desenhados a partir da lectina AiCTL1 de *Argopecten irradians*, disponível em bancos gênicos públicos, foi possível amplificar, clonar e sequenciar parcialmente o cDNA correspondente a uma lectina tipo-C (CTL), que foi denominada de NnCTL. A expressão desta proteína foi investigada em vieiras desafiadas com componentes da parede de microorganismos (LPS e β -1,3 glicanas) e vieiras não desafiadas. Sequências gênicas parciais correspondentes a esta proteína foram amplificadas em ambos os tratamentos, sugerindo que a produção de NnCTL se dá de forma constitutiva. A sequência parcial da NnCTL apresentou 88% de identidade com a AiCTL1 (BlastX). A sequência aminoacídica parcial deduzida da NnCTL obtida contém 118 aminoácidos, dos quais 117 fazem parte de seu CRD, e que representa cerca de 70% da lectina completa AiCTL1. Foram identificadas quatro cisteínas no CRD da NnCTL, sendo duas implicadas na formação de pontes internas de dissulfeto e duas cisteínas adicionais localizadas próximas à região N-terminal da molécula. Assim como a AiCTL1, a NnCTL contém apenas um motivo QPD (Gln-Pro-Asp) de ligação ao carboidrato D-galactose, sugerindo sua afinidade por esse açúcar. Durante este estudo tentou-se obter a sequência completa da NnCTL através da técnica RACE, porém não obtivemos sucesso até o momento. Estratégias alternativas serão utilizadas na tentativa de completar a sequência de NnCTL.

Palavras-chave: proteínas de reconhecimento padrão; PRP; lectinas tipo-C; CRD; *Nodipecten nodosus*; vieiras

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Material Biológico.....	19
3.2. Desafio das Vieiras e Coleta de Hemolinfa.....	20
3.3. Extração de RNA Total e Síntese de cDNA.....	21
3.4. Amplificação das Sequências de cDNA.....	21
3.5. Clonagem e Sequenciamento dos Insertos	22
3.6 Análise das Sequências Gênicas.....	23
3.7. Obtenção da Sequência Gênica Completa da Lectina Tipo C Através da Técnica RACE (do inglês: <i>rapid amplification of cDNA ends</i>).....	23
3.7.1 Purificação do DNA	24
3.7.2. Desenho dos iniciadores	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5. CONCLUSÕES.....	30
REFERÊNCIAS	32

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Exemplares adultos da espécie de vieira *Nodipecten nodosus* (tamanho natural). A seta indica o músculo adutor.20
- Figura 2:** Eletroforese em gel de agarose (1,2%) corado com brometo de etídio, mostrando a amplificação de bandas de cerca de 357 pb, indicada pelas setas vermelhas, correspondendo à lectina tipo-C de *N. nodosus*. 1: marcador de peso molecular (escala 100 pb); 2: cDNA de *N. nodosus* (D); 3: cDNA de *N. nodosus* (ND).....25
- Figura 3:** Sequências nucleotídica e aminoacídica deduzida da lectina tipo-C de *N. nodosus* (NnCTL). O domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) está sublinhado, os dois resíduos de cisteína implicados na formação de pontes de dissulfeto estão destacados em azul. Os dois resíduos de cisteína adicionais da região N-terminal estão destacados em preto e o motivo QPD (Gln-Pro-Asp) que se liga à galactose está contornado.26
- Figura 4:** Alinhamento da sequência parcial aminoacídica deduzida da CTL de *N. nodosus* (NnCTL) com a sequência aminoacídica da AiCTL1 de *A. irradians* (EU277646.1). Resíduos de aminoácidos idênticos entre ambas as sequências estão indicados, na linha inferior, por asterisco (*). Os hífen indicam *gaps* e os símbolos (.) e (:) indicam resíduos de aminoácidos pouco e muito similares, respectivamente. Os dois resíduos de cisteína implicados na formação de pontes de dissulfeto estão destacados em azul. Os dois resíduos de cisteína adicionais da região N-terminal estão destacados em preto e o motivo QPD (Gln-Pro-Asp) que se liga à galactose está contornado. Os outros dois resíduos de cisteína implicados na formação de pontes de dissulfeto estão destacados em vermelho.27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nome e sequência dos iniciadores utilizados no presente trabalho. Erro! Indicador não definido.

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cDNA	DNA complementar ao RNA mensageiro
CRD	do inglês <i>Carbohydrate-Recognition Domain</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dT	Deoxitirosina
dNTP	Deoxinucleotídeos trifosfatados
LB	Meio Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
MAS	Solução de Alsever Modificada (do inglês <i>Modified Alsever Solution</i>)
mRNA	RNA mensageiro
PAM	Peptídeo Antimicrobiano
PAMP	Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PRP	Proteína de Reconhecimento de Padrões
RACE	do inglês <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
RT-PCR	Reação de transcrição reversa (do inglês <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
Taq	Polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

Aminoácidos

A – Ala – Alanina	C – Cys – Cisteína	D – Asp – Aspartato
E – Glu – Glutamato	F – Phe – Fenilalanina	G – Gly – Glicina
H – His – Histidina	I – Ile – Isoleucina	K – Lys – Lisina
L – Leu – Leucina	M – Met – Metionina	N – Asn – Asparagina
P – Pro – Prolina	Q – Gln – Glutamina	R – Arg – Arginina
S – Ser – Serina	T – Thr – Treonina	V – Val – Valina
W – Trp – Triptofano	Y – Tyr – Tirosina	

1. INTRODUÇÃO

O sistema imune dos organismos multicelulares evoluiu sob uma pressão seletiva imposta pelos microorganismos, resultando no desenvolvimento de diversos mecanismos de defesa, os quais são ativados por infecções e protegem o hospedeiro por meio da destruição de patógenos invasores e neutralização de fatores virulentos (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997).

Os moluscos, assim como outros invertebrados, contam apenas com um *sistema imune intato* ou *natural*, diferentemente dos vertebrados que possuem, além deste, um *sistema adaptativo* ou *adquirido*. O primeiro, filogeneticamente mais antigo e considerado mais simples, é encontrado em todos os organismos multicelulares. Já o sistema imune adaptativo é mais recente e ocorre apenas nos vertebrados. Este se caracteriza pela presença de uma infinidade de receptores e anticorpos específicos e ainda células de memória, que garantem uma resposta de defesa rápida, eficiente e altamente específica, principalmente numa segunda infecção pelo mesmo patógeno. O sistema adaptativo deriva basicamente da linhagem celular linfocítica, que ocorre exclusivamente nos vertebrados e que se encontra na base das respostas imunológicas específicas. Sua ausência nos invertebrados inviabiliza qualquer tentativa de desenvolvimento de *vacinas*, na concepção clássica da palavra, diminuindo assim de forma substancial a possibilidade de se prevenir e controlar doenças nestes animais (BARRACCO; DA SILVA, 2008).

O sistema imune inato dos moluscos está intimamente relacionado ao seu sangue ou hemolinfa, que consiste em uma fração celular representada pelas células circulantes, ou hemócitos, e em uma fração líquida constituída pelo plasma e os fatores humorais nele dissolvidos. As respostas imune celulares e humorais atuam de forma integrada em moluscos, protegendo-os da invasão de microorganismos e parasitas, garantindo sua integridade corpórea (VARGAS-ALBORES; BARRACCO, 2001; BARRACCO; DA SILVA, 2008).

Quando a integridade corpórea do molusco é rompida pela invasão de microorganismos, vários mecanismos imunológicos são desencadeados com o objetivo de contornar e limitar a infecção. Os hemócitos constituem a primeira linha de defesa contra invasores, e suas respostas imunes celulares incluem a fagocitose de microorganismos, a formação de nódulos e cápsulas celulares em torno de partículas estranhas e sua posterior destruição ou neutralização pela produção de moléculas tóxicas, microbicidas e/ou degradativas, como enzimas hidrolíticas, espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio

(ERN) e as proteínas ou peptídeos antimicrobianos (PAMs) (VARGAS-ALBORES; BARRACCO, 2001; BARRACO; DA SILVA, 2008).

Um dos primeiros e mais importantes passos no estabelecimento de uma resposta imunológica nos moluscos é o reconhecimento do agente invasor, que acontece por meio de proteínas capazes de reconhecer eficientemente, desencadear e amplificar a resposta imune contra uma grande variedade de invasores (BARRACO; DA SILVA, 2008). Essas proteínas, que podem ser secretadas para o plasma ou encontrarem-se inseridas nas membranas celulares dos hemócitos, são chamadas de PRPs (proteínas de reconhecimento de padrões) por reconhecerem e se ligarem a padrões moleculares específicos associados a patógenos (PAMPs). Os PAMPs são estruturas moleculares essenciais à sobrevivência dos microorganismos e mutações afetando essas estruturas podem lhes ser fatais. Desta forma, os PAMPs não desenvolveram muita variabilidade durante o processo evolutivo, o que implicou em seu compartilhamento em grandes grupos de patógenos. Sendo assim, um receptor que reconheça um determinado PAMP é capaz de detectar a presença de qualquer patógeno que possua este mesmo PAMP (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997).

Os principais PAMPs de invertebrados são os lipopolissacarídeos (LPS) da superfície das bactérias Gram-negativas, as peptidoglicanas (PGs) da parede das Gram-positivas, as β -1,3-glicanas da superfície de fungos e o RNA dupla fita de vírus (dsRNA) (LEE; SÖDERHÄLL, 2002). Nenhum desses compostos é produzido pelos hospedeiros, e todos são essenciais à fisiologia e sobrevivência de seus respectivos microorganismos (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997).

A grande maioria dos PAMPs supracitados é constituída por carboidratos e são reconhecidos por PRPs capazes de discriminá-los especificamente. As principais PRPs de invertebrados são: a PGRP (do inglês: *peptidoglycan recognition protein*), que reconhece peptidoglicanas da parede de bactérias Gram-positivas, a LBP (do inglês: *LPS binding protein*), a β GBP (do inglês: *β -1,3-glucan binding protein*) e a LGBP (do inglês: *LPS or/and β -1,3-glucan binding protein*), que reconhecem LPS de parede de bactérias Gram-negativas e/ou β -1,3-glicanas de parede de fungos, e, diferentes lectinas que reconhecem e se ligam a diferentes açúcares específicos da superfície celular de patógenos (ver revisão: LEE; SÖDERHÄLL, 2002).

Dentre as diferentes PRPs, as lectinas alcançam especial destaque por serem um grupo de proteínas ou glicoproteínas de ocorrência constitutiva ou induzida no plasma dos moluscos, sem atividade catalítica, com capacidade de se ligar a açúcares específicos presentes na superfície de diferentes células causando sua aglutinação. Esta reação ocorre pelo

fato das lectinas serem moléculas bivalentes, ou seja, possuem no mínimo dois sítios de ligação para carboidratos específicos da superfície celular de microorganismos (MARQUES; BARRACO, 2000; BARRACCO; DA SILVA, 2008). Lectinas, identificam geralmente os monossacarídeos para os quais tem afinidade em posições terminais na cadeia de carboidratos, porém os subterminais frequentemente influenciam nesta ligação (ARASON, 1996). Essa interação entre lectinas e carboidratos está envolvida em várias reações imunológicas, como na adesão celular, na opsonização dos microorganismos invasores, na formação de nódulos hemocíticos (ver revisões: LEE; SÖDERHÄLL, 2002; BARRACCO; DA SILVA, 2008) e participação no processo de encapsulamento e melanização de parasitas (LING; YU, 2006).

A especificidade das lectinas é determinada pelo tipo de carboidrato ao qual ela mostra maior afinidade, mas a maioria das lectinas consideradas específicas para um determinado monossacarídeo pode também se ligar, embora com menor afinidade, a outros carboidratos estruturalmente relacionados. Lectinas de invertebrados são geralmente específicas para manose, galactose, glicose, lactose, fucose, ácidos siálicos e glicoproteínas do tipo mucina (MARQUES; BARRACCO, 2000).

Do ponto de vista estrutural, as lectinas animais podem ser divididas em no mínimo quatro superfamílias de acordo com seu domínio de reconhecimento de carboidratos ou CRD (do inglês: *carbohydrate-recognition domain*) que é altamente conservado em cada família (SHARON; LIS, 2004): *lectinas tipo-P*, cujo CRD é específico para manose-6-fosfato (do inglês: *mannose-6-phosphate*); *lectinas tipo-C* cuja designação se refere ao fato de serem dependentes do íon Ca^{2+} ; *galectinas*, assim chamadas por se ligarem a β -galactosídeos; e *pentraxinas*, que são compostas por cinco subunidades idênticas dispostas em configuração pentamérica cíclica (vide revisão de MARQUES, BARRACCO, 2000).

As lectinas tipo-C ou CTLs (do inglês: *C-type lectins*) podem ser específicas para vários carboidratos, mas todas têm sua atividade dependente de cátions divalentes, em especial o cálcio. Podem ser encontradas no soro, matriz extracelular e nas membranas celulares. Possuem um número variável de subunidades, com tamanho aproximado de 15 kDa (em invertebrados) e em sua maioria um único CRD por subunidade. O CRD das lectinas tipo-C contém usualmente duas regiões α -hélices, duas folhas- β e alguns *loops* moleculares. O motivo de ligação a carboidratos encontra-se em um desses *loops*, e é fortemente associado a dois sítios de ligação a cálcio, os quais são essenciais para a ligação do carboidrato. As diferentes especificidades são causadas por pequenas variações estruturais neste motivo de ligação (vide revisão ARASON, 1996). As CTLs que apresentam o motivo EPN (Glu-Pro-Asn) ou o motivo EPD (Glu-Pro-Asp), ligam-se especificamente através destes motivos

moleculares à manose (ou qualquer outro açúcar similar que tenha 3-OH e 4-OH equatorial), enquanto que as CTLs que contém o motivo QPD (Gln-Pro-Asp) na mesma posição exibem especificidade para galactose (ou outro açúcar similar com 3-OH axial e 4-OH equatorial) (WEIS et al., 1998; LIU et al., 2007).

Lectinas, em especial as CTLs já foram descritas em vários bivalves como em ostras (*Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica* e *Pinctada fucata martensii*) e mexilhões (*Mytilus edulis* e *Crenomytilus grayanus*) (ver revisões de VARGAS-ALBORES; BARRACCO, 2001; BARRACCO, DA SILVA, 2008).

Em pectinídeos também já foram descritas CTLs. A vieira *Chlamys farreri* é uma espécie amplamente cultivada na China e de grande importância econômica, alcançando por volta de 75-80% da produção chinesa de vieiras. No entanto, desde 1997 mortalidades maciças de verão vem ocorrendo, resultando em perdas dramáticas para a aquicultura local. Desde então, muitas pesquisas na China têm sido dedicadas a um maior entendimento do sistema imune desta vieira, o que poderia contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de doenças, garantindo a sustentabilidade da cultura de vieiras a longo prazo (WANG et al., 2007; QIU et al., 2007). Neste contexto, foram identificadas recentemente em *C. farreri* quatro CTLs por abordagem molecular, que foram denominadas de CfLec-1 (WANG et al., 2007), CfLec-2 (ZHENG et al., 2008), CfLec-3 (ZHANG et al., 2009a) e CfLec-4 (ZHANG et al., 2009b). Também na vieira *Argopecten irradians*, espécie nativa da costa dos Estados Unidos que foi introduzida na China em 1982, foram identificadas duas CTLs por abordagem molecular, denominadas Ai Lec (ZHU et al., 2008a) e AiCTL1 (ZHU et al., 2008b).

No Brasil, a espécie *Nodipecten nodosus* apresenta grande potencial para a aquicultura devido a suas características zootécnicas, como rápido crescimento e alto valor comercial (RUPP; BEM, 2004; RUPP; PARSON, 2006). *N. nodosus* habita as águas superficiais do Oceano Atlântico desde o Caribe na América Central até a costa de Santa Catarina no Brasil. No litoral brasileiro, a espécie é conhecida popularmente como “vieira”, “pata-de-leão”, “concha da Shell” ou mesmo “coquille” e constitui o maior pectinídeo do litoral brasileiro, sendo comercializada a um custo de aproximadamente R\$ 35 a dúzia, podendo alcançar R\$ 50 em outros estados. Já as demais espécies nativas são de pequeno tamanho ou ocorrem em número muito reduzido (BERNADINO, 2007; DALLANHOL, 2007).

Ao contrário de outras espécies de vieira (*Pecten maximus*, *Placopecten magellanicus*, *A. irradians*, entre outros) que se agregam em bancos, o que é de alto valor econômico, *N. nodosus* não é uma espécie gregária. Os indivíduos de *N. nodosus* são

usualmente encontrados distantes uns dos outros, sendo que grupos de até três ou quatro animais já foram observados, algumas vezes mesmo dentro de cavernas (RUPP; PARSON, 2006). Assim sendo, a única forma de explorar comercialmente a vieira *N. nodosus* é através do seu cultivo, haja visto a escassez de suas populações naturais, decorrente da intensa captura predatória durante muitos anos, o que inviabiliza sua extração em grande escala (PEREIRA, 2000).

O estado de Santa Catarina é atualmente o segundo maior produtor de *N. nodosus* a nível nacional (atrás apenas do estado do Rio de Janeiro) apesar de seu cultivo ainda esbarrar em diversos obstáculos tecnológicos, principalmente em relação a produção de sementes, já que as larvas de pectinídeos são muito sensíveis às condições de cultivo, estando também sujeitas a mortalidades causadas por contaminações de origem bacteriana, principalmente do gênero *Vibrio* (BERNADINO, 2007). Embora o cultivo de *N. nodosus* ainda seja incipiente no litoral de Santa Catarina, este já se encontra em fase comercial (EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina). Pesquisas com este pectinídeo vêm auxiliando na consolidação e otimização da atividade, que por sua vez vem promovendo um importante desenvolvimento econômico e social para esta região e vem aumentando a diversificação dos produtos da malacultura catarinense (BERNADINO, 2007).

De acordo com a EPAGRI a produção estadual de *N. nodosus* em 2008 cresceu 1,30% em relação a 2007, passando de 3,08 toneladas para 3,12 ton. Porém, cabe ressaltar que a produção estadual de vieiras em 2008 ocorreu apenas em Porto Belo (2.88 ton) e Penha (0,24 ton). Houve na verdade um crescimento de quase 14% na produção estadual de vieiras, mas o excesso de chuvas no mês de novembro de 2008 causou uma significativa queda na salinidade das águas costeiras. Como tanto os juvenis quanto os adultos de *N. nodosus* são altamente susceptíveis à baixa salinidade, houve uma grande perda no total da produção, sendo que Governador Celso Ramos foi o município que apresentou a maior mortalidade, estimada em 24 toneladas, seguido por Florianópolis com uma perda estimada em 6,4 toneladas (EPAGRI).

Em trabalho anterior, Schleder et al. (2008) detectaram uma atividade aglutinante na hemolinfa de *N. nodosus* através de ensaios de hemaglutinação usando diferentes eritrócitos de vertebrados. Os resultados obtidos sugeriram a presença de pelo menos duas lectinas parcialmente dependentes de cálcio, diferentemente de outros bivalves onde as lectinas geralmente são altamente dependentes de cálcio. As lectinas de *N. nodosus* apresentaram forte afinidade pelos monossacarídeo D-galactose e principalmente por ácido siálico e

sialoconjugados, além de possuírem uma pequena afinidade pelos monossacarídeos D-manose e L-fucose (SCHLEDER et al., 2008).

No presente trabalho, que representa uma continuação do trabalho de Schleder et al. (2008), procurou-se identificar por abordagem molecular uma lectina tipo-C (CTL) na hemolinfa de *N. nodosus* com base na sequência da lectina AiCTL1 de *A. irradians* disponível em bancos de dados públicos. O trabalho visou ainda avaliar se a expressão gênica dessa lectina ocorre de forma constitutiva ou induzida, utilizando-se vieiras desafiadas com componentes da parede de bactérias e fungos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Detectar, clonar e sequenciar uma lectina da hemolinfa da vieira *Nodipecten nodosus*, contribuindo assim, para um maior conhecimento do sistema imune desta espécie nativa de grande valor comercial no Brasil.

2.2. Objetivos Específicos

1. Detectar a expressão do RNA mensageiro (mRNA) de uma lectina tipo-C nos hemócitos da vieira por RT-PCR, utilizando iniciadores específicos desenhados a partir da sequência gênica de uma lectina (AiCTL1) da vieira *Argopecten irradians* disponível em bancos de dados públicos.
2. Determinar se a expressão desta lectina ocorre de forma constitutiva (vieiras não desafiadas) ou se é induzida por patógenos (animais desafiados com componentes de superfícies microbianas).
3. Clonar e sequenciar o gene codificante para a lectina da vieira.
4. Analisar e comparar as sequências gênicas obtidas com sequências já descritas para outros animais utilizando ferramentas de busca (BlastP e Blast X) em bancos de dados públicos (GenBank).
5. Contribuir para uma maior compreensão do sistema imune inato da vieira *N. nodosus*, visando gerar novas ferramentas para o monitoramento e prevenção de infecções nestes animais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material Biológico

Foram utilizadas, neste estudo, vieiras adultas da espécie *Nodipecten nodosus* (Linné, 1758) (Fig. 1), medindo de 70 a 80 mm de altura, obtidas com a colaboração do Laboratório de Cultivo de Moluscos (LMM) do Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As vieiras foram transportadas para o Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA/UFSC) onde foram mantidas por 12h em aquários contendo água do mar filtrada antes de sua utilização nos experimentos.

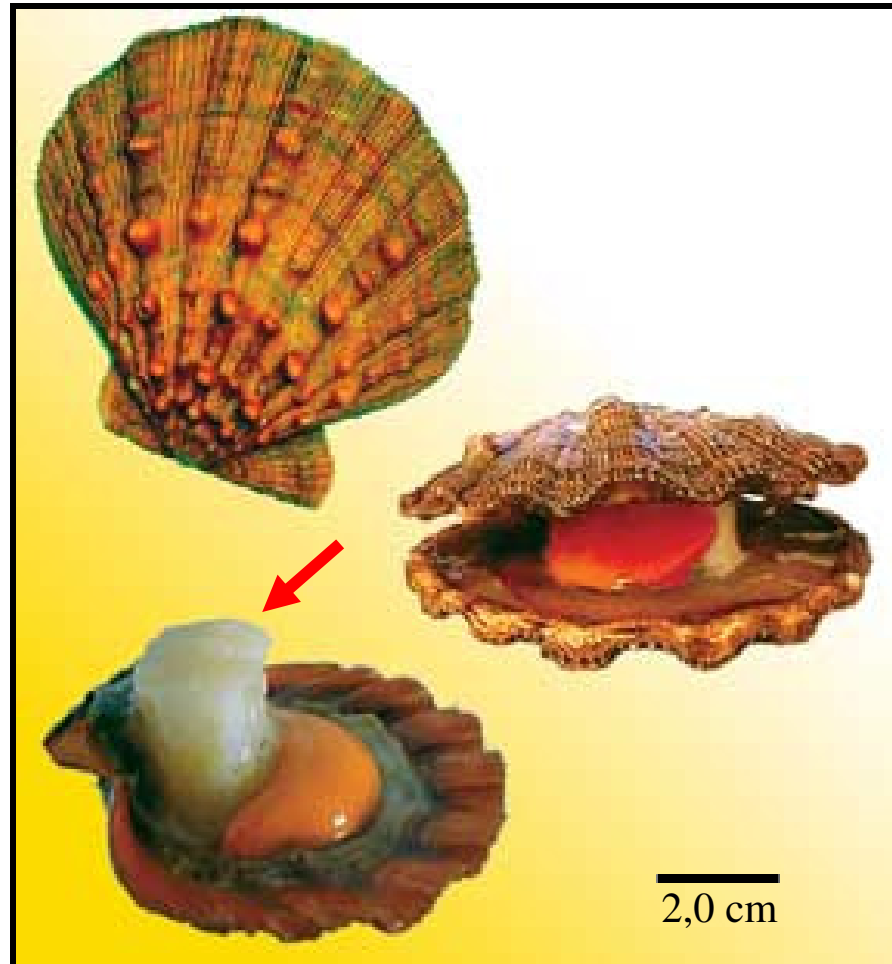


Figura 1: Exemplos adultos da espécie de vieira *Nodipecten nodosus* (tamanho natural). A seta indica o músculo adutor.

3.2. Desafio das Vieiras e Coleta de Hemolinfa

Um total de 10 vieiras *N. nodosus* foram utilizadas para extração de RNA total a partir da hemolinfa (hemócitos). Metade dos animais (n=5) foi desafiada individualmente com componentes da superfície de microorganismos. O desafio foi realizado através da injeção (seringa estéril de 1 ml) de 100 μ l de uma solução contendo β -glicanas de fungos (10 μ g mL⁻¹) e LPS de bactérias Gram-negativas (1 μ g mL⁻¹ ambos dissolvidos em água MilliQ) no músculo adutor liso das vieiras (grupo desafiado ou D). Os outros cinco animais serviram de grupo controle (grupo não desafiado ou ND), não recebendo tratamento algum. A hemolinfa de ambos os grupos foi extraída, 12 h após o desafio, a partir do músculo adutor em presença de uma solução antiagregante ou MAS (solução de Alsever modificada: citrato de sódio 27 mM, cloreto de sódio 336 mM, glicose 115 mM, EDTA 9 mM, pH 7,0). Os hemócitos de cada *pool* de vieiras (n=5) foram isolados por centrifugação (800 x g por 10 min a 4°C) e utilizados imediatamente para extração de RNA.

3.3. Extração de RNA Total e Síntese de cDNA

O RNA total dos hemócitos foi extraído em TRIzol[®] (Invitrogen[™]) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e a pureza das amostras foram avaliadas em espectrofotômetro WPA Biowave II ($A_{260/280} > 1,8$). Para obtenção da primeira fita de cDNA, 1 µg do RNA total foi reversamente transcrito utilizando-se a enzima *SuperScript[®] III reverse transcriptase* (Invitrogen[™]) na presença de 0,4 mM de cada dNTP (Invitrogen[™]), tampão (250 mM Tris-HCL, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) e um iniciador oligo (dT)₁₆-*anchor* (Tabela 1), direcionado para a região da cauda poli(A) dos mRNA. Na extremidade 5' desse iniciador oligo (dT)₁₆ encontra-se um segmento adaptador (*anchor*) de sequência conhecida, estando presente em todas as fitas de cDNA recém sintetizadas. A integridade do cDNA foi avaliada pela amplificação concomitante de uma sequência codificadora para a proteína intracelular actina, através de iniciadores específicos (Tabela 1).

3.4. Amplificação das Sequências de cDNA

A amplificação da sequência de cDNA correspondente a lectina tipo-C foi realizada em presença de iniciadores específicos desenhados a partir de uma única sequência gênica codificante para uma lectina tipo-C da vieira *Argopecten irradians* (número de acesso no *GenBank* EU277646.1) e denominados AiCTL1-F2/R2 (ZHU et al., 2008b) (Tabela 1). A amplificação das sequências foi realizada por PCR (BIOCYCLE[®]) na presença de 1 ul de cDNA, 0,4 µM de cada iniciador, 1 U da enzima *Taq DNA* polimerase (Invitrogen[™]), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂ e 1X tampão (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl). As condições utilizadas foram: desnaturação à 94°C por 10 min; 35 ciclos de amplificação de 94°C por 1 min, 56°C por 1 min e 72°C por 1 min, seguido de uma extensão final de 10 min a 72°C. Os produtos de PCR foram examinados por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo em água destilada (0,01%).

Tabela 1. Nome e sequência dos iniciadores utilizados no presente trabalho

Nome do iniciador	Sequência 5' – 3'
AV1-Fw	TAATCCACATCTGCTGGAAGGTGG
AV2-Rv	TCACCAACTGGGATGACATGG
AiCTL1-F2	TACGTGTCCTTCAGGTTGGATC
AiCTL1-R2	CTCCACACCAGATTGTTGTCA
Oligo (dT) ₁₆ - <i>anchor</i>	GACCACGCGTATCGATGTGCGAC (T) ₁₆ V
M13-Fw	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13-Rv	CAGGAAACAGCTATGACC
NnLec-Fw	GCGGAGGCTGACTGTAGGAAACACAGT
NnLec-Rv	GTCGTTACCTCCGAGCCAGAAATGACCG

V: A/C/G

3.5. Clonagem e Sequenciamento dos Insertos

Para a clonagem foi utilizado o TOPO[®] TA Cloning[®] Kit (Invitrogen[™]). Os produtos de PCR de tamanho esperado (aproximadamente 357 pb) foram ligados a um vetor plasmidial pCR[®] 2.1-TOPO[®] (Invitrogen[®]) utilizando-se a enzima *T4 DNA ligase*. Estes plasmídios foram utilizados para transformar, através de choque térmico, bactérias competentes previamente preparadas *Escherichia coli One Shot TOP10* (Invitrogen[™]). Após transformação, as bactérias foram repicadas para um meio ágar LB na presença de X-GAL (20 µg/ml) e antibiótico (ampicilina – 100 µg/ml) e mantidas a 37°C por 24 h para crescimento. As colônias positivas, contendo potencialmente o gene codificante para a lectina, foram selecionadas e repicadas para crescimento em um novo meio ágar LB com antibiótico (ampicilina - 100 µg/ml) por mais 24 h a 37°C.

A comprovação da presença dos insertos nos plasmídios recombinantes foi realizada através de amplificação do inserto por PCR, diretamente das colônias de bactérias, utilizando

os iniciadores específicos AiCTL1-F2/R2 ou do vetor de clonagem ou plasmidial M13-Fw/Rv (Tabela 1). A PCR ocorreu na presença de parte da colônia bacteriana de interesse, 0,4 μM de cada iniciador, 1 U da enzima *Taq DNA* polimerase (InvitrogenTM), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl_2 e 1X tampão (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), num volume final de 10 μl . As condições de amplificação foram as mesmas utilizadas para a amplificação da sequência gênica da lectina e a confirmação foi feita através de gel de agarose como previamente explicado. Após confirmação, as colônias transformadas tiveram seus plasmídios recombinantes extraídos através de lise alcalina. Os plasmídeos foram então preparados para sequenciamento no sequenciador *MegaBace 1000[®] DNA Analysis System* (GE Healthcare[®]) do Laboratório de Protozoologia (LP) do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC.

3.6 Análise das Sequências Gênicas

As sequências nucleotídica e aminoacídicas deduzidas foram confrontadas e analisadas utilizando-se algoritmos BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>] (ALTSCHUL et al., 1997) a fim de comparar as similaridades com sequências nucleotídicas (BLASTX) e protéicas (BLASTP) de lectinas de outros animais. A obtenção (tradução) e análise das sequências aminoacídicas deduzidas foram estimadas utilizando-se ferramentas virtuais do *ExpASy Proteomics (Expert Protein Analysis System)* [<http://us.expasy.org/tools>], do Instituto Suíço de Bioinformática. Os alinhamentos múltiplos das sequências nucleotídicas e aminoacídicas traduzidas foram realizadas utilizando-se o *software* virtual CLUSTALW [<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>].

3.7. Obtenção da Sequência Gênica Completa da Lectina Tipo-C Através da Técnica RACE (do inglês: *rapid amplification of cDNA ends*)

Na tentativa de se obter a sequência completa da lectina, foi utilizado o kit *SmartTM RACE cDNA Amplification Kit* (Clontech), que permite sintetizar fitas completas de cDNA a partir de sequências parciais já conhecidas, conforme as instruções do fabricante. Utilizando o

cDNA sintetizado e os iniciadores específicos para lectina, foram feitas PCRs na tentativa de amplificar a molécula completa.

3.7.1 Purificação do DNA

Para a obtenção de bandas únicas, utilizamos o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante, a fim de purificar o DNA a partir de uma banda de tamanho esperado, extraída do gel de agarose. O DNA purificado foi utilizado na ligação com o vetor e em seguida foi feita a clonagem.

3.7.2. Desenho dos iniciadores

A fim de otimizar a técnica do RACE, a qual tem um melhor desempenho com iniciadores com cerca de 28 nucleotídeos e temperaturas ótimas de anelação em cerca de 70°C, foram desenhados novos iniciadores específicos a partir da sequência nucleotídica parcial obtida, os quais foram denominados NnLec-Fw/Rw

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo de vieiras da espécie *N. nodosus* vem crescendo nos últimos anos no litoral de Santa Catarina e vem constituindo uma importante fonte de renda principalmente para a população local. No entanto, *N. nodosus* é uma espécie que necessita de intenso manejo devido a dificuldades de seu cultivo. A identificação e caracterização de genes do sistema imune desta espécie permitiriam melhor compreender seus mecanismos de defesa, auxiliando no desenvolvimento de melhores estratégias de controle de doenças e contribuindo, assim, para uma maior sustentabilidade dos cultivos.

Como citado anteriormente, as lectinas do tipo-C (CTLs) são capazes de se ligar a carboidratos específicos e possuem importante papel em diversas respostas imunes de invertebrados, incluindo a aglutinação e opsonização de microorganismos (SIERRA, et al.,

2005; LUO et al., 2006), atividade antibacteriana (SCHRODER et al., 2003) e participação no processo de encapsulamento e melanização de parasitas (LING; YU, 2006).

No que se refere à vieira *N. nodosus*, a ocorrência de lectinas parcialmente dependentes de cálcio em sua hemolinfa foi apenas muito recentemente relatada em nosso laboratório. Como mencionado anteriormente estas lectinas mostraram-se específicas para D-galactose e sialoconjugados (SCHLEDER et al., 2008). Neste estudo, que representou uma continuidade do trabalho de Schleder et al. (2008), buscou-se detectar e caracterizar pelo menos uma lectina da hemolinfa de *N. nodosus*, por abordagem molecular, utilizando iniciadores específicos desenhados a partir da sequência nucleotídica da lectina tipo-C (AiCTL1) de *A. irradians*. Com base nesta abordagem foi possível amplificar uma sequência de cDNA de tamanho esperado (357 pb) em ambos os grupos (desafiado e não desafiado) como mostra a Figura 2.

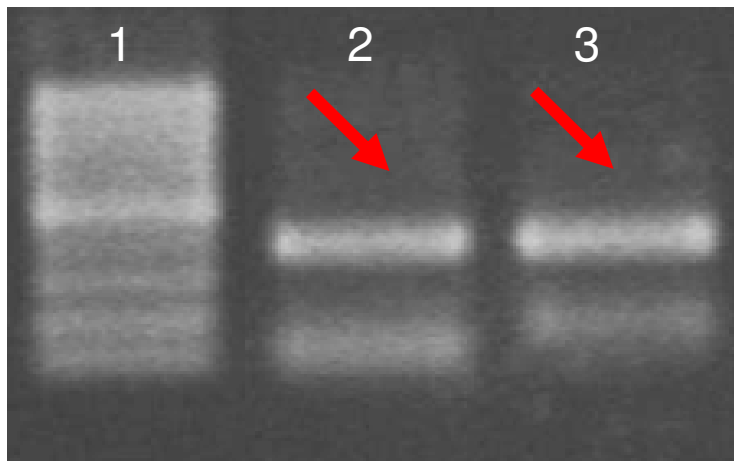


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose (1,2%) corado com brometo de etídio, mostrando a amplificação de bandas de cerca de 357 pb, indicada pelas setas vermelhas, correspondendo à lectina tipo-C de *N. nodosus*. 1: marcador de peso molecular (escala 100 pb); 2: cDNA de *N. nodosus* (D); 3: cDNA de *N. nodosus* (ND)

Por escolha arbitrária decidiu-se utilizar o grupo ND para realizar a clonagem. O produto amplificado foi então clonado em *E. coli* (*One Shot TOP10*, Invitrogen™) e sequenciado. As sequências foram então confrontadas e analisadas através do programa

BLAST (NCBI). Os resultados mostraram que o produto amplificado correspondia a uma sequência parcial de uma lectina tipo-C, que incluía o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) quase completo. As sequências nucleotídica e aminoacídica deduzida da lectina de *N. nodosus*, anotada como NnCTL, estão representadas na Figura 3.

A sequência aminoacídica parcial deduzida da NnCTL apresentou 88% de identidade (BLASTX) com a AiCTL1 de *A. irradians* (ZHU et al., 2008b). Essa alta identidade era esperada, uma vez que sua sequência foi obtida a partir de iniciadores específicos desenhados para a AiCTL1 de *A. irradians*. A NnCTL obtida contém 118 aminoácidos (dos quais 117 fazem parte de seu CRD) e representa cerca de 70% da lectina completa descrita em *A. irradians* (Fig. 4). A NnCTL abrange a quase totalidade do CRD (90%) com base no CRD da AiCTL1 de *A. irradians*.

Outra *assinatura molecular* típica da família das lectinas tipo-C, é a presença de cisteínas, implicadas na formação de pontes de dissulfeto. Foram encontradas 4 cisteínas na NnCTL, sendo duas implicadas na formação de pontes internas de dissulfeto (Cys³⁰ e Cys¹⁰⁵) e duas cisteínas adicionais localizadas próximas à região N-terminal (Cys² e Cys¹³) da molécula (Figs. 3 e 4), com base na sequência da AiCTL1 (ZHU et al., 2008).

1	tacgtgtccttcaggttggatcgagttaaccaagaatgcttttggtttgggtcatccaa	60
	<u>T C P S G W I E F N Q E C F W F G S S K</u>	20
61	gaagacgtggaatgatgcgaggctgactgtaggaaacacagtagctacctgaccacaga	120
21	<u>K T W N D A E A D C R K H S S Y L T T D</u>	40
121	cgataatctagaaaagcacaacttcttgaaagtatacctcaacatattccaactcctggaa	180
41	<u>D N L E K H N F L K V Y L N I F H S W K</u>	60
181	gctcggtcatttctggctcggaggtaacgacttggctgtagagaaccattggcgttggtt	240
61	<u>L G H F W L G G N D L A V E N H W R W F</u>	80
241	cgaatctggttcgggataggtaccacaacgttctgggacgtaggccagcccagcggtaa	300
81	<u>E S G S G I G S T T F W D V G Q P D G N</u>	100
301	caactccgctaactgtatgtccttctatatgaatgctgacaacaatctggtgtggag	
101	<u>N S A N C M S F Y M N A D N N L V W</u>	

Figura 3: Sequências nucleotídica e aminoacídica deduzida da lectina tipo-C de *N. nodosus* (NnCTL). O domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) está sublinhado, os dois

resíduos de cisteína implicados na formação de pontes de dissulfeto estão destacados em azul. Os dois resíduos de cisteína adicionais da região N-terminal estão destacados em preto e o motivo QPD (Gln-Pro-Asp) que se liga à galactose está contornado.

A sequência aminoacídica da NnCTL (BLAST P) mostrou ainda similaridade com sequências de CTLs de vários outros grupos de animais, como a CTL da ostra *Crassostrea gigas* (41%), do robalo *Dicentrarchus labrax* (35%), da perca amarela *Perca flavescens* (35%) e do *Homo sapiens* (32%), entre outras. Todas essas lectinas contêm pelo menos um CRD, com quatro resíduos de cisteína conservados, envolvidos na formação de duas pontes de dissulfeto, além dos dois resíduos adicionais de cisteína na posição N-terminal.

No alinhamento entre as sequências aminoacídicas da CTL de *N. nodosus* (parcial) e a sequência AiCTL1 não se observou nenhum *gap*. Dos 118 aminoácidos da NnCTL, 105 são idênticos aos da AiCTL1, 4 são muito similares e apenas 4 são pouco similares (Fig. 4).

AiCTL1	1	RHEANTVTLKMAASWILFTSVAFSGFFLVLS	C PSGWIEFNQ E CF	FLGASKKDWNDAEAD	60
NnCTL	1	-----	T CP	SGWIEFNQ E CFWFGSSKKTWNDAEAD	29
			*****	*.*	*****
AiCTL1	61	C RRHSSYLSTDDNAEKHSFLKTYLNI	FHSWKLGHFWLGGNDLAVEN	SWRWFESGHAIGPA	120
NnCTL	30	C RKHSSYLSTDDNLEKHNFLKVYLNI	FHSWKLGHFWLGGNDLAVEN	HWRWFESGSGIGST	89
		.*	***	*****	*.*
AiCTL1	121	TFWDVGP	Q PD G NNSANC M SFYMNADNNLVWRDR	C TARYNYI C EQNATASTPMPVVG	176
NnCTL	90	TFWDVGP	Q PD G NNSANC M SFYMNADNNLVW	-----	118
		*****	*****		

Figura 4: Alinhamento da sequência parcial aminoacídica deduzida da CTL de *N. nodosus* (NnCTL) com a sequência aminoacídica da AiCTL1 de *A. irradians* (EU277646.1). Resíduos de aminoácidos idênticos entre ambas as sequências estão indicados, na linha inferior, por asterisco (*). Os hífens indicam *gaps* e os símbolos (.) e (:) indicam resíduos de aminoácidos pouco e muito similares, respectivamente. Os dois resíduos de cisteína implicados na formação de pontes de dissulfeto estão destacados em azul. Os dois resíduos de cisteína adicionais da região N-terminal estão destacados em preto e o motivo QPD (Gln-Pro-Asp) que se liga à galactose está contornado. Os outros dois resíduos de cisteína implicados na formação de pontes de dissulfeto estão destacados em vermelho.

Lectinas tipo-C podem se ligar a carboidratos de maneiras específicas e já foi comprovado que a posição dos doadores e aceptores de hidrogênio no CRD determina a especificidade com o carboidrato. A maioria das lectinas possui o motivo EPN, porém a NnCTL apresenta um motivo QPD assim como a AiCTL. A afinidade da NnCTL por galactose está em acordo com os resultados obtidos por Schleder et al. (2008) que descreveu a presença de lectinas com especificidade para D-galactose na hemolinfa de *N. nodosus*.

Curiosamente, apesar da alta similaridade com a AiCTL1, a NnCTL não mostrou identidade com a outra lectina detectada em *A. irradians*, denominada de AiLec (ZHU et al., 2008a), ou com as lectinas descritas no pectinídeo, *Chlamys farreri*.

As CTLs AiLec de *A. irradians* e CfLec-1, CfLec-2, CfLec-3 e CfLec-4 de *C. farreri*, possuem motivos EPD (Glu-Pro-Asp), tendo assim uma especificidade por D-manose (ZHANG et al., 2009b) e não por D-galactose como a NnCTL e a AiCTL1. Estes resultados sugerem, assim, que lectinas específicas para açúcares distintos diferem não apenas no seu motivo molecular de ligação a carboidratos, mas também no seu CRD e estrutura molecular geral, apesar de co-existirem na mesma espécie.

As CfLec-3 e CfLec-4 são lectinas com múltiplos domínios, apresentando além do motivo EPD, o motivo EPN. Com isso, foi proposto que a especificidade das CTLs é determinada não só pela orientação dos doadores e receptores de hidrogênio, mas também pela sua estrutura como um todo (ZHANG et al., 2009b). Ademais, estudos recentes têm demonstrado que lectinas de organismos marinhos possuem uma grande diversidade em relação a seus carboidratos ligantes. Por exemplo, lectinas da ostra *Ostrea edulis* têm especificidade para ambas, D-galactose e D-manose (MINAMIKAWA et al., 2004).

No estudo realizado por Schleder et al. (2008), os autores mostraram que além de uma forte afinidade por ácido siálico e D-galactose, as lectinas da hemolinfa de *N. nodosus* apresentavam também uma fraca afinidade por D-manose. Os autores não isolaram as lectinas da hemolinfa de *N. nodosus* e portanto não é possível determinar se existe apenas uma lectina com múltiplos motivos de ligação a diferentes açúcares (hipótese menos provável) ou se ocorrem diferentes lectinas com apenas um motivo de ligação a carboidratos (hipótese mais provável). A sequência NnCTL obtida no presente estudo apresenta apenas um motivo de ligação ao carboidrato galactose (QPD), o que parece reforçar a segunda hipótese, apesar de sua sequência não estar completa. Contudo a AiCTL1, cuja sequência encontra-se completa, apresenta apenas o motivo QPD, o que nos faz acreditar que o mesmo deva ocorrer também com a sequência completa da NnCTL. Sendo assim, a hipótese de diferentes lectinas em *N.*

nodosus parece mais provável e a fraca afinidade das lectinas da hemolinfa por manose, poderia ser explicada por uma menor abundância deste tipo de lectina na hemolinfa em relação a que se liga a galactose. Seria interessante detectar também a(s) lectina(s) com afinidade para ácido siálico, já que a hemolinfa de *N. nodosus* mostrou forte afinidade/especificidade para este carboidrato e seus conjugados.

Quanto ao desafio realizado com componentes da parede de patógenos, ambos os grupos, o desafiado e o não desafiado, expressaram mRNA para esta lectina, o que significa que sua produção é constitutiva. Porém, não foi realizado um PCR em tempo real para saber se a expressão deste mRNA foi de fato modulada pelo desafio. Zhu et al. (2008b) mostraram que a expressão da AiCTL1 é modulada em *A. irradians* por injúrias e desafio bacteriano, sugerindo que esta proteína participe dos processos de cicatrização de feridas e na resposta imune desta vieira. Se a similaridade entre AiCTL1 e NnCTL abranger também suas funções, é plausível supor que a expressão da NnCTL possa também ser modulada em vieiras desafiadas, apesar de haver uma produção basal constitutiva desta PRP.

Durante este estudo tentou-se obter a sequência completa da NnCTL através da técnica RACE. A aplicação desta técnica resultou na síntese completa da fita de cDNA codificante para a lectina, a qual foi utilizada para amplificação com os iniciadores AiCTL-F2/R2. O resultado da amplificação gerou diversas bandas no gel de eletroforese e conseqüentemente foi realizada a purificação da banda de tamanho esperado (~600pb) a partir do próprio gel. O produto obtido com a purificação foi utilizado para clonagem. Infelizmente, porém, não foi possível amplificar o inserto nas colônias de bactérias por PCR. Esse resultado possivelmente se deve ao fato da ligação do produto ao vetor não ter sido bem sucedida, já que por PCR confirmou-se a presença do vetor nas bactérias.

Na tentativa de otimizar o resultado da técnica RACE, novos iniciadores foram desenhados e utilizados. Mas apesar de diversas tentativas não foi possível amplificar uma banda de tamanho esperado. Considerando que os iniciadores estão apropriados, as dificuldades encontradas para amplificar as sequências esperadas devem derivar certamente da própria técnica (kit) RACE, que infelizmente nem sempre funciona.

Em conclusão, neste trabalho foi possível detectar, clonar e sequenciar, a partir da hemolinfa de *N. nodosus*, uma sequência parcial de uma lectina tipo-C com motivo de ligação à D-galactose e que provavelmente participa da resposta imune desta vieira.

Este resultado contribui para um maior entendimento do sistema imune de vieiras, quanto à produção de uma molécula que poderia servir de imunomarcador para monitorar o

estado de saúde das vieiras, contribuindo assim para um maior controle das condições de cultivo dessa espécie de importância comercial.

5. CONCLUSÕES

- Através da técnica de RT-PCR foi possível amplificar uma sequência parcial codificante para uma lectina tipo-C a partir de hemócitos da vieira nativa *Nodipecten nodosus*, denominada de NnCTL;
- A NnCTL parcial apresentou 88% de similaridade aminoacídica com a sequência correspondente AiCTL descrita na vieira *Argopecten irradians*;
- A sequência parcial da NnCTL corresponde a cerca de 70% da molécula completa, e compreende cerca de 90% do seu CRD em relação a AiCTL1;
- A sequência parcial da NnCTL apresentou quatro cisteínas das quais duas estão implicadas na formação de pontes de dissulfeto;
- Assim como a AiCTL, a NnCTL apresenta um motivo QPD em seu CRD, que lhe confere especificidade para D-galactose e confirma sua afinidade por esse carboidrato;

- A lectina tipo-C é expressa constitutivamente, mas a modulação de sua expressão em situações de estresse não pode ser descartada;
- Não foi possível obter a sequência completa da NnCTL pela técnica RACE.

6. PERSPECTIVAS

- Na continuação deste trabalho, pretende-se obter a sequência completa da NnCTL, utilizando novos iniciadores com base nas extremidades da molécula AiCTL1;
- Pretende-se ainda avaliar se a expressão quantitativa desta molécula funciona como imunomarcador das condições de saúde da vieira visando um maior controle do cultivo dessa espécie de importância comercial

REFERÊNCIAS

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

ARASON, G. J. Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 6, p. 277–289, 1996.

BARRACCO, M. A.; DA SILVA, P. M. Hemolinfa e Sistema Imune. In: RESGALLA, C. J.; CONCEIÇÃO, M. B.; WEBER, L. I. (eds). **O Mexilhão Perna perna (L.): Biologia, Ecologia e Aplicações**. Rio de Janeiro: Interciência, p. 85-103, 2008.

BERNADINO, T. S. **A Comercialização de Vieiras na região de Florianópolis**. Florianópolis: UFSC, 2007. 66 f., Relatório de Estágio de Conclusão de Curso de Engenharia de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000. Disponível em: < <http://www.tcc.cca.ufsc.br/agronomia/ragr39.pdf> >. Acesso em 08 de dezembro de 2009.

EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **Culturas e Criações: Mexilhões, Ostras e Vieiras**. Disponível em: <www.epagri.rct-sc.br>. Acesso: 31 de outubro de 2009.

DALLANHOL, H. **Fazendas marinhas diversificam produção**. FAPESC – Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina, 2007. Disponível em: <<http://www.fapesc.rct-sc.br/noticias.php?id=162>>. Acesso em 09 de dezembro de 2009.

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

LING, E.; YU, X. Q. Cellular encapsulation and melanization are enhanced by immunectins, pattern recognition receptors from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 30, p. 289–299, 2006.

LIU, Y.; LI, Z.; LIN, Q.; KOSINSKI, J.; SEETHARAMAN, J.; BUJNICKI, J. M.; SIVARAMAN, J.; HEW, C. L. Structure and Evolutionary Origin of Ca²⁺-Dependent Herring Type II Antifreeze Protein. **PLoS ONE**, v. 2, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1891086/>>. Acesso em outubro de 2009.

LUO, T.; YANG, H.; LI, F.; ZHANG, X.; XU, X. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 30, p. 607–617, 2006.

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

MEDZHITOV, R.; JANEWAY JR., C. A. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell**, v.91, p. 295-298, 1997.

MINAMIKAWA, M.; HINE, M.; RUSSELL, S.; HUBER, P.; DUIGNAN, P.; LUMSDEN, J. S. Isolation and partial characterization of a calcium-dependent lectin (chiletin) from the haemolymph of the flat oyster, *Ostrea chilensis*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 17, p. 463-476, 2004.

PEREIRA, A. **Estudo da flora associada à larvicultura de *Nodipecten nodosus* (LINNAEUS, 1758 – BIVALVIA: PECTINIDAE)**. Florianópolis: UFSC, 2000. 86 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Curso de Pós-Graduação em Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

QIU, L.; SONG, L.; XU, W.; NI, D.; YU, Y. Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from Zhikong Scallop, *Chlamys farreri*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 22, p. 451-466, 2007.

RUPP, G. S.; BEM, M. M. de. Cultivo de vieiras. In: POLI, C. R.; POLI, A. T. B.; ANDREATTA, E. R.; BELTRAME, E (Orgs.). **E. Aquicultura: Experiências brasileiras**. Florianópolis: UFSC; Multimídia, 2004. p. 289-308.

RUPP, G. S. ; PARSON, G. J. Scallop aquaculture and fisheries in Brazil. In : SHUMWAY, S. E. ; PARSONS, G. J. **Scallop: biology, ecology and aquaculture**. Oxford: Elsevier, p. 1225-1245, 2006. Disponível em : <<http://books.google.com.br/books?id=1qvoa2ULLD4C&pg=PP1&dq=scallops#v=onepage&q=&f=false>>. Acesso em 27 de outubro de 2009.

SCHLEDER, D. D.; KAYSER, M.; SÜHNEL, S.; FERREIRA, J. F.; RUPP, G. S.; BARRACCO, M. A. Evaluation of hemato-immunological parameters during the reproductive cycle of the scallop *Nodipecten nodosus* in association with a carotenoid-enriched diet. **Aquaculture**, v. 280, p. 256-263, 2008.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**. v. 14, p. 53R-62R, 2004.

SIERRA, C.; LASCURAIN, R.; PEREYRA, A.; GUEVARA, J.; MARTÍNEZ, G.; AGUNDIS, C.; ZENTENO, E.; VÁZQUEZ, L. Participation of serum and membrane lectins on the oxidative burst regulation in *Macrobrachium rosenbergii* haemocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 29, p. 113–121, 2005.

SCHRODER, H. C.; USHIJIMA, H.; KRASKO, A.; GAMULIN, V.; THAKUR, N. L.; DIEHL-SEIFERT, B.; MÜLLER, I. M.; MÜLLER, W.E. Emergence and disappearance of an immune molecule, an antimicrobial lectin, in basal metazoa. A tachylectin-related protein in the sponge *Suberites domuncula*. **The Journal of Biological Chemistry** v. 278, p. 32810–32817, 2003.

VARGAS-ALBORES, F.; BARRACO, M. A. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalves con énfasis en pectínidos. In: MAEDA-MARTÍNEZ, A. N. (Org.). **Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura**. La Paz: Limusa, 2001. Cap. 7, p. 127-140.

WANG, H.; SONG, L.; LI, C.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; NI, D.; XU, W. Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 722–73, 2007.

WEIS, W. I.; TAYLOR, M. E.; DRICKAMER, K. The C-type lectin superfamily in the immune system. **Immunology Reviews**, v. 163, p. 19–34, 1998.

ZHANG, H.; WANG, H.; WANG, L.; SONG, X.; ZHAO, J.; QIU, L.; LI, L.; CONG, M.; SONG, L. A novel C-type lectin (Cflec-3) from *Chlamys farreri* with three carbohydrate-recognition domains. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 26, p. 707-715, 2009a.

ZHANG, H.; WANG, H.; WANG, L.; SONG, L.; SONG, X.; ZHAO, J.; LI, L.; QIU, L. Cflec-4, a multidomain C-type lectin involved in immune defense of Zhikong scallop *Chlamys farreri*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, p. 780–788, 2009b.

ZHENG, P.; WANG, H.; ZHAO, J.; SONG, L.; QIU, L.; DONG, C.; WANG, B.; GAI, Y.; MU, C.; LI, C.; NI, D.; XING, K. A lectin (CfLec-2) aggregating *Staphylococcus haemolyticus* from scallop *Chlamys farreri*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 24, p. 286-293, 2008.

ZHU, L.; SONG, L.; XU, W.; QIAN, P. Y. Identification of a C-type lectin from the bay scallop *Argopecten irradians*. **Molecular Biology Reports**, v. 36, p. 1167-1173, 2008a.

ZHU, L.; SONG, L.; XU, W.; QIAN, P. Y. Molecular cloning and immune responsive expression of a novel C-type lectin gene from bay scallop *Argopecten irradians*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 25, p. 231-238, 2008b.