

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2009.03.05	(73) Titular(es): VIB VZW	
(30) Prioridade(s): 2008.03.05 US 33830	RIJVISSCHESTRAAT 120 9052 GENT	BE
(43) Data de publicação do pedido: 2010.12.29	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: 2015.04.22	FRANK VAN BREUSEGEM	BE
175/2015	JAN STAELENS*	BE
	MARNIK VUYLSTEKE	BE
	(74) Mandatário:	
	NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO	
	RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **NOVA HORMONA DE GLÂNDULA ANDROGÉNICA DE CRUSTÁCEOS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UMA NOVA HORMONA DE GLÂNDULA ANDROGÉNICA DE CRUSTÁCEOS. MAIS ESPECIFICAMENTE, A INVENÇÃO REFERE-SE A UMA HORMONA DE GLÂNDULA ANDROGÉNICA DERIVADA DE PENAEUS MONODON. A INVENÇÃO REFERE-SE AINDA À UTILIZAÇÃO DA REFERIDA HORMONA PARA INFLUENCIAR A PROPORÇÃO DOS SEXOS EM CULTURAS DE GAMBAS E CAMARÕES, E PARA ESTABELECEER CULTURAS MONOSSEXO. REFERE-SE TAMBÉM À UTILIZAÇÃO DA HORMONA E O SEU GENE OU FRAGMENTOS DO MESMO NA DETERMINAÇÃO DO SEXO

RESUMO

"NOVA HORMONA DE GLÂNDULA ANDROGÉNICA DE CRUSTÁCEOS"

A presente invenção refere-se a uma nova hormona de glândula androgénica de crustáceos. Mais especificamente, a invenção refere-se a uma hormona de glândula androgénica derivada de *Penaeus monodon*. A invenção refere-se ainda à utilização da referida hormona para influenciar a proporção dos sexos em culturas de gambas e camarões, e para estabelecer culturas monossexo. Refere-se também à utilização da hormona e o seu gene ou fragmentos do mesmo na determinação do sexo.

DESCRIÇÃO

"NOVA HORMONA DE GLÂNDULA ANDROGÉNICA DE CRUSTÁCEOS"

A presente invenção refere-se a uma nova hormona de glândula androgénica de crustáceos. Mais especificamente, a invenção refere-se a uma hormona de glândula androgénica derivada de *Penaeus monodon*. A invenção refere-se ainda à utilização da referida hormona para influenciar a proporção dos sexos em culturas de gambas e camarões, e para estabelecer culturas monossexo. Refere-se também à utilização da hormona e o seu gene ou fragmentos do mesmo na determinação do sexo.

O cultivo e comércio de gambas e camarões é uma atividade muito importante em todo o mundo. As principais espécies em cultivo são *Penaeus monodon* (camarão tigre gigante, camarão tigre jumbo, gamba tigre jumbo, camarão tigre preto, camarão tigre azul, camarão grass ...), cultivada principalmente na Ásia, com uma produção aquícola de cerca de 600.000 toneladas em 2003; e *Penaeus vannamei* (camarão whiteleg, camarão branco), cultivada principalmente nas Américas e na China e na Tailândia, com uma produção aquícola que é comparável ao *P. monodon*. Para essas espécies, a aquicultura é muito mais importante do que a captura.

A demanda crescente para a produção aquícola significa uma pressão crescente do desenvolvimento de sistemas de produção mais eficientes.

Uma vez que a maioria dos *Penaeus* sp. são sexualmente dimórficos (Hansford e Hewitt, 1994), um grande esforço

tem sido feito na criação de culturas monossexo. A esse respeito, vários grupos têm tentado desenvolver marcadores sexuais confiáveis (Khamnamtong *et al.*, 2006). Alternativamente, culturas monossexo poderiam ser obtidas pela secreção *in vitro* da hormona sexual androgénica a partir da glândula androgénica, tal como divulgado no documento US6740794. Embora esta possa ser uma abordagem interessante, é dificultada pelo facto de que a estrutura da hormona de glândula androgénica, ou do gene que codifica não é conhecida. Recentemente Manor *et al.* (2007) descreveram um gene semelhante à insulina que é expresso exclusivamente na glândula androgénica do lagostim australiano macho *Cherax quadricarinatus*. Este pode ser um gene candidato interessante, que possivelmente codifica para a hormona da glândula androgénica, mas o seu efeito ainda não foi demonstrado. Além disso, não há homólogos em gambas ou camarões conhecidos hoje. A procura por sequências homólogas é dificultada pelo facto de que apenas um número limitado de sequências de gambas e camarões está disponível nas bases de dados, e pelo facto de que a homologia entre espécies é provavelmente baixa - se houver.

Surpreendentemente, num ensaio de perfil transcriptómico com base em AFLP no camarão tigre preto (*Penaeus monodon*), identificamos 2 fragmentos de DNA específicos de glândula androgénica homólogos à "hormona da glândula androgénica" de isópode e fator de "glândula androgénica semelhante à insulina" de lagostim. Através de mais sequenciações de cDNA e experiências de RACE, identificamos quatro mRNAs, denominados PmAGH1, PmAGH2, PmAGH3 e PmAGH4, muito provavelmente provenientes de um único gene por splicing alternativo. Ainda mais surpreendente, o tratamento de

camarões juvenis geneticamente fêmeas utilizando Pm_AGH1, Pm_AGH2, PmAGH3 e/ou PmAGH4 recombinante, teve efeitos masculinizantes. Camarões juvenis geneticamente machos foram feminizados pelo silenciamento (*knock-down*) mediado por dsRNA de Pm_AGH1, Pm_AGH2, PmAGH3 e/ou PmAGH4.

Um primeiro aspeto da invenção é uma proteína isolada selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 9 e SEQ ID N° 12, ou uma sua mutante ou variante. De preferência, a referida proteína é isolada de uma espécie *Penaeus*, mais preferencialmente é isolada de *Penaeus monodon*. Os mutantes e variantes, como descrito aqui, estão mutantes e variantes com pelo menos 50% de identidade, como medido num BLASTp (Altschul *et al.*, 1997). De preferência, os referidos mutantes e variantes são biologicamente ativos, tal como medido através do seu efeito hormonal (masculinização; ou feminização quando atua como um composto negativo dominante). Os referidos mutantes e variantes estão a reter a capacidade de masculinização das proteínas isoladas com as SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 9 ou SEQ ID N° 12 em camarões juvenis.

Outro aspecto da invenção é um fragmento de ácido nucleico, que codifica uma proteína de acordo com a invenção. Fragmento de ácido nucleico, tal como se utiliza aqui, pode ser qualquer ácido nucleico, incluindo, mas não limitado a RNA mensageiro, DNA de cadeia simples, DNA de cadeia dupla, incluindo DNA genómico, possivelmente com a sua organização intrão-exão. Na sua forma mais simples, o fragmento de ácido nucleico é limitado à sequência de codificação, mas pode compreender outras sequências, tais como, mas não limitados a, sequências não traduzidas 5' e

3', sequências reguladoras tais como sequências promotoras e terminadoras, e intrões. De preferência, o referido fragmento de ácido nucleico compreende as SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 8 ou SEQ ID N° 11 (sequências de codificação).

Ainda outro aspeto da invenção é um fragmento de ácido nucleico, que compreende as SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 7 ou SEQ ID N° 10 (mRNA) ou a SEQ ID N° 13 (gDNA), ou o seu complemento, ou um seu fragmento funcional. Um fragmento funcional, tal como utilizado aqui é, como exemplo não limitativo, um fragmento que pode ser utilizado como iniciador para deteção, ou um fragmento que pode ser utilizado como RNA antissentido ou como RNAi para regular negativamente a expressão.

Outro aspeto da invenção é a utilização de uma proteína de acordo com a invenção para modificar a proporção dos sexos em gambas ou camarões. De preferência, as referidas gambas ou camarões pertencem à família *Penaeidae*, ainda mais preferencialmente a referida gamba ou camarão é uma espécie *Penaeus*, mais preferencialmente a referida gamba ou camarão é *Penaeus monodon*.

Ainda outro aspeto da invenção é a utilização de um fragmento de ácido nucleico de acordo com a invenção para modificar a proporção dos sexos em gambas ou camarões. De preferência, as referidas gambas ou camarões pertencem à família *Penaeidae*, ainda mais preferencialmente a referida gamba ou camarão é uma espécie *Penaeus*, mais preferencialmente a referida gamba ou camarão é *Penaeus monodon*.

Ainda outro aspeto da invenção é a utilização de uma sequência de ácido nucleico de acordo com a invenção para determinar o sexo em gambas ou camarões. De preferência, as referidas gambas ou camarões pertencem à família *Penaeidae*, ainda mais preferencialmente a referida gamba ou camarão é uma espécie *Penaeus*, mais preferencialmente a referida gamba ou camarão é *Penaeus monodon*. Com efeito, com base na sequência apresentada, é óbvio para o especialista na técnica desenvolver iniciadores que podem ser utilizados para medir a expressão do gene específico da glândula androgénica.

Ainda outro aspeto da invenção é um método para estabelecer uma cultura monossexo em gambas ou camarões, que compreende a utilização de uma proteína e/ou um ácido nucleico de acordo com a invenção. De preferência, as referidas gambas ou camarões pertencem à família *Penaeidae*, ainda mais preferencialmente a referida gamba ou camarão é uma espécie *Penaeus*, mais preferencialmente a referida gamba ou camarão é *Penaeus monodon*. Com efeito, através da injeção da proteína em animais jovens pós-larvas, as fêmeas podem ser convertidas em machos. Alternativamente, a expressão e/ou a injeção de RNA antissentido, dsRNA e/ou RNAi irá reprimir a expressão da proteína específica da glândula androgénica, e feminiza os animais. Como alternativa, os anticorpos, de preferência os anticorpos de cadeia simples ou anticorpos de camelídeos ou fragmentos de anticorpos, tais como nanocorpos contra as proteínas da invenção podem ser utilizados para feminizar as gambas ou camarões. Pela utilização da proteína purificada, ou os seus fragmentos, a geração de anticorpos é um processo conhecido do especialista na técnica.

Outro aspeto da invenção é um método para estabelecer uma cultura monossexo em gambas ou camarões, que compreende a determinação do sexo utilizando um ácido nucleico de acordo com a invenção. De preferência, as referidas gambas ou camarões pertencem à família *Penaeidae*, ainda mais preferencialmente a referida gamba ou camarão é uma espécie *Penaeus*, mais preferencialmente a referida gamba ou camarão é *Penaeus monodon*. Alternativamente, uma proteína de acordo com a invenção também poderia ser utilizada na determinação do sexo, especialmente em combinação com um anticorpo contra a proteína de acordo com a invenção, como descrito acima. Tal anticorpo pode ser utilizado, como exemplo não limitativo, num ensaio ELISA para testar a concentração da proteína específica da glândula androgénica presente no animal.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: vista geral esquemática do DNA genómico que codifica a hormona da glândula androgénica, e os RNAs mensageiros dele derivados através de splicing alternativo.

EXEMPLOS

Materiais e métodos para os exemplos:

Amostragem

Foi dissecado tecido na base da quinta pata, onde supõe-se que a glândula androgénica está situada, de machos maduros. Foi dissecado tecido de controlo de localização idêntica nas fêmeas. As amostras de músculo foram tomadas

da cauda de machos e fêmeas adultos. Todas as amostras foram imediatamente congeladas em azoto líquido e armazenadas a -70 °C até a preparação do RNA.

cDNA-AFLP

Amostras de glândulas androgénicas congeladas rapidamente (n = 4), amostras de tecido circundante de controlo (n = 2) e amostras do músculo (n = 6) foram pulverizadas utilizando almofariz e pilão sob azoto líquido. O RNA total foi isolado utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen). A qualidade do RNA foi avaliada espectrofotometricamente (Nanodrop) e por electroforese em gel. O RNA de alta qualidade (2,5 µg) foi convertido em cDNA de cadeia dupla utilizando um iniciador oligo-dT biotinilado. Após purificação do cDNA de cadeia dupla (kit de purificação de PCR Qiaquick, Qiagen) a qualidade e o rendimento foram analisados por electroforese em gel.

Modelos de AFLP foram preparados por digestão de restrição dos cDNA de cadeia dupla utilizando BstYI. Os fragmentos da extremidade 3' foram isolados utilizando Dynabeads magnéticos revestidos com estreptavidina (Dyna) e digeridos adicionalmente utilizando MseI. Adaptadores específicos do local de restrição foram ligados às extremidades dos fragmentos.

A mistura adaptador-ligadura foi diluída duas vezes até um volume total de 100 µL. A amplificação utilizando um iniciador específico de BstYI com um T (BstYI-T+0) ou C (BstYI-C+0) na sua extremidade 3', em combinação com um iniciador específico para MseI dividiu o conjunto de fragmentos em dois. Amplificação específica de 5 µL das

misturas de pré-amplificação diluídas 600 vezes foi realizada utilizando o iniciador BstYI-C/T marcado com ^{33}P com um nucleótido seletivo adicional na sua extremidade 3' em combinação com o iniciador MseI com dois nucleótidos seletivos. Neste cenário, 128 combinações de iniciadores foram necessárias para rastrear o conjunto completo de fragmentos de transcrição.

Após a amplificação, as amostras foram separadas num gel de sequenciação de poliacrilamida a 5%. Foi incluído um padrão de dimensionamento 10 pb marcado com ^{33}P . Depois da execução e secagem a vácuo em papel whatmann, o gel foi analisado num Phosphorimager.

Análise da sequência de fragmentos de cDNA-AFLP.

Quando os fragmentos de cDNA-AFLP foram cortados do gel para análise de sequência, o gel foi exposto a um autorradiograma Biomax MR (Kodak). Os géis foram revestidos com o filme revelado e os fragmentos relevantes foram cortados do gel. O DNA foi dissolvido em tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM) e novamente amplificado utilizando os iniciadores seletivos BstYI e MseI. A amplificação foi verificada por electroforese em gel e os fragmentos foram sequenciados diretamente utilizando o iniciador seletivo BstYI ou MseI.

Pesquisa de homologia utilizando as sequências obtidas.

A base de dados não redundante de sequência de proteínas e uma base de dados de sequência de DNA compilada internamente contendo todas as sequências de DNA disponíveis de invertebrados foram pesquisadas quanto a

sequências homólogas à sequência do fragmento de cDNA-AFLP. Um algoritmo desenvolvido internamente pesquisou primeiro a base de dados de proteínas para sequências homólogas à sequência de consulta traduzida (em todas as 6 possíveis estruturas de leitura) (pesquisa blastx). Quando nenhuma homologia foi encontrada, a base de dados de DNA de invertebrados foi pesquisada quanto a sequências homólogas de DNA (pesquisa blastn). Quando foi identificada homologia a uma sequência de DNA, uma pesquisa blastx foi realizada com este acerto. Quando nenhuma homologia foi encontrada na base de dados de DNA de invertebrados, foi realizada uma pesquisa tblastx, em que a homologia foi pesquisada na base de dados de DNA traduzido utilizando a sequência de consulta traduzida.

Análise RACE de genes putativos da hormona da glândula androgénica.

Análise de Amplificação Rápida das Extremidades do cDNA (RACE, *Rapid Amplification of cDNA Ends*) foi realizada utilizando o kit de amplificação de cDNA BD SMART RACE (BD Biosciences). O RNA total de alta qualidade (1 µg) de tecido da glândula androgénica foi convertido em cDNA pronto para RACE 5' e RACE de cDNA pronto para RACE 3' de acordo com as instruções do fabricante. 5' e RACE 5' aninhado foram efectuados utilizando os iniciadores AGHRACE_Rev1 (5'-TATGACAGAAACCGCCAGGGGAGAC-3') e AGHRACE_Rev2 (5'-AGGTACCGGGTCCTCGCAATACTCC-3'), respectivamente. 3' e RACE 3' aninhado foram realizados utilizando os iniciadores AGHRACE_Fw1 (5'-CTGGCGGTTTCTGTCATATGCGATG-3') e AGHRACE_Fw2 (5'-GTCTCCCCTGGCGGTTTCTGTCATA-3'), respectivamente. Apenas um fragmento distinto foi amplificado tanto na extremidade 5'

como RACE 5' aninhada, enquanto dois fragmentos distintos foram amplificados na 3' e RACE 3' aninhada. Os fragmentos foram isolados do gel e clonados utilizando o kit de clonagem TOPO TA para sequenciação (Invitrogen). Os fragmentos clonados foram sequenciados utilizando os iniciadores padrão T7 e SP6. As sequências foram manualmente curadas e montadas utilizando os pacotes de software phredPhrap e consed (Ewing *et al*, 1998; Ewing e Green, 1998; Gordon *et al*, 1998).

Com base na sequência de cDNA de consenso obtida nas experiências RACE, foram concebidos iniciadores para a amplificação do cDNA completo. Os iniciadores diretos AGHRT_3 (5'-ACACAGGACAGGGCAAGTTC-3') e AGHRT_1 (5'-TCCCTCCACAAAAACCACTC-3') foram usados em combinação com os iniciadores reversos AGHRT_12 (5'-TCTGGGGCCTATTAATCGAA-3') e AGHRT_16 (5'-ACGTTTCGGAAAATCGAAAGAT-3'). Os tamanhos dos fragmentos de PCR eram de acordo com o que era esperado a partir das experiências RACE e a sequenciação dos fragmentos confirmou as sequências anteriormente obtidas por RACE.

Sequenciação genômica de genes putativos da hormona da glândula androgénica.

Utilizando os iniciadores AGHFULL2_FW (5'-GTGCTGCCACACACAGGAC_-3') e AGHPC3_FW (5'-GCACGCCCTCGTCAAG-3') em combinação com o iniciador AGHFULL2_REV (5'-TCAAGAATTACTCTGGGGCCTA-3') e o iniciador AGH_indel1 (5'-CCAGTACCGCCTGCATCC-3') em combinação com o iniciador AGH_indel2 (5'-GGCTCACCAGGTGGTCTCT-3'), amplificamos por PCR os fragmentos que se sobrepõem do gene AGH no DNA genómico. Informações adicionais da sequência foram

obtidas utilizando o kit Genome Walker Universal (Clontech). O DNA genômico foi isolado de vários camarões fêmeas e agrupado. Foram preparadas bibliotecas de DNA de acordo com as instruções do fabricante e reações de amplificação primárias de 5' e 3' foram realizadas utilizando os iniciadores AGHRACE_REV1 e AGHRACE_FW1 (ver acima), respectivamente. Foram realizadas reações de amplificação aninhadas utilizando os iniciadores AGHRACE_REV2 e AGHRACE_FW2 (ver acima), respectivamente. Foi montada uma sequência genômica parcial, incluindo a região 3' UTR completa das sequências de mRNA até a cauda poli-A, utilizando os pacotes de software phredPhrap e consed.

Clonagem e expressão de proteínas recombinantes de genes putativos da hormona da glândula androgénica.

A sequência de codificação completa foi expressa num hospedeiro de levedura (*Pichia pastoris*), para garantir enrolamento e glicosilação corretas da proteína recombinante.

Produção de dsRNA.

Utilizando os iniciadores para PCR AGH_CDS_T7_Fw

5'-TAATACGACTCACTATAGGGATGCCCCACTCAGCTGCTT3') e AGH_CDS_T7_Rev (5'-AATACGACTCACTATAGGGCTAAGGTACCGGGTCCTCG-3'), geramos um fragmento de PCR que incorpora uma sequência promotora T7 em ambos. Este fragmento foi utilizado como um para o modelo de polimerase de RNA T7 para produção de RNA de cadeia dupla utilizando o kit Megascript RNAi (Ambion).

Ensaio de reversão sexual em camarão *P. monodon* juvenil por injeção de AGH recombinante.

Grupos de animais jovens pós-larvas (PL30-PL60) são injetados com 120 ng do AGH recombinante a cada três dias. O grupo 1 recebe injeções que cobrem o período de PL30 a PL60. O grupo 2 recebe injeções que cobrem o período de PL30 a PL45. Finalmente, o grupo 3 recebe injeções que cobrem o período de PL45 a PL60. Em PL150, o sexo fenotípico é avaliado por inspeção visual e histologia enquanto o sexo genotípico é determinado ao nível do DNA utilizando um marcador de sexo com base em PCR tal como divulgado no documento PCT/EP2007/054041.

Ensaio de reversão sexual em camarão *P. monodon* juvenil por injeção de RNA de cadeia dupla AGH-específico.

Grupos de animais jovens pós-larvas (PL30-PL60) são injetados com 0,5 µg de AGH de dsRNA a cada três dias. O grupo 1 recebe injeções que cobrem o período de PL30 a PL60. O grupo 2 recebe injeções que cobrem o período de PL30 a PL45. Finalmente, o grupo 3 recebe injeções que cobrem o período de PL45 a PL60. Em PL150, o sexo fenotípico é avaliado por inspeção visual e histologia enquanto o sexo genotípico é determinado ao nível do DNA utilizando um marcador de sexo com base em PCR tal como divulgado no documento PCT/EP2007/054041.

Exemplo 1: Identificação de hormonas da glândula androgénica de *Penaeus monodon*.

Foi realizado o perfil de transcrição de todas as possíveis combinações de iniciadores de cDNA-AFLP (128 PC)

em amostras de tecido da glândula androgénica (macho; n = 4), amostras de controlo de tecido circundante (fêmea; n = 2) e amostras do músculo da fêmea e do macho (n = 3 cada). Por inspeção visual dos géis de cDNA-AFLP, selecionamos 355 fragmentos específicos da glândula androgénica. Obtivemos informações de sequência para 254 (71,6%) desses fragmentos. As pesquisas de homologia indicaram que pelo menos 47 (18,5%) eram idênticos (alinhamento blastx mostra pelo menos 75% de identidades) às sequências bacterianas (*Propionibacterium acnes*). Isto é muito provavelmente devido a uma infecção bacteriana das glândulas androgénicas nos animais amostrados.

Constatou-se que dois fragmentos de cDNA-AFLP eram homólogos ao "fator de glândula androgénica semelhante à insulina" do lagostim garra vermelha (*Cherax quadricarinatus*): BC4M21M263.5 e BC4M34M404.4.

Análise RACE, seguida de amplificação e sequenciação do cDNA completo resultou na identificação de quatro sequências de cDNA PmAGH1 (Seq ID N° 1), PmAGH2 (SEQ ID N° 4), PmAGH3 (Seq ID N° 7) e PmAGH4 (Seq ID N° 10). A sequenciação genómica de uma parte do gene (Seq ID N° 13) indicou que todos os quatro destes cDNA originam por splicing alternativo de um único gene.

O fragmento BC4M21 M263.5 corresponde a um fragmento de restrição de BstYI-MseI 234 pb proveniente de PmAGH1 e PmAGH3, enquanto o fragmento BC4M34M404.4 corresponde a um fragmento de restrição de BstYI-MseI 372 pb proveniente de PmAGH2 e PmAGH4.

A pesquisa de homologia com as sequências completas de cDNA não revelou qualquer homologia significativa ao nível de nucleótidos. Ao nível da proteína, a homologia foi novamente encontrada com o "fator de glândula androgénica semelhante à insulina" do lagostim (32% de identidade) e, em menor medida, com as hormonas da glândula androgénica dos isópodes *Armadillidium vulgare*, *Porcelio scaber* e *Porcelio dilatatus* (entre 29 e 26% de identidade).

Exemplo 2: reversão sexual em *P. monodon* juvenil utilizando *Pm_AGH1*, *Pm_AGH2*, *Pm_AGH3* e/ou *Pm_AGH4* recombinante.

A administração de PenMon_AGH1 e PenMon_AGH2 recombinante a *P. monodon* juvenis é capaz de masculinizar fêmeas genéticas.

Exemplo 3: reversão sexual em *P. monodon* juvenil utilizando silenciamento do gene da hormona da glândula androgénica mediada por dsRNA.

A administração de dsRNA que é dirigido a PenMon_AGH1/2 é capaz de silenciar a expressão do gene tanto das variantes como do *P. monodon* juvenil macho geneticamente feminizado.

REFERÊNCIAS

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhan, Z., Miller, W. And Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402.

- Ewing, B. and Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome research* 8, 186-194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendel, M.C. and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome research* 8, 175-185.
- Gordon, D., Abajian, C. and Green, P. (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome research* 8, 195-202.
- Hansford, S.W. and Hewitt, D.R. (1994). Growth and nutrient digestibility by male and female *Penaeus monodon*: evidence of sexual dimorphism. *Aquaculture* 125, 147-154.
- Khamnamtong, B., Thumrungrtanakit, S., Klingbunga, S., Aoki, T., Hirono, I. and Menasveta, P. (2006) Identification of sex-specific expression markers in the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Biochem. Mol. Biol.* 39, 37-45.
- Manor, R., Weil, S., Oren, S., Glazer, L., Aflalo, E.D., Ventura, T., Chalifa-Caspi, V., Lapidot, M. And Sagi, A. (2007) Insulin and gender: an insulin-like gene expressed exclusively in the androgenic gland of the male crayfish. *Gen Comp. Endocrinol.* 150, 326-336.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> VIB VZW

UNIVERSITEIT GENT

MOANA BELGIUM NV

<120> NOVA HORMONA DA GLÂNDULA ANDROGÉNICA

<130> FVB/SX2/V258

<150> US 61/033,830

<151> 2008-03-05

<160> 28

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2091

<212> DNA

<213> Penaeus monodo

<400> 1

gagggtgctgc cacacacagg acagggaag ttctctgccc ggccttacct tgatccaaga	60
accattcaag gttgtgcgtg taccctcaact ccttcacttt cccgtatcct ccccaccata	120
cccaccactc cagttctcca cctccaaccc tctcagatc tctccaccaa tccctccaca	180
aaaaccactc catcaaccct acgtatttgc taactcctcc acctcccctc tatccacccc	240
tctataccta ttatccctcc tctttttcca ctcttctcat agacacaaag aaaaaaatga	300
accaactcgc tgctcagcg acctacggcc tcggcatgcc cactcagctg cttgtgggaa	360
tgctgatggg cctctccctg acttcgacgt caagctgcta caacgtcacg gggattcctg	420
ttgacttcga ctgcggcgac atcggcgata ccatgagtca catctgcaag acgtttccca	480
cagcccgccc tcaactcgca gtgtccaggc cagctgatac cgacgacctc tggcaggaca	540
cgagagcagg tcagaccacg cccattgacc tgcttcctcg ccagtaccgc ctgcatcccc	600
gggccttgaa tccgatgca tatttcgaaa tggttagtca ggacctgata agagaccacc	660
tggtgagccc cgargccgag cagccctcgc tcaagacatc crggaggcgc gcgaagagat	720
cctacaacgt gcaggatgag tgctgcaacc acgtgagcca ggggacgtgt gtggcggagg	780
agattctgga gtattgcgag gaccgggtac cttagtctcc cctggcggtt tctgtcatat	840
gcgatgttct ctctttatta cacttttttt gctaagtctt acagatatat agtatatgca	900
tagcgcattc tgataacaca tatgtatatt ttatakgtgt acaatgtgtg ttaaaacaaa	960
ttcattgtgt tctctctgtt tcacaaggta gaatataatc ctatcctttt gatagtaatt	1020
tactcgcata cagcgttgta aatcttgttt tcgtctcgtg tggttttgat ctacattctt	1080
cttcatgtat gatttctaga tgtgagagta agtaggcaag ttatctctcg aatgaaattc	1140

```

gaaatcaggc aaatcagtya ttaacatttc tcccttctgt ttccccagta cttctaaacc 1200
ttgaacctga cctgacctat ggccttccta acctctctaa gtggagtcgt cagtgggtcca 1260
tggccccacc atcctcctta caacagtctt cgggtgacctg atcatatggc ctctccatcc 1320
tctcaatgac ctgacctcaa ccaygggtc ccccttctt taggccaagt ctttgcgagc 1380
ctgacccaaa ccgaggttc tctaaccctc ctctgatgag tttgtaataa aaataaccgg 1440
cctggtgacc caagtctca tgaatttgac ttaatctgca attaatgacc cgtagagtc 1500
ctttcaatga tgtctgcaa aagtagcgtt acattccatt tttcttttcg aktawtaggc 1560
cccagagtaa ttcttgacct caactttcta aaaaaaata ygtatattca grgcaagaac 1620
tattttcatt catgttctgt caatttctty ggcgtcataa tttctttcta tccttttatt 1680
aaacaaaata aataaaagat aaccatacat taacaaaggt gtgatacaaa gacataaaag 1740
atatcaaagt tcagtacttt ctttcgcttt ttctattttt atctttcgat tttccgaacg 1800
ttttaagtt tctaactttt atcccyctgt aaaaataaag ttgacagacg ataataaaaa 1860
gcaataatgt tttagaatct attccttttt tgtgatcacc tgaatatctt ttttatatat 1920
acattatcgt attggaatca gatagatcag yacggyatat cagaattaat tcgtaataaa 1980
aaaatgcatt tcaataactg aatttccgat aaaaaaattt cmcctgtatc tgtcttttgc 2040
gaaacaataa aagcatttca aaatcgraa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 2091

```

<210> 2

<211> 480

<212> DNA

<213> *Penaeus monodon*

<400> 2

```

atgcccactc agctgcttgt gggaatgctg atggtcctct cctgacttc gacgtcaagc 60
tgctacaacg tcacggggat tctgttgac ttcgactgcg gtgacatcgg cgataccatg 120
agtcacatct gcaagacgtt tcccacagcc cggcctcact cgcgagtgtc caggtcagct 180
gataccgacg acctctggca ggacacgaga gcaggtcaga ccacgcccac tgacctgctt 240
cctcgccagt accgcctgca tccccgggcc ttgaatccga tgcgatattt cgaaatgggt 300
agtcaggacc tgataagaga ccacctggtg agccccgarg ccgcgcacgc cctcgtcaag 360
acatccrgga ggcgcgcgaa gagatcctac aacgtgcagg atgagtgtgt caaccacgtg 420
agccagcgga cgtgtgtggc ggaggagatt ctggagtatt gcgaggaccc ggtaccttag 480

```

<210> 3

<211> 159

<212> PRT

<213> *Penaeus monodon*

<400> 3

Met Pro Thr Gln Leu Leu Val Gly Met Leu Met Val Leu Ser Leu Thr
1 5 10 15

Ser Thr Ser Ser Cys Tyr Asn Val Thr Gly Ile Pro Val Asp Phe Asp
20 25 30

Cys Gly Asp Ile Gly Asp Thr Met Ser His Ile Cys Lys Thr Phe Pro
35 40 45

Thr Ala Arg Pro His Ser Arg Val Ser Arg Ser Ala Asp Thr Asp Asp
50 55 60

Leu Trp Gln Asp Thr Arg Ala Gly Gln Thr Thr Pro Ile Asp Leu Leu
65 70 75 80

Pro Arg Gln Tyr Arg Leu His Pro Arg Ala Leu Asn Pro Met Arg Tyr
85 90 95

Phe Glu Met Val Ser Gln Asp Leu Ile Arg Asp His Leu Val Ser Pro
100 105 110

Glu Ala Ala His Ala Leu Val Lys Thr Ser Gly Arg Arg Ala Lys Arg
115 120 125

Ser Tyr Asn Val Gln Asp Glu Cys Cys Asn His Val Ser Gln Arg Thr
130 135 140

Cys Val Ala Glu Glu Ile Leu Glu Tyr Cys Glu Asp Pro Val Pro
145 150 155

LISTAM DE SEQUÊNCIAS

<210> 4

<211> 1709

<212> DNA

<213> *Penaeus monodon*

<400> 4

```

gaggtgctgc cacacacagg acagggcaag ttctctgccc ggccttacct tgatccaaga      60
accattcaag gttgtgcgtg taccctcact ccttcacttt cccgtatcct ccccaccata      120
cccaccactc cagttctcca cctccaaccc tctcagatc tctccacaa tccctccaca      180
aaaaccactc catcaaccct acgtatttgc taactcctcc acctcccctc tatccacccc      240
tcctatccta ttatccctcc tccttttcca ctcttctcat agacacaaag aaaaaaatga      300
accaactcgc tgcctcacgc acctacggcc tcggcatgcc cactcagctg cttgtgggaa      360
tgctgatggt cctctccctg acttcgacgt caagctgcta caacgtcacg gggattcctg      420
ttgacttcga ctgoggtgac atoggcgata ccatgagtca catctgcaag acgtttccca      480
cagcccggcc tcactcgca gtgtccaggt cagctgatac cgacgacctc tggcaggaca      540
cgagagcagg tcagaccacg cccattgacc tgcttctctg ccagtaccgc ctgcatcccc      600
gggccttgaa tccgatgca tatttcgaaa tggtagtca ggacctgata agagaccacc      660
tggtgagccc cgargccg cgagccctcg tcaagacatc crggaggcgc gcgaagagat      720
cctacaacgt gcaggatgag tgctgcaacc acgtgagcca ggggacgtgt gtggcggagg      780
agattctgga gtattgcgag gacccgtact tctaaacctt gaacctgacc tgacctatgg      840
ccttctaac ctctctaagt ggagtcgtca gtggtccatg gccacccat cctccttaca      900
acagtcttcg gtgacctgat catatggcct ctccatcctc tcaatgacct gacctcaacc      960
caygggtccc cccttcttta ggccaagtct ttgcggacct gacccaaacc gaggttctc     1020
taaccctcct ctgatgagtt tgtaataaaa ataaccggcc tggtgacca agttctcatg     1080
aatttgactt aatctgcaat taatgaccog ttagagtcct ttcaatgatg tctgccaaaa     1140
gtagcgttac attccatttt tcttttcgak tawtaggccc cagagtaatt cttgacctca     1200

actttctaaa aaaaaatayg tatattcagr gcaagaacta ttttcattca tgttctgtca     1260
atttcttygg cgtcataatt tctttctatc cttttattaa acaaaataaa taaaagataa     1320
ccatacatta acaaagggtg gatacaaaga cataaaagat atcaaagttc agtactttct     1380
ttcgtttttt ctatttttat ctttcgattt tccgaacgtt ttaaagtttc taacttttat     1440
cccycgtgaa aaataaagtt gacagacgat aataaaaagc aataatgttt tagaatctat     1500
tccttttttg tgatcacctg aatatctttt ttatatatac attatcgtat tggaatcaga     1560
tagatcagya cgyyatatca gaattaatto gtaataaaaa aatgcatttc aataactgaa     1620
tttccgataa aaaaatttcm cctgtatctg tcttttgca aacaataaaa gcatttcaaa     1680
atcgraaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa     1709

```

<210> 5

<211> 480

<212> DNA

<213> *Penaeus monodon*

<400> 5

atgccactc agctgcttgt gggaatgctg atggtcctct cctgacttc gacgtcaagc	60
tgctacaacg tcacggggat tcctgttgac ttcgactgcg gtgacatcgg cgataccatg	120
agtcacatct gcaagacgtt tcccacagcc cggcctcact cgcgagtgtc caggtcagct	180
gataccgacg acctctggca ggacacgaga gcaggtcaga ccacgcccat tgacctgctt	240
cctogccagt accgcctgca tccccgggcc ttgaatccga tgcgatattt cgaaatggtt	300
agtcaggacc tgataagaga ccacctggtg agccccgarg ccgcgcacgc cctcgtcaag	360
acatccrgga ggcgcgcgaa gagatcctac aacgtgcagg atgagtgtcg caaccacgtg	420
agccagcgga cgtgtgtggc ggaggagatt ctggagtatt gcgaggaccc gtacttctaa	480

<210> 6

<211> 159

<212> PRT

<213> *Penaeus monodon*

<400> 6

Met Pro Thr Gln Leu Leu Val Gly Met Leu Met Val Leu Ser Leu Thr
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Ser Cys Tyr Asn Val Thr Gly Ile Pro Val Asp Phe Asp
 20 25 30

Cys Gly Asp Ile Gly Asp Thr Met Ser His Ile Cys Lys Thr Phe Pro
 35 40 45

Thr Ala Arg Pro His Ser Arg Val Ser Arg Ser Ala Asp Thr Asp Asp
 50 55 60

Leu Trp Gln Asp Thr Arg Ala Gly Gln Thr Thr Pro Ile Asp Leu Leu
 65 70 75 80

Pro Arg Gln Tyr Arg Leu His Pro Arg Ala Leu Asn Pro Met Arg Tyr
 85 90 95

Phe Glu Met Val Ser Gln Asp Leu Ile Arg Asp His Leu Val Ser Pro
 100 105 110

Glu Ala Ala His Ala Leu Val Lys Thr Ser Gly Arg Arg Ala Lys Arg
 115 120 125

Ser Tyr Asn Val Gln Asp Glu Cys Cys Asn His Val Ser Gln Arg Thr
 130 135 140

Cys Val Ala Glu Glu Ile Leu Glu Tyr Cys Glu Asp Pro Tyr Phe
 145 150 155

<210> 7

<211> 2082

<212> DNA

<213> Penaeus monodon

<400> 7

gaggtgctgc cacacacagg acagggcaag ttctctgccc ggccttacc	60
accattcaag gttgtgctg taccctcact ccttcacttt ccggtatcct	120
cccaccactc cagttctcca cctccaacc tcctcagatc tctccaccaa	180
aaaaccactc catcaaccct acgtatttgc taactcctcc acctccctc	240
tcctatccta ttatccctcc tccttttcca ctcttctcat agacacaaag	300
accaactcgc tgcctcacgc acctacggcc tcggcatgcc cactcagctg	360
tgctgatggt cctctccctg acttcgacgt caagctgcta caacgtcacg	420
ttgacttcca ctgcggtgac atcgcgata ccatgagtca catctgcaag	480
cagcccgcc tcactcgga gtgtccaggt cagctgatac cgacgacctc	540
cgagagcagg tcagaccag cccattgacc tgcttctcgc ccagtaccgc	600
gggccttgaa tccgatgga tatttcgaaa tggacctgat aagagaccac	660
ccgargccgc gcacgccctc gtcaagacat ccrggaggcg cggaagaga	720
tgcaggatga gtgctgcaac cacgtgagcc agcggacgtg tgtggcggag	780
agtattgga ggaccggta ccttagtctc ccctggcggg ttctgtcata	840
tctcwtatt acactttttt tgctaagtct tacagatata cagtatatgc	900
ctgataacac atatgtatat ttatakgtg tacaatgtgt gttaaaacaa	960
ttctctctgt ttcacaaggt agaataaat cctatccctt tgatagtaat	1020
acacgcttgt aaatcttgt ttcgctcgt gtggttttga totacattct	1080
tgatttctag atgtgagagt aagtaggcaa gttatctctc gaatgaaatt	1140
caaactcagty attaacattt cctccctctg tttccccagt acttctaaac	1200
acctgacctc tggccttctt aaactctcta agtggagtcg tcagtggctc	1260
catcctcctt acaacagtct tcggtgacct gatcatatgg cctctccatc	1320
cctgacctca acccaygggt ccccccttct ttaggccaag tctttgcgga	1380

```

accgaggctt ctctaaccct cctctgatga gtttgaata aaaataaccg gcctggtgac 1440
ccaagttctc atgaatttga cttaatctgc aattaatgac ccgtagagt cctttcaatg 1500
atgtctgcc aagtagcgt tacattccat tttcttttc gaktawtagg cccagagta 1560
attcttgacc tcaactttct aaaaaaaaaat aysatattc agrgcaagaa ctattttcat 1620
tcatgttctg tcaattttct yggcgtcata atttctttct atccttttat taaacaaat 1680
aaataaaaga taaccataca ttaacaaagg tgtgatacaa agacataaaa gatatcaaag 1740
ttcagtactt tctttcgtt tttctatttt tatctttcga tttccgaac gttttaagt 1800
ttctaacttt tatcccyctg taaaaataaa gttgacagac gataataaaa agcaataatg 1860
ttttagaatc tattcctttt ttgtgatcac ctgaatatct tttttatata tacattatcg 1920
tattggaatc agatagatca gyacgyata tcagaattaa ttcgtaataa aaaaatgcat 1980
ttcaataact gaatttcga taaaaaaatt tcmctgtat ctgtcttttg cgaaacaata 2040
aaagcatttc aaatcgraa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2082

```

<210> 8

<211> 471

<212> DNA

<213> *Penaeus monodon*

<400> 8

```

atgccactc agctgcttgt gggaatgctg atggtcctct cctgacttc gacgtcaagc 60
tgctacaacg tcacgggat tctgttgac ttcgactgcg gtgacatcgg cgataccatg 120
agtcacatct gcaagacgtt tcccacagcc cggcctcact cgcgagtgtc caggtcagct 180
gataccgacg acctctggca ggacacgaga gcaggtcaga ccacgcccac tgacctgctt 240
cctcgccagt accgcctgca tccccgggcc ttgaatcga tgcgatattt cgaaatggac 300
ctgataagag accacctggt gagccccgar gccgcgcacg ccctcgtcaa gacatccrgg 360
aggcgcgcga agagatccta caacgtgcag gatgagtgtc gcaaccacgt gagccagcgg 420
acgtgtgtgg cggaggagat tctggagtat tgcgaggacc cggtaacctta g 471

```

<210> 9

<211> 156

<212> PRT

<213> *Penaeus monodon*

<400> 9

Met Pro Thr Gln Leu Leu Val Gly Met Leu Met Val Leu Ser Leu Thr
1 5 10 15

Ser Thr Ser Ser Cys Tyr Asn Val Thr Gly Ile Pro Val Asp Phe Asp
20 25 30

Cys Gly Asp Ile Gly Asp Thr Met Ser His Ile Cys Lys Thr Phe Pro
35 40 45

Thr Ala Arg Pro His Ser Arg Val Ser Arg Ser Ala Asp Thr Asp Asp
50 55 60

Leu Trp Gln Asp Thr Arg Ala Gly Gln Thr Thr Pro Ile Asp Leu Leu
65 70 75 80

Pro Arg Gln Tyr Arg Leu His Pro Arg Ala Leu Asn Pro Met Arg Tyr
85 90 95

Phe Glu Met Asp Leu Ile Arg Asp His Leu Val Ser Pro Glu Ala Ala
100 105 110

His Ala Leu Val Lys Thr Ser Gly Arg Arg Ala Lys Arg Ser Tyr Asn
115 120 125

Val Gln Asp Glu Cys Cys Asn His Val Ser Gln Arg Thr Cys Val Ala
130 135 140

Glu Glu Ile Leu Glu Tyr Cys Glu Asp Pro Val Pro
145 150 155

<210> 10

<211> 1700

<212> DNA

<213> *Penaeus monodon*

<400> 10

```

gaggtgctgc cacacacagg acagggcaag ttctctgccc ggccttacc tgatccaaga      60
accattcaag gttgtgctg tacctcact ccttcacttt ccggtatcct cccaccata      120
cccaccactc cagttctcca cctccaacc tctcagatc tctccacca tccctccaca      180
aaaaccactc catcaaccct acgtatttgc taactcctcc acctccctc tatccacccc      240
tcctatccta ttatccctcc tccttttcca ctcttctcat agacacaaag aaaaaaatga      300
accaactcgc tgcctcagc acctacggcc tcggcatgcc cactcagctg cttgtgggaa      360
tgctgatggt cctctccctg acttcgacgt caagctgcta caacgtcacg gggattcctg      420
ttgacttcga ctgcggtgac atcggcgata ccatgagtca catctgcaag acgtttccca      480
cagcccgccc tcaactcgga gtgtccaggt cagctgatac cgacgacctc tggcaggaca      540
cgagagcagg tcagaccag cccattgacc tgettctctg ccagtaccgc ctgcatcccc      600
gggccttgaa tccgatgga tatttcgaaa tggacctgat aagagaccac ctggtgagcc      660
ccgargccgc gcacgccctc gtcaagacat crrggaggcg cgcgaagaga tcctacaacg      720
tgcaggatga gtgctgcaac cacgtgagcc agcggacgtg tgtggcggag gagattctgg      780
agtattgca ggaccctac ttctaaacct tgaacctgac ctgacctatg gccttcctaa      840
cctctctaag tggagctgc agtggtccat ggcccacca tctccttac aacagtcttc      900
ggtgacctga tcatatggcc tctccatcct ctcaatgacc tgacctcaac ccaygggtcc      960
ccccttcttt aggccaaagtc tttggcgacc tgacccaac cgaggcttct ctaaccctcc     1020
tctgatgagt ttgtaataaa aataaccggc ctggtgaccc aagttctcat gaatttgact     1080
taatctgcaa ttaatgacc gttagagtcc tttcaatgat gtctgcaaaa agtagcgtta     1140
cattccattt ttcttttcca ktawtaggac ccagagtaat tcttgacctc aactttctaa     1200
aaaaaaatay gtatattcag rgcaagaact atttctctc atgttctgtc aatttcttyg     1260
gcgtcataat ttctttctat ccttttatta aacaaaataa ataaaagata accatacatt     1320
aacaaggtg tgatacaaag acataaaaga tatcaaagtt cagtacttcc tttcgctttt     1380
tctattttta tctttcgatt ttccgaacgt tttaaagttt ctaactttta tcccyctgta     1440
aaaataaagt tgacagacga taataaaaag caataatggt ttagaatcta ttcctttttt     1500
gtgatcacct gaatatcttt tttatatata cattatcgta ttggaatcag atagatcagy     1560
acggyatatc agaattaatt cgtaataaaa aatgcattt caataactga atttccgata     1620
aaaaaatttc mcctgtatct gtcttttgcg aaacaataaa agcatttcaa aatcgraaaa     1680
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa                                     1700

```

<210> 11

<211> 471

<212> DNA

<213> Penaeus monodon

<400> 11

```

atgccactc agctgcttgt gggaatgctg atggtcctct ccctgacttc gacgtcaagc      60
tgctacaacg tcacggggat tcctgttgac ttcgactgcg gtgacatcgg cgataccatg    120
agtcacatct gcaagacggt tcccacagcc cggcctcact cgcgagtgtc caggtcagct    180
gataccgacg acctctggca ggacacgaga gcaggtcaga ccacgcccac tgacctgctt    240
cctcgccagt accgcctgca tccccggggc ttgaatccga tgcgatattt cgaaatggac    300
ctgataagag accacctggg gagccccgar gccgcgcacg ccctcgtcaa gacatccrgg    360
aggcgcgcga agagatccta caacgtgcag gatgagtgtc gcaaccacgt gagccagcgg    420
acgtgtgtgg cggaggagat tctggagtat tgcgaggacc cgtacttcta a              471

```

<210> 12

<211> 156

<212> PRT

<213> *Penaeus monodon*

<400> 12

Met Pro Thr Gln Leu Leu Val Gly Met Leu Met Val Leu Ser Leu Thr
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Ser Cys Tyr Asn Val Thr Gly Ile Pro Val Asp Phe Asp
 20 25 30
 Cys Gly Asp Ile Gly Asp Thr Met Ser His Ile Cys Lys Thr Phe Pro
 35 40 45
 Thr Ala Arg Pro His Ser Arg Val Ser Arg Ser Ala Asp Thr Asp Asp
 50 55 60
 Leu Trp Gln Asp Thr Arg Ala Gly Gln Thr Thr Pro Ile Asp Leu Leu
 65 70 75 80
 Pro Arg Gln Tyr Arg Leu His Pro Arg Ala Leu Asn Pro Met Arg Tyr
 85 90 95
 Phe Glu Met Asp Leu Ile Arg Asp His Leu Val Ser Pro Glu Ala Ala
 100 105 110
 His Ala Leu Val Lys Thr Ser Gly Arg Arg Ala Lys Arg Ser Tyr Asn
 115 120 125
 Val Gln Asp Glu Cys Cys Asn His Val Ser Gln Arg Thr Cys Val Ala
 130 135 140
 Glu Glu Ile Leu Glu Tyr Cys Glu Asp Pro Tyr Phe
 145 150 155

<210> 13

<211> 2008

<212> DNA

<213> *Penaeus monodon*

<400> 13

aaatcaaact gtatttttat ctcaaccaca aaacatccca acaagcagac agtgccttct 60
 ctttccctta cagtgtccag gtcagctgat accgaagacc tctggcagga cagcagagca 120
 ggctcagacca cgcccattga cctgcttcct cgccagtacc gcctgcatcc ccgggccttg 180
 aatccgatgc gatatttcga aatgggttagt caggtaacag gtatttctta ttaattgtaa 240

```

caccattatc acaaatatct gataatatta agtatctgca agttcctatt cttctgtggt      300
gttcgtgatt ctttaattgca tagcattatt ttcagttctc agataatatt gcatactgac      360
gtgcgctaca gttaattac ccttcatata taacatcact tttatgtaat cttaccttgt      420
gacatataga aacatacaac gatagtctgc ccactaagta cctgcgagggt agacggttct      480
atttctgcag tactacataa tatatacaca aaatagactc tagtacacga aaggattcct      540
gccatgccac aggacctgat aagagaccac ctggtgagcc ccgargccgc gcacgccctc      600
gtcaagacat ccrggaggcg cggaagaga tcctacaacg tgcaggatga gtgctgcaac      660
cacgtgagcc agcggacgtg tgtggcggag gagattctgg agtattgcca ggacccggtg      720
ccttagtctc ccctggcggg ttctgtcata tgcgatgttc tcwctttatt acactttttt      780
tgctaagtct tacagatata cagtatatgc atagcgcatt ctgataaacac atatgtatat      840
tttatakgtg tacaatgtgt gttaaaacaa attcattgtg ttctctctgt ttcacaagggt      900
agaatataat cctatccttt tgatagtaat ttaactcgcat acacgcttgt aaatcttgtt      960
ttcgtctcgt gtggttttga tctacattct tcttcatgta tgatttctag atgtgagagt     1020
aagtaggcaa gttatctctc gaataaaatt cgaaatcagg caaatcagty attaacattt     1080
ctcccttctg tttcccagct acttctaaac cttgaacctg acctgacctc tggccttcct     1140
aacctctcta agtggagtcg tcagtggctc atggcccacc catcctcctt acaacagtcct     1200
tcggtgacct gatcatatgg cctctccatc ctctcaatga cctgacctca acccaygggt     1260
cccccttctt ttaggccaag tttttgcgga cctgacccaa acccgaggct tctctaaccct     1320
tcctctgatg agtttgtaat aaaaataacc ggcttggtga cccaagttct catgaatttg     1380
acttaatctg caattaatga cccgttagag tcctttcaat gatgtctgcc aaaagtagcg     1440
ttacattcca tttttctttt cgaktawtag gcccagagt aattcttgac ctcaactttc     1500
taaaaaaaaa taygtatatt cagrgcaaga actattttca ttcatgttct gtcaatttct     1560
tyggcgctcat aatttctttc tatectttta ttaaacaaaa taaataaaaag ataaccatac     1620
attaacaaag gtgtgataca aagacataaa agatatcaaa gttcagtaact ttctttcgct     1680
ttttctattt ttatctttcg attttccgaa cgtttttaaag tttctaactt ttatcccyct     1740
gtaaaaataa agttgacaga cgataataaa aagcaataat gttttagaat ctattccttt     1800
tttgtgatca cctgaatata ttttttatat atacattatc gtattggaat cagatagatc     1860
agyacgyat atcagaatta attcgtaata aaaaaatgca tttcaataac tgaatttccg     1920
ataaaaaaat ttcmctgta tctgtctttt gcgaaacaat aaaagcattt caaatcgrg     1980
aaatatgaat ccttgcttgc aacagctg                                         2008

```

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 14

tatgacagaa accgccaggg gagac 25

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 15

aggtaccggg tcctcgcaat actcc 25

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 16

ctggcggttt ctgtcatatg cgatg 25

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 17

gtctcccctg gcggtttctg tcata 25

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 18

acacaggaca gggcaagttc 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 19

tccctccaca aaaaccactc 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 20

tctggggcct attaatcgaa 20

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 21

acgttcggaa aatcgaaaga t 21

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 22

gtgctgccac acacaggac 19

<210> 23

<211> 16

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 23

gcacgccctc gtcaag 16

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 24

tcaagaatta ctctggggcc ta 22

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 25

ccagtaccgc ctgcatcc 18

<210> 26

<211> 19

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 26

ggctcaccag gtggtctct 19

<210> 27

<211> 38

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 27

taatacgact cactataggg atgccactc agctgctt 38

<210> 28

<211> 39

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 28

taatacgact cactataggg ctaaggtacc gggtcctcg 39

Lisboa, 21 de julho de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína isolada, selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 9 e SEQ ID N° 12, ou uma sua mutante ou variante com pelo menos 50% de identidade, que retém a atividade da hormona da glândula androgénica semelhante à insulina da referida proteína isolada em camarões juvenis.
2. Fragmento de ácido nucleico, que codifica uma proteína de acordo com a reivindicação 1.
3. Fragmento de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 2, em que o referido fragmento compreende a SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 8 ou SEQ ID N° 11.
4. Fragmento de ácido nucleico, que compreende a SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 7 ou SEQ ID N° 10, ou o seu complemento, ou um seu fragmento funcional que pode ser utilizado como iniciador ou RNAi específico para a SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 7 ou SEQ ID N° 10.
5. Utilização de uma proteína de acordo com a reivindicação 1 para modificar a proporção dos sexos em gambas ou camarões.
6. Utilização de uma proteína de acordo com a reivindicação 5, em que a referida gamba ou camarão pertence à família *Penaeidae*.

7. Utilização de uma proteína de acordo com a reivindicação 6, em que a referida gamba ou camarão é *Penaeus monodon*.
8. Utilização de um fragmento de ácido nucleico ou um seu fragmento funcional de acordo com a reivindicação 2 ou 3, para modificar a proporção dos sexos em gambas e camarões.
9. Utilização de um fragmento de ácido nucleico ou um seu fragmento funcional de acordo com a reivindicação 2 ou 3, para determinar o sexo em gambas ou camarões.
10. Utilização de um fragmento de ácido nucleico ou um seu fragmento funcional de acordo com a reivindicação 8 ou 9, em que a referida gamba ou camarão pertence à família *Penaeidae*.
11. Utilização de um ácido nucleico ou um seu fragmento funcional de acordo com a reivindicação 10, em que a referida gamba ou camarão é *Penaeus monodon*.
12. Método para estabelecer uma cultura monossexo em gambas e camarões, que compreende a utilização de uma proteína de acordo com a reivindicação 1.
13. Método para estabelecer uma cultura monossexo em gambas e camarões, que compreende a utilização de um fragmento de ácido nucleico de acordo com qualquer das reivindicações 2-4.

14. Método para estabelecer uma cultura monossexo em gambas e camarões, que compreende a determinação do sexo de acordo com a reivindicação 9.
15. Método de acordo com qualquer das reivindicações 12-14, em que a referida gamba ou camarão é *Penaeus monodon*.

Lisboa, 21 de julho de 2015

Figura 1

