

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Purificação e caracterização das lectinas ACL-I e ACL-II da esponja marinha *Axinella corrugata*, imunolocalização da ACL-I e avaliação do seu potencial como marcador de transformação celular

Roger Remy Dresch

Porto Alegre, 2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Purificação e caracterização das lectinas ACL-I e ACL-II da esponja marinha *Axinella corrugata*, imunolocalização da ACL-I e avaliação do seu potencial como marcador de transformação celular

Tese apresentada por **Roger Remy Dresch** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dra. Amélia T. Henriques

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 11 de março de 2008, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Tereza dos Santos Correia

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Calos Termignoni

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Regla Vargas

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

D773p Dresch, Roger Remy

Purificação e caracterização das lectinas ACL-I e ACL-II da esponja marinha *Axinella corrugata*, imunolocalização da ACL-I e avaliação do seu potencial como marcador de transformação celular / Roger Remy Dresch – Porto Alegre: UFRGS, 2008. – xxviii, 222p.: il.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Lectinas. 2. *Axinella corrugata*. 3. Esponja marinha. 4. Quimiotaxia. 5. Citotoxicidade. 6. Mitogenicidade. 7. Imuno-histoquímica. 8. Células transformadas. I. Henriques, Amélia Teresinha. II. Título.

CDU: 547.963.1

Bibliotecária responsável:

Heloísa do Canto Canabarro, CRB 10/1036

Margarida Maria C. F. Ferreira, CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Lectinologia do Departamento de Bioquímica da UFRGS, no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da UFRGS e, em parte, na Faculdade de Ciências Químicas da Universidade Nacional de Córdoba/Argentina e no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

O suporte financeiro para o desenvolvimento deste trabalho foi obtido junto à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



**“O dever, lealmente cumprido, mantém a saúde da consciência.”**

**André Luiz**



**Aos meus pais e à minha irmã por todo o incentivo.**

**À minha esposa por todo o apoio e amor.**

**Dedico**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais, pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida e por compreenderem os momentos de ausência.

Agradeço à minha querida irmã, por sempre estar ao meu lado.

Agradeço também de modo especial à minha esposa, por todo o seu amor e por me auxiliar inúmeras vezes na execução desse trabalho.

Agradeço à Profa. Dra. Amélia T. Henriques, pela orientação e por ter acreditado em meu potencial.

Agradeço à profa. Dra. Magdolna Maria Vozári Hampe do Departamento de Bioquímica/ICBS/UFRGS, pela co-orientação e por toda a sua paciência, dedicação e auxílio incondicionais na execução desse trabalho.

Agradeço à Fundação Zoobotânica do RS pela coleta da esponja *Axinella corrugata*, em especial à Dra. Cléa B. Lerner e à Dra. Beatriz Mothes.

Agradeço a todos os meus amigos, de dentro e de fora da Universidade.

Agradeço ao Gilberto D. Zanetti, um grande amigo que conheci no doutorado, durante o qual compartilhamos desafios, vitórias e derrotas.

À Faculdade de Ciências Químicas da Universidade Nacional de Córdoba, Córdoba/Argentina, em especial ao prof. Dr. Fernando Irazoqui e aos alunos de pós-graduação Victor e Natacha.

Aos professores do Departamento de Bioquímica da UFRGS e da Faculdade de Farmácia da UFRGS, em especial à profa. Dra. Vera Maria Treis Trindade, ao prof. Dr. Fábio Klamt, à profa. Dra. Ana Maria Oliveira Battastini e ao Dr. Luiz Valmor Cruz Portela.

Ao prof. Dr. Rinaldo Pires dos Santos do Laboratório de Anatomia Vegetal/Instituto de Biociências/UFRGS e ao Centro de Microscopia Eletrônica/UFRGS.

Ao prof. Dr. João Henrique Corrêa Kanan do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Microbiologia/ ICBS/ UFRGS.

Ao laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Ao prof. Dr. Carlos Termignoni, às alunas de mestrado Alessandra Ciprandi e Andréia Estrela e à doutoranda Adriana Seixas, do Laboratório de Peptídeos e Enzimas Proteolíticas do Centro de Biotecnologia/UFRGS.

Ao prof. Dr. Moisés Evandro Bauer e ao mestrando Rodrigo Pestana Lopes, do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular/PUC/RS.

Ao prof. Dr. Claudio Wageck Canal do Laboratório de Virologia e à profa. Dra. Ana Paula Ravazzolo, ambos da Faculdade de Veterinária/UFRGS.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Lectinologia do Departamento de Bioquímica da UFRGS, em especial à Ana Paula, Letícia, Cristiana e Silvana.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia.

Aos doutorandos Fabiane Moreira Farias, Cabral Pavei e Francilene da Silva e à mestranda Cláudia Avello Simões Pires da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Ao mestrando Leandro Tasso da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Ao doutorando Renato Moreira Rosa do Departamento de Biofísica da UFRGS.

Às alunas Cláudia, Luci e Andressa do PPG Bioquímica/UFRGS.

À Vera Pagliarini e Solange Scshoelzel da UFSM.

Ao Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial ao Dr. José César Rosa, pela análise de aminoácidos da lectina I da esponja.

À Fundação Estadual de Proteção e Pesquisa em Saúde do RS.

Ao laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia.

Ao mestre de edificações e de infra-estrutura Waldemar Albino Gehrke do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

Ao técnico Antonio Severino do Laboratório de Neuroanatomia do Departamento de Ciências Morfológicas/ ICBS/ UFRGS.

Ao Biotério Central da UFRGS e às bioteristas Angela e Roselaine.

Ao técnico de laboratório Valeri Brando do Departamento de Bioquímica/UFRGS.

À técnica de laboratório Fabiana da Faculdade de Farmácia/ UFRGS.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	xv
LISTA DE TABELAS .....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xxi
RESUMO .....	xxv
ABSTRACT .....	xxvii
INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA.....	1
OBJETIVOS.....	5
Objetivo Geral.....	5
Objetivos Específicos.....	5
REVISÃO DO TEMA .....	7
Lectinas .....	7
Aplicações futuras das lectinas .....	16
Esponjas .....	19
CAPÍTULO I - Considerações sobre a esponja <i>Axinella corrugata</i> e sua identificação por características morfo-anatômicas .....	23
INTRODUÇÃO.....	23
Classe Demospongiae.....	23
Família Axinellidae.....	24
Gênero <i>Axinella</i> .....	26
<i>Axinella corrugata</i> (George & Wilson, 1919).....	28
I.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
I.1.1 Matéria-prima .....	32
I.1.2 Produtos, reagentes químicos e equipamentos .....	32
I.1.3 Caracterização por microscopia eletrônica de varredura .....	33
I.1.3.1 Fixação e desidratação do material .....	33
I.1.3.2 Processamento do material para MEV .....	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
CAPÍTULO II - Purificação, caracterização físico-química e química da(s) lectina(s) ACL-I e ACL-II de <i>Axinella corrugata</i> .....	39
INTRODUÇÃO.....	39
II.1 MATERIAIS E MÉTODOS .....	42
II.1.1 Matéria-prima .....	42
II.1.2 Animais .....	42
II.1.3 Eritrócitos .....	42
II.1.4 Produtos, reagentes químicos e equipamentos .....	43
II.1.5 Preparação dos extratos brutos .....	44
II.1.6 Determinação da concentração de proteínas .....	44

II.1.7 Determinação da atividade hemaglutinante .....	44
II.2 Métodos de Purificação das Lectinas .....	46
II.2.1 Preparação dos extratos tamponados .....	46
II.2.2 Cromatografia de afinidade em gel de estroma de eritrócitos de coelho-poliacrilamida .....	46
II.2.3 Cromatografia de gel filtração .....	47
II.2.4 Eletroforese em gel de poliácridamida .....	48
II.2.4.1 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) .....	48
II.2.4.2 Eletroforese nativa (PAGE) .....	48
II.3 Caracterização físico-química e química .....	50
II.3.1 Estimação da massa molecular relativa de ACL-I e de ACL-II .....	50
II.3.2 Efeito da temperatura sobre a estabilidade de ACL-I e de ACL-II .....	50
II.3.3 Efeito do pH sobre a hemaglutinação de ACL-I .....	51
II.3.4 Efeito do pH sobre a estabilidade de ACL-I e de ACL-II .....	51
II.3.5 Determinação do efeito de cátions divalentes e do EDTA sobre a atividade hemaglutinante de ACL-I e de ACL-II .....	51
II.3.6 Efeito de agentes desnaturantes e redutores sobre ACL-I .....	52
II.3.7 Espectro de absorção de ACL-I .....	52
II.3.8 Coeficiente de extinção de ACL-I .....	52
II.3.9 Determinação do ponto isoelétrico de ACL-I .....	53
II.3.10 Estabilidade de ACL-I frente a enzimas proteolíticas .....	53
II.3.11 Verificação da natureza glicoprotéica de ACL-I .....	54
II.3.12 Análise de aminoácidos de ACL-I .....	54
RESULTADOS .....	57
DISCUSSÃO .....	74
CAPÍTULO III - Propriedades biológicas das lectinas ACL-I e ACL-II .....	87
INTRODUÇÃO .....	87
III.1 MATERIAIS E MÉTODOS .....	95
III.1.1 Matéria-prima .....	95
III.1.2 Animais .....	95
III.1.3 Eritrócitos .....	95
III.1.4 Obtenção das lectinas .....	96
III.1.5 Produtos, reagentes químicos e equipamentos .....	96
III.2 Propriedades Biológicas .....	97
III.2.1 Determinação da especificidade da hemaglutinação .....	97
III.2.2 Determinação dos inibidores da hemaglutinação .....	97
III.2.3 Atividade quimiotáxica de ACL-I .....	97
III.2.4 Atividade antioxidante de ACL-I .....	99
III.2.5 Atividade citotóxica de ACL-I .....	99
III.2.6 Atividade mitogênica de ACL-I .....	100
III.2.7 Determinação da concentração de proteínas .....	101
RESULTADOS .....	102
DISCUSSÃO .....	108
CAPÍTULO IV - Localização de ACL-I nos tecidos da esponja <i>Axinella corrugata</i> por imuno-histoquímica .....	115
INTRODUÇÃO .....	115
IV.1 MATERIAIS E MÉTODOS .....	119
IV.1.1 Matéria-prima .....	119
IV.1.2 Obtenção da lectina ACL-I .....	119
IV.1.3 Produtos, reagentes químicos e equipamentos .....	119

IV.1.4 Animais .....	120
IV.1.5 Produção de anticorpos policlonais .....	120
IV.1.6 Determinação da presença de anticorpos anti-ACL-I .....	120
IV.1.7 Imunolocalização da lectina ACL-I na esponja <i>Axinella corrugata</i> por MO de campo claro .....	122
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	124
CAPÍTULO V - O uso da lectina ACL-I como marcadora de células transformadas .....	131
INTRODUÇÃO .....	131
V.1 Materiais e Métodos .....	137
V.1.1 Obtenção da lectina ACL-I .....	137
V.1.2 Produtos, reagentes químicos e equipamentos .....	137
V.1.3 Linhagens celulares .....	137
V.1.4 Biotinização de ACL-I .....	139
V.1.5 Verificação da biotinação da lectina .....	139
V.1.6 Marcação das linhagens celulares com a lectina biotinizada .....	139
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	141
DISCUSSÃO GERAL .....	161
CONCLUSÕES .....	165
PERSPECTIVAS .....	167
REFERÊNCIAS .....	169
ANEXOS.....	195
PARECERES DOS MEMBROS DA COMISSÃO EXAMINADORA.....	195
ARTIGOS PUBLICADOS – PUBLICAÇÃO 1.....	201
PUBLICAÇÃO 2.....	211
BIOGRAFIA .....	221



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama seqüencial de sítios de ligação de proteínas.....	8
Figura 1.1: Árvore filogenética da família Axinellidae.....	26
Figura 1.2: Árvore filogenética do gênero <i>Axinella</i> .....	28
Figura 1.3: Esponja <i>Axinella corrugata</i> . Figura 1.3a – Esponja <i>Axinella corrugata</i> , foto <i>in situ</i> ; Figura 1.3b – Detalhe das aberturas osculares.....	29
Figura 1.4: Aspecto da superfície de <i>Axinella corrugata</i> ao MEV, evidenciando a presença de espículas.....	34
Figura 1.5: Aspecto geral da superfície de <i>Axinella corrugata</i> ao MEV, evidenciando a ampla variação na dispersão das espículas.....	35
Figura 1.6: Aspecto geral do esqueleto de <i>Axinella corrugata</i> ao MEV. 1- conjunto de escleras do tipo estilos .....	35
Figura 1.7: Diagrama de algumas das diferentes formas das espículas de <i>Axinella corrugata</i> .....	36
Figura 1.8: Foto do conjunto espicular do esqueleto de <i>Axinella corrugata</i> ao MEV.....	37
Figura 2.1: Cromatograma do extrato bruto tamponado da esponja <i>Axinella corrugata</i> em coluna de estroma de coelho-poliacrilamida .....	57
Figura 2.2: Cromatograma em gel filtração AcA 44 do pico lectínico (P <sub>2</sub> ) obtida da cromatografia em coluna de estroma de coelho-poliacrilamida (figura 2.1).....	58
Figura 2.3: Eletroforese em sistema PAGE em gel de poliactilamida a 11 %, pH 9,2, de ACL-I.....	59
Figura 2.4 A: Eletroforese em sistema SDS-PAGE em gel de poliactilamida a 11 % de ACL-I.....	61
Figura 2.4 B: Eletroforese em sistema SDS-PAGE em gel de poliactilamida a 11 % de ACL-I.....	61
Figura 2.4 C: Eletroforese em sistema SDS-PAGE de ACL-I em gradiente de poliactilamida.....	62
Figura 2.4 D: Eletroforese em sistema SDS-PAGE em gel de poliactilamida a 11 % de ACL-I.....	62
Figura 2.5: Reta de regressão linear para estimação da Mr de ACL-I e de suas subunidades obtida por SDS-PAGE.....	62
Figura 2.6: Reta de regressão linear para estimação da Mr de ACL-I obtida por FPLC.....	63
Figura 2.7: Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante de ACL-I .....	64
Figura 2.8: Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante de ACL-I.....	64
Figura 2.9: Efeito do pH sobre a estabilidade protéica de ACL-I .....	65
Figura 2.10: Espectro de absorção da ACL-I.....	67
Figura 2.11: Eletroforese em sistema PAGE em gel de poliactilamida a 11 %, pH 9,2, de ACL-II.....	70
Figura 2.12: Eletroforese em sistema SDS-PAGE em gel de poliactilamida a 11 % de ACL-II.....	71
Figura 2.13: Reta de regressão linear para estimação da Mr de ACL-II obtida por SDS-PAGE.....	71
Figura 2.14: Reta de regressão linear para estimação da Mr de ACL-II obtida por FPLC.....	72
Figura 2.15: Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante de ACL-II .....	72
Figura 2.16: Efeito do pH sobre a estabilidade protéica de ACL-II.....	73
Figura 3.1: Especificidade de aglutinação de ACL-I para diferentes eritrócitos .....	102

Figura 3.2: Efeito de ACL-I sobre a migração de neutrófilos de rato <i>in vitro</i> .....	104
Figura 3.3: Atividade mitogênica de ACL-I para células mononucleares humanas.....	105
Figura 3.4: Especificidade de aglutinação de ACL-II para diferentes eritrócitos.....	106
Figura 4.1: Imunodeteção da ACL-I por <i>Western blotting</i> .....	124
Figuras 4.2: Imunolocalização de ACL-I em seções da esponja <i>Axinella corrugata</i> ...	125
Figuras 4.2a: Seção transversal dos tecidos de <i>Axinella corrugata</i> – imunolocalização da lectina com emprego de anticorpos policlonais anti-ACL-I produzidos em camundongos, seguido de conjugação com anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase e revelação com DAB.....	125
Figura 4.2b: Seção transversal dos tecidos de <i>Axinella corrugata</i> , evidenciando a presença de células com vesículas e de uma possível câmara coanocitária. Imunolocalização da lectina com emprego de anticorpos policlonais anti-ACL-I produzidos em camundongos, seguido de conjugação com anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase e revelação com DAB.....	125
Figura 4.2c: Seção transversal dos tecidos de <i>Axinella corrugata</i> , evidenciando a presença de células com vesículas e de espículas. Imunolocalização da lectina com emprego de anticorpos policlonais anti-ACL-I produzidos em camundongos, seguido de conjugação com anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase e revelação com DAB.....	125
Figura 4.2d: Seção transversal dos tecidos de <i>Axinella corrugata</i> – controle negativo da imunolocalização da ACL-I, com adição de albumina bovina a 1 % em PBS em substituição ao antisoro anti-ACL-I.....	126
Figura 4.2e: Seção transversal dos tecidos de <i>Axinella corrugata</i> – controle negativo da imunolocalização da ACL-I, sem adição de reagentes.....	126
Figura 4.3: Diagrama das diferentes regiões da esponja <i>Axinella polypoides</i> .....	128
Figura 4.4: Fator de agregação (FA) que une células durante a agregação da esponja <i>Geodia cydonium</i> .....	130
Figura 5.1: Marcação de células da linhagem V79-4 com ACL-I biotinizada e revelada com estreptoavidina-Alexa 488.....	143
Figura 5.1a: células marcadas com ACL-I biotinizada e reveladas com estreptoavidina-Alexa 488 .....	143
Figura 5.1b: controle 1 – células tratadas com ACL-I biotinizada e previamente inibida por GlcNAc 0,2 M e, posteriormente, incubadas com estreptoavidina-Alexa 488.....	143
Figura 5.1c: controle 2 – células tratadas com estreptoavidina-Alexa 488, sem incubação com a lectina biotinizada.....	143
Figura 5.2: Marcação de células da linhagem CHO-K1 com ACL-I biotinizada e revelada com estreptoavidina-Alexa 488.....	145
Figura 5.2a: células marcadas com ACL-I biotinizada e reveladas com estreptoavidina-Alexa 488 .....	145
Figura 5.2b: controle 1 – células tratadas com ACL-I biotinizada e previamente inibida por GlcNAc 0,2 M e, posteriormente, incubadas com estreptoavidina-Alexa 488 .....	145
Figura 5.2c: controle 2 – células tratadas com estreptoavidina-Alexa 488, sem incubação com a lectina biotinizada .....	145
Figura 5.3: Marcação de células da linhagem U-138 MG com ACL-I biotinizada e revelada com estreptoavidina-Alexa 488.....	145
Figura 5.3a: células marcadas com ACL-I biotinizada e reveladas com estreptoavidina-Alexa 488 .....	145
Figura 5.3b: controle 1 – células tratadas com ACL-I biotinizada e previamente inibida por GlcNAc 0,2 M e, posteriormente, incubadas com estreptoavidina-Alexa	

488 .....	145
Figura 5.3c: controle 2 – células tratadas com estreptoavidina-Alexa 488, sem incubação com a lectina biotinizada .....	145
Figura 5.4: Marcação de células da linhagem HT-29 com ACL-I biotinizada e revelada com estreptoavidina-Alexa 488.....	147
Figura 5.4a: células marcadas com ACL-I biotinizada e reveladas com estreptoavidina-Alexa 488 .....	147
Figura 5.4b: controle 1 – células tratadas com ACL-I biotinizada e previamente inibida por GlcNAc 0,2 M e, posteriormente, incubadas com estreptoavidina-Alexa 488 .....	147
Figura 5.4c: controle 2 – células tratadas com estreptoavidina-Alexa 488, sem incubação com a lectina biotinizada .....	147
Figura 5.5: Marcação de células da linhagem OVCAR-3 com ACL-I biotinizada e revelada com estreptoavidina-Alexa 488.....	147
Figura 5.5a: células marcadas com ACL-I biotinizada e reveladas com estreptoavidina-Alexa 488 .....	147
Figura 5.5b: controle 1 – células tratadas com ACL-I biotinizada e previamente inibida por GlcNAc 0,2 M e, posteriormente, incubadas com estreptoavidina-Alexa 488 .....	147
Figura 5.5c: controle 2 – células tratadas com estreptoavidina-Alexa 488, sem incubação com a lectina biotinizada .....	147
Figura 5.6: Marcação de células da linhagem T-47D com ACL-I biotinizada e revelada com estreptoavidina-Alexa 488.....	149
Figura 5.6a: células marcadas com ACL-I biotinizada e reveladas com estreptoavidina-Alexa 488 .....	149
Figura 5.6b: controle 1 – células tratadas com ACL-I biotinizada e previamente inibida por GlcNAc 0,2 M e, posteriormente, incubadas com estreptoavidina-Alexa 488 .....	149
Figura 5.6c: controle 2 – células tratadas com estreptoavidina-Alexa 488, sem incubação com a lectina biotinizada .....	149
Figura 5.7: Marcação de células da linhagem MCF7 com ACL-I biotinizada e revelada com estreptoavidina-Alexa 488.....	149
Figura 5.7a: células marcadas com ACL-I biotinizada e reveladas com estreptoavidina-Alexa 488 .....	149
Figura 5.7b: controle 1 – células tratadas com ACL-I biotinizada e previamente inibida por GlcNAc 0,2 M e, posteriormente, incubadas com estreptoavidina-Alexa 488 .....	149
Figura 5.7c: controle 2 – células tratadas com estreptoavidina-Alexa 488, sem incubação com a lectina biotinizada .....	149
Figura 5.8: Marcação de células da linhagem H460 com ACL-I biotinizada e revelada com estreptoavidina-Alexa 488.....	151
Figura 5.8a: células marcadas com ACL-I biotinizada e reveladas com estreptoavidina-Alexa 488 .....	151
Figura 5.8b: controle 1 – células tratadas com ACL-I biotinizada e previamente inibida por GlcNAc 0,2 M e, posteriormente, incubadas com estreptoavidina-Alexa 488 .....	151
Figura 5.8c: controle 2 – células tratadas com estreptoavidina-Alexa 488, sem incubação com a lectina biotinizada .....	151
Figura 5.9: Marcação de células da linhagem T24 com ACL-I biotinizada e revelada com estreptoavidina-Alexa 488.....	151
Figura 5.9a: células marcadas com ACL-I biotinizada e reveladas com estreptoavidina-Alexa 488 .....	151
Figura 5.9b: controle 1 – células tratadas com ACL-I biotinizada e previamente inibida por GlcNAc 0,2 M e, posteriormente, incubadas com estreptoavidina-Alexa 488 .....	151

Figura 5.9c: controle 2 – células tratadas com estreptoavidina-Alexa 488, sem  
incubação com a lectina biotinizada ..... 151

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das lectinas animais quanto ao seu domínio de reconhecimento a carboidratos.....	14
Tabela 2.1: Gradiente de separação para a eluição dos feniltiocarbonil-aminoácidos .....	55
Tabela 2.2: Purificação de ACL-I.....	59
Tabela 2.3: Efeito de cátions divalentes e do EDTA sobre a atividade hemaglutinante de ACL-I .....	66
Tabela 2.4: Efeito de agentes desnaturantes e redutores sobre a atividade hemaglutinante de ACL-I .....	66
Tabela 2.5: Composição de aminoácidos de ACL-I .....	68
Tabela 2.6: Efeito de cátions divalentes e do EDTA sobre a atividade hemaglutinante de ACL-II .....	73
Tabela 3.1: Inibidores de ACL-I.....	103
Tabela 3.2: Inibidores de ACL-II .....	107
Tabela 5.1: Linhagens celulares empregadas para marcação com ACL-I.....	138
Tabela 5.2: Marcação das linhagens celulares com ACL-I.....	141



## LISTA DE ABREVIATURAS

- AAA: aglutinina de *Anguilla anguilla*
- ACL-I: lectina I de *Axinella corrugata*
- ACL-II: lectina II de *Axinella corrugata*
- ANOVA: análise de variância
- APS: persulfato de amônio
- ATCC: *American Type Culture Collection* (coleção de cultura tipo americano)
- Blotting: técnica de transferência de proteínas
- BSA: *bovine serum albumin* (albumina bovina sérica)
- CHAPS: 3-[(3-colamidopropil) dimetilamônio] -1-propano-sulfonato
- CHO: *Chinese Hamster Ovary cells* (células de ovário de hamster chinês)
- ConA: Concanavalina A
- ConBr: *Canavalia brasiliensis*
- CRD: domínio de reconhecimento de carboidrato
- DAB: 3,3'-diaminobenzidina
- DC: célula dendrítica
- DC-SIGN: *DC-specific ICAM-3 grabbing non-integrin* (ligante de molécula de adesão intercelular não integrina específica de célula dendrítica)
- DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium* (meio de Eagle modificado por Dulbecco)
- DMSO: dimetilsulfóxido
- DNA: ácido desoxirribonucléico
- DPPH: 2,2-difenil-1-picrilidrazil
- DTT: ditioneitol
- EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
- ELISA: *enzyme linked immuno sorbent assay* (ensaio imuno absorvente ligado à enzima)
- EML: lectina de *Euphorbia milii*
- EPM: erro padrão da média

ERGIC: compartimento intermediário entre retículo endoplasmático e complexo de Golgi

FA: fator de agregação

FBS: soro fetal bovino

FCS: soro fetal de bezerro

FPLC: *fast protein liquid chromatography* (cromatografia líquida rápida de proteínas)

GalNAc: *N*-acetil-D-galactosamina

GlcNAc: *N*-acetil-D-glicosamina

GSA: aglutinina de *Griffonia simplicifolia*

HOL: lectina de *Halichondria okadai*

HP: *Hewlett Packard*

HPA: aglutinina de *Helix pomatia*

HPLC: *high-performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência)

ICLC: *Interlab Cell Line Collection* (coleção de linha celular do projeto *Interlab*)

IEF: focalização isoelétrica

IgG: imunoglobulina G

i.p.: intraperitoneal

LAA: aglutinina de *Lycoris aurea*

LacNAc: *N*-acetil-D-lactosamina

LPS: lipopolissacarídeo

ManNAc: *N*-acetil-D-manosamina

MEV: microscopia eletrônica de varredura

MGL: *macrophage galactose-type lectin* (lectina de macrófago tipo galactose)

Mr: massa molecular relativa

MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns* (receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos)

PBS: tampão fosfato salino, pH 7,2

PHA: aglutinina (fitohemaglutinina) de *Phaseolus vulgaris*

PHA-L: leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris*

PHA-M: forma mucoproteína de *Phaseolus vulgaris*

pl: ponto isoelétrico

PMSF: fenilmetilsulfonilfluoreto

PNA: *peanut agglutinin* (aglutinina do amendoim)

pNP: resíduo *p*-nitrofenil

PRPs: *pattern recognition proteins* (receptores protéicos de reconhecimento de padrões moleculares)

PRRs: *pattern recognition receptors* (receptores de reconhecimento de padrões moleculares)

PTC: feniltiocarbonil

PWM: lectina mitógena de *Pokeweed* (tintureira) (*Phytolacca americana*)

RE: retículo endoplasmático

Rf: *rate of flow* (fator de retenção)

RGD: seqüência de adesão celular formado por arginina-glicina-ácido aspártico

RNA: ácido ribonucléico

rpm: rotações por minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute* (meio de cultura segundo o Instituto Memorial Parque Roswell)

SBA: *soybean agglutinin* (aglutinina de feijão de soja)

SCLV: vesículas grandes de células esferulosas da esponja *Axinella polypoides*

SCSV: vesículas pequenas de células esferulosas da esponja *Axinella polypoides*

SDS: dodecil sulfato de sódio

Siglecs: *sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins* (lectinas da superfamília de imunoglobulinas ligadoras de ácido siálico)

SPSS: *statistical package for the social sciences* (programa estatístico para ciências sociais)

SRCR: receptor *scavenger* com domínio rico em cisteína

TCA: ácido tricloroacético

TEMED: *N,N,N',N'*-tetrametil-1,2-diaminometano

TL: lectina do tomate

Tris: tris (hidroximetil)-aminometano

UEA-I: lectina I de *Ulex europaeus*

UH: unidades hemaglutinantes

VML: lectina de *Vatairea macrocarpa*

VVA: aglutinina de *Vicia villosa*

WGA: *wheat germ agglutinin* (aglutinina do gérmen de trigo)

## RESUMO

A partir de extratos aquosos da esponja marinha *Axinella corrugata*, coletada na costa sul do Brasil (Santa Catarina), foram purificadas duas lectinas, ACL-I e ACL-II, por cromatografia em coluna de afinidade de matriz de estroma de coelho-poliacrilamida, seguida por gel filtração em Ultrogel AcA 44. Os trabalhos se concentraram, especialmente, no estudo da lectina com maior atividade hemaglutinante, ACL-I. Dentre os eritrócitos testados, ACL-I aglutinou, fortemente, eritrócitos de coelho, além de eritrócitos caprinos e caninos. A atividade hemaglutinante foi inibida por *N*-acetil-D-glicosamina, *N*-acetil-D-galactosamina e *N*-acetil-D-manosamina com igual intensidade, além de *N*, *N'*, *N''*-triacetilquitotriose, o melhor inibidor. Por outro lado, ACL-II aglutinou, preferencialmente, eritrócitos de coelho e caninos, tendo sua atividade hemaglutinante inibida por *N*-acetil-D-glicosamina, *N*-acetil-D-manosamina, quitina, *N*, *N'*, *N''*-triacetilquitotriose e fetuína, além de D-galactose, mas não por *N*-acetil-D-galactosamina. Ambas lectinas foram fracamente inibidas por *N*-acetil-D-lactosamina. A atividade hemaglutinante mostrou-se independente de cátions divalentes e foi estável a uma ampla faixa de temperatura e de pH para ACL-I e para ACL-II. ACL-I foi estável frente à ação de enzimas proteolíticas, mas perdeu 50 % de sua atividade na presença de agentes redutores e desnaturantes. ACL-I é uma glicoproteína e sua massa molecular relativa foi estimada em 82.300 por SDS-PAGE em condições redutoras e não redutoras, e sem desnaturação pelo calor. Ainda, mostrou ser constituída por 6 subunidades monoméricas de 13.900, apresentando pontes de dissulfeto entre as mesmas. Por FPLC, a massa molecular estimada foi de 78.500. Da mesma forma como para ACL-I, ACL-II apresentou apenas uma banda em sistema SDS-PAGE, na ausência de agente redutor e sem desnaturação pelo calor, cuja massa molecular relativa foi estimada em 80.000, enquanto que por FPLC foi estimada em 78.000. O pI de ACL-I foi de 6,3, avaliado por focalização isoeletrica, e a sua composição centesimal de aminoácidos exibiu uma prevalência de glicina, seguida de ácido aspártico/asparagina, ácido glutâmico/glutamina e alanina. Dentre as atividades biológicas testadas, a ACL-I demonstrou atividade quimiotática, mitogênica e citotóxica, mas não antioxidante. Os ensaios imuno-histoquímicos mostraram que

ACL-I se encontra intracelularmente em grânulos celulares, provavelmente no interior de células esferulosas da esponja marinha. A lectina também mostrou ser uma ferramenta útil na marcação de células transformadas de mama, cólon, pulmão, ovário e bexiga.

Palavras-chave: lectinas, *Axinella corrugata*, esponja marinha, quimiotaxia, citotoxicidade, mitogenicidade, imuno-histoquímica, células transformadas

## ABSTRACT

### **Purification and characterization of lectins ACL-I and ACL-II from the marine sponge *Axinella corrugata*, immunolocalization of ACL-I and its evaluation as marker of cellular transformation**

Two lectins, ACL-I and ACL-II, were purified from aqueous extracts of marine sponge *Axinella corrugata*, collected at Atlantic coastline of southern Brazil (Santa Catarina) by rabbit stroma-polyacrylamide gel affinity column, followed by size-exclusion chromatography on Ultrogel AcA 44. The analysis were performed, especially, on the study of lectin with greater hemagglutinating activity, ACL-I. Among the erythrocytes tested, ACL-I agglutinated, strongly, native rabbit, goat and dog erythrocytes, whose hemagglutinating activity was inhibited by *N*-acetyl-D-glucosamine, *N*-acetyl-D-mannosamine, *N*-acetyl-D-galactosamine and *N*, *N'*, *N''*- triacetylchitotriose. On the other hand, ACL-II agglutinated, preferentially, rabbit and dog erythrocytes, with its hemagglutinating activity inhibited by D-galactose, *N*-acetyl-D-glucosamine, *N*-acetyl-D-mannosamine, chitin, *N*, *N'*, *N''*- triacetylchitotriose and fetuin, but not by *N*-acetyl-D-galactosamine. Both lectins were weakly inhibited by *N*-acetyl-D-lactosamine. The hemagglutinating activity was independent of divalent cations and it was stable at large range of temperature and pH to ACL-I and ACL-II. ACL-I was resistant to enzymatic proteolysis, but lost 50 % of its activity in the presence of reducing or denaturant agents. This lectin presented a relative molecular mass of 82,300 estimated by SDS-PAGE in the presence or absence of 2-mercaptoethanol, without pre-heating, and it is constituted by six monomeric subunits of 13,900, showing disulphide bridges among them. By FPLC the relative molecular mass was 78,500. Similar to ACL-I, ACL-II showed one unique protein band by SDS-PAGE, in the absence of 2-mercaptoethanol and without pre-heating, whose relative molecular mass was estimated as 80,000 and by gel filtration as 78,000. The isoelectric focusing of ACL-I revealed the presence of one unique protein band with pI of 6.3 and the amino acid composition showed a prevalence of glycine, followed by aspartic acid/asparagine, glutamic acid/glutamine and alanine. Among the biological activities analysed, the ACL-I demonstrated chemotactic, mitogenic and cytotoxic activities,

but not antioxidant. The immunohistochemical assays revealed that ACL-I is stored in vesicles, probably inside of spherulous cells of the marine sponge. The lectin showed to be a useful tool in the labelling of transformed cells of breast, colon, lung, ovary and bladder.

Key words: lectins, *Axinella corrugata*, marine sponge, chemotaxis, cytotoxicity, mitogenicity, immunohistochemistry, transformed cells

## INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

Lectinas são glicoproteínas ou proteínas que possuem pelo menos um domínio capaz de reconhecer e ligar, de maneira reversível e com certa especificidade, carboidratos livres ou complexados, sem os modificar. A ligação pode ser tanto a monossacarídeos quanto a carboidratos complexos, como, por exemplo, determinantes glicídicos contendo configuração anomérica específica e resíduos de carboidrato adjacentes. Lectinas podem detectar diferenças sutis entre estruturas glicídicas complexas (Singh; Tiwary; Kennedy, 1999; Varki *et al.*, 1999; Gabius *et al.*, 2002; Peumans, 2002).

As lectinas têm potencial para exercerem um papel fundamental na medicina do século XXI, no controle e prevenção de infecções, na proteção contra antígenos, na identificação de células cancerosas, ação citotóxica, no transporte de fármacos a sítios específicos, na detecção de toxinas em alimentos e medicamentos, na terapia gênica, bem como, na separação, purificação e análise de carboidratos, glicoproteínas, glicolipídios, oligossacarídeos, enzimas e imunoglobulinas. Estudos poderiam ser realizados com modelagem molecular auxiliada por computador sobre a interação específica lectina-carboidrato, o que seria muito útil na compreensão dos processos de interação celular e das funções de proteínas de interesse, tanto em plantas quanto em animais. Além disso, plantas geneticamente modificadas que expressem lectinas poderão desenvolver proteção das plantas contra doenças e intensificar o processo de nodulação e fixação de nitrogênio (Zatta; Cummings, 1992; Kennedy *et al.*, 1995; Ezpeleta *et al.*, 1999; Singh; Tiwary; Kennedy, 1999; Varki *et al.*, 1999; Lehr, 2000; Wang *et al.*, 2000; Woodley, 2000).

As lectinas são ferramentas biotecnológicas atrativas devido à sua alta estabilidade (boa resistência à digestão enzimática no trato gastrointestinal, inclusive

em pH ácido), por serem facilmente disponíveis, por terem elevada especificidade a carboidratos e por suportarem modificações químicas e processos de conjugação. Assim, têm aplicações em muitos campos, incluindo imunologia, estudos bioquímicos nas estruturas de membrana, identificação celular, histologia, citoquímica, etc (Zatta; Cummings, 1992; Ponchel; Irache, 1998).

A partir de 1980, um grande número de lectinas foram isoladas e aplicadas em biotecnologia, com um potencial de uso na indústria, agricultura e medicina. Conforme Kocourek e Freed (1990), Varki *et al.* (1999) e Cruz *et al.* (2005) alguns usos biotecnológicos das lectinas são:

A) como bioefetores: ação imunomoduladora; ação mitogênica (ConA - Concanavalina A, lectina de *Phytollaca americana* e PHA-L - leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris*) a baixas concentrações para linfócitos periféricos humanos; como vacinas; como inibidores (para técnica de cultura de células, seleção de linhagens celulares para produção de substâncias úteis); para tratamento anticâncer ou estimulação de processos de regeneração de tecidos;

B) formas imobilizadas de lectinas para a purificação de glicoproteínas, hormônios, glicopeptídeos, glicanos livres, glicolipídios, imunoglobulinas, enzimas, receptores de membrana;

C) uso de lectinas imobilizadas para detecção de ação enzimática;

D) clonagem de genes de lectinas em bactérias, leveduras, linhagens celulares, etc;

E) como imunotoxinas;

F) uso de lectinas em sistemas carreadores;

G) emprego de lectinas em ensaios como ELISA;

H) utilização de lectinas em técnicas de transferência de proteínas (*blotting*);

I) em histoquímica, como na investigação de glicoconjugados na membrana celular;

J) como biosensores: lectinas marcadas com fluorocromo para microscopia e citometria de fluxo;

K) uso para copolimerização de lectinas e enzimas em géis para o transporte de substratos de enzimas;

L) emprego na agricultura, na melhora da fixação de nitrogênio em arroz e outros cereais.

As maiores aplicações das lectinas atualmente conforme Sharon e Lis (2004) são:

- A) separação e identificação celular;
- B) detecção, isolamento e estudos estruturais de glicoproteínas;
- C) investigação de carboidratos em células e organelas subcelulares; histoquímica e citoquímica;
- D) mapeamento de rotas neuronais;
- E) seleção de mutantes resistentes a lectinas;
- F) estudos de biossíntese de glicoproteínas.

Os usos clínicos das lectinas se concentram principalmente na estimulação mitogênica de linfócitos, na depuração da medula óssea para transplante, na tipagem bacteriana e celular e como imunotoxinas (Nicolson, 1974; Brown, Hunt, 1978; Reisner *et al.*, 1981; Slifkin; Doyle, 1990; Sharon; Lis, 2004). Lectinas já são usadas também como sondas no auxílio de diagnósticos histopatológicos com relação a tumores primários e suas metástases (Renani *et al.*, 1994; Mody; Joshi; Chaney, 1995) e em diagnósticos não histopatológicos para câncer (Leerapun *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007), além do tratamento clínico de tumores (Beuth *et al.*, 1992; Beuth, 1997; Lenartz *et al.*, 2000).

As esponjas marinhas constituem um campo relativamente novo de pesquisa, com inúmeros tipos de metabólitos primários e secundários ainda para serem descobertos, dentre eles, as lectinas. O trabalho de rastreamento da atividade hemaglutinante de extratos aquosos de esponjas marinhas realizado por Dresch e colaboradores (2005) mostrou uma atividade destacada na esponja marinha *Axinella corrugata*. Devido a este fato, a(s) lectina(s) dessa esponja foi(foram) escolhida(s) para estudo, aliado pela busca contínua de novos compostos farmacologicamente ativos. Não foi encontrado na literatura nenhuma referência ao estudo das lectinas desta esponja, o que possibilita a descoberta de alguma atividade biológica importante, inclusive com possíveis aplicações na compreensão de processos fisiológicos e na terapêutica.

Visando um ordenamento dos assuntos abordados, o trabalho está dividido em cinco capítulos.

O capítulo I apresenta uma revisão da literatura sobre a esponja *Axinella corrugata*, com a análise de características morfológicas do esqueleto da referida esponja por MEV (microscopia eletrônica de varredura), com fins de sua identificação.

O capítulo II relata a purificação e caracterização físico-química e/ou química das lectinas I e II da esponja marinha.

O capítulo III inclui um levantamento bibliográfico sobre atividades biológicas de lectinas de animais com a aplicação de métodos para a determinação das propriedades biológicas das lectinas I e II da referida esponja.

O capítulo IV aborda como as lectinas podem contribuir para a constituição estrutural e para a biologia celular das esponjas marinhas. Dessa maneira, anticorpos policlonais contra ACL-I foram produzidos em camundongos com o objetivo de se verificar a localização desta lectina nos tecidos da esponja.

O capítulo V apresenta uma revisão bibliográfica sobre a função biológica dos carboidratos de membrana celular e a participação das lectinas nesse processo. Neste contexto, a marcação de glicoconjugados da membrana celular de células transformadas com a lectina ACL-I conjugada a fluoróforo, objetivou utilizar a mesma como instrumento de diagnóstico de tumores malignos.

## OBJETIVOS

### Objetivos Gerais:

Extração, isolamento, purificação e avaliação das propriedades biológicas da(s) lectina(s) da esponja marinha *Axinella corrugata*.

### Objetivos Específicos:

Realizar a caracterização morfo-anatômica de *Axinella corrugata*;

Propor um protocolo de purificação para a(s) lectina(s) de *Axinella corrugata* a partir de seus extratos aquosos, além de estimar a massa molecular e estudar o efeito da temperatura, do pH e de cátions divalentes e do EDTA sobre a estabilidade protéica e/ou hemaglutinação.

Determinar o ponto isoelétrico, o número de cadeias polipeptídicas, os aminoácidos constituintes e a natureza glicoprotéica ou não de ACL-I, bem como o efeito de agentes redutores e desnaturantes e de enzimas proteolíticas sobre a atividade dessa lectina;

Verificar as propriedades biológicas, principalmente de ACL-I, como atividade quimiotática, mitogênica, citotóxica e antioxidante, e a especificidade para diferentes carboidratos e células sangüíneas (eritrócitos), visando possíveis aplicações;

Realizar a imunolocalização de ACL-I nos tecidos de *Axinella corrugata*;

Utilizar ACL-I como marcadora de células transformadas.



## REVISÃO DO TEMA

### Lectinas

Inicialmente, o termo lectina referia-se à habilidade de algumas proteínas (denominadas de hemaglutininas pela primeira vez por Elfstrand em 1898) de ligarem-se de forma seletiva a carboidratos da membrana de eritrócitos, provocando a aglutinação dos mesmos (Sumner; Howell, 1936; Watkins; Morgan, 1952; Damme *et al.*, 1998). O termo lectina, em substituição ao nome hemaglutinina, foi primeiramente proposto por Boyd e Shapleigh em 1954, tendo em vista à distinção de eritrócitos de diferentes tipos sangüíneos por parte de aglutininas de plantas em função da presença de certo grupo de moléculas de carboidrato na superfície da membrana plasmática eritrocitária. Contudo, constatou-se que as lectinas eram proteínas de origem não imune que se ligavam a carboidratos e poderiam aglutinar outras células além de eritrócitos, precipitando polissacarídeos, glicoproteínas e glicolipídios, caso apresentassem os carboidratos para os quais são específicos. O nome lectina é derivado da palavra *legere* em latim, que significa escolher, eleger. Também verificou-se que algumas lectinas apresentam apenas um sítio de ligação a carboidratos e assim, não são capazes de aglutinarem glicoconjugados ou células. Ainda, há lectinas que apresentam além do domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) um outro domínio catalítico, com atividade enzimática (Micucci; Camps, 1987; Peumans; Damme, 1995; Kilpatrick, 2000; Sharon; Lis, 2004). Dessa maneira, o conceito mais apropriado de lectina estabelece que lectina é toda aquela proteína que possui ao menos um domínio não catalítico que liga-se de forma reversível e com especificidade a mono ou oligossacarídeos, livres ou conjugados (Peumans; Damme, 1995). Barondes (1988) descreve lectinas que apresentam um domínio adicional que não reconhece carboidratos como moléculas bifuncionais,

representando um diagrama de três tipos de proteínas que ligam a carboidratos, conforme figura 1.



Figura 1: Diagrama sequencial de sítios de ligação de proteínas. >< proteína com dois CRD; >< proteína com dois CRD e um domínio que não reconhece carboidratos; > proteína com um CRD; < > proteína com um CRD e um domínio que não reconhece carboidratos (Barondes; 1988).

A estrutura protéica das lectinas é altamente diversificada. São encontradas em plantas, algas, microrganismos (vírus, bactérias), fungos, animais invertebrados (moluscos, crustáceos, protozoários, esponjas) e vertebrados (peixes, batráquios, répteis, aves, mamíferos e no ser humano). No homem estão presentes em plaquetas, células endoteliais, macrófagos, fibroblastos, espermatozóides, linfócitos, células normais ou transformadas, fígado, baço, tecido nervoso, etc (Micucci; Camps, 1987; Singh; Tiwary; Kennedy, 1999; Kilpatrick, 2000; Kilpatrick, 2002; Loris, 2002; Sharon; Lis, 2004; Bettler; Imberty; Loris, 2005).

Mitchell e Reichert (1886) foram os primeiros a observar a propriedade de aglutinação de venenos de cobra (Liener; Sharon; Goldstein, 1986). Logo em seguida, foi feita a primeira descrição de lectinas, em plantas, mais precisamente em sementes de *Ricinus communis* (Stilmark, 1888; Micucci; Camps, 1987; Sharon; Lis, 2004), culminando no isolamento da ricina. Em invertebrados, o primeiro registro de lectinas foi em caracóis, no albúmen de *Helix pomatia* (Camus, 1899). Em 1902/1903 foram descobertas lectinas na hemolinfa de crustáceos (Noguchi *apud* Liener; Sharon; Goldstein (1986); Noguchi, 1903) e no veneno de cobras (Fletcher; Noguchi, 1902). Por outro lado, em mamíferos, foi relatada a primeira lectina em bovinos, a conglutinina (Bordet; Gay, 1906).

NOGUCHI, H. *University of Pennsylvania. Medical Bulletin*, v. 15, p. 295-301, 1902 *apud* LIENER, I. E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. *The Lectins – Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. Orlando: Academic Press, 1986. 600 p.

A partir de 1935 foram encontradas lectinas em extratos de enguias e mostrado o seu uso potencial para tipagem sangüínea (Liener; Sharon; Goldstein, 1986). Os estudos realizados por Sugishita (1935) e Jonsson (1944) em enguias e por Renkonen (1948) e Boyd e Reguera (1949) em plantas podem ser considerados como os primeiros que reconheceram que as lectinas podem ser específicas a grupos sangüíneos e, assim, passíveis de serem utilizadas como moléculas de reconhecimento (Liener; Sharon; Goldstein, 1986; Sol *et al.*, 2006).

Em 1964 foi citada uma lectina na hemolinfa de moluscos (*Saxidomus giganteus*) (Johnson, 1964) que passaram a ser os invertebrados mais investigados (Micucci; Camps, 1987). Lectinas foram primeiramente descritas em esponjas por Dodd, MacLennan e Hawkins (1968). A primeira lectina relatada em um tecido específico de vertebrados foi a do órgão elétrico da enguia *Electrophorus electricus* em 1975 por Teichberg e colaboradores. Também foram descobertas lectinas com atividade hemaglutinante em mariscos (Vasta, 1978).

Tradicionalmente, as lectinas são classificadas conforme sua similaridade de seqüência de aminoácidos e na estrutura terciária. Contudo, também podem ser classificadas com base em seu sistema de reconhecimento de carboidratos e características topológicas do sítio de combinação (Devarajan; Sonavane, 2003).

De acordo com a sua estrutura, as lectinas, independente de sua origem, podem ser classificadas em quatro grupos. Merolectinas são as lectinas que possuem apenas um CRD. Assim, elas são monovalentes e não podem precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Hololectinas apresentam dois ou mais CRD idênticos ou muito homólogos, ligando-se a carboidratos estruturalmente similares ou idênticos (Damme *et al.*, 1998; Neumann *et al.*, 2004). Algumas lectinas também apresentam um outro domínio cuja ligação hidrofóbica é não específica a um ligante não carboidrato via interações proteína-proteína, proteína-lipídio e proteína-ácido nucléico. Estas são as quimerolectinas que possuem pelo menos um CRD e um outro domínio não relacionado, sendo este possivelmente responsável por uma atividade enzimática bem definida ou a outras atividades biológicas da proteína que ocorrem independentemente ou não do CRD. Por exemplo, a proteína não integrina ligante à elastina/laminina liga-se à elastina e à laminina via ligação hidrofóbica proteína-proteína, contudo, tem também um CRD associado à galactose. Entretanto,

estas duas atividades não são independentes. A elastina liga-se com alta afinidade à proteína na ausência da galactose, mas a presença deste carboidrato ou outro relacionado muda a conformação da não integrina e causa a concomitante queda na afinidade pela elastina. Desta maneira a interação lectina-carboidrato pode regular a interação proteína-proteína (Barondes, 1988; Ponchel; Irache, 1998; Damme *et al.*, 1998; Kilpatrick, 2002; Neumann *et al.*, 2004). Por fim, as superlectinas têm pelo menos dois CRD estruturalmente diferentes e que reconhecem carboidratos não relacionados (Damme *et al.*, 1998; Neumann *et al.*, 2004).

As lectinas animais, do ponto de vista funcional, são classificadas em intracelulares, proteínas ligadas à membrana ou extracelulares. As primeiras são envolvidas no controle de qualidade celular e na seleção de glicoproteínas em rotas secretórias, assim como, em processos específicos no compartimento citoplasmático e nuclear. As lectinas de superfície celular agem como receptores e são mais associadas a processos de endocitose (receptores para ligantes fisiológicos, como enzimas lisossomais e asialoglicoproteínas), adesão celular, interação célula-célula e imunidade inata, estando restritas ao tipo de célula no qual foram sintetizadas. Por sua vez, as lectinas extracelulares são envolvidas na organização da matriz extracelular, no crescimento e desenvolvimento celular, além de agir como moléculas sinalizadoras na imunidade. São capazes de se difundir localmente em tecidos ou atingir a circulação (Singh; Tiwary; Kennedy, 1999; Varki *et al.*, 1999, Damme *et al.*, 2004). A associação seletiva das lectinas a glicoproteínas ou glicolipídios da superfície celular acarreta outras implicações funcionais, como embriogênese e mecanismos para a eliminação de patógenos, como aglutinação, imobilização, opsonização mediada por complemento e lise (Vasta; Ahmed; Odom, 2004).

A natureza da ligação lectina animal-carboidrato pode ser de dois tipos: aquele envolvendo glicosaminoglicanos (principalmente heparina e ácido hialurônico, via contato de carga superficial) e o envolvendo *N*- e *O*-glicanos. Os sítios de ligação são de relativamente baixa afinidade e são encontrados em reentrâncias superficiais das proteínas. A região de contato entre o sacarídeo e a proteína normalmente envolve de um a três resíduos de carboidrato, o que proporciona baixa afinidade e alta especificidade (Varki *et al.*, 1999).

A seletividade da ligação lectina-carboidrato é principalmente atingida via pontes de hidrogênio (envolvendo grupos hidroxila do carboidrato e da cadeia lateral da lectina ou grupos amida da cadeia principal da proteína com hidroxilas do carboidrato), forças de van der Waals (envolvendo a face hidrofóbica do monossacarídeo e o aminoácido aromático) e via interações hidrofóbicas (especialmente entre a galactose e o triptofano ou fenilalanina). Contudo, pode também ser devida a interações metálicas por cátions divalentes (Elgavish; Shaanan, 1997; Varki *et al.*, 1999). Moléculas de água são capazes de mediar as pontes de hidrogênio entre carboidrato e proteína, cuja interação pode ser tão forte quanto as pontes de hidrogênio carboidrato-proteína, equivalendo aos grupos ligantes de hidrogênio da proteína e assim ser considerada parte da arquitetura do sítio de ligação lectina-carboidrato. Além disso, as posições das moléculas de água nos CRD de uma certa lectina podem ser substancialmente conservadas e inclusive tais moléculas podem mimetizar a função de grupos hidroxila ausentes no CRD da proteína. Outra forma de interação é entre aminoácidos da lectina e carboidratos carregados, como o grupamento carboxilato do ácido siálico e derivados com aminoácidos carregados positivamente na cadeia lateral, como arginina (Weis; Drickamer, 1996; Vijayan; Chandra, 1999).

A situação de baixa afinidade entre lectina-carboidrato faz com que a grande maioria das lectinas animais contenham uma estrutura com várias subunidades ou apresentem múltiplos domínios de CRD dentro de uma única molécula protéica, o que acarreta numa característica multivalente às lectinas. Desta maneira uma mesma lectina pode apresentar uma diversidade de ligação a carboidrato, gerando uma função diferente. Tal multivalência das lectinas otimiza a função lectínica na natureza, possibilitando mediar interações biologicamente relevantes (Varki *et al.*, 1999).

Entretanto, existem algumas exceções, como as selectinas (lectinas tipo C, dependentes de cálcio) e os *siglecs* (lectinas tipo I, proteínas com sítio de ligação a carboidrato pertencentes ao domínio da superfamília das imunoglobulinas) que apresentam apenas um CRD (Varki *et al.*, 1999).

As lectinas animais são agrupadas em famílias baseadas na natureza do seu carboidrato ligante, no processo biológico no qual participam, na sua localização, no

sítio de reconhecimento de carboidrato, na sua dependência de cátions divalentes e na homologia de sua estrutura primária. A atividade lectínica pode estar vinculada a várias famílias não relacionadas de lectinas no que se refere à estrutura primária da molécula protéica. A classificação baseada nas características de seqüências de reconhecimento compartilhadas é atualmente uma das mais úteis ferramentas para agrupar as lectinas em famílias. Enquanto que a arquitetura total das lectinas varia amplamente, a ligação ao carboidrato pode ser atribuída a uma porção limitada de uma dada lectina, segmento este denominado pela primeira vez de domínio de reconhecimento de carboidrato em 1988, por Kurt Drickamer. CRDs em cada grupo de lectinas partilham de um padrão constante e altamente conservado de resíduos de aminoácidos (Drickamer, 1988; Drickamer; Taylor, 1993; Kilpatrick, 2002). Dessa maneira, as lectinas são capazes de reconhecer diferenças sutis na estrutura de glicanos complexos (configuração do carboidrato, pontos distintos de ligação aos aminoácidos do CRD, seqüência de carboidratos específica ou conformação do mesmo no sítio de reconhecimento) e, portanto, capazes de discriminar entre diferentes tipos de células que têm variações pequenas nos tipos de carboidratos de membrana (Cavada *et al.*, 1993; Cruz *et al.*, 2005).

Um mesmo domínio de união a carboidratos pode apresentar diferente estequiometria e orientação espacial em diferentes lectinas multiméricas (com várias subunidades), o que incrementa sua variabilidade estrutural. Como conseqüência, lectinas da mesma família exibem especificidade para diferentes carboidratos ou reconhecem diferentes determinantes da mesma estrutura complexa de carboidratos, propiciando que ajam em diferentes atividades biológicas. Por outro lado, as interações multivalentes das lectinas com seus carboidratos modulam sua seletividade e a afinidade da ligação lectina-polissacarídeo, além de incrementar sua atividade (Calvete *et al.*, 1998; Calvete *et al.*, 1999; Neumann *et al.*, 2004; Sol *et al.*, 2006).

Em 1988 as lectinas animais eram classificadas em apenas duas categorias, segundo seu CRD: lectinas tipo C e lectinas tipo S (lectinas com afinidade para galactose e não necessariamente dependem de grupos SH para exercer sua atividade) (Drickamer, 1988). Contudo, com o avanço das pesquisas, constatou-se que nem todas as lectinas que não eram do tipo C não requeriam cálcio. Assim, atualmente, as lectinas animais são classificadas em 9 famílias principais, conforme

seu CRD: calnexina, lectinas tipo C, L (lectinas animais com alguma semelhança com as lectinas de sementes de plantas leguminosas), P (lectinas com especificidade para manose 6-fosfato), I, R (família de proteínas relacionadas a ricina), M (lectinas que se ligam a glicanos contendo manose) , S e F (muitas lectinas desta família se ligam a fucose) (Savan; Endo; Sakai, 2004; Vasta; Ahmed; Odom, 2004). Há muitas controvérsias na literatura quanto ao número de famílias de lectinas animais existentes. Além disso, muitas lectinas já foram descobertas, mas a homologia da seqüência de carboidratos que melhor reconhecem, ainda é desconhecida, fazendo com que não sejam agrupadas em nenhuma família (Varki *et al.*, 1999).

Em bases de dados de lectinas encontra-se uma classificação mais detalhada quanto aos tipos de famílias de lectinas animais existentes (tabela 1), conforme os autores Bettler, Imberty e Loris (2005); Drickamer (2006) e Hirabayashi e Kojima (1997), complementado pelos autores Sanz *et al.* (1992) e Rosen *et al.* (1973) que classificam as espermadesinas e as discoidinas como lectinas animais, respectivamente. Baumgartner *et al.* (1998) e Kilpatrick (2002) também consideram as discoidinas como lectinas animais. De acordo com Baumgartner *et al.* (1998), Bettler, Imberty e Loris (2005) e Drickamer (2006) as famílias de lectinas animais presentes em invertebrados são: lectinas tipo P, C, R, F, S, intelectinas, discoidinas e proteínas ligadoras de quitina.

Tabela 1: Classificação das lectinas animais quanto ao seu domínio de reconhecimento de carboidratos.

<b>Família de lectina</b>	<b>Carboidrato ligante</b>	<b>Localização</b>	<b>Função</b>
Lectinas tipo C (Gabius, 1997; Drickamer, 2006)	manose, galactose, fucose, GlcNAc, GalNAc e derivados	extracelular, membrana celular	interação célula-célula, imunidade inata e adquirida, montagem da rede da matriz extracelular, eliminação de glicoproteínas (enzimas lisossomais, hormônios, colágeno e de células com glicosilação estranha ou aberrante)
Lectinas tipo I (Drickamer, 2006)	Man <sub>6</sub> GlcNAc <sub>2</sub> , ácido siálico e derivados, ácido hialurônico	membrana celular	interação célula-célula, interação célula-matriz extracelular, imunidade inata e adquirida
Lectinas tipo S (galectinas) (Drickamer, 2006; Gabius, 2006)	β-galactosídeos	extracelular, intracelular, membrana plasmática	ligação cruzada de glicanos na matriz extracelular, interação substrato-célula, interação célula-célula, montagem da rede da matriz extracelular, imunidade inata
Lectinas tipo F (fucolectinas) (Gabius, 1997; Vasta; Ahmed; Odom, 2004; Drickamer, 2006)	galactose e derivados, monossacarídeos sulfatados e fosforilados, oligossacarídeos terminando em fucose	extracelular, intracelular	imunidade inata, fertilização, captura de restos celulares, reconhecimento de glicosilação estranha ou aberrante nas células, endocitose
Lectinas tipo P (Gabius, 1997; Drickamer, 2006)	glicoproteínas contendo manose-6-fosfato e outros	intracelular	transporte de proteínas pós-Golgi, degradação de glicoproteína, atividade enzimática, endocitose
Lectinas tipo L (Drickamer, 2006)	glicanos ligados a manose, GalNAc e outros	RE, ERGIC, Golgi	saída de proteínas do RE
Lectinas tipo R (Drickamer, 2006)	galactose, GalNAc e outros	Golgi, membrana celular	<i>turnover</i> de hormônios, atividade enzimática
Calnexinas (Drickamer, 2006)	glicanos ligados a Glc <sub>1</sub> Man <sub>9</sub> GlcNAc <sub>2</sub>	RE	saída de proteínas do RE, <i>fold</i> ing de proteínas, degradação protéica
Anexinas (Hirabayashi, 1997; Hirabayashi; Kojima, 1997)	fosfatidil-(serina, etanolamina, inositol, colina), esfingomielina	intracelular	regulação da atividade da fosfolipase A2, transporte vesicular de lipídios, endocitose, exocitose

Tabela 1(continuação)

Proteínas ligadoras de quitina (Kawabata <i>et al.</i> , 1996; Shen; Jacobs-Lorena, 1999 ; Bettler; Imberty; Loris, 2005)	quitina	intracelular, extracelular	imunidade inata e outras não definidas
Ficolinas (Holmskov; Thiel; Jensenius, 2003; Liu <i>et al.</i> , 2005 ; Drickamer, 2006)	fucose, GlcNAc, GalNAc, sialil-N-acetilactosamina	extracelular, membrana plasmática	imunidade inata, reconhecimento de glicosilação estranha ou aberrante nas células
Espermadesinas (Töpfer-Petersen <i>et al.</i> , 1998; Töpfer-Petersen, 1999; Sanz <i>et al.</i> 1992)	oligossacarídeos contendo manose-6-fosfato, galactose, GalNAc, glicanos ligados a GlcNAc e GalNAc, polissacarídeos sulfatados	extracelular	fertilização
Lectinas como quitinase (quilectinas) (Drickamer, 2006; Vasta <i>et al.</i> , 2007)	quitina, quito-oligossacarídeos, glicosamina, heparina, galactosamina	extracelular	metabolismo do colágeno, imunidade inata, interação célula matriz extracelular
F-box lectinas (Drickamer, 2006)	GlcNAc	citoplasma	degradação de glicoproteínas defeituosas no citoplasma
Lectinas tipo X (intelectinas) (Drickamer, 2006; Vasta <i>et al.</i> , 2007)	galactose, galactofuranose, pentoses	extracelular, membrana celular	imunidade inata, fertilização e embriogênese
Lectinas tipo M (Drickamer, 2006)	glicanos contendo manose	RE	remoção de glicoproteínas defeituosas do RE com posterior degradação no citoplasma
Discoidinas (Rosen <i>et al.</i> , 1973; Baumgartner <i>et al.</i> , 1998 ; Kilpatrick, 2002)	galactose, GalNAc, $\beta$ -galactosídeos	extracelular, membrana celular	interações células-matriz extracelular, agregação celular, coagulação, adesão celular, receptores de enzimas, fertilização, reconhecimento e interação célula-célula

## Aplicações futuras das lectinas

Um dos maiores problemas com a administração oral de fármacos de difícil absorção é a rapidez com a qual eles passam através do trato gastrointestinal. Com um tempo de trânsito no intestino delgado de menos de três horas isto normalmente prejudica a completa absorção do fármaco. Se o tempo de residência de um fármaco no intestino fosse incrementado, tal fato poderia conduzir a uma melhor absorção, permitir menor administração de doses e diminuir possíveis efeitos tóxicos ou adversos (Naisbett; Woodley, 1995). O uso de lectinas para a vetorização de fármacos de difícil absorção a sítios específicos no organismo humano representa um grande potencial para o tratamento futuro de doenças. Além da ligação de fármacos a um tecido específico e na diminuição do trânsito gastrointestinal dos mesmos, as lectinas poderiam ser usadas na internalização e subsequente envio intracelular de fármacos, como a lisossomos, núcleo e citoplasma.

Outros estudos que poderiam ser feitos é na modelagem molecular auxiliada por computador da interação específica lectina-carboidrato, o que seria muito útil no entendimento do processo de absorção de certos fármacos (Lehr, 2000; Woodley, 2000).

O uso de novas proteínas bioativas no tratamento de doenças depende do desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos que superem o problema da instabilidade relacionada a proteínas e peptídeos após administração intravenosa ou subcutânea. O uso da nanotecnologia farmacêutica de carreadores coloidais de fármacos, especialmente lipossomos, é de grande aplicação porque tornam os fármacos seguros da degradação nos fluidos biológicos, prolongando a sua circulação no sangue e conduzindo à sua penetração nas células (Andrade *et al.*, 2004).

A ligação de lectinas a sistemas carreadores (nanopartículas, lipossomos, micropartículas, microesferas) pode ser obtida por ligação covalente (mais estável) ou por adsorção. Outra possibilidade consiste no emprego de lipossomos polimerizados (Ponchel; Irache, 1998; Arangoa *et al.*, 2000). O uso de vetores com lectinas transportando fármacos devem ser desenvolvidos para permitir a liberação

do fármaco durante o período de tempo correspondente à duração de sua adesão ao tecido desejado, o que torna estes procedimentos de preparação mais complexos (Ponchel; Irache, 1998).

Em vista disso, a administração oral a ratos e camundongos de lipossomos contendo insulina conjugados ou não a distintas lectinas (WGA - aglutinina do gérmen de trigo, TL-lectina do tomate- e UEA-I - lectina I de *Ulex europaeus*) ligadas covalentemente a fosfatidiletanolamina foi comparada com a administração subcutânea e intraperitoneal de insulina, respectivamente. Em ratos e camundongos o efeito hipoglicemiante dos lipossomos conjugados a lectinas foi considerável, observando-se ausência de efeito significativo naqueles lipossomos de insulina administrados oralmente livres de lectina. Em camundongos, lipossomos contendo UEA-I tiveram o mesmo efeito da insulina administrada intraperitonealmente, mas lipossomos conjugados a WGA tiveram efeito hipoglicemiante marcante. Em ratos, a insulina administrada subcutaneamente provocou menor efeito hipoglicemiante do que os lipossomos conjugados a lectina. As lectinas ligadas a lipossomos intensificaram a absorção oral de insulina devido à sua combinação com sítios específicos no trato gastrintestinal, podendo se constituir num sistema importante de vetorização de peptídeos e de proteínas (Zhang *et al.*, 2005). Outro sistema carreador à base de nanopartículas para a administração de insulina por via oral a ratos foi desenvolvido por Zhang *et al.* (2006), também empregando WGA. O nível de glicose sanguínea diminuiu consideravelmente com efeito mais marcante após 3 horas da administração, o que igualmente mostrou que esse sistema intensificou a absorção intestinal de insulina por ligação do carreador a receptores das células do epitélio intestinal e que protegeu a mesma da ação de enzimas proteolíticas. Resultados semelhantes foram obtidos por Kim *et al.* (2005) após administração oral a ratos de micropartículas contendo insulina, conjugadas a WGA.

Em outro estudo, Yin e colaboradores (2006) desenvolveram um conjugado contendo WGA e o incorporaram numa preparação de nanopartículas contendo timopentina. A timopentina é um peptídeo sintético usado no tratamento de doenças auto-imunes. Contudo, apresenta tempo de meia vida muito curto e extenso metabolismo no trato gastrintestinal. O sistema carreador foi administrado via oral (1 mg/kg ao dia, durante 6 dias) a ratos induzidos a leucopenia. A análise do sangue dos animais após o tratamento revelou que o nível de linfócitos naqueles tratados

com o sistema carreador teve um aumento significativo em relação aos controles negativos. Na dose de 10 µg de WGA/mg de nanopartícula os resultados foram semelhantes àqueles animais que receberam timopentina por via intravenosa, forma empregada na administração do fármaco, demonstrando notável efeito imunomodulador. Os autores verificaram um aumento na absorção e uma proteção contra degradação ácida e enzimática.

Com relação a vacinas, duas estratégias estão sendo estudadas para aperfeiçoar a imunidade por via oral: associação de vacinas com micropartículas para proteger antígenos lábeis da proteólise e propiciar a absorção pelo intestino e associação de antígenos com lectinas de plantas ou de bactérias que são estáveis no intestino e encaminham vacinas, especificamente, ao epitélio intestinal. Tais estratégias podem ser combinadas para gerar sistemas onde as vacinas são retidas na forma de partículas, protegidas da degradação e encaminhadas ao epitélio intestinal, induzindo assim a resposta imune nos sítios do trato gastrointestinal. Com isso se melhora a absorção e inclusive se pode alterar a via de administração (Lavelle, 2006).

A atividade citotóxica de lectinas também pode ser explorada pelo uso de sistemas carreadores. Andrade e colaboradores (2004) analisaram a atividade antitumoral da lectina de *Cratylia mollis* associada a lipossomas contra sarcoma 180 em camundongos. O tratamento foi conduzido intraperitonealmente por 7 dias (7 mg/kg/dia). Análises histopatológicas do tumor conduziram a uma inibição de 71% do sarcoma. Os resultados permitem uma aplicação da lectina no campo da nanotecnologia farmacêutica. Os autores concluíram que os lipossomas são sistemas estáveis, o que prolongou o contato entre as células do tumor e os fármacos encapsulados.

## Esponjas

O filo Porifera faz parte dos metazoários, representando esponjas que são especializadas por serem sésseis e por terem um plano corporal incomum, construído ao redor de um sistema de canais de água e de câmaras, por onde circula a água, contendo uma considerável população móvel de células capazes de totipotência e imperfeitamente dispostas, com certo grau de independência. Somente em 1765 foram observadas pela primeira vez as correntes de água internas nas esponjas. Estes invertebrados possuem espículas silicosas ou calcáreas, na maioria, mas não todas as espécies. As esponjas são agrupadas em 4 classes: Hexactinellida, Demospongiae, Archaeocyatha e Calcarea (Storer *et al.*, 1984; Ruppert; Barnes, 1996; Hooper; Soest; Debrenne, 2002).

A estrutura das esponjas pode ser caracterizada como uma superfície perfurada por muitas pequenas aberturas (óstios ou poros incorrentes), de onde deriva o nome Porifera. Cada poro é formado por um porócito, canal através de uma célula tubular, que se estende da superfície externa até a cavidade interna da esponja (espongiocela). A cavidade ou luz do porócito forma o óstio (com capacidade de se fechar ou de se abrir por meio de uma contração) que por sua vez abre-se para o exterior através de uma grande abertura (óstulo). A superfície externa das esponjas reveste-se de células achatadas de propriedade contrátil (pinacócitos), que juntas constituem a pinacoderme. Os pinacócitos podem se mover em direção ao mesoílo. Abaixo da pinacoderme encontra-se o mesoílo, consistindo de uma matriz protéica gelatinosa que contém material esquelético e células amebóides (amebócitos) (Storer *et al.*, 1984; Gaino; Manconi; Pronzato, 1995; Ruppert; Barnes, 1996).

O esqueleto pode ser composto por espículas e/ou fibras de espongina (fibrilas de colágeno). As espículas freqüentemente se projetam através da pinacoderme. As células amebóides são os arqueócitos (fagocitários, totipotentes e exercem papel na digestão e captura de nutrientes), colêncitos (células fixas secretoras de colágeno), esclerócitos (secretores de espículas), espongiócitos (secretores do esqueleto de espongina), miócitos (células longas, contráteis, que formam esfíncteres ao redor dos poros e do óstulo) e outras células móveis

secretoras de colágeno. Os arqueócitos também podem dar origem às células reprodutivas (óvulos e gêmulas) e aos demais amebócitos. No lado interno do mesoílo encontra-se uma camada frouxa de células, denominada de coanócitos, responsáveis pelo movimento da água através da esponja, por obter alimento e também transferi-lo para os amebócitos, além de participarem do processo de excreção, sendo consideradas as células fundamentais das esponjas. Os pinacócitos podem se diferenciar em coanócitos. Os arqueócitos podem se diferenciar em pinacócitos e vice-versa. Por sua vez, os arqueócitos podem se diferenciar em coanócitos e vice-versa, o que confere uma grande plasticidade às esponjas. Os coanócitos são responsáveis pela produção do esperma e óvulos. Devido à ocorrência de citoplasma rico em grânulos, como em *Chondrilla nucula*, eles são grosseiramente estocados no mesoílo em células esferulosas, fase final da especialização dos arqueócitos (Storer *et al.*, 1984; Gaino; Manconi; Pronzato, 1995; Ruppert; Barnes, 1996; Müller *et al.*, 2003).

As esponjas são uns dos animais multicelulares mais simples e estão entre os mais antigos animais metazoários. Eles diferem de outros grupos de invertebrados por manterem independência entre suas células constituintes, já que não formam órgãos, mas apresentam um tecido conjuntivo bem desenvolvido no qual as células realizam várias funções. Sua digestão é intracelular e sua respiração e excreção ocorrem por difusão passiva. Devido à sua prevalência, distribuição e habilidade de sintetizar uma gama de substâncias de diferentes classes estruturais, esses organismos tornaram-se uma das fontes promissoras para descoberta de novos compostos com atividade biológica (Stebbins, 1991; Carté, 1996; Ruppert; Barnes, 1996; Hentschel; Usher; Taylor, 2006).

Aproximadamente 7000 espécies de esponjas já foram descritas em ambientes marinhos, comparadas às apenas cerca de 150 espécies de água doce. As esponjas abundam em todos os oceanos (regiões polares, tropicais e temperadas), utilizando como substrato de crescimento conchas, rochas, madeiras submersas ou corais. Algumas espécies adaptaram-se a areia macia ou a leitos de lama. A maioria das esponjas prefere águas relativamente rasas, mas algumas, como as esponjas-de-vidro, vivem em águas profundas. A forma de crescimento das esponjas é, em parte, uma resposta à disponibilidade de espaço, à inclinação do

substrato e à velocidade da corrente de água, vivendo de um a vários anos (Ruppert; Barnes, 1996; Newbold *et al.*, 1999; Simões *et al.*, 2003).

As esponjas variam enormemente em tamanho e forma, de milímetros a mais de um metro em diâmetro e altura. Algumas são radialmente simétricas, mas a maioria é irregular, exibindo padrões de crescimento maciços, eretos, incrustantes ou ramificados. Grande parte das espécies comuns é brilhantemente colorida, mas o significado da coloração é ainda incerto (Carté, 1996; Ruppert; Barnes, 1996).

A arquitetura das esponjas, construída ao redor de um sistema de canais de água, é chave para a compreensão de muitos aspectos de sua fisiologia. A fisiologia de uma esponja depende enormemente da corrente de água que flui através de seu corpo. A água traz os nutrientes, o oxigênio, removendo detritos e impurezas. As esponjas podem controlar e inclusive até interromper este fluxo de água. Alimentam-se de material particulado extremamente fino, de bactérias, de dinoflagelados e de outros organismos do plâncton. Além disso, podem abrigar organismos fotossintéticos simbióticos (dinoflagelados, cianobactérias) e outras bactérias (Storer *et al.*, 1984; Ruppert; Barnes, 1996).

As esponjas multiplicam-se assexualmente e sexualmente. A reprodução assexual mais comum nas esponjas é por gêmulas que consiste num grupo de arqueócitos enriquecidos por alimento e circundados por espongiócitos, podendo conter espículas. Sob condições favoráveis desenvolvem-se numa esponja. Quanto à reprodução sexual, a maioria das esponjas é hermafrodita. O esperma sai de uma esponja e entra em outra nas correntes que fluem através dos canais de água. Os ovos são fertilizados localmente no mesoólio. Eles podem, então, ser liberados através dos canais de água ou, então, serem incubados até que atinjam o estado larval. As larvas são, por fim, removidas pelos canais de água (Storer *et al.*, 1984; Ruppert; Barnes, 1996).

Os extratos de esponjas marinhas são uma fonte rica e simples de produtos naturais. Inúmeros estudos têm revelado que organismos marinhos possuem uma variedade de substâncias orgânicas com conhecidas ou novas atividades farmacológicas e toxicológicas. Produtos do metabolismo de esponjas com localizações distintas no globo terrestre têm exibido uma gama de atividades

biológicas, tais como: antimicrobiana, antifúngica, aglutinante, hemolítica, antiviral, antiinflamatória, analgésica, imunossupressora, antagonista de receptores, ictiotóxica, neurotóxica, miotóxica, mitogênica, citotóxica, como inibidores enzimáticos, etc. As substâncias isoladas a partir das esponjas variam amplamente em complexidade estrutural, incluindo esteróis, terpenóides, derivados de aminoácidos, saponinas e macrolídeos, muitas das quais não são encontradas em fontes terrestres, mas suas funções fisiológicas são ainda desconhecidas. As esponjas constituem, ainda, uma nova opção para fármacos anticancerígenos. Já foram isoladas das esponjas substâncias que inibem o crescimento de células cancerosas, como lactonas, alcalóides, proteínas e peptídeos (Pettit *et al.*, 1992; Muricy *et al.*, 1993; Carté, 1996; Chanas *et al.*, 1996; Villate; Pérez; Alfonso, 1998; Swearingean; Pawlik, 1998; Wilson *et al.*, 1999; Rangel *et al.*, 2001).

Várias funções fisiológicas foram propostas para estas substâncias orgânicas isoladas, tais como: impedir colonização por outros organismos competitivos, proteção contra peixes, predadores e microrganismos patogênicos (acredita-se que esta seja a função mais importante), competição pelo espaço com outros animais (como interação alelopática coral-esponja), desfavorecer a formação de um biofilme bacteriano, proteção contra radiação ultravioleta, etc (Muricy *et al.*, 1993; Ruppert; Barnes, 1996; Newbold *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 1999; Simões *et al.*, 2003).

## Capítulo I

### Considerações sobre a esponja *Axinella corrugata* e sua identificação por características morfo-anatômicas

#### Introdução

##### Classe Demospongiae:

A classe Demospongiae é definida como um Porifera contendo espículas silicosas e/ou esqueleto fibroso, ou ocasionalmente sem um esqueleto. O esqueleto é composto por fibras de espongina sozinhas ou juntamente com espículas silicosas, normalmente divididas em megascleras e microscleras. Espongina é quase universalmente presente, formando discretas fibras ou ligando os elementos do esqueleto. Na maioria dos casos o esqueleto espicular e o esqueleto fibroso formam um reforço combinado. Alguns grupos não possuem esqueleto espicular, compensado por um elaborado esqueleto fibroso. Outros grupos não relacionados apresentam apenas colágeno fibrilar difuso. Outros grupos menores apresentam um esqueleto basal hipercalcificado ou uma sólida estrutura aragonítica (carbonato de cálcio) desprovida de espículas. Os elementos celulares são discretos, nunca sinciciais, e a diversidade celular pode ser considerável. A maioria das esponjas desta classe são leuconóides, onde ocorre o mais alto grau de pregueamento da parede corporal das esponjas, abrangendo todos os tipos de padrões de crescimento, com os coanócitos restritos a câmaras discretas, dispersas no mesoílo. Estas esponjas podem atingir um tamanho grande, podem ser incrustrantes ou eretas, com corpos achatados ou ramificados, embora muitas espécies tenham forma de vasos, de plataformas irregulares, formas tubulares, de cordão, foliáceas, de copo e de urna. Apresentam câmaras de coanócitos e apenas uma família é

desprovida de sistema aquífero do tipo leucon (Ruppert; Barnes, 1996; Hooper; Soest; Debrenne, 2002).

A classe Demospongiae engloba cerca de 85 % das espécies de esponjas (marinhas e de água doce), o que corresponde a aproximadamente 6000 espécies já descritas na literatura, distribuídas em 15 ordens, 88 famílias e cerca de 500 gêneros válidos, dos quais em torno de 40 são oriundos de água doce (Hooper; Soest; Debrenne, 2002). São encontradas em águas rasas a profundas. A coloração é frequentemente brilhante (Ruppert; Barnes, 1996; Swearingean; Pawlik, 1998; Hentschel; Usher; Taylor, 2006).

As esponjas desta classe abrigam organismos fotossintéticos simbióticos. Algumas esponjas leuconóides são também hospedeiras para outros seres vivos, como camarões e estrelas frágeis (Ruppert; Barnes, 1996).

Na maioria das esponjas da classe Demospongiae o desenvolvimento dos estágios larvais ocorre dentro do corpo do animal original. No entanto, em algumas espécies ocorre liberação dos ovos fertilizados, os quais se desenvolvem na própria água marinha (Ruppert; Barnes, 1996).

A classe Demospongiae é conhecida por produzir um número grande e diversificado de metabólitos secundários (Newbold *et al.*, 1999). Além disso, esponjas caribenhas, por exemplo, representam uma rica fonte de proteína, numa média de 20,7 mg de proteína solúvel por mL de tecido (Wilson *et al.*, 1999).

### **Família Axinellidae:**

A família Axinellidae constitui um grupo de esponjas caracterizado por algumas das mais simples características morfológicas corriqueiramente usadas na taxonomia de esponjas. Inclui esponjas de diversas formas de crescimento, com a superfície aveludada a hispida devido à projeção de espículas. Apresentam um esqueleto coanossomal que em algumas espécies é dividido em axial (condensado e composto por fibras de espongina) e em extra-axial (plumoso ou plumoreticulado). Esqueleto ectossomal sem especialização. As espículas estão presentes no esqueleto axial, formadas por sinuosas óxeas, localizadas no centro das fibras,

projetadas por estilos. O tipo (estrôngilos, óxeas, anisóxeas, estilos, ráfides) e localização das espículas variam entre as espécies. A família contém um amplo e heterogêneo conjunto de gêneros, com aproximadamente 92 gêneros e 300 espécies descritas. Contudo, a maioria dos gêneros são sinônimos, com 10 gêneros válidos na família: *Auletta*, *Axinella*, *Cymbastela*, *Dragmacidon*, *Dragmaxia*, *Pararhaphoxya*, *Phakellia*, *Phycopsis*, *Ptilocaulis*, *Reniochalina* (Hooper; Lévi, 1993; Alvarez *et al.*, 2000; Hooper; Soest; Debrenne, 2002). Hooper *et al.* (1992) já sugeriu a subdivisão da família, em virtude de sua heterogeneidade. As esponjas desta família estão distribuídas das regiões polares aos trópicos (Hooper; Lévi, 1993).

A família Axinellidae é claramente heterogênea em seu perfil bioquímico e genético (figura 1.1), mas é homogênea em suas características morfológicas (Hooper *et al.*, 1992; Alvarez *et al.*, 2000). Tal fato sugere a divisão da família Axinellidae em dois grupos: a Axinellidae I compreende todas as espécies de *Axinella*, com exceção da *Axinella polypoides*, pertencente à Axinellidae II (Alvarez *et al.*, 2000).

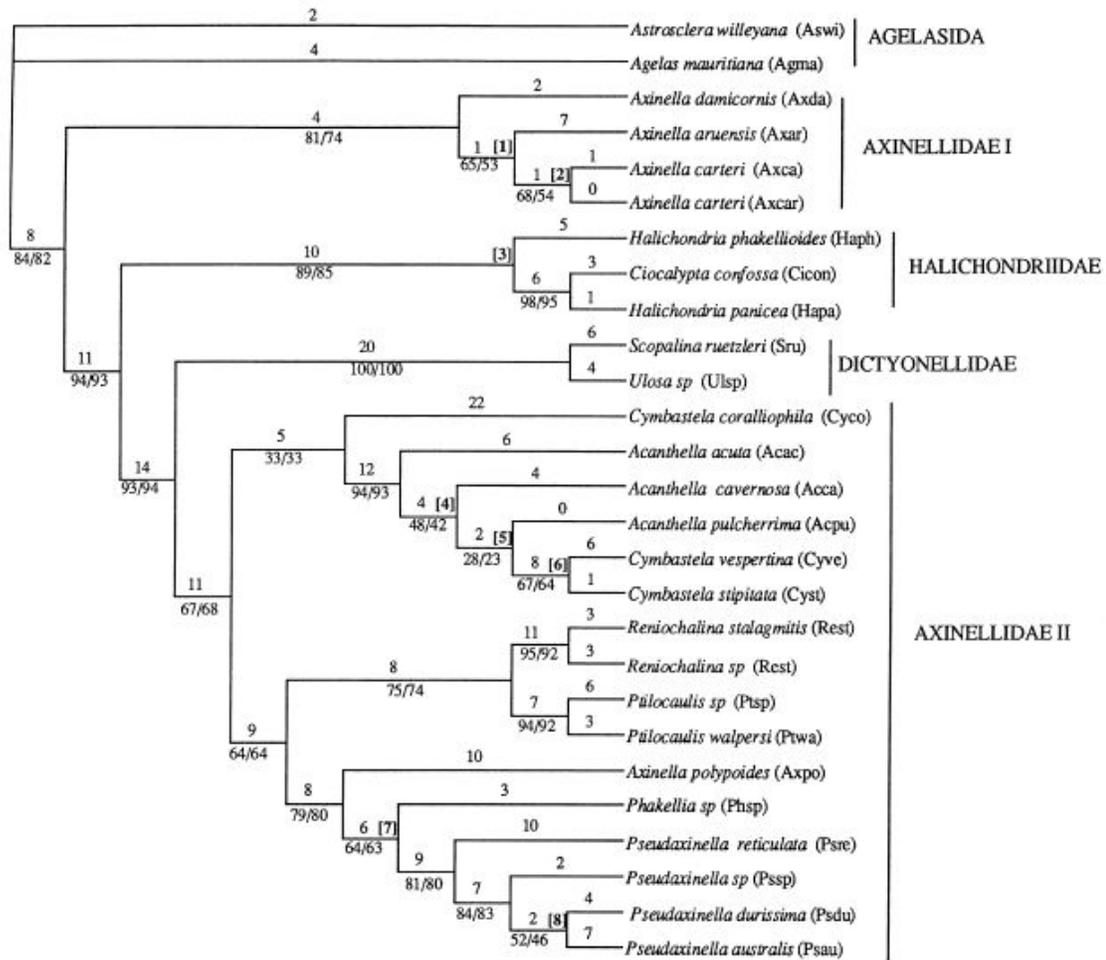


Figura 1.1: Árvore filogenética da família Axinellidae (Alvarez *et al.*, 2000).

### Gênero *Axinella*:

O tipo de arquitetura do esqueleto é uma das características de diagnose mais importantes do gênero, além de outras características morfológicas (proporção relativa, geometria, tamanho e composição das espículas, envolvimento por esponjina, forma, cor, superfície, consistência da esponja) (Hooper *et al.*, 1992; Alvarez; Soest; Rutzler, 1998; Alvarez *et al.*, 2000). Estudos quimiotaxonômicos auxiliam no estudo de uma família, fornecendo informações adicionais sobre as relações filogenéticas entre os gêneros, como características bioquímicas (produção de metabólitos secundários, aminoácidos livres, pigmentos carotenóides, conteúdo protéico), estudos de ultraestrutura celular, características morfológicas, estudos moleculares e características anatômicas (tamanho e forma das câmaras de

coanócitos, razão mesoílo/cavidades de aquíferos). A cor e a consistência são características subjetivas para uma avaliação filogenética (Hooper *et al.*, 1992; Alvarez; Soest; Rutzler, 1998; Alvarez *et al.*, 2000).

As características bioquímicas constituem um bom indicador de filogenia de esponjas e inclusive são usadas em estudos de sistemática. A diversidade de propriedades bioquímicas das esponjas tem sido demonstrada pela descoberta contínua de novos compostos com propriedades farmacológicas. Já os aspectos moleculares podem ser usados no estudo da evolução das esponjas (Alvarez *et al.*, 2000).

O gênero *Axinella* é caracterizado por um esqueleto coanossomal diferenciado em esqueleto axial (condensado ou vagamente reticulado) e em esqueleto extra-axial (plumoso ou plumorreticulado). Apresenta esqueleto ectossomal sem especialização. Ósculos podem apresentar padrão de formato estrelado. Espículas se dividem em megascleras e microscleras. Megascleras são estilos; estilos e óxeas ou somente óxeas, quando ambas estão presentes, uma delas é rara. Modificações das megascleras são comuns em muitas espécies. Microscleras, se presentes, são microrráfides e ráfides (Lerner, 2001; Hooper; Soest; Debrenne, 2002). O gênero é amplamente distribuído nos ambientes marinhos, tendo em torno de 60 espécies válidas, com uma grande plasticidade entre elas (Hooper; Soest; Debrenne, 2002).

O arranjo das espécies de *Axinella*, de acordo com os dados morfológicos, indica que o gênero não é monofilético (figura 1.2) (Alvarez *et al.*, 2000).

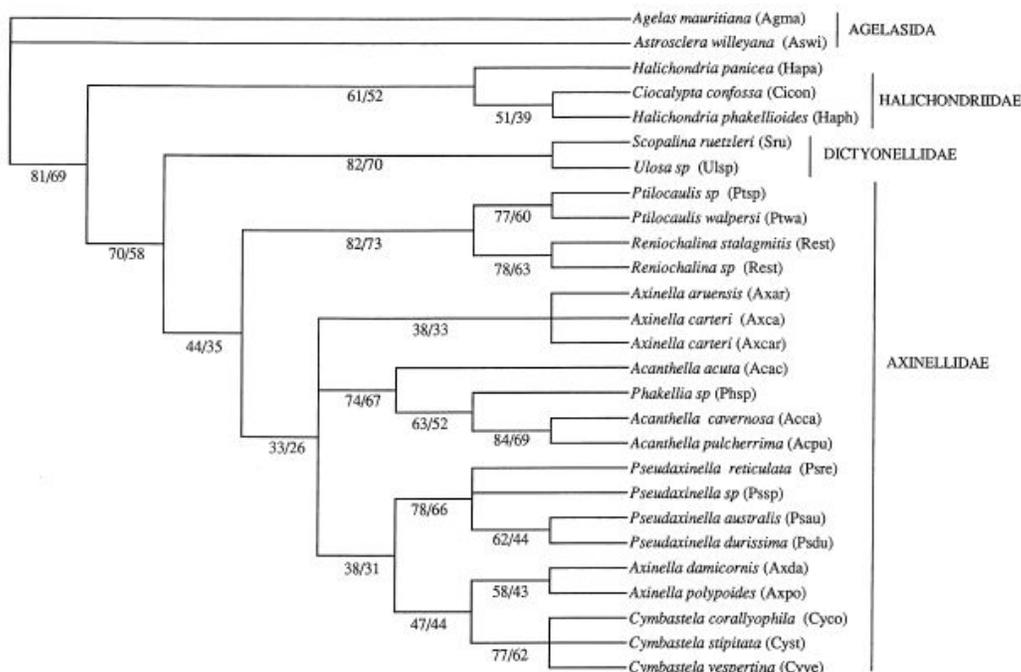


Figura 1.2: Árvore filogenética do gênero *Axinella* (Alvarez *et al.*, 2000).

### ***Axinella corrugata* (George & Wilson, 1919):**

A esponja *Axinella corrugata*, pertencente à classe Demospongiae, ordem Halichondrida e família Axinellidae, vive predominantemente em ambiente marinho de pouca profundidade (Alvarez; Soest; Rutzler, 1998; Hooper; Soest; Debrenne, 2002).

A espécie foi originalmente descrita para a Carolina do Norte por George e Wilson (1919) como *Acanthella corrugata*. Também foi denominada de *Teichaxinella morchella* por Wiedenmayer (1977). Foi citada pela primeira vez como *Axinella corrugata* por Alvarez e Crisp (1994), com confirmação do nome por Alvarez e colaboradores (1998). Na costa litorânea brasileira a espécie foi registrada pela primeira vez por Lerner (1996) como *Teichaxinella corrugata*, em amostras coletadas em Santa Catarina. Em 1998, Muricy e Moraes registraram *Axinella corrugata* em amostras coletadas na costa de Pernambuco.

Sua distribuição geográfica vai da costa leste dos Estados Unidos (Carolina do Norte a Flórida), Golfo do México até ao sul do Caribe e Brasil, onde é encontrada da costa do Pará ao litoral de Santa Catarina (Alvarez; Soest; Rutzler, 1998; Lerner, 2001; Muricy; Hajdu, 2006).

A esponja *Axinella corrugata* apresenta cor laranja viva a vermelha e amarela brilhante a laranja amarelada (figura 1.3a). Tem forma arbustiva, assimétrica, de 4 a 20 cm de altura por 5 a 30 cm de largura, lobada ou ramificada, com uma base estreita e às vezes fixada com pedúnculo em fundo arenoso, de 1 cm de diâmetro. Possui superfície hispida, muito enrugada, com cristas irregulares e depressões verticais, horizontais ou desordenadas. Contém ósculos circulares e esparsos (figura 1.3b), membranosos e diminutos, de 1 a 2 mm de diâmetro. É de consistência firme, porém compressível (Lerner, 1996; Alvarez; Soest; Rutzler, 1998; Lerner, 2001; Muricy; Hajdu, 2006).



**1.3a**



**1.3b**

Figura 1.3: Esponja *Axinella corrugata*. Figura 1.3a – Esponja *Axinella corrugata*, foto *in situ*; Figura 1.3b – Detalhe das aberturas osculares (I). Fotos gentilmente cedidas por Cléa B. Lerner, Fundação Zoobotânica do RS.

Quanto à anatomia, a esponja apresenta esqueleto axial comprimido, reticulado a confuso, com espículas e envelopado em espongina. Esqueleto extra-axial, plumorreticulado, com espículas dispersas. As espículas apresentam ampla variação de tamanho e aspecto (algumas com forma de mama nas pontas), sem localização funcional e dispersas. Compreendem estrôngilos, óxeas, estrôngilóxeas, estilos, subtilóstilos e estilóides (Lerner, 1996; Alvarez; Soest; Rutzler, 1998; Lerner, 2001; Muricy; Hajdu, 2006).

Coloniza substrato rochoso e base de recifes de corais, sendo localizada de 2 a 71 metros de profundidade, às vezes na zona de transição entre rocha e areia, em ambientes fotófilos (ambientes de preferência iluminados). Na costa litorânea brasileira é encontrada em águas rasas, de 2 a 15 metros de profundidade, podendo estar associada a algas calcáreas do gênero *Jania*. No Brasil já foi identificada na Ilha da Galé (SC), Ilha do Arvoredo (SC), Ilha João da Cunha (SC), Ilha Bela (SP), São Sebastião (SP), Rio de Janeiro (RJ), Arraial do Cabo (RJ), Búzios (RJ), Salvador (BA) e Tamandaré (PE) (Lerner, 1996; Alvarez; Soest; Rutzler, 1998; Lerner, 2001; Muricy; Hajdu, 2006).

A esponja *Axinella corrugata* possui estrutura corporal frágil, sendo vulnerável a predadores. Foi descrita na literatura a presença de um metabólito ativo nesta esponja, a estevensina, um alcalóide pirrólico, encontrado na esponja a uma concentração de 19 mg/mL de tecido. Em lugares com abundância desta esponja poucos peixes são encontrados, o que sugere que este metabólito seja a principal arma de defesa contra peixes predatórios. Em laboratório, já foi constatado que peixes não se alimentaram com sedimentos contendo extratos orgânicos de *Axinella corrugata* ou estevensina purificada a concentrações maiores que 2,25 mg/mL (Wilson *et al.*, 1999). Além disso, estudos com cinco espécies de esponjas da família Axinellidae mostraram que seus extratos orgânicos incorporados a sedimentos também detiveram o consumo dos mesmos por parte de peixes, em laboratório (Pawlik *et al.*, 1995).

Rangel e colaboradores (2001) determinaram atividade citotóxica nos extratos aquosos de *Axinella corrugata* frente a ovas de ouriço-do-mar, por bloqueio da mitose. Em outro estudo, extratos aquosos de *Axinella corrugata* (100 µg/mL) foram citotóxicos frente a leucócitos polimorfonucleares de rato. Além disso, foi verificada fraca atividade antibacteriana contra *Micrococcus luteus* na concentração de 2,5 mg/mL (Monks *et al.*, 2002). Extratos aquosos (1 mg/mL) ainda demonstraram atividade antiviral contra o vírus da herpes HSV-1/KOS (EC<sub>50</sub>= 332 µg/mL) e contra o adenovírus AdV-5 (EC<sub>50</sub>= 400 µg/mL) (Silva *et al.*, 2006).

Por outro lado, extratos orgânicos de *Axinella corrugata* foram citotóxicos contra linhagens cancerosas de mama de humanos (MCF7) e de melanoma de camundongo (B16). O processamento dos referidos extratos levou ao isolamento de

dois derivados cumarínicos, o éster metílico do ácido 4-esculetinocarboxílico e o éster etílico do ácido 4-esculetinocarboxílico, os primeiros derivados cumarínicos isolados de uma esponja marinha. O éster etílico mostrou atividade *in vitro* contra a replicação do coronavírus SARS em células infectadas ( $EC_{50}$ = 112  $\mu$ M/L), bem como, um inibidor da atividade da protease 3CL<sup>pro</sup>, necessária à virulência ( $ID_{50}$ = 46  $\mu$ M/L) (Lira *et al.*, 2007). Além disso, extratos orgânicos de *Axinella corrugata* foram ativos contra bactérias de origem marinha (*Vibrio alginolyticus*, *Deleya marina* e cepas de *Bacillus* sp.), produzindo zonas de inibição maiores que os da estevensina purificada (testada nas concentrações de 50 a 200 mg/mL), indicando fraca atividade antibacteriana deste metabólito, podendo, então, não ser o único metabólito antibacteriano produzido pela esponja, já que sua concentração média na mesma é de 19 mg/mL de tecido. Os extratos testados estavam numa solução à concentração equivalente ao tecido original da esponja (Newbold *et al.*, 1999).

O objetivo deste capítulo foi identificar a esponja marinha *Axinella corrugata*, por meio de seus aspectos morfo-anatômicos, utilizando microscopia eletrônica de varredura, com fins de matéria-prima para o isolamento e caracterização de novas lectinas, não descritas na literatura.

## **I.1 Materiais e Métodos**

### **I.1.1 Matéria-prima:**

A matéria-prima para este trabalho consistiu da esponja marinha *Axinella corrugata*, coletada na costa sul do Brasil, em Santa Catarina, na Ilha do Arvoredo (Engenho), fora da área da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo, em 17/02/2004, com um fragmento depositado junto ao Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do RS sob número MCN 7832.

Após a coleta, o material foi lavado exaustivamente com água marinha e armazenado em etanol 70 °GL até o seu processamento.

### **I.1.2 Produtos, reagentes químicos e equipamentos:**

Os equipamentos mais importantes para a realização desse trabalho foram:

Equipamento de ponto crítico CPD 030 Critical Point Dryer - Baltec (Balzers, Liechtenstein).

Equipamento de metalização SCD 050 Sputter Coater - Baltec (Balzers, Liechtenstein).

Microscópio eletrônico de varredura JSM 6060 - Jeol (Tóquio, Japão).

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Todas as soluções foram preparadas com água destilada purificada no sistema Milli-Q Plus, Millipore (Bedford, MA, EUA), denominada como água, neste trabalho.

### **I.1.3 Caracterização por microscopia eletrônica de varredura**

#### **I.1.3.1 Fixação e desidratação do material:**

Imediatamente após a coleta, a esponja foi fixada em etanol 70 °GL e mantida a 4 °C até o momento do uso.

Seções de 1 cm x 1 cm x 1 cm da esponja foram desidratadas em série etílica ascendente de 80, 90 e 96 °GL, com uma hora de contato em cada solução. Após a desidratação, o material foi processado para microscopia eletrônica de varredura.

#### **I.1.3.2 Processamento do material para MEV:**

As seções da esponja, previamente fixadas e desidratadas, foram repassadas para acetona. O material foi, então, aderido à suporte de alumínio, com o auxílio de fita dupla face de grafite, e levado para aparelho de ponto crítico, onde a temperatura foi baixada até 4 °C, com 10 passagens do material em CO<sub>2</sub>, para a retirada gradual da acetona. Em seguida, foi realizada metalização das peças com uma fina camada de ouro, de 20 nm de cobertura, em 40 mA, por 1 min, através do sistema *sputten*, marca Balzers SCD 050.

As imagens foram obtidas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6060, sob 20 kvolts e registradas em microfotografias.

## Resultados e Discussão

As imagens obtidas em microscopia eletrônica de varredura, conforme figuras 1.4 e 1.5, mostraram que a esponja *Axinella corrugata* possui superfície irregular, com depressões verticais, horizontais ou desordenadas.

Além disso, como pode ser verificado nas figuras 1.5 e 1.6, as espículas apresentam ampla variação de aspecto e de dispersão ao longo do esqueleto da esponja.

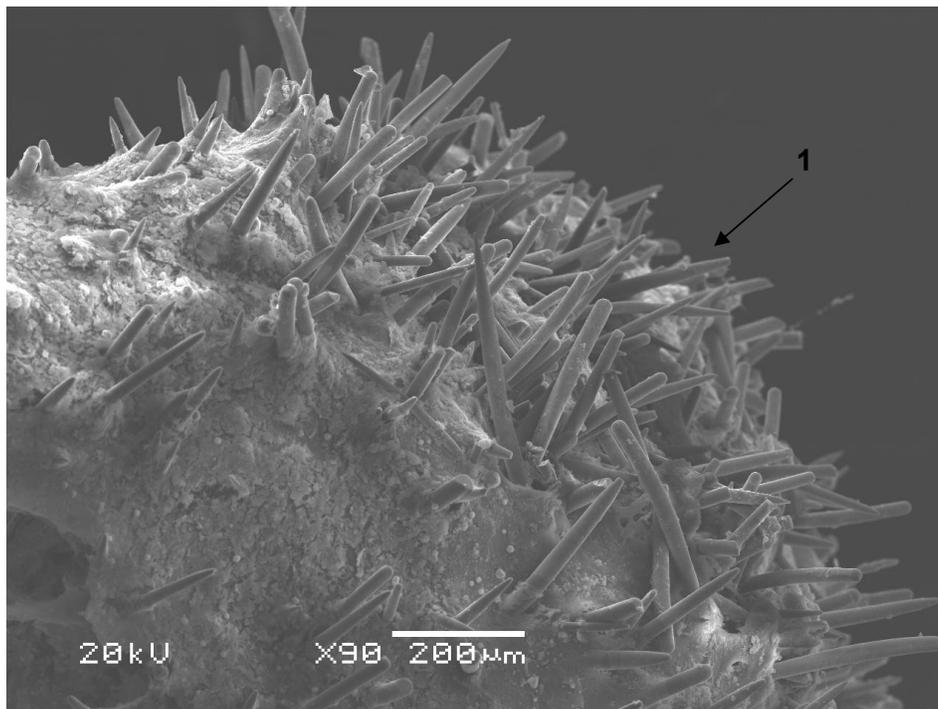


Figura 1.4: Aspecto da superfície de *Axinella corrugata* ao MEV, evidenciando a presença de espículas (1).

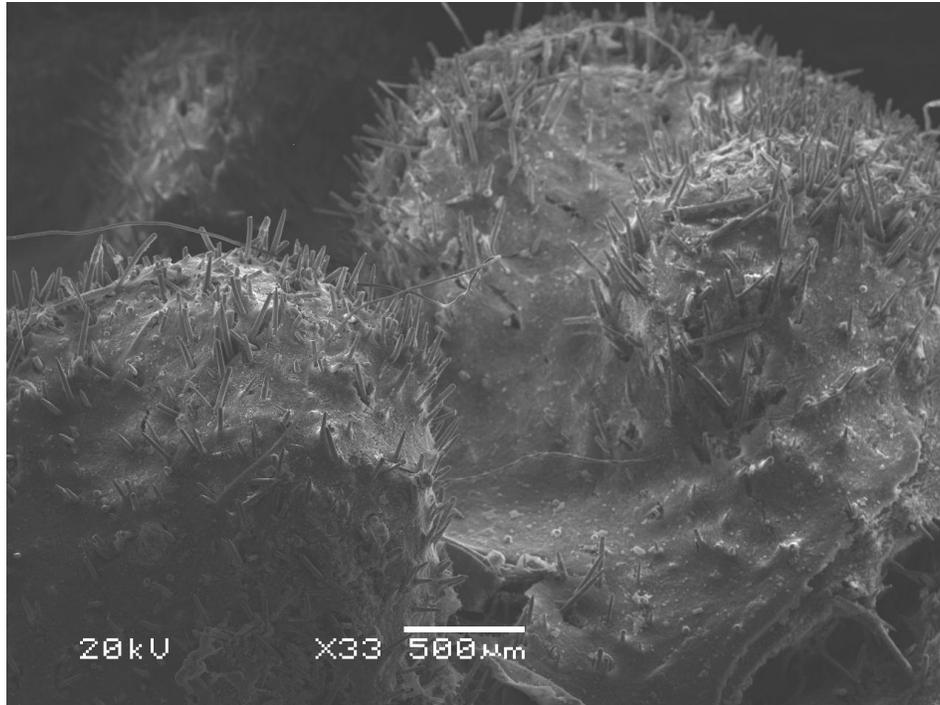


Figura 1.5: Aspecto geral da superfície de *Axinella corrugata* ao MEV, evidenciando a ampla variação na dispersão das espículas.

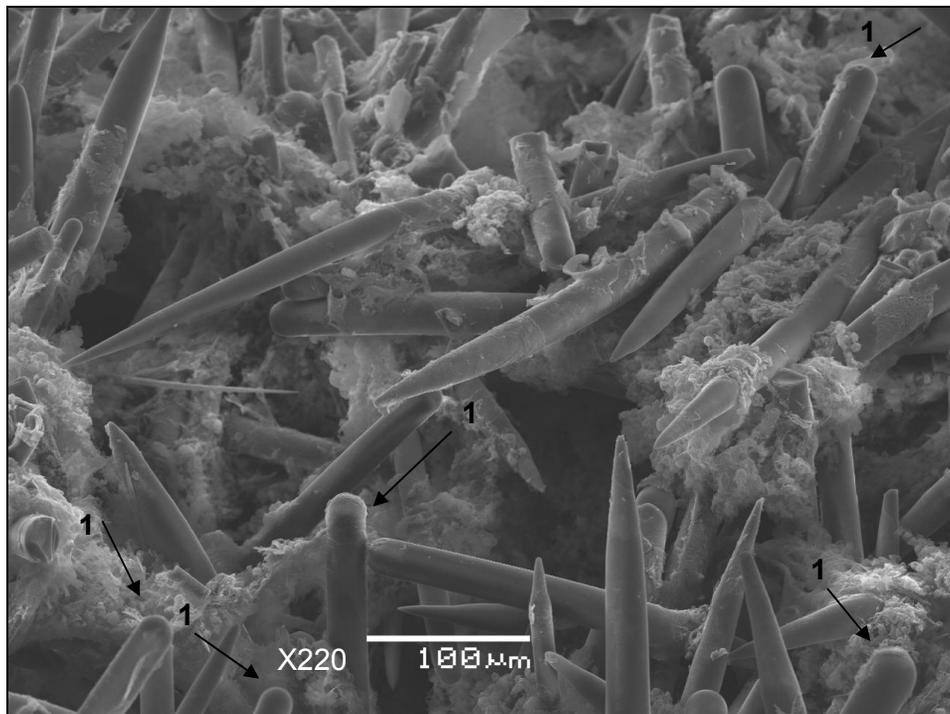


Figura 1.6: Aspecto geral do esqueleto de *Axinella corrugata* ao MEV. 1- conjunto de escleras do tipo estilos.

Espículas em forma de mama são uma característica do gênero *Axinella* (figura 1.6). A figura 1.7 mostra um diagrama das várias formas das espículas da esponja em estudo, em conformidade com os resultados obtidos por MEV.

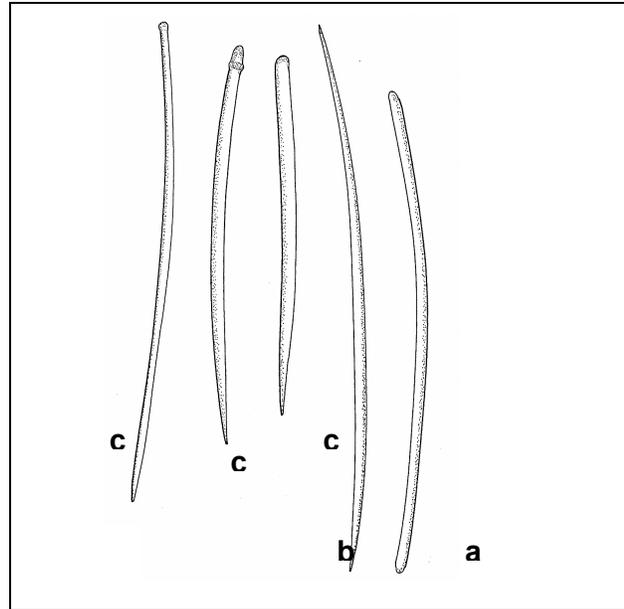


Figura 1.7: Diagrama de algumas das diferentes formas das espículas de *Axinella corrugata*, denominadas de estrôngilos (a), óxeas (b) e estilos (c) (Alvarez; Soest; Rutzler, 1998; Muricy; Hajdu, 2006).

Segundo a figura acima, as espículas denominadas de estrôngilos (a) possuem as duas extremidades arredondadas, as óxeas (b) têm ambas as extremidades pontiagudas, enquanto que os estilos (c) apresentam uma extremidade arredondada e outra pontiaguda.

Estudos realizados por Lerner (1996), que classificou a esponja *Axinella corrugata* no Brasil pela primeira vez, revelaram que na costa brasileira essa esponja caracteriza-se por apresentar espículas do tipo estrongilóxeas, óxeas e estilos, não possuindo estrôngilos (figura 1.8).

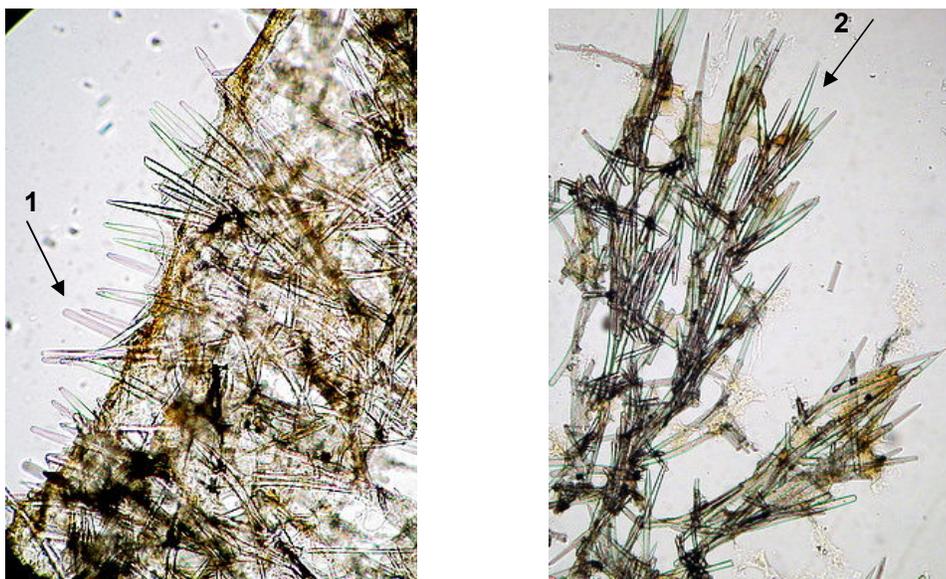


Figura 1.8: Foto do conjunto espicular do esqueleto de *Axinella corrugata* ao MEV. 1- estilos (X5); 2- óxeas (X10). Fotos gentilmente cedidas por Cléa B. Lerner, Fundação Zoobotânica do RS.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com as características da esponja marinha *Axinella corrugata*, classificada e caracterizada por Lerner (1996), assim como em estudos de diagnose realizados com amostras dessa esponja coletadas na costa leste dos Estados Unidos e do México (Alvarez; Soest; Rutzler, 1998).



## **Capítulo II**

### **Purificação, caracterização físico-química e química da(s) lectina(s) ACL-I e ACL-II de *Axinella corrugata***

#### **Introdução**

O interesse nas lectinas aumentou consideravelmente quando se constatou que elas são ferramentas importantes para a detecção, isolamento e caracterização de glicoconjugados, para a histoquímica de células e tecidos e para a investigação de mudanças que ocorrem na superfície celular durante processos fisiológicos e patológicos, da diferenciação celular ao câncer (Sharon; Lis, 2004; Monzo; Bonn; Guttman, 2007; Sharon, 2007).

A habilidade das lectinas de ligarem-se a carboidratos de forma específica e reversível permite o seu uso não só para o isolamento e caracterização de compostos contendo carboidratos e para o fracionamento celular, mas inclusive à sua própria purificação em cromatografia de afinidade. Os métodos empregados para o isolamento e purificação de lectinas envolvem o uso de técnicas cromatográficas baseadas principalmente em processos de gel permeação molecular, de troca iônica e de cromatografia de afinidade (Belitz; Weder, 1990). Os três maiores tipos de adsorventes bioespecíficos descritos para a purificação de lectinas por cromatografia de afinidade são: polissacarídeos, nativos ou modificados, glicoproteínas ou glicopeptídeos ligados a uma matriz insolúvel e ainda mono ou dissacarídeos ligados a uma matriz, sendo estes últimos os mais abundantes. Além disso, na purificação de lectinas são usadas membranas de eritrócitos incorporadas a géis de poli(acrilamida) ou suspensos em matriz de Sephadex. À princípio, este

método de purificação não é diferente dos que usam outros biopolímeros com sítios de ligação específicos, mas é geralmente muito mais simples. Isto decorre do fato que as lectinas não provocam modificação dos compostos com os quais se ligam e a interação não é muito forte, podendo as mesmas ser rapidamente desligadas pelos carboidratos com os quais têm especificidade ou ainda por variação do pH e da osmolaridade do meio, além do aumento da temperatura. O conhecimento do tipo de carboidrato para o qual a lectina apresenta afinidade permite a escolha do procedimento de purificação mais apropriado. Contudo, a maioria dos adsorventes também se ligam a glicosidases. Como tais enzimas são freqüentemente presentes em materiais biológicos de origem vegetal ou animal, as lectinas purificadas podem ser contaminadas por tais enzimas (Lis; Sharon, 1981; Genaud *et al.*, 1982; Hernández *et al.*, 1993).

Há uma grande diversidade na organização estrutural das lectinas, com um número de subunidades variável por molécula, associadas via pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e pontes de dissulfeto, principalmente (Kennedy *et al.*, 1995). De forma geral, cada subunidade de uma mesma lectina apresenta a mesma especificidade e os sítios de ligação a carboidrato são equivalentes. Além disso, normalmente há um sítio de ligação por subunidade. Mas há exceções, como a lectina WGA que apresenta duas subunidades, mas quatro sítios de ligação a carboidratos. Ainda, a lectina LAA (aglutinina de *Lycoris aurea*) é homotetramérica com quatro sítios por monômero (Sharon; Lis, 1989; Carvalho, 1990; Liu *et al.*, 2007).

Há também a existência de formas moleculares múltiplas de lectinas que apresentam atividades biológicas similares e possuem pequenas diferenças em suas propriedades químicas (seqüência de aminoácidos, estrutura tridimensional ou alterações nas cadeias laterais de carboidratos presentes em grande número de lectinas). As formas moleculares múltiplas resultam em mobilidades eletroforéticas caracteristicamente distintas. Elas se originam *in vivo* por modificações pós-tradução de natureza covalente e não covalente, por serem produtos de genes estritamente relacionados e por variantes do meio, como pH, por exemplo. Entretanto, as formas moleculares múltiplas podem surgir também como artefatos durante migrações eletroforéticas ou, então, durante/antes do processo de isolamento. Um exemplo de artefato é decorrente da hidrólise do grupo amida da glutamina ou asparagina das

cadeias laterais da proteína (Sharon; Lis, 1972; Carvalho, 1990; Kennedy *et al.*, 1995; Calvete *et al.*, 1999).

Muitas lectinas das plantas leguminosas apresentam estruturas dependentes do pH. Lectinas de plantas pertencentes à subtribo Diocleinae exibem um equilíbrio na forma dímero-tetrâmero dependente de pH, onde apenas o tetrâmero é capaz de se ligar aos receptores da membrana celular. Podem-se citar as lectinas de *Cratylia floribunda*, *Dioclea virgata* e *Dioclea rostrata* que formam tetrâmeros a um pH igual ou superior a 6,5. As lectinas de *Dioclea grandiflora* e *Dioclea violacea* comportam-se como proteínas tetraméricas a pH igual ou superior a 4,5. Já as lectinas de *Dioclea guianensis* e *Canavalia bonaerensis* apresentam um equilíbrio dímero-tetrâmero até em pH elevados (Calvete *et al.*, 1999).

A lectina de *Vatairea macrocarpa* não apresenta variação na sua massa molecular numa faixa de pH de 2,5 a 8,5 (Calvete *et al.*, 1998). Ao pH fisiológico, as lectinas do amendoim (*Arachis hypogaea*) e da soja (*Glycine Max*) são dímeros de um dímero. A lectina ConBr (*Canavalia brasiliensis*) é uma mistura de dímeros e tetrâmeros a pH 8,5, muito diferente da Concanavalina A (*Canavalia ensiformis*) que é um dímero a pH 5 e um dímero de um dímero acima de pH 7 (Grangeiro *et al.*, 1997).

O objetivo deste capítulo foi propor um protocolo de purificação, bem como, realizar a caracterização físico-química das lectinas ACL-I e ACL-II e química da lectina ACL-I extraídas da esponja *Axinella corrugata*.

## **II.1 Materiais e Métodos**

### **II.1.1 Matéria-prima:**

A matéria-prima para este trabalho consistiu da esponja marinha *Axinella corrugata*, coletada na costa sul do Brasil, em Santa Catarina, na Ilha do Arvoredo (Engenho), fora da área da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo, em 12/03/2002, com um fragmento depositado junto ao Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do RS sob número MCN 6296.

Após a coleta, as esponjas foram lavadas exaustivamente com água marinha e armazenadas a -18 °C até o seu processamento.

### **II.1.2 Animais:**

Os coelhos, com fins de obtenção de eritrócitos, foram da raça Nova Zelândia. Os animais foram mantidos junto ao Biotério da Faculdade de Farmácia da UFRGS ao longo da realização deste trabalho, à temperatura em torno de 25 °C e com ciclo de luz de 12 h.

### **II.1.3 Eritrócitos:**

As amostras de sangue de coelho foram obtidas por punção venosa da orelha do animal e coletadas sobre EDTA 0,2 M em PBS, sendo armazenadas sob refrigeração a 4 °C. Após centrifugação e retirada do plasma, os eritrócitos foram lavados 3X com PBS. A desinfecção do material utilizado foi feita por exposição à solução de hipoclorito de sódio a 0,1% por 20 min (Couto; Pedrosa; Nogueira, 1999; Brasil, 2004b; Brasil, 2005).

#### II.1.4 Produtos, reagentes químicos e equipamentos:

A seguir está relacionada a procedência das matérias-primas e equipamentos mais importantes para a realização desse trabalho:

Anfólitos carregadores, CHAPS e azul de bromofenol - Pharmacia (Uppsala, Suíça).

Acrilamida, *N,N'*-metilenobisacrilamida, glicina e Immobiline Drystrip (pH 3-10) -Amersham (Uppsala, Suíça).

Tris - USB (Cleveland, OH, EUA).

SDS (Dodecil sulfato de sódio) e TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametil-1,2-diaminometano) - INLAB (São Paulo, SP, Brasil).

APS (persulfato de amônio) - Serva (Heidelberg, Alemanha).

$\beta$ -mercaptoetanol - Calbiochem (San Diego, CA, EUA).

DTT (ditiotretitol) - Fluka (Buchs, Suíça).

Ultrogel AcA 44 - LKB (Villeneuve-la-Garenne, França).

Bio Gel P-150 - Bio-Rad (Hercules, CA, EUA).

PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto), Coomassie brilliant blue R 250, Coomassie brilliant blue G 250, azul de dextrano, albumina bovina cristalina fração V (BSA), quimotripsina, tripsina, carboidratos - Sigma (St. Louis, MO, EUA).

Padrões de proteínas Sigma (St. Louis, MO, EUA), Amersham (Uppsala, Suíça), Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA) ou GE Healthcare (Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, Inglaterra).

Sistema modular de eletroforese - BioAgency (Miami, EUA).

Sistema modular de eletroforese NuPAGE<sup>®</sup> Novex - Invitrogen (Carlsbad, EUA).

Microcentrífuga *Eppendorf* Spin IE - Bioanalytical Systems (West Lafayette, EUA).

Centrífuga clínica modelo Excelsa 4 - Fanem (São Paulo, Brasil).

Densitômetro Shimadzu CS 9301PC - Shimadzu (Kioto, Japão).

Liofilizador modular Modulyo 4 K - Edwards (Crawley, Inglaterra).

Espectrofotômetro DU<sup>®</sup> 640 - Beckman (Palo Alto, EUA).

Espectrofotômetro 8452 A - Hewlett Packard (Palo Alto, EUA).

*Speed-vac* modelo Univapo 100 H - UniEquip (München, Alemanha).

Fonte de eletroforese - Labof (Budapeste, Hungria).

LKB Multiphor II - Pharmacia (Uppsala, Suíça).

FPLC System - Pharmacia (Uppsala, Suíça).

HPLC - Waters (Medford, EUA).

Coluna C<sub>18</sub> Pico-Tag - Waters (Medford, EUA).

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

Todas as soluções foram preparadas com água destilada purificada no sistema Milli-Q Plus, Millipore (Bedford, MA, EUA).

### **II.1.5 Preparação dos extratos brutos:**

Para a extração das proteínas, a esponja congelada foi triturada e macerada em gral com água durante 30 min a 20 °C. A solução obtida foi filtrada através de papel de filtro e mantida a 0 °C. O sedimento foi reextraído com água nas mesmas condições experimentais anteriores, até o sobrenadante não apresentar mais atividade hemaglutinante. Os filtrados aquosos resultantes foram reunidos, liofilizados e estocados a -18 °C até o momento do uso.

### **II.1.6 Determinação da concentração de proteínas:**

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando albumina bovina fração V, Sigma, como padrão. O método está baseado na medida em espectrofotômetro a 750 nm da cor desenvolvida pelo complexo formado entre o cobre e as ligações peptídicas da proteína, seguido da redução do reagente de Folin-Ciocalteu pelas tirosinas presentes no complexo corado, levando à intensificação de coloração.

### **II.1.7 Determinação da atividade hemaglutinante:**

Os testes de hemaglutinação foram realizados conforme o método da dupla diluição serial em placas de microtitulação (Matsumoto; Osawa, 1970), usando 25 µL de solução de lectina diluída em PBS, adicionando-se à mesma 25 µL de eritrócitos nativos de coelho a 2 % em PBS. A leitura da aglutinação foi feita a olho nu após

duas horas de incubação. A atividade hemaglutinante foi expressa em unidades hemaglutinantes por mL (UH/mL) e definida como o inverso do título, com o uso de um volume de 25  $\mu$ L de solução de lectina em cada poço e as unidades calculadas para 1 mL, de acordo com Kilpatrick e Yeomann (1978). O título foi considerado a maior diluição da lectina, capaz de produzir aglutinação visível. Atividade específica foi definida como a atividade correspondente às unidades hemaglutinantes por mg de proteína.

## **II.2 Métodos de Purificação das Lectinas**

### **II.2.1 Preparação dos extratos tamponados:**

O extrato bruto liofilizado foi pesado (300 mg) e ressuspensão em até 2 mL com tampão fosfato-salino - pH 7,2 (PBS - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 mM e NaCl 136 mM, contendo NaN<sub>3</sub> 20 mg/L). Em seguida, o material foi centrifugado a 11000 rpm por 10 min, em microcentrífuga *Eppendorf*. O sobrenadante foi coletado e submetido à purificação em coluna de afinidade de matriz de estroma-poliacrilamida.

### **II.2.2 Cromatografia de afinidade em gel de estroma de eritrócitos de coelho-poliacrilamida:**

O extrato protéico foi passado em coluna de afinidade com matriz de estroma de eritrócitos de coelho-poliacrilamida, com dimensões de 3,0 x 9,0 cm, conforme *Bétail et al.* (1975).

Na obtenção dos estromas, o sangue de coelho foi preparado conforme item II.1.3 e lavado mais 3 vezes com NaCl a 0,9 %, do mesmo modo que anteriormente com PBS. Os eritrócitos foram então adicionados a uma solução aquosa de ácido acético 0,0004 %, na proporção de 2:8 (v/v) e incubados por 18 h a 4 °C, sob lenta agitação. O material foi centrifugado a 3000 rpm, à temperatura ambiente, e o sedimento lavado seqüencialmente com ácido acético 1 mM em pH 5; PBS e NaCl a 0,9 %. O material suspenso em NaCl a 0,9 % foi incubado a 100 °C por 1 h. Para a preparação da matriz cromatográfica, os estromas foram incorporados em solução contendo acrilamida a 11,54 %, bis-acrilamida a 0,62 %, APS a 1,44 % e TEMED a 1,44 %, na proporção de 1:1 (p/v). Após polimerização, o gel obtido foi finamente seccionado por extrusão, para a formação da matriz cromatográfica.

Na preparação da coluna de matriz de estroma-poliacrilamida, a mesma foi lavada com PBS, seguida de solução NaCl 0,154 M:NH<sub>4</sub>OH 23 % (1:0,006; v/v). Por fim, foi equilibrada com PBS. Após aplicação da amostra protéica na coluna, a coluna foi lavada exaustivamente com PBS até a obtenção de absorvância menor

que 0,010 a 280 nm e ausência de atividade hemaglutinante. A fração protéica retida na matriz foi eluída com uma solução NaCl 0,154 M:NH<sub>4</sub>OH 23 % (1:0,006; v/v), sendo a coluna regenerada com PBS até obtenção de pH 7. O material protéico eluído da coluna foi monitorado pela medida da absorvância a 280 nm. A presença de lectinas nas frações coletadas foi verificada pela determinação da atividade hemaglutinante.

A fração ativa eluída da coluna foi submetida a um processo de diálise contra água, com agitação, a 4 °C e troca de água a cada 2 h, por 4 vezes consecutivas. O dialisado foi centrifugado durante 10 min, a 3.000 rpm em centrífuga clínica e o sobrenadante concentrado a vácuo (*speed-vac*). O material resultante foi armazenado a -18 °C até o momento de uso.

### **II.2.3 Cromatografia de gel filtração:**

O material obtido na coluna de afinidade de matriz de estroma-poliacrilamida foi submetido a cromatografia de gel filtração em coluna de Ultrogel – AcA 44, de 1,65 cm x 75 cm, previamente lavada e equilibrada com PBS. ACL-I foi eluída com PBS, até a obtenção de absorvância menor que 0,010 nm, a 280 nm e ausência de atividade hemaglutinante. ACL-II, fortemente ligada na matriz cromatográfica, foi eluída com água até que as frações coletadas não apresentassem mais atividade hemaglutinante. As frações lectínicas foram dialisadas de forma independente contra água e concentradas a vácuo (*speed-vac*), sendo armazenadas a -18 °C até o momento de uso.

A pureza do material obtido foi monitorada por eletroforese em gel de poliácridamida, em condições nativas (PAGE) e em condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970).

## **II.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida:**

### **II.2.4.1 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE):**

A eletroforese em gel de poliacrilamida, usando-se sistema SDS-PAGE descontínuo, foi desenvolvida segundo o método de Laemmli (1970). O gel de entrada foi constituído de poliacrilamida a 5 % em solução tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 e o gel de resolução (ou de separação) de poliacrilamida a 11 % em solução tampão Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8.

As amostras lectínicas de ACL-I (15 ou 20 µg) foram aplicadas no gel de entrada em solução tampão constituída de Tris-HCl, 0,0625 M, pH 6,8, contendo glicerol a 10 %, azul de bromofenol a 0,001 %, SDS a 2 % e β-mercaptoetanol a 5 %. Antes da aplicação das amostras protéicas no gel, as mesmas foram ou não submetidas a banho de água a 100 °C.

Inicialmente, as amostras foram submetidas à corrente de 15 mA aumentada para 20 mA após a entrada das proteínas no gel de resolução. A diferença de potencial foi de 60 V durante 2 h e em seguida de 100 V, à temperatura de 20 ± 1 °C. O tampão de cuba eletroforética foi constituído de solução tampão Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, contendo glicina 0,192 M e SDS a 0,1 %.

Após o desenvolvimento eletroforético, o gel foi corado com solução de Coomassie brilliant blue R 250 a 0,2 % em ácido acético:metanol:água (10:50:40) (v/v/v) durante 2 h, à temperatura ambiente de 20 ± 1 °C. O excesso de corante foi removido do gel com solução contendo ácido acético:metanol:água (9:22:69) (v/v/v).

### **II.2.4.2 Eletroforese nativa (PAGE):**

A eletroforese das proteínas nativas em gel de poliacrilamida (PAGE) a 11 % foi realizada em meio alcalino (pH 9,2).

A eletroforese em pH alcalino foi conduzida como descrito anteriormente, porém todos os agentes redutores e desnaturantes foram substituídos por água e as amostras não foram desnaturadas pelo calor. As amostras lectínicas de ACL-I e de

ACL-II (20  $\mu\text{g}$ ) foram diluídas no mesmo tampão de preparação do gel, contendo ainda glicerol a 10 % e azul de bromofenol a 0,001 %.

## **II.3 Caracterização físico-química e química**

### **II.3.1 Estimação da massa molecular relativa de ACL-I e de ACL-II:**

As massas moleculares relativas ( $M_r$ ) de ACL-I e de ACL-II foram estimadas por eletroforese em sistema SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 11 % e por cromatografia em gel filtração.

No que se refere à eletroforese, a  $M_r$  das lectinas foi estimada sem desnaturação prévia pelo calor e na ausência de condições redutoras ( $\beta$ -mercaptoetanol). Os padrões de referência de massa molecular na faixa de 6 a 98 kDa foram: fosforilase B, albumina bovina, glutâmico desidrogenase, ovalbumina, álcool desidrogenase, anidrase carbônica, tripsinogênio, inibidor de tripsina,  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina, lisozima, citocromo C e aprotinina.

A estimação da  $M_r$  das lectinas foi realizada também por meio de gel filtração em sistema FPLC usando uma coluna Superose 12 HR (30 x 1 cm), previamente equilibrada com PBS contendo GlcNAc 0,2 M. ACL-I e ACL-II (50  $\mu$ g) foram diluídas em 200  $\mu$ l e eluídas com PBS contendo GlcNAc 0,2 M, do mesmo modo que os padrões de referência (ribonuclease A, anidrase carbônica, ovalbumina e conalbumina). O volume morto da coluna foi determinado com azul de dextrano.

### **II.3.2 Efeito da temperatura sobre a estabilidade de ACL-I e de ACL-II:**

Soluções lectínicas de ACL-I e de ACL-II foram colocadas, respectivamente, em tubos *Eppendorf* graduados e submetidas a temperaturas de 0 °C a 100 °C, mediante aquecimento em banho de água durante 10 e 30 min. A seguir, os tubos foram resfriados em banho de gelo e o volume reconstituído com tampão PBS, caso tivesse havido perda de líquido por evaporação. A atividade hemaglutinante foi então avaliada pelo método da dupla diluição serial. Quando necessário, os tubos foram centrifugados a 11000 rpm por 10 min, à temperatura ambiente, com a finalidade de eliminar eventuais precipitados formados durante o aquecimento.

### **II.3.3 Efeito do pH sobre a hemaglutinação de ACL-I:**

Soluções lectínicas de ACL-I, em solução de NaCl a 0,154 M, foram incubadas em soluções tampões na faixa de pH de 2 a 11, contendo NaCl 0,154 M, durante 60 min a 20 °C. Em seguida, foi determinada a atividade hemaglutinante dos incubados em placas de microtitulação, diluindo-se as soluções lectínicas assim tratadas com solução tampão de pH idêntico. A hemaglutinação foi verificada com o uso de eritrócitos nativos de coelho a 2 % em NaCl a 0,154 M.

### **II.3.4 Efeito do pH sobre a estabilidade de ACL-I e de ACL-II:**

Soluções lectínicas de ACL-I e de ACL-II, em solução de NaCl a 0,154 M, foram incubadas, respectivamente, em soluções tampões na faixa de pH de 2 a 11, contendo NaCl 0,154 M, durante 60 min a 20 °C. Em seguida, foi determinada a atividade hemaglutinante dos incubados em placas de microtitulação, diluindo-se as soluções lectínicas assim tratadas em PBS. A hemaglutinação foi verificada com o uso de eritrócitos nativos de coelho a 2 % em PBS.

### **II.3.5 Determinação do efeito de cátions divalentes e do EDTA sobre a atividade hemaglutinante de ACL-I e de ACL-II:**

Foi determinado o efeito de cátions divalentes (cloreto de cálcio, sulfato de magnésio e sulfato de manganês numa concentração final de 40 mM) sobre a atividade hemaglutinante de ACL-I e de ACL-II, usando-se EDTA como agente quelante, conforme Pajic *et al.* (2002). Sobre as soluções lectínicas dialisadas contra água foi adicionada solução de EDTA dissódico até uma concentração final de 5 ou 25 mM. Após incubação de 30 min a 20 °C, foi determinada a atividade hemaglutinante em placas de microtitulação, mediante o emprego de eritrócitos nativos de coelho a 2 %. O efeito de cátions divalentes foi verificado adicionando-se às amostras, previamente incubadas com EDTA 5 ou 25 mM, solução de cloreto de cálcio, sulfato de magnésio e sulfato de manganês numa concentração final de 40 mM, sendo, então, conduzido novamente o teste da atividade hemaglutinante em placas de microtitulação, com eritrócitos nativos de coelho a 2 %. Foi testado

simultaneamente um controle com solução de lectina sem EDTA e sem cátions divalentes. Os dados foram registrados como média de três experimentos independentes.

### **II.3.6 Efeito de agentes desnaturantes e redutores sobre ACL-I:**

ACL-I foi incubada 30 min à temperatura ambiente em PBS contendo DTT ou  $\beta$ -mercaptoetanol a 2,5 e 5,0 mM, ou em PBS contendo uréia a 4 M, ao abrigo da luz. Após este período, a atividade lectínica foi avaliada pelo método de dupla diluição serial em placas de microtitulação, empregando-se eritrócitos nativos de coelho a 2 %.

Como controle positivo foi utilizada uma solução lectínica sem agentes redutores/desnaturantes e como controle negativo uma solução de PBS contendo agentes redutores/desnaturantes. Os dados foram representados como média de três experimentos independentes.

### **II.3.7 Espectro de absorção de ACL-I:**

O espectro de absorção de ACL-I foi determinado em espectrofotômetro Hewlett Packard (HP), na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm. A lectina foi dissolvida em água (25  $\mu$ g/mL), empregando-se água como referência.

### **II.3.8 Coeficiente de extinção de ACL-I:**

O coeficiente de extinção de ACL-I foi obtido pela leitura da absorvância da solução lectínica em espectrofotômetro HP a 280 nm. A lectina foi previamente diluída em NaCl 0,154 M (25  $\mu$ g/mL), empregando-se NaCl 0,154 M como referência.

### **II.3.9 Determinação do ponto isoelétrico de ACL-I:**

A determinação do ponto isoelétrico de ACL-I foi realizada por focalização isoelétrica segundo Westermeier (1997). A lectina foi ressuspensa em solução contendo uréia 8 M, CHAPS a 2 %, azul de bromofenol a 0,002 %, DTT 0,1 M e anfólitos carreadores a 0,5 %, na proporção de 2:18 (p/v). As amostras ressuspensas nesta solução foram colocadas em contato com gel de poliacrilamida a 5 %, com 11 cm de comprimento e 5 mm de largura e gradiente de pH imobilizado (3-10 distribuídos uniformemente), por um período de 10 h, para hidratação do gel.

A migração eletroforética nos primeiros 30 min foi conduzida com uma integral Vh (voltagem/hora) de 150 Vh. Nas 5 horas seguintes a integral utilizada foi de 15000 Vh, a 20 °C. Após a migração eletroforética os géis foram corados, por 10 h, em Coomassie brilliant blue G 250 a 0,079 %, em solução contendo água:ácido sulfúrico 1 M:NaOH 10 M:TCA (ácido tricloroacético) a 100 % (25:25:5,5:7,75) (v/v/v/v), sendo que os dois últimos produtos foram adicionados após 3 h de agitação constante. O excesso de corante foi retirado com água.

### **II.3.10 Estabilidade de ACL-I frente a enzimas proteolíticas:**

Amostras de ACL-I (50 µg) foram incubadas, respectivamente, com solução de tripsina 1 mg/mL em Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, por 3 h e com quimotripsina 1 mg/mL em Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, por 3 h a 37 °C, em quantidade equivalente a 50 µg de enzima, conforme o método de Rios *et al.* (1996) modificado.

Após este período, foi acrescentado no ensaio da tripsina e da quimotripsina uma solução de PMSF em etanol (1 mg/mL), diluído em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 na proporção de 3:1, para interromper a reação enzimática.

Em seguida foi acertada a isotonicidade das soluções com PBS 10X. A estabilidade lectínica frente a enzimas proteolíticas foi então testada em termos de atividade hemaglutinante pelo método da dupla diluição serial em placas de microtitulação com emprego de eritrócitos nativos de coelho a 2 % em PBS.

Como controles do experimento foram utilizadas uma solução lectínica em água e uma solução lectínica contendo as soluções empregadas no ensaio, excetuadas as enzimas digestivas. Os dados foram representados como média de três experimentos independentes.

### **II.3.11 Verificação da natureza glicoprotéica de ACL-I:**

Foi empregado o método de Dubois *et al.* (1956) que está baseado na medida da intensidade de cor, lida a 490 nm em espectrofotômetro, resultante da reação dos carboidratos neutros, ligados à proteína, com ácido sulfúrico concentrado e fenol a 4 %. Como padrão foi utilizada solução de D-glicose.

A solução lectínica foi previamente cromatografada em coluna de BioGel P-150, com o objetivo de eliminar possíveis contaminantes glicídicos oriundos dos processos cromatográficos anteriores.

### **II.3.12 Análise de aminoácidos de ACL-I:**

A análise dos aminoácidos constituintes de ACL-I foi realizada pelo método da feniltiocarbonil (PTC), conforme Atherton (1989) e Bidlingmeyer, Cohen e Tarvin (1984) no Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo.

A hidrólise de 10 µg de lectina foi efetuada em tubos de borosilicato, previamente pirolisados a 350 °C e acondicionados em frasco de hidrólise. Foram adicionados à lectina 30 µL de solução de HCl 6 N bidestilado:fenol a 0,1 % (v/p). Os frascos de hidrólise foram fechados, congelados e submetidos a vácuo, com vapores de nitrogênio, até que todo o oxigênio foi eliminado dos mesmos. Após atingirem a temperatura ambiente, os frascos foram colocados em mufla e incubados por 48 h, a 110 °C. O excesso do reagente foi removido em *speed-vac*, a 50 °C, por 30 min.

O resíduo resultante da hidrólise foi alcalinizado com 20 µL de solução contendo metanol:água:triethylamina (2:2:1) e conduzido ao *speed-vac*, a 50 °C, por 15 min. Para a derivatização foram adicionados 20 µL de solução contendo

metanol:água:trietilamina:fenilisotiocianato (7:1:1:1), com incubação de 20 min e novamente concentrado em *speed-vac*, por 1 h, à temperatura de  $20 \pm 1$  °C. O procedimento de derivatização também foi realizado com o *pool* de padrões de aminoácidos, usando-se 20  $\mu$ L de uma solução contendo 125 nmol/mL.

A separação dos derivados PTC-aa, para a quantificação dos mesmos, foi realizada em HPLC, com sistema de bombas binárias e coluna de fase reversa C<sub>18</sub> Pico-Tag Waters (3,9 A° x 150 mm). A cromatografia foi desenvolvida a  $38 \pm 1$  °C, com o emprego de detector de UV com comprimento de onda de 254 nm e célula de fluxo contínuo de 10  $\mu$ L. Na fase móvel foi usada uma mistura binária de solventes, onde o solvente A foi uma solução de acetato de sódio 0,14 M: trietilamina a 0,06 %, pH 5,7 e o solvente B uma mistura de acetonitrila:água (60:40) (v/v), com gradiente crescente de acetonitrila (tabela 2.1) e fluxo de 1 mL/min.

Tabela 2.1: Gradiente de separação para a eluição dos feniltiocarbonil-aminoácidos

Tempo (min)	Solvente B (%)	Fluxo (mL/min)
0,0	10	1,0
2,2	15	1,0
2,5	17	1,0
3,0	21	1,0
5,5	26	1,0
6,0	35	1,0
6,5	36	1,0
8,0	42	1,0
10,0	54	1,0
11,5	100	1,0
12,0	100	1,0
12,3	100	1,5
16,5	100	1,5
17,0	100	1,0
17,5	10,0	1,0
27,5	10,0	1,0

A coluna foi equilibrada por 10 min com 5 % do solvente B e para limpeza foi usado 100 % do solvente B. As amostras (*pool* de padrões de aminoácidos e lectina) foram ressuspensas em 500  $\mu$ L de uma solução contendo acetonitrila a 5 %, acetato de sódio 0,14 M e trietilamina a 0,06 %, pH 7,5. Apenas 20  $\mu$ L foram injetados na coluna, de forma que o volume aplicado do *pool* de padrões de aminoácidos continha 100 pmol de cada aminoácido.

A quantificação dos PTC-aa foi baseada na área de cada pico de aminoácido, tomando como referência a área do pico do padrão de cada aminoácido, com concentração conhecida e derivatizado nas mesmas condições que a amostra. A hidrólise e todo o processo foram realizados em duplicata, com coeficiente de variação  $\leq$  a 10 %. O cromóforo é detectado a partir de 1 picomol.

Os resíduos de triptofanos foram determinados conforme Edelhoich (1967).

## Resultados

### Purificação

O extrato liofilizado da esponja *Axinella corrugata* foi ressuspenso em PBS e aplicado em coluna de matriz de estroma-poliacrilamida equilibrada com PBS, obtendo-se o perfil cromatográfico abaixo, mostrando a separação de dois picos (figura 2.1). O pico P<sub>1</sub> foi eluído com PBS e corresponde ao material não retido pela coluna, e o pico P<sub>2</sub>, ao retido pela coluna e com atividade hemaglutinante, que foi desligado da matriz com solução de NaCl 0,154 M:NH<sub>4</sub>OH 23 % (1:0,006; v/v).

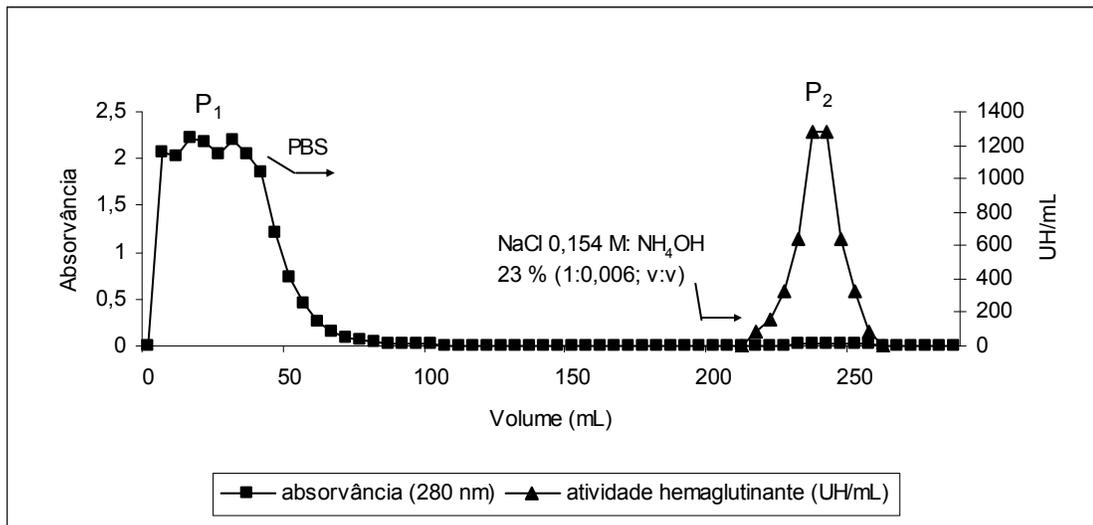


Figura 2.1: Cromatograma do extrato bruto tamponado da esponja *Axinella corrugata* em coluna de estroma de coelho-poliacrilamida.

A fração com atividade lectínica (P<sub>2</sub>) foi dialisada, concentrada em *speed-vac*, ressuspenso em PBS e recromatografada em coluna de gel filtração Ultrogel AcA 44 (figura 2.2).

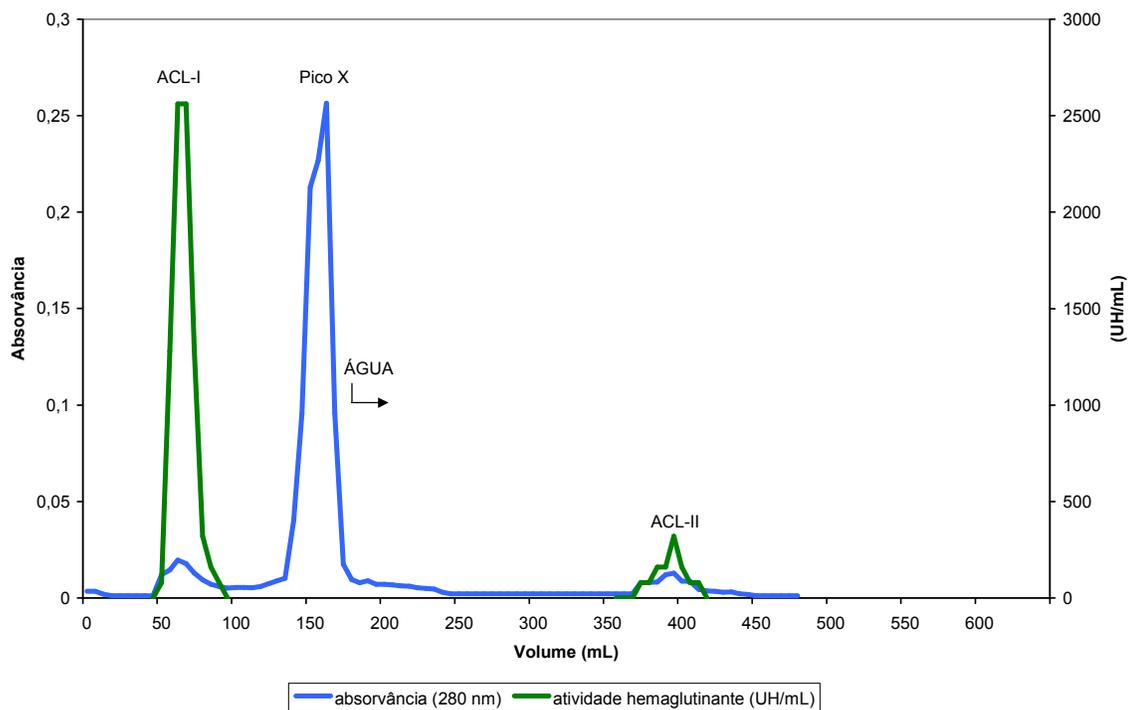


Figura 2.2: Cromatograma em gel filtração AcA 44 do pico lectínico ( $P_2$ ) obtida da cromatografia em coluna de estroma de coelho-poliacrilamida (figura 2.1).

A cromatografia do material do pico  $P_2$  (figura 2.1), eluído da coluna de estroma-poliacrilamida, em coluna de Ultrogel AcA 44 revelou que o extrato aquoso da esponja *Axinella corrugata* contém duas lectinas, conforme pode ser verificado na figura 2.2. A primeira lectina, com maior atividade hemaglutinante, foi denominada de ACL-I e eluída com PBS. A eluição da segunda, ACL-II, retida pela coluna de Ultrogel AcA 44 mesmo após lavagem exaustiva da mesma com 500 mL de PBS, somente foi possível com água. Tal fato demonstrou que a matriz de Ultrogel AcA 44 funcionou ao mesmo tempo como matriz de gel filtração para ACL-I e de afinidade para ACL-II, devido à especificidade desta lectina à galactose, constituinte da matriz do gel AcA 44. A matriz de Ultrogel AcA 44 também permitiu a separação de um pico X de elevada absorvância a 280 nm, sem atividade lectínica, logo após a lectina ACL-I e que foi eluído conjuntamente no pico  $P_2$  oriundo da matriz de estroma-poliacrilamida.

A tabela 2.2 resume o processo de purificação de ACL-I. O da ACL-II não foi representado devido ao fato dessa lectina ser responsável por apenas 10 % da atividade lectínica total do extrato aquoso de *Axinella corrugata*.

Tabela 2.2: Purificação de ACL-I.

Etapas	Proteína total (mg)	Atividade total (UH)	Atividade específica (UH/mg)	Fator de purificação	Rendimento em proteína (%)	Rendimento em atividade hemaglutinante (%)
Extrato aquoso liofilizado (300 mg)	30	191.066	6.368	1	100	100
Cromatografia de afinidade de matriz de estroma-poliacrilamida	0,276	23.705	86.200	13,53	0,9	12,41
Cromatografia de gel filtração em coluna AcA 44	0,061	14.621	239.688	37	0,2	7,65

### Eletroforese PAGE de ACL-I:

A avaliação da pureza da fração ACL-I, obtida por gel filtração em coluna de AcA 44, foi demonstrada através de eletroforese nativa (PAGE) pH 9,2 a 11 % (figura 2.3) e por SDS-PAGE a 11 % (figura 2.4A, coluna 6). Em ambas as situações, obteve-se apenas uma única banda protéica, visualizada após coloração com Coomassie Brilliant Blue R 250, mostrando a pureza da lectina e a ausência de isoformas para ACL-I.

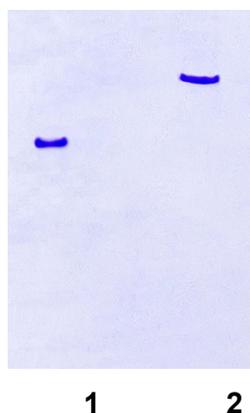


Figura 2.3: Eletroforese em sistema PAGE em gel de poliácridamida a 11 %, pH 9,2, de ACL-I. 1- padrão de referência ovalbumina; 2- ACL-I (20 µg).

## Caracterização físico-química e química da lectina ACL-I

### Estrutura molecular e estimação da massa molecular de ACL-I e de suas subunidades por SDS-PAGE:

Com fins de se estimar a  $M_r$ , ACL-I foi dissolvida em tampão de amostra, não submetida à ação desnaturante pelo calor antes de sua aplicação no gel de eletroforese, no sistema SDS-PAGE a 11 %, e em condições redutoras (em presença de  $\beta$ -mercaptoetanol) ou não. Os resultados mostraram, em ambas as condições, a presença no gel de uma banda protéica fortemente corada (B) (figura 2.4A, colunas 5 e 6), cuja  $M_r$  foi estimada em 82.300, por meio da reta de regressão (figura 2.5). Entretanto, na coluna 5 da figura 2.4A, correspondendo à amostra adicionada do redutor, houve o aparecimento de uma segunda banda, com fraca intensidade de coloração, e que seria proveniente da ação do  $\beta$ -mercaptoetanol sobre a molécula a frio e cuja  $M_r$  foi estimada em 22.000.

Quando a amostra ACL-I foi desnaturada por efeito do calor, em banho de água fervente durante 3 min, em presença de SDS e de redutor, a proteína apresentou quatro bandas, com intensidades de coloração diferenciadas, com  $M_r$  respectivas de 82.300; 40.800; 22.000 e 13.900, como se uma porção da banda de  $M_r$  de 82.300 se desdobrasse em constituintes com  $M_r$  menores (figura 2.4A, coluna 4).

No entanto, com o aumento do tempo de desnaturação a 100 °C para 5 min (figura 2.4B), a banda protéica com  $M_r$  de 82.300 diminuiu fortemente de intensidade de cor e aumentou a de 13.900 (figura 2.4B, coluna 3). Por sua vez, com o aquecimento a 100 °C por 30 min e na presença de redutor, a banda de 82.300 desapareceu totalmente do gel, bem como as de 40.800 e 22.000, dando origem a uma única banda, com  $M_r$  de 13.900 (figura 2.4C, coluna 2). Na ausência de redutor, nas mesmas condições experimentais (figura 2.4C, coluna 3), 23 % de ACL-I permaneceu com  $M_r$  de 82.300. Por outro lado, quando a lectina foi submetida a aquecimento a 100 °C por 30 min na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol e também de SDS, este último adicionado à amostra um pouco antes de sua aplicação no gel,

ocorreu um desdobramento menor da banda de proteína de Mr de 82.300 (figura 2.4D, coluna 2) em comparação quando da presença de SDS nas mesmas condições experimentais (figura 2.4D, coluna 3). Por fim, o aquecimento de ACL-I na presença de somente  $\beta$ -mercaptoetanol e na ausência de SDS, adicionado pouco antes da aplicação no gel de poliacrilamida, provocou o desdobramento completo da proteína em subunidades com Mr de 13.900 (figura 2.4D, coluna 4). Esses resultados sugerem que ACL-I é constituída por 6 subunidades monoméricas, similares e ligadas de algum modo por pontes S-S.

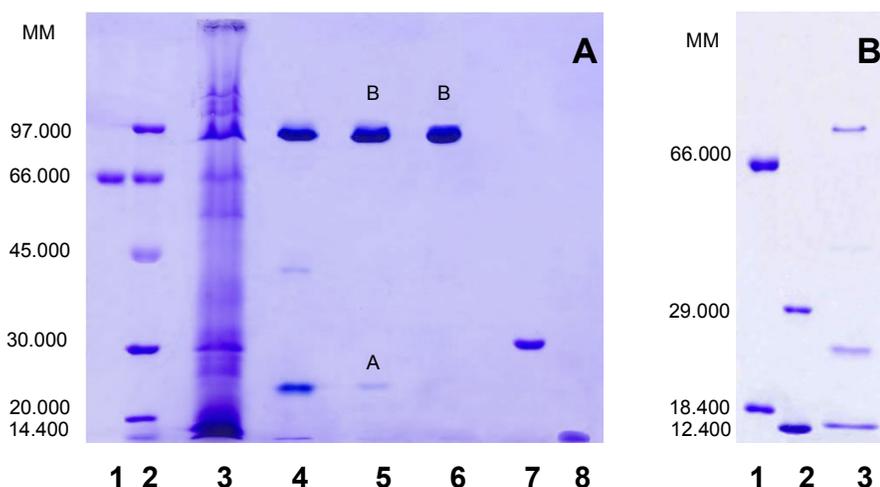


Figura 2.4

A: Eletroforese em sistema SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 11 % de ACL-I. 1- padrão de referência albumina bovina (66.000); 2- padrões de referência: fosforilase b (97.000); albumina bovina (66.000); ovalbumina (45.000); anidrase carbônica (30.000); inibidor de tripsina (20.000);  $\alpha$ -lactoalbumina (14.400); 3- extrato bruto da esponja *Axinella corrugata* (50  $\mu$ g); 4- ACL-I (20  $\mu$ g) submetida a aquecimento a 100 °C por 3 min na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol; 5- ACL-I (20  $\mu$ g) não submetida à ação do calor, em presença de  $\beta$ -mercaptoetanol; 6- ACL-I (20  $\mu$ g) não submetida à ação do calor, na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol; 7- padrão de referência anidrase carbônica (29.000); 8- padrão de referência citocromo C (12.400).

B: Eletroforese em sistema SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 11 % de ACL-I. 1- padrões de referência albumina bovina (66.000) e  $\beta$ -lactoglobulina (18.400); 2- padrões de referência anidrase carbônica (29.000) e citocromo C (12.400); 3- ACL-I (20  $\mu$ g) aquecida a 100 °C por 5 min na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol.

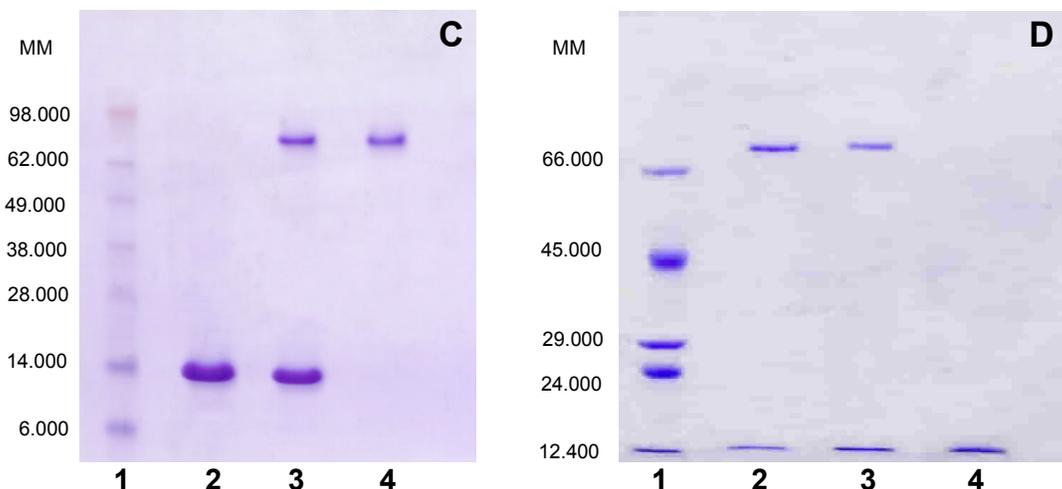


Figura 2.4

C: Eletroforese em sistema SDS-PAGE de ACL-I em gradiente de poliacrilamida de 4-12 %. 1- padrões de referência de acordo com o fabricante: fosforilase (98.000); albumina bovina (62.000); glutâmico desidrogenase (49.000); álcool desidrogenase (38.000); anidrase carbônica (28.000); lisozima (14.000); aprotinina (6.000); 2- ACL-I (20 µg) aquecida a 100 °C por 30 min na presença de β-mercaptoetanol; 3- ACL-I (20 µg) aquecida a 100 °C por 30 min na ausência de β-mercaptoetanol; 4- ACL-I (10 µg) não submetida à ação do calor, na ausência de β-mercaptoetanol.

D: Eletroforese em sistema SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 11 % de ACL-I. 1- padrões de referência: albumina bovina (66.000); ovalbumina (45.000); anidrase carbônica (29.000); tripsinogênio (24.000); citocromo C (12.400); 2- ACL-I (10 µg) aquecida a 100 °C por 30 min na ausência de β-mercaptoetanol e de SDS (antes da aplicação no gel foi adicionado SDS); 3- ACL-I (10 µg) aquecida a 100 °C por 30 min na ausência de β-mercaptoetanol e na presença de SDS ; 4- ACL-I (10 µg) aquecida a 100 °C por 30 min na presença de β-mercaptoetanol e na ausência de SDS (antes da aplicação no gel foi adicionado SDS).

A figura 2.5 mostra a reta de regressão linear, obtida a partir dos padrões da figura 2.4B, com fins da estimação da  $M_r$  da ACL-I e de suas subunidades. Os resultados foram registrados com um gráfico do logaritmo decimal da massa molecular dos padrões pela sua respectiva mobilidade relativa.

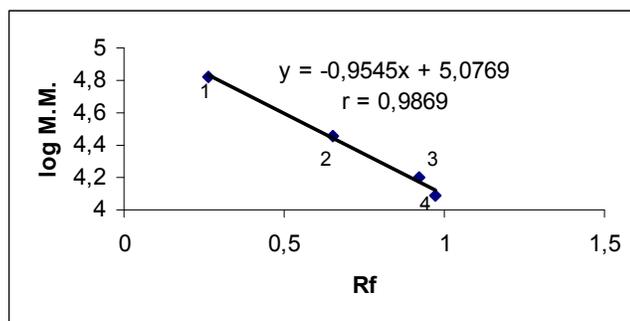


Figura 2.5: Reta de regressão linear para estimação da  $M_r$  de ACL-I e de suas subunidades obtida por SDS-PAGE. 1 - albumina bovina (66.000); 2 - anidrase carbônica (29.000); 3 - β-lactoglobulina (18.400); 4 - citocromo C (12.400).

### Estimação da massa molecular de ACL-I por sistema FPLC:

A estimação da  $M_r$  de ACL-I por meio de gel filtração em coluna Superose 12 HR foi realizada com o uso do gráfico do logaritmo decimal da massa molecular dos padrões pela razão  $V_e/V_o$ , onde  $V_e$  é o volume de eluição da proteína e  $V_o$  é o volume de exclusão do azul de dextrano, tendo-se obtido o valor de 78.500, de acordo com a reta de regressão linear da figura 2.6. Este valor é muito próximo ao obtido por SDS-PAGE (82.300).

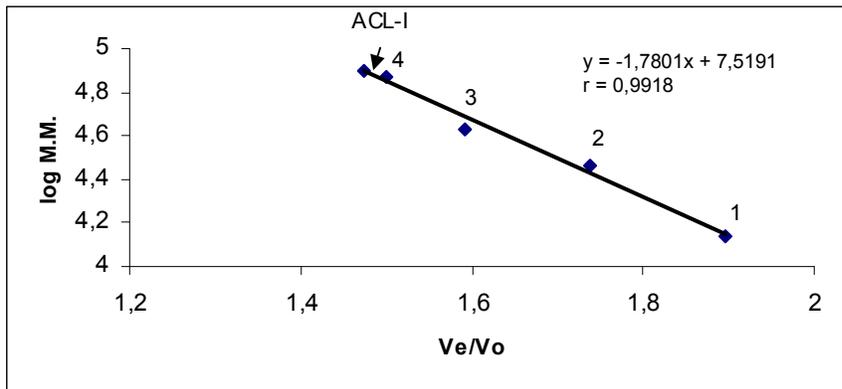


Figura 2.6: Reta de regressão linear para estimação da  $M_r$  de ACL-I obtida por FPLC. 1 - ribonuclease (13.700); 2 - anidrase carbônica (29.000); 3 - ovalbumina (43.000); 4 - conalbumina (75.000).

### Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante:

Como se pode verificar na figura 2.7, ACL-I mostrou ser estável, quando aquecida até 70 °C durante 30 min. A atividade hemaglutinante reduziu a partir de 75 °C, desaparecendo completamente com aquecimento a 95 °C por 10 min ou a 90 °C por 30 min.

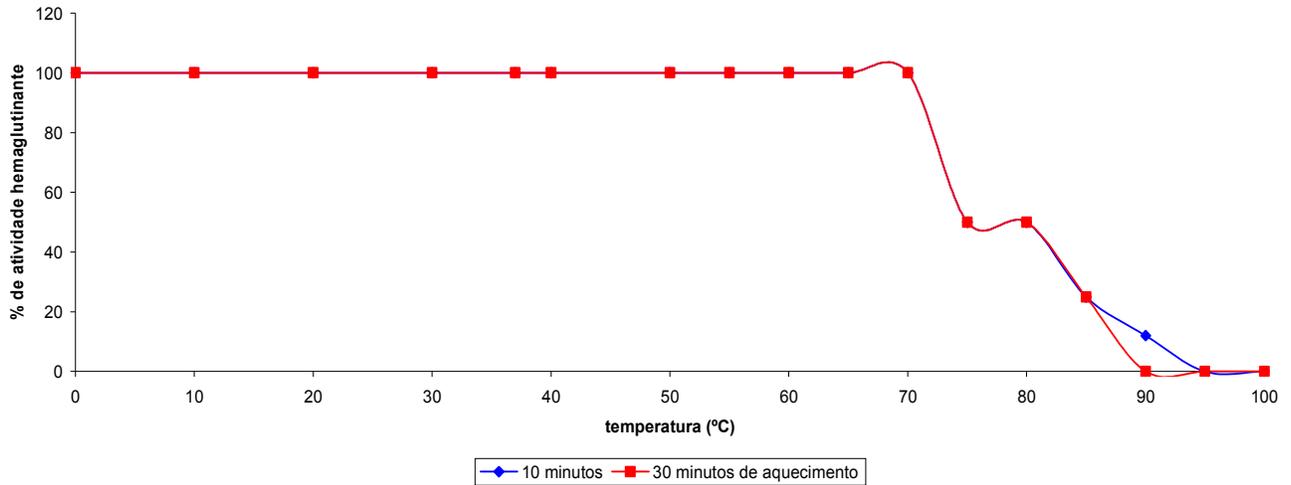


Figura 2.7: Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante de ACL-I.

### Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante:

O estudo do efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante mostrou que ACL-I apresentou atividade na faixa de pH de 4,5 a 11, com maior atividade lectínica entre o pH 6,5 e 8,0 (figura 2.8). Em pH inferiores a 4 a hemaglutinação foi totalmente abolida, por hemólise dos eritrócitos.

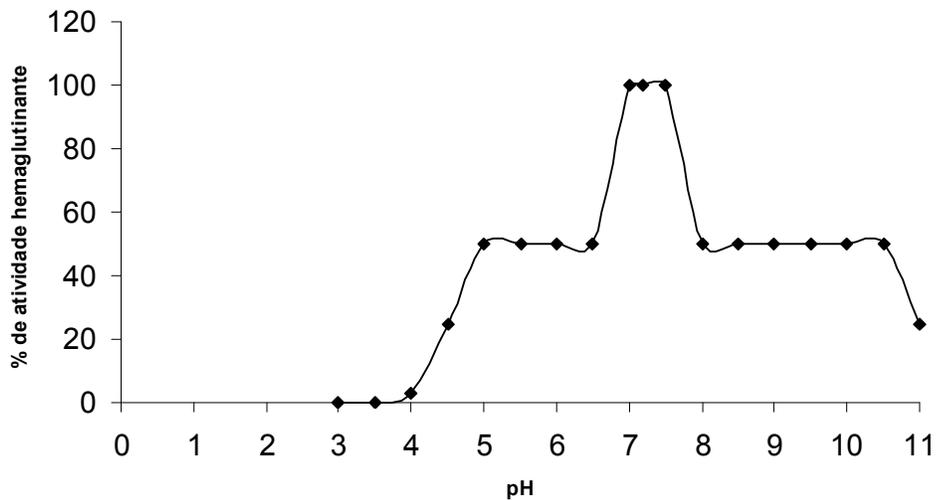


Figura 2.8: Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante de ACL-I.

### Efeito do pH sobre a estabilidade de ACL-I:

Com relação ao efeito do pH sobre a estabilidade da molécula protéica, a lectina manteve atividade hemaglutinante quando submetida à variação de pH na faixa de pH de 2 a 11, com maior atividade entre pH 6,5 e 8,5 (figura 2.9), quando avaliada a pH 7,2. No pH 1,5 a atividade hemaglutinante diminuiu drasticamente. Em pH 1 ocorreu perda total da atividade lectínica, possivelmente por desnaturação irreversível da proteína.

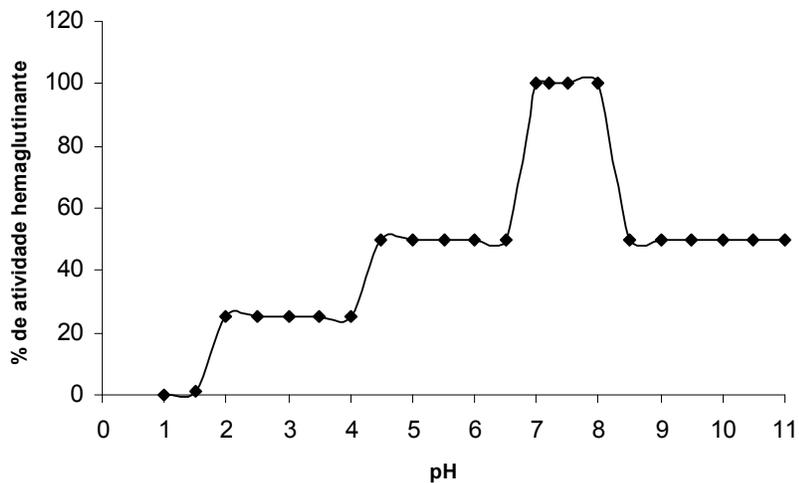


Figura 2.9: Efeito do pH sobre a estabilidade protéica de ACL-I.

### Efeito de cátions divalentes e do EDTA sobre a atividade hemaglutinante:

A atividade hemaglutinante de ACL-I não foi dependente de cátions divalentes e não diminuiu em presença de EDTA, conforme a tabela 2.3.

Tabela 2.3: Efeito de cátions divalentes e do EDTA sobre a atividade hemaglutinante de ACL-I.

Solução	Atividade hemaglutinante (UH/mL)
Controle	1280
EDTA 5 mM ou 25 mM	1280
EDTA 5 mM ou 25 mM + CaCl <sub>2</sub> 40 mM	1280
EDTA 5 mM ou 25 mM + MgSO <sub>4</sub> 40 mM	1280
EDTA 5 mM ou 25 mM + MnSO <sub>4</sub> 40 mM	1280

### **Efeito de agentes desnaturantes e redutores sobre a atividade hemaglutinante:**

ACL-I, quando incubada com DTT ou  $\beta$ -mercaptoetanol a 2,5 e 5,0 mM, respectivamente, assim como, na presença de uréia 4 M, mostrou uma diminuição na atividade hemaglutinante da ordem de 50 %, em comparação com o controle (tabela 2.4).

Tabela 2.4: Efeito de agentes desnaturantes e redutores sobre a atividade hemaglutinante de ACL-I.

Solução	% de atividade hemaglutinante remanescente em relação ao controle (100%)
Uréia 4 M	50
$\beta$ -mercaptoetanol 2,5 mM	50
$\beta$ -mercaptoetanol 5,0 mM	50
DTT 2,5 mM	50
DTT 5,0 mM	50

### **Espectro de absorção:**

ACL-I apresentou pico máximo de absorção a 278 nm, conforme pode ser visualizado pelo espectro de absorção no UV da figura 2.10. A 280 nm a absorvância foi de 0,28270 e a 278 nm de 0,28551.

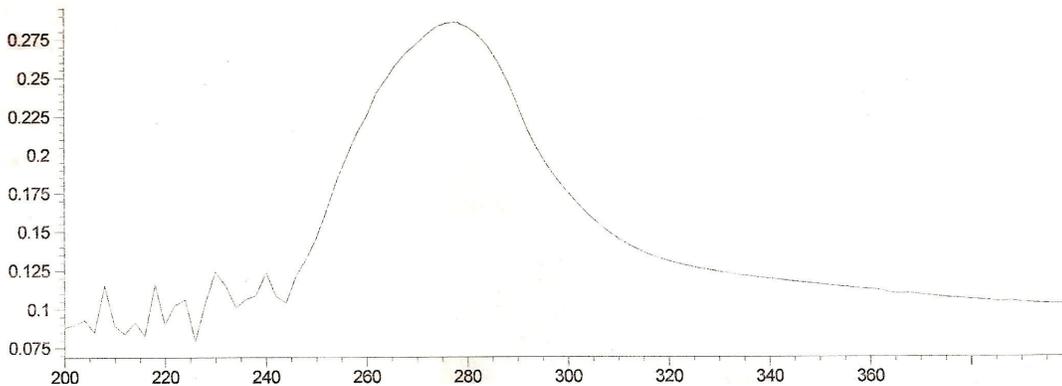


Figura 2.10: Espectro de absorção da ACL-I entre 200 e 400 nm.

### **Coefficiente de extinção:**

O coeficiente de extinção da ACL-I a 1 % em NaCl 0,154 M foi de 105,788. A partir desse resultado foi calculado o coeficiente de extinção molar da lectina, obtendo-se o valor de  $8,671 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

### **Ponto Isoelétrico:**

A focalização isoelétrica revelou a presença de uma única banda protéica em condições não desnaturantes pelo calor, mas em presença de uréia e de DTT, com valor de  $pI$  de 6,3. A obtenção de uma única banda protéica por IEF, nas condições experimentais desta técnica, é mais um indicativo da pureza da ACL-I obtida pelo método de purificação usado neste trabalho.

### **Estabilidade frente a enzimas proteolíticas:**

ACL-I mostrou ser estável, sendo resistente à ação das enzimas tripsina e quimotripsina.

Com relação a possível ação proteolítica da pepsina sobre a atividade lectínica, a reação é realizada em  $pH$  1. Como foi observado na figura 2.9, em  $pH$  1

ocorre desnaturação irreversível da proteína. Deste modo, ficou impossível avaliar o efeito da pepsina sobre a estabilidade de ACL-I.

### **Natureza glicoprotéica:**

A análise de carboidratos neutros pelo método de Dubois *et al.* (1956) revelou a presença de 19,02 % de carboidratos em ACL-I.

### **Composição de aminoácidos:**

O resultado da análise da composição de aminoácidos de ACL-I encontra-se na tabela 2.5.

A lectina apresentou um alto conteúdo de glicina (28,94 móis %), de ácido aspártico/asparagina (11,70 móis %), de ácido glutâmico/glutamina (10,96 móis %) e de alanina (8,63 móis %).

Tabela 2.5: Composição de aminoácidos de ACL-I.

Aminoácido	Móis %	Resíduos/molécula
Ácido aspártico/ asparagina	11,70	80
Ácido glutâmico/ glutamina	10,96	75
Alanina	8,63	59
Arginina	2,34	16
Cisteína	0,44	3
Fenilalanina	3,36	23
Glicina	28,94	198
Histidina	0,15	1
Isoleucina	0,15	1
Leucina	6,58	45
Lisina	3,65	25
Metionina	0,88	6
Prolina	4,68	32
Serina	7,02	48
Tirosina	4,82	33
Treonina	3,95	27
Triptofano	0,29	2
Valina	1,46	10

O número de aminoácidos calculados presentes na molécula de glicoproteína foi de 684, correspondendo a uma massa molecular protéica de 66.700. Considerando que 19,02 % da Mr de ACL-I corresponde a carboidratos, a Mr de

82.300 obtida a partir da estimação por SDS-PAGE fica em 66.600, muito semelhante à determinada pelo número de aminoácidos.

## Características da lectina ACL-II

### Eletroforese PAGE:

A avaliação da pureza de ACL-II, obtida por gel filtração em Ultrogel AcA 44, foi demonstrada através de eletroforese nativa (PAGE) pH 9,2 a 11 %. A figura 2.11 mostra a presença de uma única banda protéica (coluna 2), após coloração com Coomassie brilliant blue R 250, comprovando a pureza da lectina e a ausência de isoformas para ACL-II neste pH.

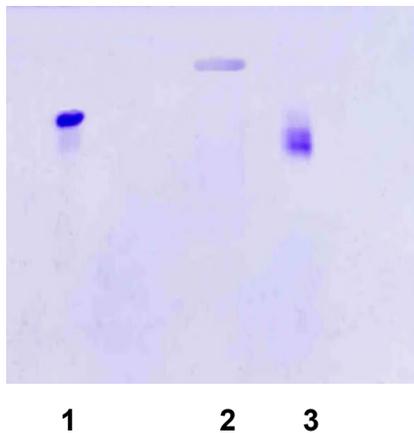


Figura 2.11: Eletroforese em sistema PAGE em gel de poliacrilamida a 11 %, pH 9,2, de ACL-II. 1- padrão de referência albumina; 2- ACL-II (10 µg); 3- padrão de referência ovalbumina.

### Estimação da massa molecular de ACL-II por eletroforese e gel filtração:

A lectina II de *Axinella corrugata* foi dissolvida em tampão de amostra na ausência de redutor, além de não ser submetida à ação desnaturante pelo calor antes de sua aplicação no gel, em sistema SDS-PAGE a 11 %. Os resultados mostraram a presença de uma única banda no gel (figura 2.11, coluna 2), sendo a  $M_r$  calculada a partir da reta de regressão obtida pela migração em paralelo dos padrões de referência (figura 2.12, colunas 1 e 3).

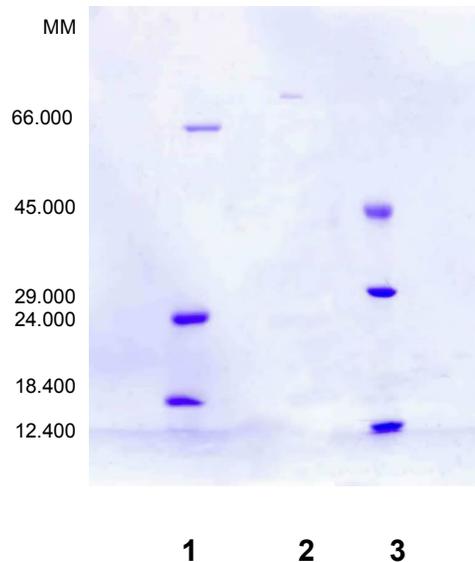


Figura 2.12: Eletroforese em sistema SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 11 % de ACL-II. 1- padrões de referência albumina bovina (66.000), tripsinogênio (24.000) e  $\beta$ -lactoglobulina (18.400); 2- ACL-II (10  $\mu$ g) não submetida à ação do calor e na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol; 3- padrões de referência ovalbumina (45.000), anidrase carbônica (29.000) e citocromo C (12.400).

A figura 2.13 mostra a reta de regressão linear, obtida a partir dos padrões da figura 2.11, com fins da estimação da  $M_r$  da ACL-II. Os resultados foram registrados com um gráfico do logaritmo decimal da massa molecular dos padrões pela sua respectiva mobilidade relativa. O resultado foi uma  $M_r$  de 80.000 para a lectina.

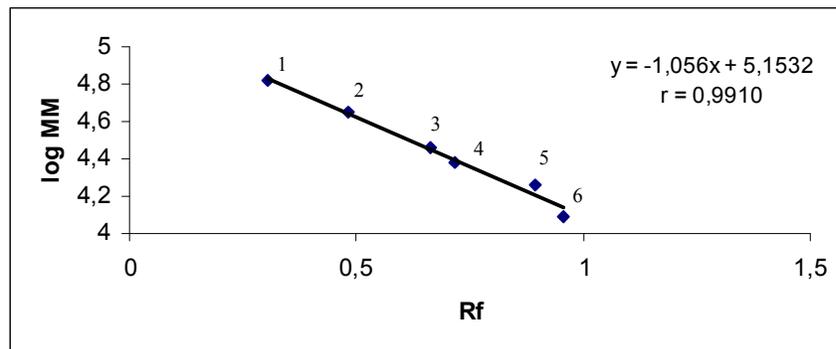


Figura 2.13: Reta de regressão linear para estimação da  $M_r$  de ACL-II obtida por SDS-PAGE. 1 - albumina bovina (66.000); 2 - ovalbumina (45.000); 3- anidrase carbônica (29.000); 4- tripsinogênio (24.000); 5 -  $\beta$ -lactoglobulina (18.400); 6 - citocromo C (12.400).

Por outro lado, a estimação da  $M_r$  por meio de gel filtração em coluna Superose 12 HR foi determinada através do gráfico do logaritmo decimal da massa molecular dos padrões pela razão  $V_e/V_o$ , tendo-se obtido o valor de 78.000 para

ACL-II, muito próximo ao obtido pela eletroforese (80.000), segundo a reta de regressão linear da figura 2.14.

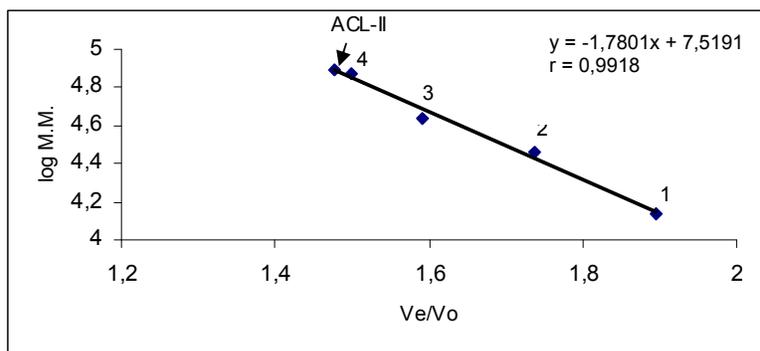


Figura 2.14: Reta de regressão linear para estimar a  $M_r$  de ACL-II obtida por FPLC. 1 - ribonuclease (13.700); 2 - anidrase carbônica (29.000); 3 - ovalbumina (43.000); 4 - conalbumina (75.000).

### Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante:

ACL-II apresentou uma estabilidade térmica semelhante à ACL-I até ao aquecimento a 65 °C por 30 min (figura 2.15). A atividade hemaglutinante começou a diminuir com o aquecimento a 70 °C por 10 min, com queda acentuada a partir de 70 °C por 30 min. Ao contrário de ACL-I, foi resistente ao aquecimento a 90 °C por 30 min e a 95 °C durante 10 min, com perda total da atividade hemaglutinante somente com aquecimento a 100 °C por 10 min.

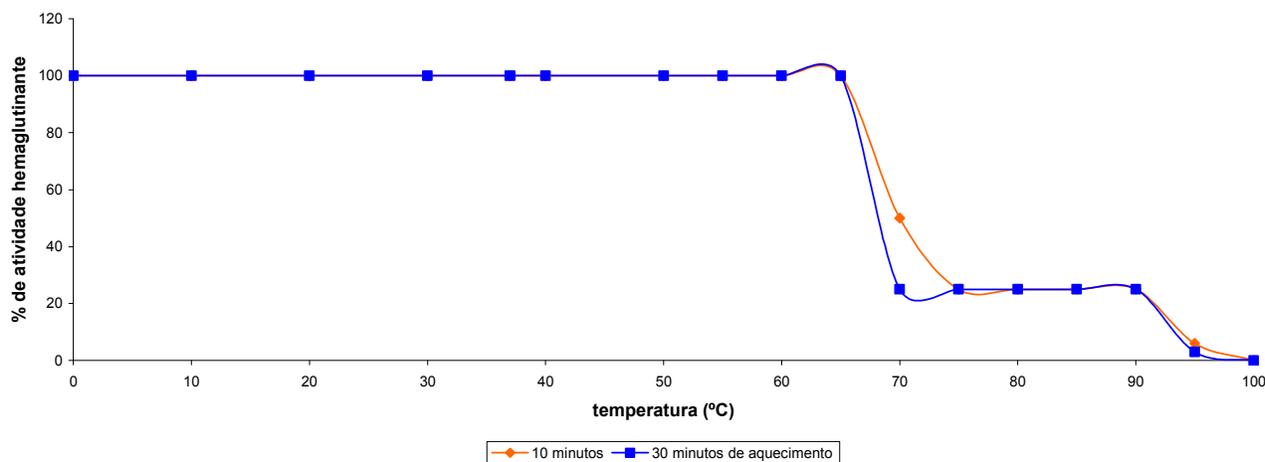


Figura 2.15: Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante de ACL-II.

### Efeito do pH sobre a estabilidade de ACL-II:

Em relação ao pH, ACL-II foi mais estável ao efeito da variação do pH que ACL-I, mantendo atividade residual em pH 1. O pico de atividade lectínica ficou entre o pH 1,5 e 6,5 (figura 2.16).

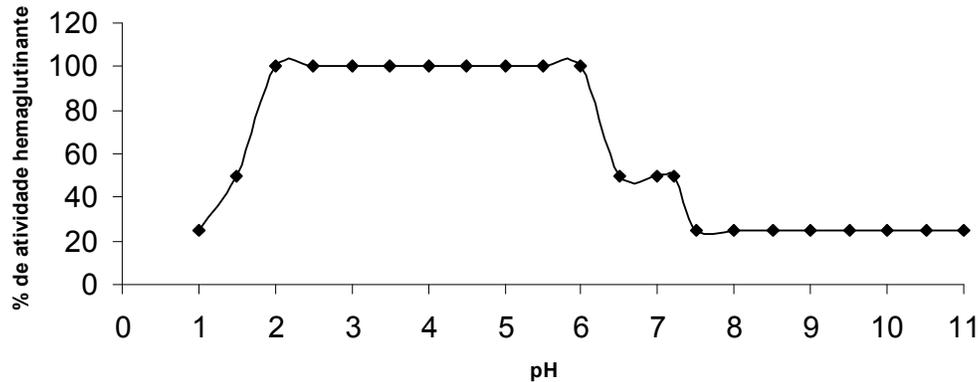


Figura 2.16: Efeito do pH sobre a estabilidade proteica de ACL-II.

### Efeito de cátions divalentes e do EDTA sobre a atividade hemaglutinante:

A atividade hemaglutinante de ACL-II não foi dependente de cátions divalentes e nem diminuiu em presença de EDTA, conforme tabela 2.6.

Tabela 2.6: Efeito de cátions divalentes e do EDTA sobre a atividade hemaglutinante de ACL-II.

Solução	Atividade hemaglutinante (UH/mL)
Controle	640
EDTA 5 mM ou 25 mM	640
EDTA 5 mM ou 25 mM + CaCl <sub>2</sub> 40 mM	640
EDTA 5 mM ou 25 mM + MgSO <sub>4</sub> 40 mM	640
EDTA 5 mM ou 25 mM + MnSO <sub>4</sub> 40 mM	640

## Discussão

Os métodos empregados para o isolamento e purificação das lectinas de *Axinella corrugata* foram alguns dos comumente utilizados para proteínas, como gel filtração e cromatografia de afinidade.

Neste trabalho a etapa inicial de purificação foi a passagem do extrato protéico da esponja em coluna cromatográfica de afinidade com matriz de estroma-poliacrilamida, seguido de cromatografia de gel filtração em coluna de Ultrogel AcA 44.

A coluna de afinidade de matriz de estroma-poliacrilamida foi muito eficiente na purificação das proteínas deste trabalho. Não foram encontrados registros na literatura do emprego desta matriz de afinidade na purificação de lectinas de origem animal. Os fragmentos da membrana plasmática dos eritrócitos de coelho ficaram imobilizados numa rede de poliácrlamida, gerando uma matriz de consistência gelatinosa. As duas lectinas de *Axinella corrugata* ficaram ligadas aos carboidratos da membrana plasmática rompida dos eritrócitos de coelho, sendo desligadas do gel com a mudança do pH e da força iônica, mediante o emprego de solução cloreto de sódio 0,154 M:hidróxido de amônio 23 % (1:0,006; v:v). A seguir, o uso da coluna de Ultrogel AcA 44 permitiu o isolamento e a purificação de duas lectinas, ACL-I e ACL-II, conforme pode-se verificar na figura 2.2. ACL-I é a lectina com maior atividade hemaglutinante, sendo por este motivo o objetivo principal de estudo neste trabalho. Não foi utilizada a etapa de precipitação salina com sulfato de amônio antes dos processos cromatográficos citados, em virtude da grande perda do material acarretada por este processo. Outros métodos experimentais para purificação, como troca iônica e cromatografia de afinidade em coluna de GlcNAc-Agarose, não alcançaram os objetivos propostos.

Lectinas de esponjas marinhas são na grande maioria purificadas por cromatografia de afinidade, como as lectinas de *Aplysina lawnosa* e *Aplysina archeri* (Miarons; Fresno, 2000), *Chondrilla nucula* (Schröder *et al.*, 1990), *Desmapsama anchorata* (Atta *et al.*, 1990), *Suberites domuncula* (Schröder *et al.*, 2003), *Cinachyrella alloclada* (Atta *et al.*, 1989), *Axinella dissimilis* (Bretting *et al.*, 1981a),

*Cliona varians* (Moura *et al.*, 2006), lectina I de *Geodia cydonium* (Müller *et al.*, 1983) e *Halichondria okadai* (Kawagishi *et al.*, 1994). Este processo de purificação permite a remoção dos contaminantes dos extratos protéicos após exaustiva lavagem da matriz, sendo a lectina posteriormente desligada e eluída em alto grau de pureza.

Processos de purificação semelhantes ao utilizado neste trabalho foram empregados na obtenção das lectinas de *Crambe crambe* (Dogovic *et al.*, 1996), *Haliclona cratera* (Pajic *et al.*, 2002), *Pellina semitubulosa* (Engel *et al.*, 1992), *Halichondria panicea* (Kamiya; Muramoto; Goto, 1990) e *Dysidea herbacea* (Kamiya *et al.*, 1985), onde inicialmente foi usada uma coluna de afinidade, seguida de gel filtração.

Além de *Axinella corrugata*, outras esponjas marinhas também possuem mais de uma lectina, como *Halichondria okadai* (Kawagishi *et al.*, 1994), *Anthosigmella varians* (Atta; Cunha; Peixinho, 1992) e *Geodia cydonium* (Hanisch *et al.*, 1984) Em *Geodia cydonium* as duas lectinas são aparentemente uma mistura idêntica de inúmeras isoformas. A lectina I da *Geodia* é a lectina majoritária (12,5 % do conteúdo protéico do extrato bruto), enquanto que a lectina II corresponde a 4,8 %. Por sua vez, *Axinella polypoides* apresenta 4 lectinas, mas duas são majoritárias. As lectinas I e II estão presentes em elevada concentração nos tecidos da esponja, compreendendo cerca de 8 % do total do conteúdo protéico extraível da mesma (Bretting; Kalthoff; Fehr, 1978).

A partir de 30 mg de proteínas obteve-se um rendimento em proteína da ACL-I e em unidades hemaglutinantes de 0,20 % e de 7,65 %, respectivamente, mas com grau de pureza de 37 vezes. Valores igualmente baixos em rendimento protéico foram encontrados na purificação das lectinas de *Haliclona cratera* (0,040 %) (Pajic *et al.*, 2002), de *Phyllospongia foliascens* (0,075 %) (Kamiya *et al.*, 1986), de *Cliona varians* (1 %) (Moura *et al.*, 2006) e para as lectinas HOL-I (2,7 %) e HOL-II (2,9 %) de *Halichondria okadai* (Kawagishi *et al.*, 1994). Rendimentos protéicos altos foram obtidos para as lectinas de *Crambe crambe* (57 %) (Dogovic *et al.*, 1996), de *Cinachyrella alloclada* (58 %) (Atta *et al.*, 1989) e de *Anthosigmella varians* (80 %) (Atta *et al.*, 1992).

Em relação ao grau de purificação, resultados comparáveis aos obtidos neste trabalho foram encontrados para as lectinas HOL-I (49X) e HOL-II (20X) de *Halichondria okadai* (Kawagishi *et al.*, 1994), para a lectina de *Desmapsama anchorata* (27X) (Atta *et al.*, 1990), de *Anthosigmella varians* (31X) (Atta *et al.*, 1992) e de *Crambe crambe* (32X) (Dogovic *et al.*, 1996). Resultados bem superiores foram alcançados para as lectinas de *Cliona varians* (192,5X) (Moura *et al.*, 2006), de *Cinachyrella alloclada* (290X) (Atta *et al.*, 1989) e de *Haliclona cratera* (648X) (Pajic *et al.*, 2002).

A pureza de ACL-I e de ACL-II foi constatada pela realização de eletroforese em sistema PAGE pH 9,2 e por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 11 %, com aplicação das amostras na ausência de redutor e sem prévia desnaturação pelo calor, quando foi verificado o aparecimento de uma única banda protéica para ambas as lectinas após coloração com azul de Coomassie R 250. Além disso, por IEF, no caso de ACL-I, em condições nativas da proteína, também ocorreu o aparecimento de apenas uma banda protéica.

Em sistema SDS-PAGE, com ACL-I sendo submetida a aquecimento em banho de água fervente, durante 30 min, em presença apenas de redutor (figura 2.4D coluna 4), obteve-se somente uma única banda protéica correspondente às subunidades monoméricas da lectina.

Há uma ampla variação nas características físico-químicas e químicas das lectinas, especialmente quanto à sua massa molecular, estrutura mono ou oligossacarídica, composição de aminoácidos e dependência de cátions divalentes para a atividade hemaglutinante, independente da origem da lectina.

A lectina I de *Axinella corrugata* em sistema SDS-PAGE a 11 %, em condições redutoras ( $\beta$ -mercaptoetanol) e com aquecimento a 100 °C por 3 min, mostrou 4 bandas protéicas (figura 2.4A, coluna 4) com massas moleculares relativas de 82.300, 40.800, 22.000 e 13.900, respectivamente, determinadas por regressão linear, indicando desdobramento da molécula por efeito do calor e do redutor. O não pré-aquecimento da amostra a 100 °C somente desdobrou levemente a molécula protéica, na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol (figura 2.4A, coluna 5).

A fervura por 5 minutos em presença de redutor provocou a intensificação da banda de menor massa molecular (13.900), com concomitante enfraquecimento na intensidade de coloração das demais bandas, enquanto que o aquecimento a 100 °C por 30 min levou à formação de apenas da banda protéica com Mr de 13.900 e o total desaparecimento das demais 3 bandas de maior massa molecular (figura 2.4C, coluna 2). Este fato não ocorreu na ausência de redutor (figura 2.4C, coluna 3), quando a análise por densitometria revelou que 23 % da lectina ainda se apresentava com Mr de 82.300. Com o objetivo de se avaliar o efeito do calor no desdobramento da proteína, a mesma foi aquecida a 100 °C por 30 minutos na ausência de SDS e também de redutor, tendo-se verificado o desdobramento parcial da banda de 82.300 para a formação da banda de menor massa molecular (13.900) (figura 2.4D coluna 2), cuja intensidade aumentou quando da presença de apenas SDS (figura 2.4D coluna 3). No entanto, o aquecimento a 100 °C somente na presença de redutor, sem SDS, levou ao desdobramento completo da lectina em suas subunidades monoméricas constituintes (figura 2.4D coluna 4). Estes resultados revelam a presença de pontes S-S ligando as subunidades e que apenas o redutor é capaz de desdobrar totalmente a lectina. Dessa maneira pode-se deduzir que ACL-I possui uma estrutura quaternária constituída por seis subunidades monoméricas, possivelmente similares com Mr de 13.900, com envolvimento de pontes de dissulfeto na formação desta estrutura quaternária.

A necessidade de um tempo maior de aquecimento de ACL-I para a separação de suas subunidades, mesmo em presença de altas concentrações de SDS e de  $\beta$ -mercaptoetanol, poderia ser devido a uma estrutura complexa da lectina, na qual a elevada concentração glicídica (19,02 %) poderia ter algum envolvimento.

A Mr de ACL-II foi estimada como sendo 80.000 por SDS-PAGE, sem pré-aquecimento e na ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol, ao passo que por gel filtração em coluna de Superose 12 HR, em presença de GlcNAc, obteve-se o valor de 78.000, valores um pouco inferiores aos estimados para ACL-I. Devido à pequena quantidade de ACL-II obtida em cada processo de purificação, não foi possível até o momento determinar a estrutura de sua molécula.

Há uma diferença marcante em unidades monoméricas entre as lectinas purificadas dentro do gênero *Axinella*. Enquanto que a lectina I de *Axinella corrugata*

é homohexamérica com  $M_r$  de 82.300, a lectina I de *Axinella polypoides* é homodimérica a pH neutro com uma  $M_r$  estimada por gel filtração de apenas 34.000. Cada subunidade contém uma ponte de dissulfeto intracadeia entre as posições 4 e 46. Por sua vez, a lectina II de *Axinella polypoides* é monomérica com massa molecular de 16.200 Da, determinada por espectrometria de massas, bem inferior às  $M_r$  das lectinas I e II de *Axinella corrugata*, estimadas em 82.300 e 80.000, respectivamente, por SDS-PAGE a 11 %. A lectina II de *Axinella polypoides* também apresenta uma ponte de dissulfeto intracadeia entre as posições 4 e 46 (Buck *et al.*, 1992; Buck *et al.*, 1998).

Foi descrito que a lectina de *Pellina semitubulosa* possui  $M_r$  estimada por SDS-PAGE a 15 % na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol de 34.000, enquanto que na ausência de redutor a  $M_r$  foi de 205.000, indicando que esta lectina, como ACL-I, também possui estrutura homohexamérica, cujas cadeias polipeptídicas são ligadas covalentemente por pontes de dissulfeto e rompidas por  $\beta$ -mercaptoetanol (Engel *et al.*, 1992). A lectina de *Helix pomatia*, um molusco terrestre, também é homohexamérica, cujos monômeros têm uma  $M_r$  de 13.000 (Hammarström; Westöö; Björk, 1972). A lectina apresenta uma  $M_r$  de 79.000, muito semelhante à de ACL-I. Outra lectina que apresenta uma elevada massa molecular é a da esponja *Chondrilla nucula*, com  $M_r$  estimada em 70.000, sendo formada por quatro subunidades de 15.600, liberadas na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol (Schröder *et al.*, 1990).

De forma diversa como obtido nesse trabalho, a lectina HOL-I de *Halichondria okadai* independe de  $\beta$ -mercaptoetanol para separar suas subunidades constituintes. Por outro lado, como ACL-I, a lectina I de *Halichondria okadai* teve estimada sua  $M_r$  por gel filtração em coluna Superose 12, com  $M_r$  obtida de 84.000, muito próxima à  $M_r$  de 82.300 de ACL-I. Contudo, HOL-I é uma molécula tetramérica, com  $M_r$  de 21.000 por subunidade monomérica (Kawagishi *et al.*, 1994). A lectina I de *Aaptos papillata*, em SDS-PAGE a 10 %, apresentou duas bandas protéicas, uma com  $M_r$  de 21.000 e outra de 12.000, ao passo que as lectinas II e III exibiram apenas uma banda de  $M_r$  igual a 16.000 (Bretting *et al.*, 1976). Além disso, a lectina de *Haliclona cratera* submetida a SDS-PAGE a 10 % revelou apenas uma banda de 14.000, na presença ou não de  $\beta$ -mercaptoetanol, sendo uma lectina homodimérica com

subunidades não ligadas por pontes de dissulfeto (Pajic *et al.*, 2002). De maneira diferente de ACL-I, as lectinas de *Aplysina lawnosa* e de *Aplysina archeri* não dependem de agente redutor para separação de suas subunidades monoméricas, cada uma com *Mr* de 16.000, sendo estas lectinas tetraméricas (Miarons; Fresno, 2000).

Por outro lado, a lectina de *Craniella australiensis* é trimérica com cadeias polipeptídicas de 18.000 ligadas por pontes de dissulfeto, cuja *Mr* foi determinada por SDS-PAGE a 15 %, na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol. Na ausência de agente redutor a *Mr* foi de 54.000 (Xiong *et al.*, 2006). A lectina de *Cliona varians* possui subunidades monoméricas de 28.000 analisadas por SDS-PAGE a 12 % em presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, mas em SDS-PAGE a 7,5 % sem  $\beta$ -mercaptoetanol, a massa molecular foi estimada em 106.000, indicando que a lectina é tetramérica e as subunidades unidas por pontes S-S (Moura *et al.*, 2006). Outra lectina com *Mr* superior à de ACL-I e de ACL-II é a de *Anthosigmella varians*. Das duas lectinas extraídas desta esponja, uma apresenta *Mr* de 90.000 (Atta *et al.*, 1992).

Um comportamento peculiar foi mostrado pela lectina I de *Geodia cydonium*. A eletroforese dessa lectina em sistema SDS-PAGE a 15 %, na ausência de redutor, revelou a presença de apenas duas bandas protéicas, com *Mr* de 23.500 e 13.500, respectivamente. Condições redutoras levaram ao aparecimento de 3 bandas com *Mr* de 13.800, 13.000 e 12.200, indicando que a lectina é composta por 3 cadeias polipeptídicas, das quais duas são ligadas covalentemente por uma ponte de dissulfeto, sendo a terceira ligada não covalentemente na molécula protéica (Müller *et al.*, 1983).

As lectinas se caracterizam, de um modo geral, por uma elevada estabilidade térmica e pela resistência a variação ampla de faixa de pH. Com as lectinas de esponjas marinhas não é diferente.

As lectinas I e II de *Axinella corrugata* mostraram comportamento semelhante frente ao aquecimento. A atividade hemaglutinante de ACL-I manteve-se invariável até a temperatura de 70 °C durante 30 min, desaparecendo completamente a 95 °C com aquecimento durante 10 min, ao passo que ACL-II teve um decréscimo em sua

atividade a partir de 70 °C. Contudo, ACL-II demonstrou uma estabilidade térmica superior à lectina ACL-I, com perda total da atividade somente a 100 °C.

A lectina IV de *Axinella polypoides* mostrou estabilidade térmica superior à lectina I de *Axinella corrugata*, apresentando atividade residual a 90 °C quando aquecida por 90 min (Bretting; Kalthoff; Fehr, 1978). Resultado idêntico a ACL-I ocorreu com a lectina de *Pellina semitubulosa*, cuja atividade foi totalmente perdida por aquecimento a 95 °C por 10 minutos (Engel *et al.*, 1992). ACL-I também teve esse comportamento a 90 °C por 30 min, como sucedeu com HOL-1 de *Halichondria okadai* (Kawagishi *et al.*, 1994). Por outro lado, ACL-I mostrou ser mais resistente que a lectina de *Cliona varians*, cuja atividade foi totalmente destruída por aquecimento a 80 °C (Moura *et al.*, 2006).

A lectina de *Craniella australiensis* apresentou perda total de atividade a 100 °C (Xiong *et al.*, 2006), assim como ACL-II. Esta lectina foi mais resistente que a de *Haliclona cratera*, que perdeu sua atividade hemaglutinante após exposição à temperatura de 95 °C por 60 minutos (Pajic *et al.*, 2002).

Com relação ao efeito do pH sobre a estabilidade da molécula protéica, ACL-I apresentou maior atividade hemaglutinante na faixa de pH 7 a 8. Em valores de pH inferiores a 7 até pH 2 e superiores a 8 até pH 11 houve diminuição da atividade lectínica. A pH 1 ocorreu desnaturação irreversível da proteína. Por sua vez, ACL-II mostrou maior estabilidade frente à variação de pH na faixa de pH de 2 ao 6 (figura 2.16) que ACL-I, apresentando ainda atividade residual a pH 1. Houve diminuição da atividade da ACL-II na faixa de pH superior a 6 até 7,2 e em pH superior ao último, a lectina apresentou atividade residual até pH 11.

Não foram encontrados registros na literatura de lectinas de esponjas marinhas com atividade hemaglutinante a pH 2, como apresentado por ACL-I e ACL-II. A lectina de *Cliona varians* possui atividade na faixa de pH 2,5 a 10,5 com um pH ótimo em 7,5 (Moura *et al.*, 2006). Por outro lado, a lectina de *Haliclona cratera* manteve sua atividade inalterada do pH 4,6 a 10,2, mas apresentou perda total da mesma em pH 3,7 (Pajic *et al.*, 2002). A lectina de *Craniella australiensis* possui um pH ótimo de atividade hemaglutinante na faixa de 5 a 8 com perda total em pH 3

(Xiong *et al.*, 2006). Além disso, as lectinas HOL-I e HOL-II de *Halichondria okadai* mantiveram sua estabilidade lectínica do pH 3,5 ao 10,5 (Kawagishi *et al.*, 1994).

Cátions divalentes, como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$ , são responsáveis por estabilizarem a ligação de lectinas ao domínio de reconhecimento de carboidratos e também por fixarem as posições dos aminoácidos que interagem com o carboidrato ligante (Weis; Drickamer, 1996). As lectinas vegetais, em sua maioria, são dependentes de cátions divalentes para a sua atividade lectínica. Algumas lectinas provenientes de esponjas marinhas também são dependentes de cátions, como as lectinas de *Aplysina lawnosa* e de *Aplysina archeri* (Miarons; Fresno, 2000), a de *Cliona varians* (Moura *et al.*, 2006) e as duas lectinas de *Anthosigmella varians* (Atta; Cunha; Peixinho, 1992), cujas atividades hemaglutinantes são completamente inibidas na presença de EDTA e recuperadas pela adição de  $\text{Ca}^{+2}$  ou  $\text{Mg}^{+2}$ . Além disso, a lectina da esponja *Aphrocallistes vastus* é uma lectina tipo C, sendo dependente de cálcio para sua atividade hemaglutinante (Gundacker *et al.*, 2001). A lectina II de *Dysidea herbacea* perde totalmente sua atividade na presença de EDTA 5 mM (Kamiya *et al.*, 1985).

As lectinas ACL-I e ACL-II, isoladas neste trabalho, não dependem de cátions divalentes para a sua atividade hemaglutinante. Da mesma forma, a maioria das lectinas de esponjas marinhas até hoje isoladas independem de cátions divalentes para suas atividades, como as lectinas de *Haliclona cratera* (Pajic *et al.*, 2002), de *Geodia cydonium* (Hanisch *et al.*, 1984), de *Cinachyrella alloclada* (Atta *et al.*, 1989), de *Craniella australiensis* (Xiong *et al.*, 2006), de *Crambe crambe* (Dogovic *et al.*, 1996), a lectina I de *Dysidea herbacea* (Kamiya *et al.*, 1985), as duas lectinas de *Halichondria okadai* (Kawagishi *et al.*, 1994), as lectinas de *Aptos papillata* (Bretting *et al.*, 1976) e a lectina de *Phyllospongia foliascens* (Kamiya *et al.*, 1986).

ACL-I diminuiu em 50 % a atividade hemaglutinante pelo tratamento com uréia 4 M e DTT ou  $\beta$ -mercaptoetanol nas concentrações de 2,5 e 5,0 mM por 2 horas a 4 °C (tabela 2.4). A lectina I de *Geodia cydonium* não foi desnaturada por uréia 2 M a 24 °C (Müller *et al.*, 1983). Uma forte estabilidade frente a agentes desnaturantes foi apresentada pela lectina de sementes de *Erythrina indica*, a qual incubada com uréia 8 M à temperatura ambiente por 24 horas não perdeu sua atividade hemaglutinante. Contudo, a elevação da temperatura a 45 °C, em pH 7,2,

na presença de uréia 8 M levou à completa desnaturação protéica da mesma (Ghosh; Mandal, 2006).

As proteínas apresentam um máximo de absorção no UV próximo a 280 nm, comprimento de onda onde os grupamentos cromóforos das cadeias laterais dos aminoácidos aromáticos absorvem com mais intensidade. ACL-I apresentou um pico de absorção a 278 nm, assim como a lectina I de *Geodia cydonium* (Müller *et al.*, 1983). Contudo, a lectina de *Pellina semitubulosa* tem um UV máximo a 277 nm (Engel *et al.*, 1992). Por outro lado, o coeficiente de extinção molar é característico de cada lectina. ACL-I apresentou um coeficiente de extinção molar a 1 % de  $8,671 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$  a 280 nm, bem superior ao da lectina I de *Geodia cydonium*, determinado a 1 % como sendo  $14,5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$  a 278 nm (Müller *et al.*, 1983). Por sua vez, o da lectina de *Pellina semitubulosa* foi determinado como sendo de  $1,327 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$  a 277 nm (Engel *et al.*, 1992). São poucas as lectinas isoladas de esponjas marinhas que tiveram seu coeficiente de extinção determinado.

ACL-I apresentou um pI de 6,3, determinado por IEF, muito próximo ao da lectina de *Pellina semitubulosa*, de 6,1 (Engel *et al.*, 1992). O pI das lectinas de esponjas marinhas encontra-se predominantemente na faixa ácida, como se pode verificar nas lectinas de *Aplysina archeri* (4,1) (Miarons; Fresno, 2000), de *Aplysina lawnosa* (4,5) (Miarons; Fresno, 2000) e nas duas de *Halichondria okadai* (em torno de 4,5) (Kawagishi *et al.*, 1994). Na esponja *Axinella polypoides*, a lectina I apresentou um pI de 4,04 (Buck *et al.*, 1992) e a lectina II um pI de 3,9 (Buck *et al.*, 1998). Além disso, as lectinas I e II de *Geodia cydonium* possuem pI de 5,6 em condições nativas (Hanisch *et al.*, 1984). Uma característica rara foi encontrada na lectina de *Haliclona cratera*, com um pI de 8,6, decorrente de seu elevado conteúdo de aminoácidos básicos, pouco comum em lectinas de esponjas marinhas (Pajic *et al.*, 2002).

ACL-I foi resistente à ação proteolítica da tripsina e da quimotripsina. Talvez o possível arranjo hexamérico da molécula confira uma maior resistência à lectina, como ocorre com a jacalina, de estrutura tetramérica, na presença de pepsina, quimiotripsina e tripsina (Rios *et al.*, 1996). Ramos e colaboradores (1999) afirmaram que a baixa digestibilidade de proteínas está relacionada à sua estrutura tridimensional altamente compactada, estabilizada por numerosas interações

hidrofóbicas e por pontes de hidrogênio, o que é compatível com a proteína em estudo, formada por seis subunidades monoméricas.

Por outro lado, lectinas diméricas (*Canavalia ensiformes*, *Canavalia brasiliensis*, *Canavalia floribunda*, *Dioclea virgata* e *Dioclea guianensis*) testadas por Rios e colaboradores (1996) tiveram um grau de digestibilidade que variou de 52 a 84 % frente à tripsina, quimotripsina e pepsina. A lectina de *Hevea brasiliensis*, por sua vez, teve sua atividade hemaglutinante totalmente eliminada após incubação com tripsina (Wititsuwannakul; Wititsuwannakul; Sakulborirug, 1998). Não foi possível testar a ação da pepsina sobre ACL-I em vista da perda da atividade hemaglutinante por efeito do pH 1 do meio de incubação.

Há uma grande variação quanto à natureza glicoprotéica de lectinas de esponjas marinhas. ACL-I apresentou alto conteúdo de carboidratos (19,02 %), muito próximo ao obtido para a lectina de *Chondrilla nucula*, representando 12,5 % da massa molecular da proteína (Schröder *et al.*, 1990), mas abaixo da lectina de *Aphrocallistes vastus* (Gundacker *et al.*, 2001), com 29,41 % em carboidratos, e da lectina de *Craniella australiensis* (Xiong *et al.*, 2006), que contém 27,6 % de carboidratos neutros. Inúmeras outras lectinas de esponjas marinhas também são glicoproteínas, como a lectina de *Phyllospongia foliascens* (4,7 %) (Kamiya *et al.*, 1986), de *Crambe crambe* (2,1 %) (Dogovic *et al.*, 1996), de *Haliclona cratera* (3,7 %) (Pajic *et al.*, 2002), de *Aplysina archeri* (3,5 %) (Miarons; Fresno, 2000), de *Aplysina lawnosa* (5,0 %) (Miarons; Fresno, 2000), de *Geodia cydonium* (9,92 %) (Müller *et al.*, 1983) e de *Pellina semitubulosa* (3,4 %) (Engel *et al.*, 1992). Poucas lectinas de esponjas marinhas não são glicoproteínas, como as lectinas I e II de *Axinella polypoides*, indicando uma variação significativa na composição química das lectinas dentro do gênero *Axinella* (Buck *et al.*, 1992; Buck *et al.*, 1998). As lectinas de I, II e III de *Aptos papillata* (Bretting *et al.*, 1976) e a lectina I de *Dysidea herbacea* (Kamiya *et al.*, 1985) também não são glicoproteínas.

O alto conteúdo em glicina encontrado na análise dos aminoácidos de ACL-I, além de ácido aspártico/asparagina, ácido glutâmico/glutamina e de alanina, está de acordo com o perfil da composição de aminoácidos das lectinas de esponjas marinhas, com predomínio em aminoácidos ácidos, além dos hidrofóbicos. As lectinas I e II de *Axinella polypoides* possuem alto conteúdo em aminoácidos ácidos

(ácido glutâmico e aspártico) e leucina, um aminoácido hidrofóbico. Ainda, a lectina I de *Axinella polypoides* não apresenta histidina, mostrando haver alguma semelhança na composição dos aminoácidos do gênero *Axinella*, pois em ACL-I há somente 0,15 mólis % deste aminoácido. Além disso, a lectina II de *Axinella polypoides* possui apenas 0,49 mólis % de histidina (Bretting; Kabat, 1976). O conteúdo em alanina de ACL-I também se aproxima ao da lectina II de *Axinella polypoides*. Os teores de cisteína e de metionina de ACL-I são, da mesma forma, equivalentes aos das lectinas I e II de *Axinella polypoides*. Por outro lado, a presença de cisteína na composição de aminoácidos de ACL-I está de acordo com os dados obtidos neste trabalho por SDS-PAGE em condições redutoras, indicando a presença de pontes de dissulfeto na ligação das subunidades, na estrutura quaternária da proteína.

A composição de aminoácidos da lectina I de *Geodia cydonium* mostra também um predomínio em aminoácidos ácidos (aspartato, glutamato) e hidrofóbicos (valina e leucina), além de treonina (Müller *et al.*, 1983). ACL-I possui 6,58 mólis % em leucina, mas apenas 1,46 mólis % em valina e 3,95 mólis % em treonina. Por outro lado, a lectina de *Craniella australiensis* é rica em treonina e também em ácido glutâmico/glutamina (Xiong *et al.*, 2006), mas pobre em glicina, ao contrário de ACL-I, onde é o aminoácido predominante. Os principais aminoácidos nas lectinas de *Halichondria okadai* foram ácidos (aspartato e glutamato) e hidrofóbicos (glicina e alanina) (Kawagishi *et al.*, 1994), semelhante a ACL-I.

Um resultado interessante foi descrito para a lectina de *Pellina semitubulosa* com um elevado conteúdo em aminoácidos hidrofóbicos (alanina, glicina e leucina) (Engel *et al.*, 1992). O teor em glicina encontrado foi de 20,8 mólis % que se aproxima do conteúdo deste aminoácido presente em ACL-I, no valor de 28,94 mólis %. Por outro lado, as lectinas II e III de *Aptos papillata* apresentam dominância de aminoácidos ácidos (aspártico e glutâmico) e hidrofóbicos (alanina), enquanto que a lectina I possui principalmente glicina, glutamato e aspartato, como a ACL-I. Contudo, as lectinas II e III de *Aptos papillata* apresentam um alto teor de cisteína (7,87 % e 6,50 mólis %, respectivamente), muito superior se comparado com os das demais lectinas de esponjas marinhas (Bretting *et al.*, 1976). Na lectina de *Haliclona cratera* há predomínio de aminoácidos básicos (lisina, arginina), além dos

característicos hidrofóbicos (glicina e fenilalanina), correspondendo a 44 % do total, o que é incomum em lectinas de esponjas marinhas (Pajic *et al.*, 2002).

A ausência de metionina foi descrita para as lectinas isoladas de *Crambe crambe* (Dogovic *et al.*, 1996) e de *Dysidea herbacea* (Kamiya *et al.*, 1985), enquanto que em ACL-I o seu teor foi um dos mais baixos, correspondente a 0,88 mólis %. O aminoácido menos presente em ACL-I foi isoleucina (junto com histidina), ao contrário da lectina de *Dysidea herbacea*, onde é o quarto aminoácido mais abundante (Kamiya *et al.*, 1985). O baixo conteúdo de triptofano em ACL-I é semelhante ao encontrado na maioria das lectinas de esponjas marinhas, exceção feita à lectina de *Haliclona cratera*, na qual é da ordem de 5,44 mólis % (Pajic *et al.*, 2002).

Não foi realizada a análise da composição de aminoácidos constituintes da ACL-II. Ao se comparar as características físico-químicas e a composição dos aminoácidos de ACL-I com as lectinas de esponjas marinhas estudadas até o momento, verifica-se a grande diversidade entre as mesmas, inclusive entre as presentes numa mesma espécie, dificultando o uso destas lectinas para fins de estudos filogenéticos.



## **Capítulo III**

### **Propriedades biológicas das lectinas ACL-I e ACL-II**

#### **Introdução**

A atividade biológica das lectinas está baseada na sua capacidade de se ligar a carboidratos (Carvalho, 1990). Nas plantas são úteis na defesa contra fitopatógenos, mediadores de simbiose (interação entre plantas e microrganismos), na manutenção da dormência das sementes, proteção contra predadores, transporte de carboidratos, estocagem de proteínas e carboidratos, estimulação mitogênica de células embriônicas, alongação da parede celular, reconhecimento de pólen, função no crescimento e desenvolvimento da planta controlado hormonalmente. Algumas atividades biológicas das lectinas provenientes de plantas já foram constatadas, como aglutinação de células, ação mitogênica em linfócitos, estimulação de leucócitos humanos a produzir gama-interferon e outras interleucinas, atividade antibacteriana, ação citotóxica, ação antioxidante, atividade inseticida, adesão celular, ação inflamatória, atividade cicatrizante, inibição do crescimento de fungos e outras (Chrispeels; Raikhel, 1991; Zatta; Cummings, 1992; Mody; Joshi; Chaney, 1995; Peumans; Damme, 1995; Calvete *et al.*, 1998; Ponchel; Irache, 1998; Singh; Tiwary; Kennedy, 1999; Varki *et al.*, 1999; Dias-Baruffi *et al.*, 2000; Ratanapo; Ngamjunyaporn; Chulavatnatol, 2001; Arbós *et al.*, 2002; Loris, 2002; FAPESP/USP, 2003).

Nos microrganismos, as lectinas cumprem função, por exemplo, na ligação a células hospedeiras (muitas enterobactérias causam infecções no trato urinário e gastrointestinal devido à presença de lectinas em seu *pili*), mas, por outro lado, suas

lectinas de membrana podem ser reconhecidas por células fagocíticas (Singh; Tiwary; Kennedy, 1999).

Nos vertebrados possuem diversas funções biológicas, como aglutinação de células, marcadores celulares, estimulação mitogênica de linfócitos B e T humanos, coagulação sanguínea (lectinas endógenas são associadas a plaquetas e a fatores de coagulação), pinocitose e fagocitose (lectina de macrófago auxilia na fagocitose de microrganismos e protozoários, como *Leishmania donovani* e *Trypanosoma cruzi*), migração de neutrófilos e plaquetas, interações intercelulares durante fertilização e desenvolvimento dos embriões, proteção contra infecções (lectinas solúveis), reconhecimento e adesão celular (célula/linfócito, célula/hepatócito, célula/macrófago), diferenciação celular e formação de órgãos, na recirculação de linfócitos da corrente sanguínea para órgãos linfóides via ligação específica ao endotélio de vênulas pós-capilares e no transporte, separação, degradação e translocação de glicoproteínas (Micucci; Camps, 1987; Zatta; Cummings, 1992; Ponchel; Irache, 1998; Singh; Tiwary; Kennedy, 1999; Kilpatrick, 2000; Arbós *et al.*, 2002; Devarajan; Sonavane, 2003).

A descoberta que a fitohemaglutinina (PHA) tinha a capacidade de estimular linfócitos T, desencadeando a sua mitose, foi um marco no ramo da imunologia, pois até então se acreditava que os linfócitos não eram capazes de se dividirem. Mais tarde descobriu-se que a ConA também tinha esta propriedade e que poderia ser inibida a baixas concentrações de manose. Desta maneira provou-se que a estimulação mitogênica de linfócitos é o resultado da ligação das lectinas aos carboidratos de superfície dos mesmos, sendo uma das primeiras demonstrações da função biológica dos carboidratos das membranas celulares. As lectinas mitogênicas passaram a ser ferramentas para o estudo da transmissão de sinal nas células e para a análise de eventos bioquímicos que ocorrem durante a estimulação de linfócitos *in vitro*, levando à descoberta das interleucinas na década de 1970 (Nowell, 1960; Carvalho, 1990; Sharon; Lis, 2004).

A importância da estimulação de linfócitos por lectinas deve ser salientada no que concerne ao estabelecimento de relações entre diversas doenças congênitas e malformações cromossômicas, além de desenvolvimentos dentro da citogenética e

no estudo da produção de imunoglobulinas, interleucinas e  $\gamma$ -interferon, bem como, no diagnóstico de imunodeficiências (Carvalho, 1990).

A demonstração que lectinas hepáticas podem mediar a eliminação de bactérias do sangue sem a participação de anticorpos e do sistema complemento foi a primeira indicação da sua participação na imunidade inata (defesa não imune). Da mesma forma, lectinas presentes na superfície bacteriana propiciam sua ligação a células fagocíticas, com fagocitose das mesmas sem a participação de opsoninas. Este processo também faz parte da imunidade inata e denomina-se de lectinofagocitose (Sharon; Lis, 2004).

Lectina ligadora de manose do soro de mamíferos e do fígado ligam-se a oligomanosídeos de microrganismos, causando a ativação do sistema complemento, sem a participação de anticorpos, e a lise do patógeno, sendo outro exemplo de imunidade inata (Sharon; Lis, 2004; Sol *et al.*, 2006).

A descoberta das selectinas demonstrou que elas exercem um papel crucial no retorno (*homing*) de linfócitos a órgãos linfóides e no transporte de leucócitos (neutrófilos e monócitos) para os sítios de inflamação por meio de interação lectina-carboidrato. E-selectina e P-selectina são as lectinas presentes na membrana celular do endotélio vascular e que funcionam como receptores de adesão celular. Elas mediam a ligação de leucócitos às células endoteliais, culminando com a diapedese através da participação de outras moléculas de adesão, como as integrinas, e da secreção de citocinas e outras substâncias quimioatraentes. A prevenção de reações inflamatórias adversas por inibição da interação endotélio-leucócito, como uma terapia antiadesão, é o maior objetivo atual da indústria farmacêutica. Há indícios que as selectinas possam funcionar como disseminadoras de células cancerosas do tumor principal para outros sítios no organismo e que o bloqueio de sua ligação ao sítio de carboidrato poderia impedir a formação de metástase (Bruehl; Springer; Bainton, 1996; Sharon; Lis, 2004; Damme *et al.*, 2004; Sol *et al.*, 2006). Várias lectinas vegetais e animais mimetizam a ação biológica das selectinas, por induzirem a migração de neutrófilos *in vivo* e *in vitro*.

Inúmeras lectinas orientam transporte intracelular de glicoproteínas. Por exemplo, a calnexina, lectina de membrana do retículo endoplasmático, assegura a

flexibilidade da glicoproteína destinada à superfície celular. Lectinas P estão envolvidas no transporte de hidrolases recém sintetizadas do retículo endoplasmático rugoso aos lisossomas. As galectinas agem como moduladores de interações substrato-célula e célula-célula e são essenciais para a diferenciação e crescimento celular de todos os animais multicelulares. Elas são capazes de induzir proliferação celular, captura de células, apoptose, captura de restos celulares, morfogênese de órgãos, metástases, transporte de leucócitos, transporte de urato, resposta imune, *splicing* do RNA, inflamação; reconhecimento e organização da matriz extracelular (Hirabayashi, 1997; Kilpatrick, 2002; Sharon; Lis, 2004; Damme *et al.*, 2004). Lectinas tipo C, ficolinas e *siglecs* também exercem funções importantes na seqüência de eventos que conduzem ao reconhecimento de patógenos, endocitose, ativação do complemento, seleção, maturação e ativação de clones de células B e T e apoptose. As lectinas tipo C e *siglecs* ainda participam no controle do crescimento celular (Gabius *et al.*, 2002; Vasta; Ahmed; Odom, 2004).

Algumas lectinas são, por outro lado, extremamente tóxicas às células animais, como a ricina (isolada de *Ricinus communis*), a abrina (isolada de *Abrus pectorius*) e as lectinas de *Viscum album*. Esta última contém três lectinas, sendo a lectina I (denominada de viscumina) constituída por duas subunidades. A subunidade B liga-se aos carboidratos da membrana celular. Dessa maneira, a outra subunidade atinge o citosol por endocitose e, como apresenta atividade enzimática (adenosina-*N*-glicosidase), é capaz de inativar cataliticamente a subunidade 60S dos ribossomos, bloqueando completamente a síntese protéica, por eliminação de uma adenosina do RNA ribossômico tipo 28S, da mesma forma como atuam a abrina e a ricina (Olsnes; Heiberg; Pihl, 1973; Endo *et al.*, 1987; Bantel *et al.*, 1999; Varki *et al.*, 1999).

Tal propriedade das lectinas tem sido usada como estratégia para tratamento de diversos tumores malignos e benignos na Europa há vários anos por meio de extratos aquosos de *Viscum album* (Hajto; Hostanska; Gabius, 1989; Hajto *et al.*, 1990; Heiny; Albrecht; Beuth, 1998; Steuer-Vogt *et al.*, 2001; Kienle *et al.*, 2003; Schumacher *et al.*, 2003). Inúmeros estudos demonstraram que ambas lectinas de *Viscum album* apresentam citotoxicidade para linhagens de melanoma (Thies *et al.*, 2005), cólon (Valentiner *et al.*, 2002) e de mama humanas (Schumacher *et al.*, 1995b), além de induzir à apoptose células leucêmicas de linfócitos humanos e de

camundongos (Janssen; Scheffler; Kabelitz, 1993). Por outro lado, num tratamento de células leucêmicas humanas apenas com a lectina I de *Viscum album* ficou comprovado que a citotoxicidade ocorreu por ativação de proteases associadas à apoptose (Bantel *et al.*, 1999).

Igualmente, outras lectinas têm apresentado citotoxicidade. A PHA prejudica a síntese de RNA em células epitelóides cervicais humanas (HeLa) (Caso, 1968), a ConA induz apoptose de fibroblastos humanos (Kulkarni *et al.*, 1998) e a lectina de *Phoradendron californicum* inativa cataliticamente a subunidade 60S do ribossomo, inibindo a síntese protéica em reticulócitos de coelho (Endo *et al.*, 1989).

Em invertebrados acredita-se que as lectinas participem nos processos biológicos que são comuns aos mamíferos, tais como interação célula-célula ou interação célula-matriz extracelular, transporte e síntese de glicoproteínas, *folding* (dobramento) de proteínas, transdução de sinal, fertilização e desenvolvimento (Vasta; Ahmed; Odom, 2004). Outras funções atribuídas às lectinas seriam a de transportadoras de glicídios e de serem substâncias importantes para o crescimento do organismo e nutrição pela captura de nutrientes, etc (Bretting; Königsmann, 1979; Micucci; Camps, 1987; Buck *et al.*, 1992; Kilpatrick, 2000).

O sistema de defesa dos invertebrados inclui coagulação da hemolinfa, encapsulamento, citólise, aglutinação celular, ação antimicrobiana e fagocitose (Iwanaga; Kawabata; Muta, 1998).

A imunidade contra agentes infecciosos nos animais é mediada por dois sistemas, o inato e o adaptativo. Imunidade adaptativa é encontrada, principalmente, em vertebrados, representada pelos linfócitos B e T. A imunidade inata é filogeneticamente mais antiga que a adquirida e está amplamente presente em todos os organismos multicelulares, sejam vertebrados ou invertebrados. Tal imunidade emprega proteínas ligadas à membrana ou solúveis para reconhecer substâncias estranhas. Estas proteínas pré-existem ou são rapidamente produzidas em poucas horas após a infecção (Kawabata; Iwanaga, 1999; Müller; Blumbach; Müller, 1999).

A imunidade inata é designada para reconhecer características químicas comuns presentes em diferentes patógenos e que são essenciais para a sobrevivência destes, denominadas de PAMPs (*pathogen-associated molecular*

*patterns*). O reconhecimento de PAMPs no sistema imune inato é mediado por um grupo de proteínas denominado de PRPs (*pattern recognition proteins*) ou PRRs (*pattern recognition receptors*) que, portanto, se ligam aos padrões altamente conservados na superfície do invasor. Há seis subgrupos de PRPs em invertebrados e as lectinas são um destes. Elas reconhecem e se ligam a carboidratos terminais em glicopeptídeos, glicoproteínas e glicolipídios, eliminando o invasor (Yu; Kanost, 2003; Wang *et al.*, 2007). Os PAMPs também exercem uma função chave na iniciação da imunidade adaptativa em vertebrados. As lectinas são PAMPs conservadas de invertebrados para vertebrados (Yu; Kanost, 2003).

Em caranguejos (*Tachypleus tridentatus*) um dos maiores sistemas de defesa é conduzido pela hemolinfa que contém ao menos dois tipos de hemócitos, granulares e não granulares, sendo que hemócitos granulares compreendem 99 % do total de hemócitos. Os hemócitos granulares são preenchidos com duas populações de grânulos secretórios, os amplos (L) e os pequenos (S). Estas células são altamente sensíveis a lipopolissacarídeos, liberando rapidamente o conteúdo de seus grânulos por exocitose. O invasor é envolvido por um gel e aglutinado por várias lectinas solúveis (liberadas dos grânulos L), com o objetivo de imobilizar o patógeno, que é eliminado a seguir por proteínas antimicrobianas, polipeptídeos e peptídeos. Dessa forma, as lectinas estão envolvidas no sistema imune inato (Iwanaga; Kawabata; Muta, 1998).

Em esponjas marinhas algumas funções das lectinas já foram comprovadas, como sendo componentes do sistema imune participando de mecanismos de defesa contra bactérias e parasitas, bem como, atuantes na agregação celular e na síntese de fibras de espongina (Bretting *et al.*, 1983; Wagner-Hülsmann *et al.*, 1996; Gundacker *et al.*, 2001; Schröder *et al.*, 2003; Harwood; Coates, 2004). Especula-se que as lectinas ainda possam participar de sistemas de transporte, auxiliar nos mecanismos de simbiose nos tecidos da esponja ou contribuir na eliminação de substâncias exógenas e de algas dos tecidos da mesma (Bretting; Königsmann, 1979; Pajic *et al.*, 2002).

As esponjas são expostas a grandes quantidades de bactérias e vírus presentes no ambiente marinho, desenvolvendo várias estratégias para enfrentar estas ameaças. Elas possuem um eficiente sistema de defesa químico para inibir a

infestação por microrganismos pela produção de uma variedade de compostos altamente ativos e com ótima especificidade, adaptados pelas esponjas durante os últimos 1 bilhão de anos. Apresentam um eficiente mecanismo de defesa celular (principalmente relacionado aos arqueócitos) e humoral (lectinas, citocinas e compostos bioativos) que compartilham, ao nível de seqüência, alta similaridade com as moléculas imunes encontradas nos humanos. Dados moleculares mostram que receptores presentes na superfície celular poderiam discriminar entre antígenos próprios e estranhos, como os receptores SRCR (receptor *scavenger* com domínio rico em cisteína), participando do sistema imune inato das esponjas. Em animais, muitos dos receptores solúveis e de superfície celular envolvidos no sistema imune contêm um domínio SRCR (Blumbach *et al.*, 1998; Müller; Blumbach; Müller, 1999; Schröder *et al.*, 2003; Harwood; Coates, 2004).

O sistema imune das esponjas é complexo, variando de metabólitos secundários altamente ativos até citocinas (dados moleculares na esponja *Suberites domuncula* comprovam que as esponjas também produzem moléculas como citocinas relacionadas às produzidas por macrófagos e linfócitos de vertebrados), receptores de membrana (relacionados ao sistema imune inato e adaptativo) e lectinas (lectinas tipo C e outras lectinas independentes de cálcio). As esponjas expressam lectinas que auxiliam no desenvolvimento de um sistema imune nestes organismos. Por exemplo, em estudos moleculares realizados, verificou-se significativa similaridade entre as lectinas solúveis de *Tachypleus tridentatus* e a lectina de *Suberites domuncula*, denominada lectina *Suberites*, provavelmente uma lectina associada à membrana, sugerindo um mecanismo de defesa contra bactérias. Mesmo a uma baixa concentração, a lectina apresentou uma significativa atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*. A uma concentração de 10 µg/mL, a lectina inibiu em 16 % o crescimento da bactéria, enquanto que a 300 µg/mL inibiu 81 %. Em contrapartida, a atividade contra *Staphylococcus aureus* foi baixa, pois a 300 µg/mL inibiu o crescimento bacteriano em apenas 15 %. Os candidatos mais prováveis em esponjas para agir como células imune são os arqueócitos e os coanócitos (Müller, 2001; Schröder *et al.*, 2003; Harwood; Coates, 2004).

Várias atividades biológicas já foram descritas para lectinas de esponjas marinhas, como ação mitogênica (Phillips, Bretting, Kabat, 1976; Bretting *et al.*,

1981b; Atta *et al.*, 1989; Schröder *et al.*, 1990; Engel *et al.*, 1992; Dogovic *et al.*, 1996; Xiong *et al.*, 2006), quimiotática (Queiroz *et al.*, 2008), citotóxica (Pajic *et al.*, 2002), efeito antibacteriano contra bactérias gram negativas (Schröder *et al.*, 2003) e gram positivas (Moura *et al.*, 2006), efeito antiprotozoário contra *Leishmania chagasi* (Moura *et al.*, 2006) e aumento no tempo de liberação das primeiras partículas do vírus HIV-1 por células infectadas (Schröder *et al.*, 1990).

O objetivo deste capítulo foi verificar a especificidade das lectinas ACL-I e ACL-II da esponja marinha *Axinella corrugata* para diferentes carboidratos e células sangüíneas, além de avaliar as atividades quimiotática, citotóxica, antioxidante e mitogênica da lectina ACL-I.

## **III.1 Materiais e Métodos**

### **III.1.1 Matéria-prima:**

As lectinas ACL-I e ACL-II isoladas de *Axinella corrugata*, conforme descrito no capítulo II, foram o material de estudo neste capítulo.

### **III.1.2 Animais:**

Os coelhos, com fins de obtenção de eritrócitos, foram os da raça Nova Zelândia. Os animais foram mantidos junto ao Biotério da Faculdade de Farmácia da UFRGS ao longo da realização deste trabalho, à temperatura em torno de 25 °C e com ciclo de luz de 12 h.

Para a indução de processo inflamatório em ratos foram utilizados ratos Wistar machos, pesando cerca de 150 g, provenientes do Biotério Central da UFRGS.

### **III.1.3 Eritrócitos:**

As amostras de sangue de coelho foram coletadas conforme descrito anteriormente no capítulo II. As amostras de sangue humano foram obtidas junto ao Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFRGS, de acordo com legislação vigente (Brasil, 2004a), com testes negativos prévios para aids, sífilis, doença de Chagas, vírus HTLV I e II, hepatites B e C (Brasil, 2006). As amostras de sangue de rato foram oriundas do Biotério da Faculdade de Farmácia/UFRGS. Sangue de camundongos (raça CF1) foi obtido a partir do sacrifício dos animais por deslocamento cervical e posterior exsanguinamento, também oriundo do Biotério da Faculdade de Farmácia da UFRGS. As amostras de eritrócitos bovinos, eqüinos, caninos, ovinos e caprinos foram coletadas de animais sadios por veterinários na Faculdade de Veterinária da UFRGS. A desinfecção do material utilizado foi realizada conforme mencionado anteriormente no item II.1.3. Todo o trabalho

experimental foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS e cadastrado com o número 2003253.

#### **III.1.4 Obtenção das lectinas:**

As lectinas foram obtidas conforme o método de isolamento e de purificação descritos no capítulo II.

#### **III.1.5 Produtos, reagentes químicos e equipamentos:**

A seguir está relacionada a procedência das matérias-primas e equipamentos mais importantes para a realização desse trabalho:

Glicogênio, LPS (lipopolissacarídeo),  $\beta$ -caroteno, ácido linoléico, DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), *Ficoll*-Hipaque, RPMI 1640, GlcNAc e MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) - Sigma (St. Louis, MO, EUA).

PHA-M (forma mucoproteína de *Phaseolus vulgaris*) - Gibco (Grand Island, NY, EUA).

DMSO (dimetilsulfóxido) - Nuclear (Diadema, SP, Brasil).

Filtro de nitrato de celulose - Millipore (Bedford, MA, EUA).

Tris - USB (Cleveland, OH, EUA).

Dextrose - Baker (Phillipsburg, NJ, EUA).

Microcentrífuga *Eppendorf* Spin IE - Bioanalytical Systems (West Lafayette, EUA).

Centrífuga clínica modelo Excelsa 4 - Fanem (São Paulo, Brasil).

Leitora automática de microplacas Multiskan EX - Labsystem (Cracow, Polônia).

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

Todas as soluções foram preparadas com água destilada purificada no sistema Milli-Q Plus, Millipore (Bedford, MA, EUA).

## **III.2 Propriedades Biológicas**

### **III.2.1 Determinação da especificidade da hemaglutinação:**

Os testes de hemaglutinação para ACL-I e ACL-II foram realizados pelo método da dupla diluição serial em placas de microtitulação, como descrito anteriormente no capítulo II, item II.1.7. Foi empregada suspensão de eritrócitos nativos a 2 % (v/v) de humanos pertencentes aos grupos sanguíneos ABO e de distintas espécies animais (coelho, canina, ovina, caprina, bovina, eqüina, suína, camundongo, rato e galinha), processados segundo mencionado no capítulo II, item II.1.3.

### **III.2.2 Determinação dos inibidores da hemaglutinação:**

Para determinar a especificidade para carboidratos de ACL-I e ACL-II foi usado o teste de inibição da hemaglutinação. Diferentes soluções de carboidratos e de glicoproteínas foram diluídas serialmente em placas de microtitulação, adicionando-se às mesmas solução de ACL-I ou ACL-II (0,1 mg/mL). As placas foram incubadas à temperatura ambiente ( $20 \pm 1$  °C) durante 30 min. Depois deste período de tempo acrescentou-se aos incubados uma suspensão de eritrócitos nativos de coelho a 2 %. Após 2 horas de incubação as placas foram lidas a olho nu, considerando-se inibidor da atividade hemaglutinante, o carboidrato ou glicoproteína capaz de inibir completamente, com a menor concentração, a atividade lectínica.

### **III.2.3 Atividade quimiotóxica de ACL-I:**

A atividade quimiotóxica *in vitro* de ACL-I foi verificada através da técnica modificada de Boyden (1962) em câmaras de acrílico de 25 poços (15,5 x 15,5 cm) segundo descrito por Monks *et al.* (2002).

Para a obtenção da suspensão de neutrófilos foi injetado um volume de 20 mL de solução de glicogênio a 1 % na cavidade intraperitoneal de ratos Wistar machos, pesando cerca de 150 g. Após um período de 4 horas, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>, seguido de injeção na cavidade intraperitoneal de 10 mL de solução de Hanks.

Após, a cavidade intraperitoneal dos animais foi aberta e o líquido contendo as células retirado, lavando-se a cavidade com 20 mL de solução de Hanks. As soluções foram reunidas e centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min. O sedimento obtido foi ressuspensão com solução de Hanks, de modo a obter-se aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  células/mL, avaliadas em câmara de Neubauer.

Para a obtenção do fator quimiotático foi usado como controle positivo lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* dissolvido em plasma (130 µg/mL), ativado em banho de água a 37 °C por 30 min e por fim diluído com solução de Hanks a uma concentração final de 5 µg/mL.

As amostras de ACL-I foram igualmente dissolvidas em plasma, ativadas em banho de água a 37 °C por 30 min e diluídas com solução de Hanks, de acordo com o esquema do ensaio.

A atividade migratória dos leucócitos foi determinada em câmaras cilíndricas, construídas em acrílico transparente, constituídas de dois compartimentos (0,5 mL de capacidade cada) separados por um filtro de nitrato de celulose com 13 mm de diâmetro e poros de 8 µm de diâmetro. O compartimento inferior foi preenchido com a solução contendo o fator quimiotático, com a amostra lectínica ou com o controle negativo e o compartimento superior com a suspensão de neutrófilos peritoneais. Cada experimento foi realizado em duplicata. A câmara foi coberta com gaze umedecida e envolvida com plástico, sendo em seguida levada a estufa, a 37 °C, por uma hora. Imediatamente após incubação na estufa, os filtros foram removidos, fixados, corados, diafanizados e montados entre lâmina e lamínula. A leitura foi feita em microscopia óptica de campo claro conforme descrito por Zigmond e Hirsch (1973), usando-se magnificação de 40X com o foco no plano superior do filtro. No momento em que se encontrou o "tapete" de neutrófilos do plano superior, o plano de observação do microscópio foi aprofundado até a visualização de apenas duas

células. A distância medida em micrômetros entre o plano superior e inferior do filtro refere-se à migração dos neutrófilos, cujo resultado foi comparado estatisticamente com o controle positivo. Foram realizadas leituras de cinco campos por filtro, totalizando dez leituras por amostra, uma vez que cada amostra foi testada em duplicata. Os grupos teste foram comparados ao grupo controle positivo usando ANOVA (fator único), com um nível de significância de 95 % ( $p < 0,05$ ). O teste de Dunnett foi usado para identificar os grupos diferentes quando indicado pela ANOVA através do programa estatístico SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

#### **III.2.4 Atividade antioxidante de ACL-I:**

A atividade antioxidante de ACL-I foi determinada pelo método do  $\beta$ -caroteno (Hammerschmidt; Pratt, 1978) e pelo DPPH (Cavin *et al.*, 1998).

Pelo método do  $\beta$ -caroteno a amostra lectínica (50  $\mu$ g) foi aplicada em placas de sílica gel G60 F<sub>254</sub>. As placas foram secas e nebulizadas com solução de  $\beta$ -caroteno (60 mL de etanol, 2 gotas de ácido linoléico, 6 mg de  $\beta$ -caroteno e 30 mL de clorofórmio) e expostas à luz ambiente por 3 h.

O método do DPPH consiste na aplicação da amostra lectínica (50  $\mu$ g) em placas de sílica gel G60 F<sub>254</sub> e nebulização, após secagem da placa, com solução de DPPH (60 mg de DPPH em 30 mL de metanol).

#### **III.2.5 Atividade citotóxica de ACL-I:**

A atividade citotóxica de ACL-I foi determinada frente a microcrustáceos (*Artemia salina*), conforme Meyer *et al.* (1982). Um total de 5 mg de ovos de *Artemia salina* em um litro de água salina sintética foram incubados com aquecimento sob lâmpada fluorescente. O período de incubação foi de 36-48 h, quando ocorreu a eclosão dos ovos e o surgimento dos náuplios. A seguir, os náuplios foram incubados na presença da lectina.

As amostras de lectina foram usadas nas concentrações de 1, 5, 10 e 100 µg/mL, em triplicata. Como controle negativo foi utilizada solução de água salina sintética. Após 24 h de incubação foi realizada contagem do número de náuplios sobreviventes, determinando-se a CL<sub>50</sub> pelo método dos probitos através do teste de Finney (1971). Os valores foram expressos como média ± EPM. Além disso, foi empregado o teste estatístico de correlação com o objetivo de verificar se houve ou não citotoxicidade.

### **III.2.6 Atividade mitogênica de ACL-I:**

A atividade mitogênica da ACL-I foi determinada conforme Sladowski *et al.* (1993), em placa de poliestireno estéril de microcultura de células com 96 poços, marca TPP, com dimensões de 128X85X17 mm. A lectina foi incubada em diferentes concentrações, em meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino endógeno, com células mononucleares de sangue periférico humano (linfócitos e monócitos).

As células mononucleares foram coletadas por punção venosa, sobre EDTA 0,1 M e isoladas por centrifugação do sangue a 2300 rpm em centrífuga clínica durante 10 min em gradiente de *Ficoll*. A concentração de células foi ajustada de modo a se obter  $1,5 \times 10^5$  células em 200 µl de meio RPMI 1640, por poço. A placa foi incubada a 37 °C em atmosfera umidificada, contendo 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 72 h.

Quatro horas antes de completar o tempo de incubação foi adicionado, a cada microcultura, MTT a 0,5 % em PBS. Após o término do período de incubação, o sobrenadante foi aspirado e centrifugado em microcentrífuga *Eppendorf*, à temperatura ambiente (20 °C). O sobrenadante foi removido e substituído por DMSO para dissolver os cristais de formazan formados pela reação do MTT com as células. Imediatamente após este procedimento, os volumes foram transferidos novamente para a placa de microcultura de células e realizada leitura a 540 nm/620 nm em leitora automática de microplacas.

Como controle positivo foi usado PHA-M na concentração final de 1 % e como controle negativo apenas RPMI 1640 com células mononucleares.

Os grupos teste foram comparados ao grupo controle negativo usando ANOVA (fator único), com um nível de significância de 95 % ( $p < 0,05$ ). O teste de Dunnett foi empregado para identificar os grupos diferentes quando indicado pela ANOVA, através do programa estatístico SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM, refletindo a média da triplicata de absorvância para cada concentração lectínica utilizada.

### **III.2.7 Determinação da concentração de proteínas:**

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Lowry *et al.* (1951), segundo descrito no capítulo II, item II.1.6.

## Resultados

### Propriedades biológicas de ACL-I

#### Especificidade da hemaglutinação:

Conforme a figura 3.1, a lectina ACL-I não mostrou especificidade absoluta de aglutinação para os distintos eritrócitos testados. A lectina aglutinou com maior intensidade eritrócitos nativos de coelho, caprinos e caninos, além de aglutinar, com menor intensidade, eritrócitos ovinos, bovinos, de camundongo, rato e de humanos pertencentes aos grupos sanguíneos ABO. A lectina não aglutinou eritrócitos eqüinos, suínos e de galinha. A atividade hemaglutinante para eritrócitos de coelho foi considerada como a máxima atividade (100 %).

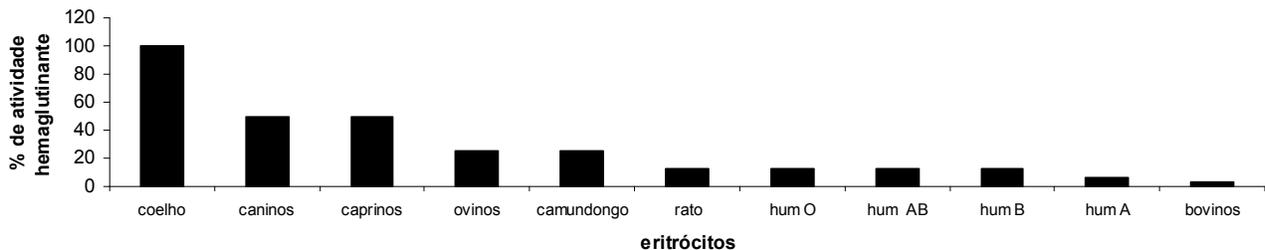


Figura 3.1: Especificidade de aglutinação de ACL-I para diferentes eritrócitos.

#### Inibidores da hemaglutinação:

Foram testados os seguintes carboidratos: 2-desoxi-D-ribose, L-arabinose, D-xilose, D-lixose, D-glicose, 2-desoxi-D-glicose, D-manose, D-frutose, D-glicose-1-fosfato, D-glicose-6-fosfato, ácido-D-glicurônico, ácido-D-galacturônico, L-sorbose, L-fucose, D-maltose, L-ramnose, D-celobiose, D-trealose,  $\alpha$ -D-melibiose, sacarose, L-galactose, D-galactose,  $\beta$ -D-lactose,  $\alpha$ -D-lactose, metil- $\alpha$ -(D)-manopiranosídeo, metil- $\alpha$ -(D)-galactopiranosídeo, D-galactosamina, D-glicosamina, N-acetil-D-manosamina, N-acetil-D-glicosamina, N-acetil-D-galactosamina, ácido siálico, N-

acetil-D-lactosamina, D-melezitose, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, rafinose, *N*, *N'*, *N''*-triacetilquitotriose, dextrano e quitina. As glicoproteínas testadas foram fetuína, asialofetuína e ovalbumina.

A tabela 3.1 mostra a menor concentração apenas dos carboidratos e glicoproteínas que foram capazes de inibir completamente a atividade hemaglutinante de ACL-I para eritrócitos de coelho a 2 %.

Tabela 3.1: Inibidores de ACL-I.

Inibidores	Concentração inibitória mínima
<i>N</i> , <i>N'</i> , <i>N''</i> -triacetilquitotriose	1,56 mM
<i>N</i> -acetil-D-glicosamina	37,5 mM
<i>N</i> -acetil-D-manosamina	37,5 mM
<i>N</i> -acetil-D-galactosamina	37,5 mM
<i>N</i> -acetil-D-lactosamina	> 100 mM

#### Atividade quimiotática:

ACL-I, em presença de plasma homólogo, apresentou atividade quimiotática sobre neutrófilos de ratos em relação ao LPS de *Escherichia coli*, nas concentrações de 12,8; 6,4; 3,2; 1,6 e 0,8  $\mu$ g/mL (figura 3.2). Apenas na concentração de 0,4  $\mu$ g/mL não foi quimiotática ( $p < 0,05$ ) quando comparada com a migração do LPS, mas induziu a migração de neutrófilos em comparação com a migração do controle negativo.

Os resultados indicaram que a atividade quimiotática não foi dependente da concentração nas concentrações de 0,8 a 12,8  $\mu$ g/mL, mas é, se considerarmos as concentrações de 0,4 e 0,8  $\mu$ g/mL em relação ao controle negativo. A migração de neutrófilos induzida pela lectina é inibida por GlcNAc.

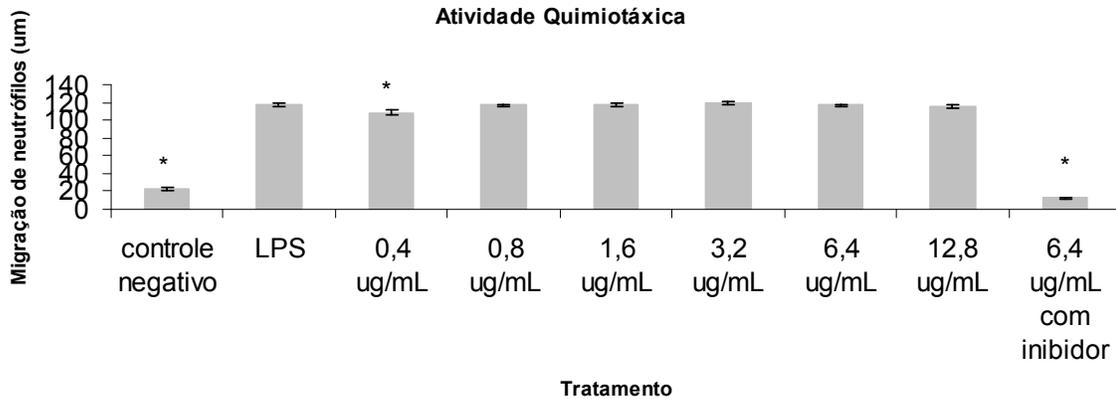


Figura 3.2: Efeito de ACL-I sobre a migração de neutrófilos de rato *in vitro*. Controle negativo: solução de plasma. Controle positivo: lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS). Inibidor: GlcNAc 0,2 M. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  indica diferença significativa em relação ao controle positivo (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

#### Atividade antioxidante:

Não foi constatada atividade antioxidante de ACL-I pelo ensaio do  $\beta$ -caroteno e do DPPH.

#### Atividade citotóxica:

Foi verificada atividade citotóxica de ACL-I para o microcrustáceo *Artemia salina*. A  $CL_{50}$  obtida foi de  $0,951 \pm 2,903 \mu\text{g/mL}$  pelo método dos probitos. A análise de correlação indicou que houve citotoxicidade, pois o  $r$  calculado foi superior ao tabelado:  $|r| > r_{0,05(8)} \Rightarrow 0,740 > 0,632$ .

#### Atividade mitogênica:

Os ensaios demonstraram atividade mitogênica de ACL-I frente a células mononucleares humanas (figura 3.3) nas concentrações de 32 e 50  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,05$ ), com um pico de mitogenicidade a 32  $\mu\text{g/mL}$ , correspondendo a 75 % da atividade da lectina de *Phaseolus vulgaris* (controle positivo), testada sob as mesmas condições experimentais.

## Mitogenicidade

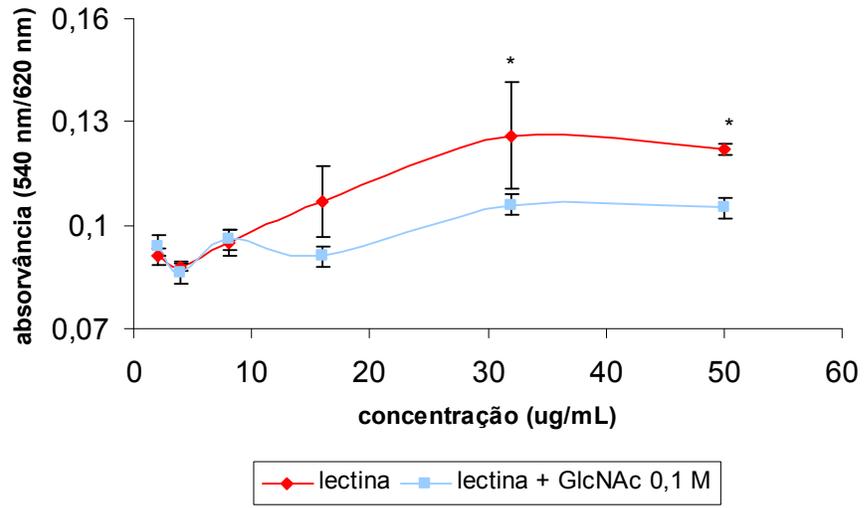


Figura 3.3: Atividade mitogênica de ACL-I para células mononucleares humanas. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  indica diferença significativa em relação ao controle negativo (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

## Propriedades biológicas de ACL-II

### Especificidade da hemaglutinação:

Segundo a figura 3.4, ACL-II aglutinou principalmente eritrócitos nativos de coelho e caninos e com menor intensidade eritrócitos de camundongo, rato e de humanos dos grupos ABO. A lectina não aglutinou eritrócitos eqüinos, suínos, caprinos, ovinos, bovinos e de galinha.

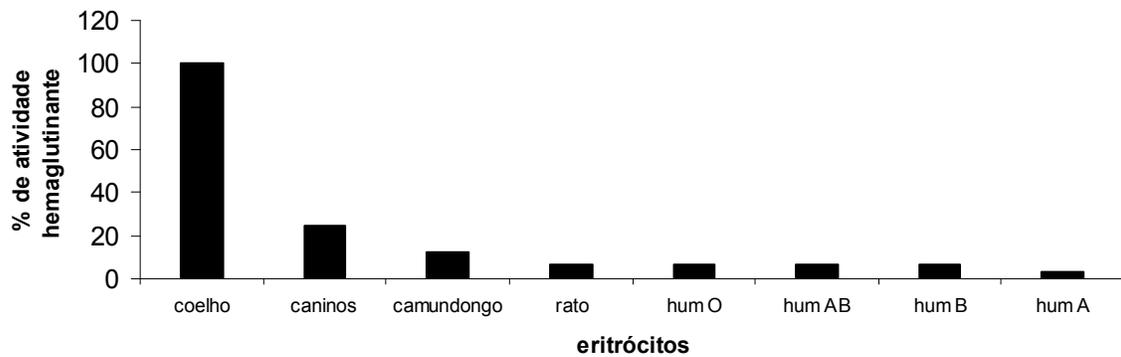


Figura 3.4: Especificidade de aglutinação de ACL-II para diferentes eritrócitos.

## Inibidores da hemaglutinação:

Os inibidores de ACL-II estão relacionados na tabela 3.2 abaixo.

Tabela 3.2: Inibidores de ACL-II.

Inibidores	Concentração inibitória mínima
<i>N, N', N''</i> -triacetilquitotriose	4,69 mM
<i>N</i> -acetil-D-glicosamina	37,5 mM
<i>N</i> -acetil-D-manosamina	37,5 mM
<i>N</i> -acetil-D-lactosamina	> 100 mM
D-galactose	150 mM
quitina	> 0,5 %
fetuína	> 0,5 %

Os resultados obtidos mostram que ambas as lectinas são inibidas por carboidratos contendo o grupo 2-*N*-acetil e que o melhor inibidor é *N, N', N''*-triacetilquitotriose. Além disso, diferente de ACL-I, ACL-II é também inibida por D-galactose, quitina e fetuína, mas não por GalNAc.

## Discussão

Há vários relatos na literatura de atividades biológicas de lectinas provenientes de esponjas marinhas. Lectinas foram primeiramente descritas em esponjas por Dodd, MacLennan e Hawkins (1968) em extratos de *Cliona celata* e de *Axinella* sp. Neste estudo, extratos de *Axinella* sp. aglutinaram eritrócitos de ganso.

A atividade hemaglutinante e a inibição da atividade por carboidratos e por glicoproteínas são as atividades biológicas mais descritas na literatura.

Os ensaios de inibição da atividade hemaglutinante mostraram que ambas as lectinas eram inibidas por GlcNAc, por seu epímero ManNAc (*N*-acetil-D-manosamina) com a mesma intensidade e fracamente por LacNAc (*N*-acetil-D-lactosamina). *N*, *N'*, *N''*-triacetilquitotriose foi o melhor inibidor, com intensidade aproximada de 24 vezes para ACL-I em comparação com GlcNAc e ManNAc. No entanto, a diferença marcante entre as duas lectinas é que ACL-II foi inibida também por galactose e quitina, forma polimérica de GlcNAc, mas não por GalNAc. ACL-I é a primeira lectina testada e inibida tanto por GlcNAc e GalNAc, como por ManNAc e LacNAc.

A galactose é o carboidrato inibidor mais freqüente das lectinas de esponjas marinhas, como a de *Axinella dissimilis* (Bretting *et al.*, 1981a), lectinas I e II de *Axinella polypoides* (Bretting; Kabat, 1976), *Aphrocallistes vastus* (Gundacker *et al.*, 2001), *Cinachyrella alloclada* (Atta *et al.*, 1989), *Cliona varians* (Moura *et al.*, 2006), *Desmapsama anchorata* (Atta *et al.*, 1990), lectina I de *Dysidea herbacea* (Kamiya *et al.*, 1985), *Halichondria panicea* (Kamiya; Muramoto; Goto, 1990), *Haliclona cratera* (Pajic *et al.*, 2002) e *Pellina semitubulosa* (Engel *et al.*, 1992).

A inibição de ACL-II por quitina pode relacioná-la a uma função de defesa da esponja, tendo em vista a quitina ser um polímero de GlcNAc, constituinte da parede celular de fungos. Por outro lado, a ACL-II teria 2 sítios distintos de ligação a carboidratos. Um deles para ManNAc, GlcNAc e seus derivados oligossacarídicos, como a quitina. Como ACL-II não é inibida por GalNAc, isso indica que a orientação da hidroxila num arranjo equatorial em C<sub>4</sub> é necessária para a atividade lectínica, ao

contrário do que ocorre para ACL-I. O segundo sítio seria para galactose e, ainda, para fetuína. Como a fetuína é uma glicoproteína contendo glicoconjugados complexos, contendo galactose, supõe-se que o CRD desse sítio apresente múltiplos pontos de interação com glicanos complexos. Em virtude da atividade hemaglutinante de ACL-II corresponder a somente 10 % do total da atividade de ACL-I, não foi possível aprofundar os estudos sobre a mesma.

ACL-I é inibida por carboidratos contendo o grupamento *N*-acetil. Em relação a isso há semelhanças no padrão de inibição de várias outras lectinas de esponjas marinhas. A lectina HOL-I de *Halichondria okadai* reconhece carboidratos contendo o grupo *N*-acetil (como GlcNAc, GalNAc e derivados de mono e oligossacarídeos destes), ao passo que a HOL-2 é inibida por LacNAc e seus análogos (Kawagishi *et al.*, 1994). Para estas lectinas, o grupo *N*-acetil seria necessário para o reconhecimento lectínico. Outra esponja com características semelhantes é a de *Aaptos papillata*. Esta esponja apresenta 3 lectinas. A lectina I é inibida por *N*, *N'*, *N''*, *N'''*-tetraacetilquitotetraose, *N*, *N'*, *N''*-triacetilquitotriose e GlcNAc. A lectina II reconhece *N*, *N'*, *N''*-triacetilquitotriose, *N*, *N'*, *N''*, *N'''*-tetraacetilquitotetraose, GlcNAc e GalNAc, ao passo que a lectina III é inibida por GlcNAc e GalNAc (Bretting *et al.*, 1976). Além disso, da mesma forma que a ACL-I, várias outras lectinas de esponjas reconhecem GalNAc, como a de *Cinachyrella alloclada* (Atta *et al.*, 1989), *Desmapsama anchorata* (Atta *et al.*, 1990), lectinas I e II de *Geodia cydonium* (Bretting *et al.*, 1981b) e de *Haliclona cratera* (Pajic *et al.*, 2002). Em relação a GlcNAc, a lectina isolada de *Suberites domuncula* também é inibida por este carboidrato (Schröder *et al.*, 2003).

No que se refere ao gênero *Axinella* somente a lectina de *Axinella dissimilis* é inibida também por GalNAc (Bretting *et al.*, 1981a), pois as lectinas de *Axinella polypoides* o são por galactose e derivados da mesma (Bretting; Kabat, 1976), o que nos leva concluir que há uma grande variação na especificidade de reconhecimento dos carboidratos pelas lectinas dentro do próprio gênero *Axinella*.

ACL-I aglutinou com maior intensidade eritrócitos de coelho, caprinos e caninos, ao passo que ACL-II aglutinou principalmente eritrócitos de coelho e caninos, de modo que nenhuma das duas lectinas apresentou especificidade eritrocitária absoluta. As lectinas do gênero *Axinella* apresentam relativa

semelhança. As lectinas das esponjas *Axinella dissimilis* e *Axinella corrugata* aglutinam eritrócitos humanos e de coelho e as lectinas I e II de *Axinella polypoides* aglutinam somente eritrócitos humanos. Cabe salientar ainda que a lectina de *Axinella dissimilis* aglutina eritrócitos de coelho e de humanos com a mesma intensidade, enquanto que ACL-I e ACL-II, purificadas neste trabalho, aglutinam eritrócitos de coelho com maior intensidade que eritrócitos humanos.

No geral, lectinas purificadas de esponjas marinhas aglutinam na sua grande maioria eritrócitos humanos, como as de *Aaptos papillata* (Bretting *et al.*, 1976), *Anthosigmella varians* (Atta; Cunha; Peixinho, 1992), *Cinachyrella alloclada* (Atta *et al.*, 1989), *Cliona varians* (Moura *et al.*, 2006), *Desmapsama anchorata* (Atta *et al.*, 1990), lectina I de *Dysidea herbacea* (Kamiya *et al.*, 1985), dentre outras.

As lectinas de *Chondrilla nucula* (Schröder *et al.*, 1990), *Craniella australiensis* (Xiong *et al.*, 2006), lectina I de *Dysidea herbacea* (Kamiya *et al.*, 1985), *Halichondria panicea* (Kamiya; Muramoto; Goto, 1990), *Phyllospongia foliascens* (Kamiya *et al.*, 1986) e a lectina de *Pellina semitubulosa* (Engel *et al.*, 1992) também aglutinam eritrócitos de coelho e de humanos. A lectina de *Craniella australiensis* (Xiong *et al.*, 2006) reconhece eritrócitos de camundongo, além de humanos. Ainda, as lectinas de *Crambe crambe* (Dogovic *et al.*, 1996), *Craniella australiensis* (Xiong *et al.*, 2006), *Halichondria panicea* (Kamiya; Muramoto; Goto, 1990), *Haliclona cratera* (Pajic *et al.*, 2002) e *Pellina semitubulosa* (Engel *et al.*, 1992) aglutinam eritrócitos ovinos, além de humanos, como a de ACL-I.

Não foi encontrada na literatura nenhuma outra lectina isolada de esponja marinha aglutinando eritrócitos caninos e caprinos, mas apenas em extratos aquosos de esponjas (Dresch *et al.*, 2005), o que revelou uma característica de especificidade de ACL-I, distinta das outras lectinas de esponjas até o momento purificadas. Cabe salientar que depois dos eritrócitos de coelho, os caninos e caprinos foram os que mais aglutinaram pela ação de ACL-I. A lectina de *Craniella australiensis* (Xiong *et al.*, 2006) aglutina eritrócitos de galinha, ao contrário de ACL-I e ACL-II.

Em relação à ACL-II, os eritrócitos que foram aglutinados por esta lectina seguiram a mesma intensidade de aglutinação que a de ACL-I. Além disso, ambas

as lectinas não aglutinaram eritrócitos eqüinos e suínos, o que novamente comprova alguma semelhança entre ACL-II e ACL-I. Contudo, ACL-II não reconheceu eritrócitos caprinos, ovinos e bovinos, reconhecidos pela ACL-I.

Há inúmeros relatos sobre o uso de lectinas vegetais na avaliação da migração de neutrófilos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, com resultados positivos comparáveis aos encontrados nesse trabalho. A lectina ACL-I avaliada no presente estudo mostrou ser quimiotática nas concentrações de 0,8 a 12,8 µg/mL. Verificou-se que a migração de neutrófilos induzida por ACL-I foi mediada por domínio de reconhecimento de carboidrato, pois foi inibida pela incubação concomitante com 0,2 M de GlcNAc.

Benjamin e colaboradores (1997) demonstraram em ratos que *soy bean agglutinin* (SBA), isolada de sementes de feijão de soja, induziu atividade quimiotática *in vitro*, em concentrações de 0,5 a 5 µM. Além disso, no ensaio *in vivo*, a injeção i.p. (intraperitoneal) de SBA (50-200 µg) provocou significativo acúmulo de neutrófilos na cavidade peritoneal, após o período de 4 horas. O efeito foi dose dependente, perdurando até as primeiras 24 horas.

Em outro trabalho, foi verificado que apenas 3,8 µM da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* foi quimiotática após injeção i.p. em ratos, com resultado significativo em relação ao controle até 8 horas após a injeção. A migração de neutrófilos ao peritônio foi causada provavelmente pela liberação de fatores quimiotáticos (citoquinas) por macrófagos residentes em reação a VML (lectina de *Vatairea macrocarpa*) (Alencar *et al.*, 2003).

ACL-I apresentou uma concentração quimiotática mínima de 0,8 µg/mL, o que é uma concentração relativamente baixa. Por outro lado, Alencar e colaboradores (2005) constataram que 300 µg/mL da lectina dos tubérculos de *Arum maculatum* eram necessárias para atividade quimiotática da mesma *in vitro*. O ensaio *in vivo*, após o período de 4 horas de injeção na cavidade intraperitoneal de ratos, revelou que essa lectina causou uma maior migração de neutrófilos na concentração de 200 µg/mL.

Contudo, a lectina frutalina induz migração de neutrófilos *in vitro*, mas com uma quimiotaxia dependente da concentração, na faixa de 0,5 a 3 µg/mL (Brando-Lima *et al.*, 2005). Da mesma maneira, a lectina de *Euphorbia milii* é quimiotóxica *in vitro* na faixa de 10 a 40 µg/mL e *in vivo* esta lectina é quimiotóxica e o efeito é dependente da concentração, na faixa de 2 a 8 µg/mL (Dias-Baruffi *et al.*, 2000).

Por outro lado, lectinas de esponjas marinhas têm sido pouco estudadas no que se refere à ação inflamatória. Queiroz e colaboradores (2008) registraram que a injeção intraperitoneal em camundongos da lectina de *Cliona varians* (50 µg/cavidade) produziu uma máxima migração de leucócitos 24 horas após a administração. Além disso, os autores verificaram que a atividade quimiotóxica diminuiu com a injeção prévia de inibidores da liberação de citocinas, indicando que a migração de neutrófilos desencadeada pela lectina é mediada via liberação de citocinas por macrófagos residentes na cavidade peritoneal dos animais. Não há relatos na literatura da atividade quimiotóxica *in vitro* de lectinas de esponjas marinhas, como foi obtido nesse trabalho.

Ainda restam dúvidas se ACL-I exerce quimiotaxia também por um mecanismo indireto, como descrito anteriormente por Alencar *et al.* (2003) e Queiroz *et al.* (2008). Os dados sugerem que a lectina apresenta uma ação pró-inflamatória, constituindo numa ferramenta importante no estudo de eventos celulares relacionados à inflamação.

Não foram encontrados registros quanto à verificação de atividade antioxidante de lectinas em relação ao DPPH e ao β-caroteno. Neste sentido, também houve negatividade do ensaio de ACL-I frente ao DPPH e ao β-caroteno. A lectina apresentou citotoxicidade contra *Artemia salina*, além de marcar células transformadas (resultados que serão apresentados no capítulo III), podendo talvez apresentar uma atividade citotóxica para as mesmas linhagens em uma maior concentração, o que não foi testado neste trabalho.

Da mesma forma, não foi encontrado na literatura nenhuma referência quanto ao ensaio de lectinas frente a *Artemia salina*. Julgou-se importante realizar este ensaio pois as esponjas marinhas convivem com inúmeros organismos no ambiente marinho, inclusive microcrustáceos, como a *Artemia salina*. Mediante os resultados

obtidos acredita-se que ACL-I pode proteger a esponja *Axinella corrugata* do ataque por aquele invasor.

A descoberta da atividade mitogênica *in vitro* de lectinas vegetais sobre linfócitos em 1960 por Nowell abriu um novo campo de pesquisa na ciência humana. As lectinas mais empregadas como moléculas modelo em estudos de mitogenicidade são PHA-L, ConA e PWM (lectina mitógena de *Pokeweed*). A partir daí foram descobertas também várias lectinas mitogênicas em esponjas marinhas.

No presente trabalho verificou-se que ACL-I de *Axinella corrugata* possui atividade mitogênica frente a células mononucleares humanas nas concentrações de 32 e 50  $\mu\text{g/mL}$ , com um comportamento semelhante à lectina de *Cinachyrella alloclada*, mitogênica para linfócitos humanos na concentração de 35  $\mu\text{g/mL}$  (Atta *et al.*, 1989). Por outro lado, outras lectinas descritas na literatura foram mitogênicas para linfócitos numa concentração menor em comparação à ACL-I, como a lectina I de *Geodia cydonium* (concentração ótima de 13  $\mu\text{g/mL}$  para linfócitos humanos) (Bretting *et al.*, 1981b), a de *Crambe crambe* (concentração ótima de 10  $\mu\text{g/mL}$  para linfócitos humanos) (Dogovic *et al.*, 1996) e a de *Pellina semitubulosa* (concentração ótima de 3  $\mu\text{g/mL}$  para linfócitos de camundongo) (Engel *et al.*, 1992). Segundo Atta e colaboradores (1990), a lectina de *Desmapsama anchorata* também foi mitogênica frente a linfócitos humanos. Além disso, a lectina de *Craniella australiensis* foi um potente mitógeno em comparação com ACL-I, mas contra esplenócitos de camundongo, com um máximo de atividade na concentração de 0,78  $\mu\text{g/mL}$  (Xiong *et al.*, 2006).

Mediante os resultados obtidos não é possível afirmar sobre qual fração de célula mononuclear humana (linfócitos ou monócitos) atua ACL-I. Há inúmeros relatos sobre o efeito mitogênico de lectinas isoladas de esponjas marinhas sobre linfócitos T. Engel e colaboradores (1992) verificaram alta atividade mitogênica da lectina de *Pellina semitubulosa* sobre linfócitos T de camundongos (concentração ideal de 30  $\mu\text{g/mL}$ ), além de causar forte liberação de interleucina 1 de macrófagos e de interleucina 2 de linfócitos T de camundongo, de forma mais intensa na concentração de 2,5  $\mu\text{g/mL}$ . Das quatro lectinas purificadas de *Axinella polypoides*, a lectina I apresentou forte efeito mitogênico em linfócitos T humanos na faixa de 10-

40 µg/mL, ao passo que a lectina II foi fracamente mitogênica a 50 µg/mL (Phillips; Bretting; Kabat, 1976). A lectina de *Crambe crambe* também foi mitogênica para linfócitos T humanos (Dogovic *et al.*, 1996). A lectina de *Haliclona cratera* somente foi fracamente mitogênica na concentração de 15 µg/mL sobre linfócitos T humanos pré-incubados com PHA a 5 µg/mL (Pajic *et al.*, 2002).

Os resultados obtidos sugerem que a ACL-I poderia ser usada como ferramenta em estudos de imunomodulação. Contudo, falta esclarecer se esta lectina exerce também efeito sobre a liberação de interleucinas por macrófagos e por linfócitos, não sendo o objetivo desse trabalho.

## **Capítulo IV**

### **Localização de ACL-I nos tecidos da esponja *Axinella corrugata* por imuno-histoquímica**

#### **Introdução**

Polímeros de carboidratos (glicanos) servem como elementos estruturais e de suporte nas paredes celulares de bactérias e de plantas, bem como, nos tecidos conectivos e nas células animais. Nos animais servem, ainda, como elementos de adesão celular. A identificação de polissacarídeos constituiu ao nível histológico um importante capítulo na histoquímica animal (Danguy; Kiss; Pasteels, 1988).

Durante a evolução de eucariotos unicelulares para animais multicelulares, as lectinas e seus receptores exerceram um papel fundamental. Pode-se dizer que as lectinas começaram a sua jornada evolutiva como moléculas de adesão promovendo o reconhecimento celular e a adesão específica. Dessa forma, desempenharam uma função primordial no desenvolvimento de todos os animais em decorrência da diversificação de funções que surgiram com o processo evolutivo (Kilpatrick, 2000).

A localização das lectinas nos tecidos por imuno-histoquímica pode ser realizada através de duas maneiras, utilizando o método direto e o indireto. O método direto consiste em produzir anticorpo contra a lectina e conjugá-lo a marcadores, principalmente fluorocromos, biotina e peroxidase, seguido de visualização em microscopia óptica. No método indireto produz-se o anticorpo primário e o mesmo é também usado para produção de anticorpo secundário. Assim, a lectina no tecido é marcada com seu anticorpo que por sua vez é ligado ao

anticorpo secundário. Este é conjugado ao marcador, seguido de análise em microscopia óptica (Danguy; Kiss; Pasteels, 1988; Grün *et al.*, 2006).

A maioria dos dados moleculares e de biologia celular moderna relativo a esponjas foram obtidos a partir de estudos com *Suberites domuncula* e *Geodia cydonium*. A adesão celular em esponjas inclui interações célula-célula e matriz extracelular-célula. A maioria das células das esponjas não exhibe contato direto entre suas membranas plasmáticas, mas sim, a adesão celular é feita através da matriz extracelular. Em *Geodia cydonium* isto é mediado por um complexo proteoglicano extracelular, conhecido como fator de agregação que age como uma ponte entre receptores protéicos de células adjacentes. Contudo, o fator de agregação une duas células por ligação a um receptor de agregação presente na superfície celular que apresenta domínio SRCR (Müller, 2001; Harwood; Coates, 2004). Em algumas esponjas tal processo de adesão celular é mediado por lectinas. Proteínas contendo domínios SRCR compreendem uma superfamília que inclui 2 membros em invertebrados e inúmeras proteínas em vertebrados. Em vertebrados participam de endocitose ou participam na ligação a lectinas (Müller, 1997; Blumbach *et al.*, 1998).

Entretanto, o receptor do fator de agregação contém ainda um domínio RGD (seqüência de adesão celular formado por arginina-glicina-ácido aspártico) com o tripeptídeo arginina-glicina-aspartato que liga-se à integrina das membranas plasmáticas celulares. Proteínas contendo o sítio de ligação RGD associadas à integrina, que serve como seu receptor, constitui o maior sistema de reconhecimento na adesão celular, influenciando e regulando outras funções, como migração celular, crescimento, diferenciação e apoptose. Integrinas de esponjas que reconhecem o domínio RGD formariam um bloco com o fator de agregação mediando a agregação celular (Ruoslahti, 1996; Harwood; Coates, 2004).

A associação de esponjas com microrganismos é uma característica comum do filo Porifera, cuja microbiota varia de esponja para esponja. Vários aspectos diferem conforme a espécie estudada: densidade de microrganismos, sua localização na estrutura da esponja, diversidade genética e morfológica e as relações estabelecidas com o hospedeiro. Os microrganismos são principalmente encontrados no mesoilo da esponja, mas também situam-se nos coanócitos, sistema

aqüífero, na pinacoderme ou intracelularmente (como em vacúolos celulares), englobando bactérias, cianobactérias e outras algas, anaeróbios facultativos e seres pertencentes ao reino Archaea (reino formado por seres unicelulares com características diferentes das bactérias, animais, plantas e dos fungos). Há descrições de simbiose entre esponja-microrganismo, onde o hospedeiro pode se beneficiar: pela produção e transferência de nutrientes; pela fagocitose e digestão intracelular de bactérias do mesoílo; pelo transporte de produtos de excreção e metabólitos ativos; pela defesa química e pela contribuição para a estrutura mecânica da esponja. Provavelmente, o simbiote beneficia-se por estar num meio protegido e com fluxo de nutrientes (Margot *et al.*, 2002; Gaino; Reborá, 2003; Webster *et al.*, 2004).

Investigações na interação química entre esponjas e outros organismos, normalmente, conduzem à elucidação de novas propriedades biológicas do filo Porifera, como antibacteriana, antifúngica, citotóxica, antimetabólica, etc. Em comparação com a maioria dos invertebrados marinhos sedentários, esponjas têm um alto nível incomum de atividade biológica. Inúmeros estudos têm correlacionado a presença de tais atividades em esponjas sob condições ecológicas particulares como: altos níveis de agressão química em ambientes saturados (alelopatia); propriedades de defesa química (toxicidade) em ambientes mais expostos para desencorajar a predação; resposta imunológica provocada pela presença de microrganismos (Hooper *et al.*, 1992).

Margot *et al.* (2002) citam a associação entre o reino Archaea e três espécies de esponjas do Mediterrâneo pertencentes ao gênero *Axinella*: *A. damicornis*, *A. verrucosa* e *Axinella* sp. Estas esponjas abrigam uma alta concentração de Archaea no colágeno que rodeia as espículas silicosas que formam seu esqueleto. Estudos moleculares e morfológicos dos filamentos do reino Archaea têm revelado que cada espécie de esponja se associa com um filotipo específico de Archaea (relação espécie específica), mas todos estritamente relacionados. Os autores acreditam que se trate de uma associação simbiótica tendo que ser determinado o tipo de relações metabólicas e/ou bioquímicas existentes. Schleper *et al.* (1998) caracterizaram molecularmente a coexistência de duas linhagens muito próximas de *Cenarchaeum symbiosum* (pertencente ao reino Archaea) com a esponja *Axinella mexicana*, do Oceano Pacífico, Archaea também profundamente relacionado com os três filotipos

de Archaea citados anteriormente por Margot *et al.* (2002). Sua localização física na esponja ainda está sob investigação. A associação Archaea-esponja marinha foi originalmente descoberto por Preston *et al.* (1996) em *Axinella mexicana*.

Alguns dos metabólitos secundários detectados em esponjas podem ser produtos de biossíntese por simbioses comumente associados às mesmas, exercendo assim um importante papel no mecanismo de defesa das esponjas (Margot *et al.*, 2002).

Em virtude da possibilidade da existência de simbiose ou contaminação da esponja por um organismo contendo lectina, o objetivo deste capítulo foi localizar por métodos imuno-histoquímicos a presença da lectina majoritária (ACL-I) de *Axinella corrugata* nos tecidos da esponja marinha, com fins de provar de se tratar de uma proteína inata da esponja e não proveniente de outro organismo ou microrganismo marinho associado.

## **IV.1 Materiais e Métodos**

### **IV.1.1 Matéria-prima:**

A esponja marinha *Axinella corrugata* foi o material de estudo neste capítulo, conforme descrito no item I.1.1.

### **IV.1.2 Obtenção da lectina ACL-I:**

ACL-I foi obtida segundo o método de isolamento e de purificação descritos no capítulo II.

### **IV.1.3 Produtos, reagentes químicos e equipamentos:**

A seguir está relacionada a procedência das matérias-primas e equipamentos mais importantes para a realização desse trabalho:

DAB (3,3'- diaminobenzidina) - Fluka (Buchs, Suíça).

Antisoro de coelho anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Dako, Glostrup, Dinamarca) cedido, gentilmente, pelo Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS.

Acrilamida, *N,N'*-metilenobisacrilamida e glicina - Amersham (Uppsala, Suíça).

Tris - USB (Cleveland, OH, EUA).

TEMED - INLAB (São Paulo, SP, Brasil).

APS - Serva (Heidelberg, Alemanha).

Albumina bovina cristalina fração V (BSA), adjuvante completo e incompleto de Freund - Sigma (St. Louis, MO, EUA).

EDTA - Merck (Darmstadt, Alemanha).

Membrana de nitrocelulose - Gibco (Grand Island, NY, EUA).

Centrífuga clínica modelo Excelsa 4 - Fanem (São Paulo, Brasil).

Sistema Mini Trans-blot<sup>®</sup> - Bio-Rad (Hercules, EUA).

Micrótono E. Leitz - Leitz (Wetzlar, Alemanha).

Microscópio óptico de campo claro PM-20 (BX 41) - Olympus (Tóquio, Japão).

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

Todas as soluções foram preparadas com água destilada purificada no sistema Milli-Q Plus, Millipore (Bedford, MA, EUA).

#### **IV.1.4 Animais:**

Os animais empregados para a produção de anticorpos policlonais contra ACL-I foram camundongos CF1 machos, pesando de 20 a 25 g.

Os animais foram provenientes da Fundação Estadual de Proteção e Pesquisa em Saúde do RS e mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS, com livre acesso à ração e água, em ambiente com temperatura e umidade controladas ( $20 \pm 1$  °C e  $60 \pm 3$  %, respectivamente) e ciclo de luz de 12 h.

#### **IV.1.5 Produção de anticorpos policlonais:**

A produção dos anticorpos policlonais foi realizada pela injeção intraperitoneal nos camundongos de 15 µg de ACL-I purificada e emulsificada com adjuvante completo de Freund, num volume máximo de aplicação de 1 mL/100 g de peso. Após um intervalo de 15 dias, 4 outras aplicações de 10 µg de lectina em adjuvante incompleto de Freund, foram administradas aos animais com intervalos de 4 dias entre cada uma. Após 5 dias da última aplicação, os camundongos foram sacrificados por exsanguinamento para a coleta do sangue. O anticoagulante usado foi EDTA 0,2 M (1:20).

O sangue foi centrifugado em centrífuga clínica a 1200 rpm, por 15 min, à temperatura ambiente de  $20 \pm 1$  °C, sendo o plasma obtido submetido a nova centrifugação. Por fim, o antisoro foi armazenado a -18 °C até o momento do uso.

#### **IV.1.6 Determinação da presença de anticorpos anti-ACL-I:**

Os anticorpos policlonais anti-ACL-I foram detectados por *Western blotting* tomando por referência Towbin; Staehelin e Gordon (1979).

A lectina foi submetida a eletroforese nativa em gel de poliacrilamida a 11 %, pH 8,3, (PAGE), segundo Laemmli (1970).

A transferência da amostra lectínica, após a eletroforese, para uma membrana de nitrocelulose, foi conduzida por eluição eletroforética utilizando-se o sistema Mini Trans-blot®.

Para cada gel de poliacrilamida foi montado um sanduíche de transferência na célula “trans-blot” da seguinte forma: sobre uma ou duas folhas de papel de filtro Whatman 3MM dispostas seqüencialmente, embebidas em tampão de transferência (Tris-NaOH 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3 em metanol 10 %) e antecedidas por um feltro poroso, foi colocado o gel seguido de uma membrana de nitrocelulose de 0,45 mm de porosidade, previamente equilibrada em tampão de transferência. Sobre a membrana de nitrocelulose foram colocadas mais uma ou duas folhas de papel de filtro Whatman 3MM e um filtro poroso, também embebidos no mesmo tampão. A eletrotransferência foi realizada por um período de três horas, sob corrente constante de 1 mA/cm<sup>2</sup> do gel, utilizando o tampão de transferência mencionado anteriormente, ou, então, durante a noite, com 5-7 V e 10-20 mA. Passado este período, o sanduíche de transferência foi desfeito e a membrana de nitrocelulose submetida ao processo de imunodeteção.

A membrana de nitrocelulose foi imersa em PBS contendo leite em pó a 5 % com Tween 20 a 0,01 % e, seqüencialmente, na solução contendo anticorpos policlonais anti-ACL-I produzidos em camundongo, na proporção de 1:100 (v/v), e por fim na solução contendo antisoro de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, diluído 1:1000 (v/v), com incubação de 1 hora em cada uma destas três etapas. As soluções contendo os anticorpos foram preparadas em PBS como citado anteriormente. Após o tratamento com cada solução com anticorpos, o material foi lavado com PBS contendo Tween 20 a 0,01 %, com 3 trocas de solução num período de 15 minutos.

Para a deteção das bandas protéicas foi utilizada uma solução de DAB a 0,05 % em PBS e 150 µL de peróxido de hidrogênio 30 volumes para cada 50 mL de solução. Após 10 minutos de incubação no escuro a membrana de nitrocelulose foi

lavada rapidamente várias vezes com água destilada, seca entre papel de filtro Whatman 3MM e fotografada.

#### **IV.1.7 Imunolocalização da lectina ACL-I na esponja *Axinella corrugata* por MO de campo claro:**

Para o ensaio de imunolocalização pelo método indireto da ACL-I na esponja *Axinella corrugata* foram obtidas seções transversais em micrótono de deslizamento E. Leitz, com 5-12  $\mu\text{m}$  de espessura, de material previamente fixado em etanol a 70 °GL. As seções foram lavadas em PBS por 15 min com troca de solução a cada 5 min e, em seguida, tratadas com albumina bovina a 1 % em PBS, por 2 h, seguido de lavagem rápida em PBS (3X).

A peroxidase endógena foi inativada com solução contendo metanol: peróxido de hidrogênio 30 volumes (97:3) (v/v), durante 30 min, seguido novamente de lavagem com PBS (3X).

Posteriormente, foi realizada incubação das seções com o antisoro anti-ACL-I, previamente diluído 1:10 v/v em PBS contendo albumina bovina a 1 %, durante 2 h, seguido de lavagem com PBS (3X). Após, aplicou-se antisoro de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase na proporção de 1:100 v/v em albumina bovina a 1 % em PBS. Decorridas 2 h de incubação o material foi novamente lavado com PBS (3X).

A revelação foi realizada conforme Graham Jr. e Karnovsky (1966), utilizando 1,5 mg de DAB em 5 mL de solução tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6, contendo água oxigenada a 0,01 % (10 volumes), seguido de lavagens rápidas com solução de sulfato de cobre a 0,5 % em PBS (p/v), e montagem entre lâmina e lamínula com bálsamo do Canadá sintético.

O material foi observado em microscópio óptico de campo claro Olympus PM-20 (BX 41).

Como controle negativo foi utilizada albumina bovina a 1 % em PBS nas seções ao invés de antisoro anti-ACL-I ou então análise das seções transversais sem adição de reagentes. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## Resultados e Discussão

### ***Western blotting:***

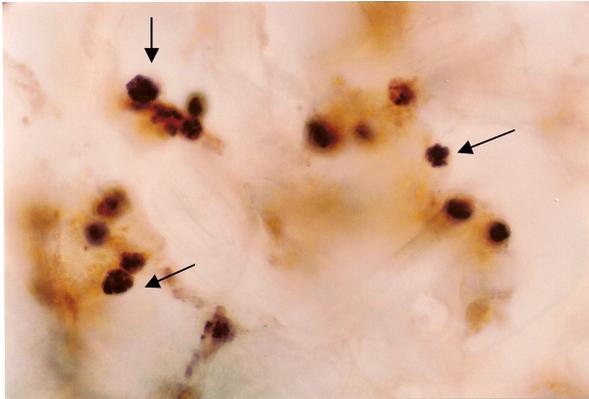
A presença e a especificidade dos anticorpos policlonais contra ACL-I foi avaliada por *Western blotting*. ACL-I foi capaz de produzir anticorpos em camundongos. Além disto, pode-se confirmar o alto grau de pureza da proteína lectínica pela visualização de uma única banda de alta massa molecular na membrana de nitrocelulose tratada com anticorpos policlonais anti ACL-I, conforme pode ser observado na figura 4.1.



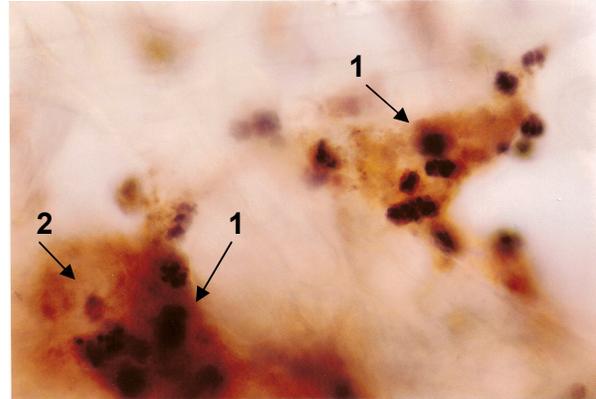
Figura 4.1: Imunodeteccção da ACL-I por *Western blotting*. Membrana de nitrocelulose incubada com anticorpos policlonais anti-ACL-I produzidos em camundongos, seguida de incubação com antisoro de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase e revelação com DAB.

### Imunolocalização:

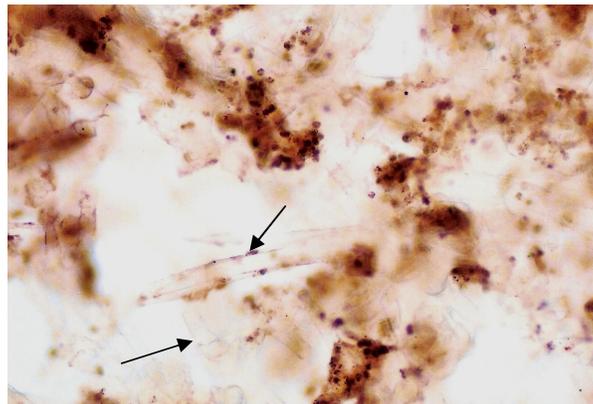
Os resultados da imunolocalização da ACL-I nas seções de *Axinella corrugata* podem ser visualizados nas figuras 4.2a, 4.2b e 4.2c abaixo, comprovando-se que a lectina é realmente sintetizada pela esponja e não por microrganismos presentes nos tecidos da mesma. As figuras 4.2d e 4.2e mostram os controles negativos.



4.2a



4.2b



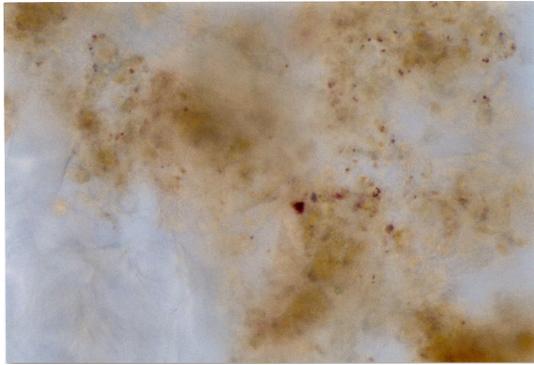
4.2c

Figuras 4.2: Imunolocalização de ACL-I em seções da esponja *Axinella corrugata*.

Figuras 4.2a: Seção transversal dos tecidos de *Axinella corrugata* – imunolocalização da lectina com emprego de anticorpos policlonais anti-ACL-I produzidos em camundongos, seguido de conjugação com anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase e revelação com DAB. Detalhe da presença de células com vesículas arredondadas no interior das mesmas, de coloração marrom avermelhada (400X).

Figura 4.2b: Seção transversal dos tecidos de *Axinella corrugata*, evidenciando a presença de células com vesículas e de uma possível câmara coenocitária. Imunolocalização da lectina com emprego de anticorpos policlonais anti-ACL-I produzidos em camundongos, seguido de conjugação com anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase e revelação com DAB. 1. células com vesículas; 2. provável câmara coenocitária (400X).

Figura 4.2c: Seção transversal dos tecidos de *Axinella corrugata*, evidenciando a presença de células com vesículas e de espículas. Imunolocalização da lectina com emprego de anticorpos policlonais anti-ACL-I produzidos em camundongos, seguido de conjugação com anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase e revelação com DAB. Detalhe da presença de espículas (100X).



4.2d



4.2e

Figura 4.2d: Seção transversal dos tecidos de *Axinella corrugata* – controle negativo da imunolocalização da ACL-I, com adição de albumina bovina a 1 % em PBS em substituição ao antisoro anti-ACL-I (400X).

Figura 4.2e: Seção transversal dos tecidos de *Axinella corrugata* – controle negativo da imunolocalização da ACL-I, sem adição de reagentes (400X).

A revelação da peroxidase com diaminobenzidina evidenciou nas seções de *Axinella corrugata* inúmeras células com vesículas de coloração marrom avermelhada, segundo mostrado na figura 4.2c. Esta coloração surgiu devido à formação de um polímero insolúvel de coloração marrom. Além disso, foi possível observar várias espículas ao longo do material. As figuras 4.2a e 4.2b mostram com mais detalhes as células. Elas se caracterizam por apresentar muitas vesículas arredondadas em seu interior que ocupam quase todo o espaço celular, comprimindo o citoplasma para as margens. No centro da figura 4.2b pode estar presente uma câmara coanocitária.

A figura 4.2d representa o controle negativo com omissão dos anticorpos anti-ACL-I. A figura 4.2e se refere ao material sem adição de reagentes. Não há diferença significativa entre os controles negativos, mostrando que o material apresenta estruturas coradas naturalmente, mas com muito menor intensidade do que nas seções tratadas com os anticorpos contra ACL-I e reveladas com DAB.

Mediante os resultados imuno-histoquímicos obtidos no presente trabalho, pode-se deduzir que as inúmeras células contendo vesículas de coloração marrom avermelhada sejam células esferulosas, como também já foi demonstrado na esponja *Axinella polypoides* por Bretting e Königsmann (1979). As células esferulosas em *Axinella polypoides* contêm praticamente um núcleo pequeno e vesículas de diferentes tamanhos e números (4 a 30). Pequenas e grandes

vesículas podem ser encontradas na mesma célula ou com predomínio de algum tipo de vesícula.

A presença da ACL-I nas vesículas de células esferulosas faz supor que a mesma seja sintetizada e estocada no interior de vesículas, assim como foi constatado para as lectinas I e II de *Axinella polypoides* (Bretting; Königsmann, 1979; Bretting *et al.*, 1983).

Bretting e colaboradores (1983) investigaram a distribuição das lectinas I e II de *Axinella polypoides*, específicas à D-galactose, nos tecidos da esponja por imuno-histoquímica, usando marcador peroxidase, sendo a visualização realizada por microscopia óptica por contraste interferencial. O emprego de anticorpo monoespecífico para a lectina I provocou a coloração intensa das vesículas grandes de células esferulosas (SCLV), ao passo que as vesículas pequenas (SCSV) coraram-se fracamente, indicando que a lectina I está presente preferencialmente nas SCLV e que a lectina II é principalmente encontrada em SCSV.

Os ensaios realizados no presente trabalho não permitiram a imunolocalização da lectina II nos tecidos da esponja *Axinella corrugata*, em virtude da pequena quantidade de material obtido para esta lectina. Entretanto, supõe-se que a distribuição de ACL-I e ACL-II nos tecidos de *Axinella corrugata* siga um comportamento similar ao das lectinas I e II de *Axinella polypoides*. Talvez ACL-II seja a lectina inicialmente produzida nas células esferulosas de *Axinella corrugata*, sendo posteriormente convertida em ACL-I, a lectina majoritária dessa esponja. Hipótese semelhante foi comprovada por Bretting e colaboradores (1983) para as lectinas I e II de *Axinella polypoides*.

O uso de microscopia eletrônica de transmissão revelou que no coanossomo de *Axinella polypoides* existem arqueócitos com numerosas vesículas, muito similares em tamanho e estrutura às vesículas pequenas das células esferulosas (contendo lectina II), sugerindo que as células esferulosas são derivadas da transformação dos arqueócitos. Posteriormente, ocorre uma nova diferenciação em células com vesículas grandes. Concomitantemente com a transformação morfológica das células, ocorre uma mudança na composição lectínica celular. A lectina II de *Axinella polypoides* é estruturalmente relacionada à lectina I, surgindo

antes que a lectina I em SCSV, com posterior degradação ou conversão à lectina I. A síntese de lectina I durante a transição celular é improvável, pois as células esferulosas são deficientes em mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi (Bretting; Königsmann, 1979; Bretting *et al.*, 1983). A transformação de arqueócitos em células esferulosas também já foi descrita na esponja *Chondrilla nucula* por Gaino e colaboradores (1995).

Bretting e colaboradores (1983) também verificaram que em todos os experimentos de imuno-histoquímica onde houve revelação de células esferulosas na região do eixo central e do coanossomo da esponja, as fibras de espongina foram coradas mais intensamente que os respectivos controles, mostrando a presença de lectinas em alguma extensão nas mesmas e concluindo que as lectinas também estão envolvidas na síntese de fibras de espongina. As células esferulosas do ectossomo de *Axinella polypoides*, ao contrário do coanossomo e do eixo central (figura 4.3), não parecem estar associadas à síntese de fibras de espongina porque estas são muito raras no ectossomo, indicando sua participação na formação da matriz intercelular desta região da esponja. Não foi possível demonstrar neste trabalho a participação de ACL-I na síntese de fibras de espongina em *Axinella corrugata*.

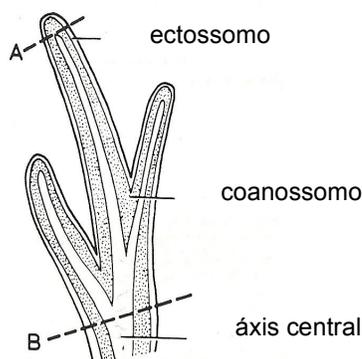


Figura 4.3: Diagrama das diferentes regiões da esponja *Axinella polypoides* (Bretting; Königsmann, 1979).

As células esferulosas podem ter várias funções em outras esponjas, além da *Axinella polypoides*: em *Verongia cavernícola* provavelmente contêm substâncias de excreção; em *Plakina trilopha* podem exercer um papel na excreção; manutenção da

matriz extracelular em *Cacospongia scalaris* e *Pleraplysilla spinifera*; formação de fibras de espongina em *Malawispongia echinoides* e *Pleraplysilla spinifera* (Bretting; Königsmann, 1979; Sciscioli *et al.*, 2000). Esponjas incapazes de sintetizar fibras de espongina, como *Aaptos aaptos* e *Geodia cydonium*, produzem lectinas com diferentes especificidades para carboidratos e possuem inúmeras células esferulosas. Em *Geodia cydonium* as células esferulosas estão embebidas em camadas de matriz extracelular que contém várias glicoproteínas. As células esferulosas devem ser as responsáveis pela produção da matriz e as lectinas podem atuar na glicosilação de um ou mais de seus constituintes (Bretting *et al.*, 1983).

Da mesma forma que para as lectinas purificadas de *Axinella polypoides*, a galectina I de *Geodia cydonium* é encontrada em células esferulosas (Wagner-Hülsmann *et al.*, 1996). Galectinas são lectinas com localização histológica diversa, podendo estar presentes no citoplasma, núcleo, superfície celular e espaços extracelulares (Hirabayashi, 1997).

Na esponja marinha *Geodia cydonium* um fator de agregação, complexo multiglicoprotéico constituído por um polipeptídeo de 140 kDa, interage com um componente inserido na membrana plasmática das células, o receptor de agregação (Wagner-Hülsmann *et al.*, 1996; Müller, 1997). Essa ligação é mediada pela galectina da esponja. Duas moléculas de galectina formam uma ponte entre o receptor e o fator de agregação, ocorrendo a interação entre células adjacentes (figura 4.4). A formação do complexo receptor de agregação-fator de agregação na presença de lectina é baixa na ausência de cálcio (Wagner-Hülsmann *et al.*, 1996).

Estudos imuno-histoquímicos realizados por Wagner-Hülsmann e colaboradores (1996), usando anticorpos monoclonais contra a galectina de *Geodia cydonium* e contra o fator de agregação (polipeptídeo de 140 kDa), revelaram que essa lectina é um componente intracelular de células esferulosas e que também faz parte da composição da membrana plasmática de tais células. A visualização foi feita por microscopia óptica de fluorescência e por microscopia confocal, respectivamente. Os autores constataram juntamente com Müller (1997) que anticorpos contra a galectina e contra o fator de agregação bloquearam a adesão celular mediada pelo fator de agregação, comprovando que a lectina é necessária para a adesão celular em *Geodia cydonium*. Ambos os autores levantaram a

hipótese de que as células esferulosas sejam efetivamente produtoras de lectinas, assim como se sugere para a esponja *Axinella corrugata*.

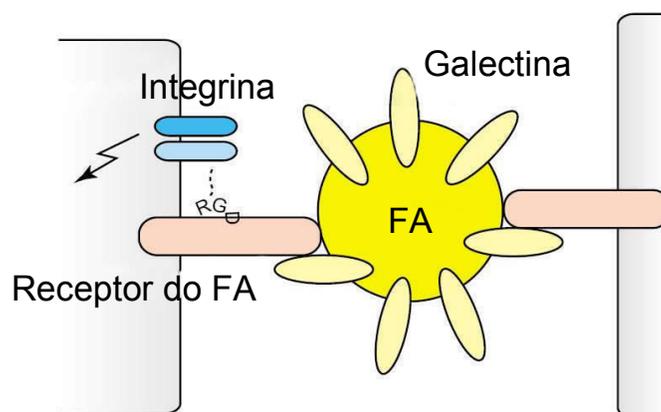


Figura 4.4: Fator de agregação (FA) que une células durante a agregação da esponja *Geodia cydonium*. A ligação com o receptor do fator de agregação é estabilizado pela galectina que se associa ao complexo FA-receptor do fator de agregação (Harwood; Coates, 2004).

A descoberta do processo de reconhecimento de carboidratos por lectinas foi um marco na glicobiologia. Lectinas animais participam ativamente do processo de interação célula-célula, como galectinas, lectinas tipo C e tipo I, envolvendo inclusive complexos com outras moléculas de adesão, como as integrinas (Kaltner; Stierstorfer, 1998).

Mediante os resultados encontrados supõe-se que a lectina I de *Axinella corrugata* também participe no mecanismo de agregação celular desta esponja, caso seja expressa na membrana plasmática das células esferulosas. Dentro do gênero *Axinella* já foi visualizado, por microscopia eletrônica, o fator de agregação da esponja *Axinella cannabina* (Müller *et al.*, 1982). Faltam subsídios para afirmar que ACL-I atue na síntese de fibras de esponjina em *Axinella corrugata*.

## Capítulo V

### O uso da lectina ACL-I como marcadora de células transformadas

#### Introdução

Muitos carboidratos formam associações com proteínas ou lipídios, constituindo as glicoproteínas e glicolipídios, respectivamente. As glicoproteínas constituem o principal componente da superfície celular, da matriz extracelular e de muitas secreções. A porção glicídica das glicoproteínas possui papel crítico em eventos específicos da biologia das células, como receptores celulares para hormônios e fatores de crescimento (Carvalho, 1990; Kaltner; Stierstorfer, 1998).

Há um enorme potencial codificador de informação presente nas estruturas dos polissacarídeos, também chamados de glicanos, superior ao das proteínas, ácidos nucléicos e outras macromoléculas. Os polissacarídeos constituem as moléculas de reconhecimento por excelência, em vista da possibilidade de criar um amplo repertório de combinações a partir de poucos carboidratos simples (Gabiús *et al.*, 1996; Sol *et al.*, 2006). Por exemplo, partindo-se dos 4 nucleotídeos e dos 20 aminoácidos, podem ser formadas, considerando estruturas de 10 monômeros,  $1,04 \times 10^6$  e  $1,28 \times 10^{13}$  combinações possíveis, respectivamente, enquanto que somente para os 8 monossacarídeos principais expressos nas membranas celulares são produzidas  $1,34 \times 10^{18}$  estruturas de 10 monômeros. A expressão de glicocódigos constitui um elemento chave no plano de desenvolvimento de um organismo. O potencial informativo codificado na estrutura dos polissacarídeos (glicocódigos) se decifra na união seletiva de lectinas a glicanos. As interações moleculares baseadas no reconhecimento específico entre lectinas e carboidratos cumprem um papel chave em muitos processos biológicos (Sol *et al.*, 2006).

A limitação das reações histoquímicas comumente empregadas para carboidratos foi superada pela alta especificidade alcançada com o emprego de lectinas marcadas que podem ser usadas como sondas específicas. A importância das lectinas como ferramenta histoquímica se deve principalmente a duas características: especificidade restrita a vários resíduos de carboidratos e possibilidade de serem ligadas a diferentes marcadores, como fluorocromos (tetrametilrodamina, alexa, isotiocianato de fluoresceína), biotina, peroxidase, fosfatase alcalina, ferritina e ouro coloidal ou serem incluídas em técnicas imunocitoquímicas para serem visualizadas ao nível de microscopia óptica convencional, ultravioleta e microscopia eletrônica. Em virtude das lectinas serem ligantes para uma seqüência de carboidratos definida, elas podem ser empregadas na investigação específica de glicoconjugados da superfície celular e de compartimentos intracitoplasmáticos, com aplicação tanto na histologia normal quanto na histopatologia (Danguy; Kiss; Pasteels, 1988; Carvalho, 1990; Grün *et al.*, 2006).

Como vários carboidratos não apresentam caráter antigênico, a importância das lectinas aumenta ainda mais em estudos histoquímicos de carboidratos e glicoconjugados de membrana. Aliado a isso, o emprego das lectinas como marcadores tem sido fundamental no conhecimento de modificações relacionadas ao desenvolvimento e diferenciação celulares *in situ*. Contudo, lectinas com mesma especificidade apresentam padrões de reatividade tecidual diferentes, fazendo com que possam não se ligar ao tecido alvo por impedimento espacial (Carvalho, 1990).

As lectinas possuem a capacidade de agir como moléculas de reconhecimento de cadeias de oligossacarídeos ligados a polipeptídeos ou lipídios dentro das células, entre as células, na superfície celular e nos fluidos, operando em diversos processos biológicos, sejam fisiológicos ou patológicos. Dentre estes últimos destacam-se a união de bactérias, vírus, protozoários e toxinas à superfície celular, o processo inflamatório, a transformação maligna, a metástase, etc (Carvalho, 1990; Kaltner; Stierstorfer, 1998; Sharon; Lis, 2004; Sol *et al.*, 2006). Neste contexto, as lectinas podem servir para diagnóstico de câncer por ligação a glicoconjugados de antígenos celulares indicadores de câncer humano, incluindo os de membrana, como o antígeno específico da próstata (PSA) (Basu; Majhi; Batabyal,

2003). Além disso, lectinas rádiomarcadas podem ser ferramentas úteis na rádio-imagem de tumores (Kojima; Jay, 1986).

As lectinas têm sido utilizadas na identificação de receptores de superfície celular que são, por exemplo, marcadores característicos de subpopulações de linfócitos e de outros tipos celulares. À semelhança dos marcadores antigênicos de superfície, os receptores para lectinas são extremamente úteis na identificação e separação de subpopulações celulares com um dado fenótipo, alguns dentre eles considerados como marcadores de diferenciação celular (Carvalho, 1990).

A presença de carboidratos específicos, na membrana de células transformadas ou não, tem permitido a marcação histoquímica para glicoconjugados da superfície celular, bem como, a separação de diferentes populações celulares com o uso de lectinas via aglutinação direta ou por imobilização das mesmas em colunas de afinidade, inclusive a separação de populações heterogêneas de células, possibilitando a caracterização de distintos estágios de maturação ou diferenciação celular (Fenlon *et al.*, 1987; Carvalho, 1990; Brooks; Leathem, 1995).

A descoberta da capacidade das lectinas de ligarem-se a células cancerosas foi feita por Aub e colaboradores (1963) com a WGA, em linfoma de camundongo. Mais tarde descobriu-se que a ConA e a SBA tinham a mesma habilidade de se ligar a tumores. Essas investigações forneceram evidências que alterações na expressão de carboidratos na superfície celular estão associadas com o desenvolvimento de câncer (Sharon; Lis, 1972; Carvalho, 1990). Estudos realizados por Hirszfeld, Halber e Laskowski (1929) e Thomsen (1930) foram os primeiros a demonstrar alterações bioquímicas em células tumorais, as quais foram posteriormente confirmadas como glicosilação aberrante associada a tumores (Dabelsteen; Clausen; Mandel, 1992). Tal fato possibilita uma alta suscetibilidade de ligação por parte de lectinas, mas que, entretanto, não é compartilhada por todas as células cancerosas (Brown; Hunt, 1978; Sharon; Lis, 2004). Contudo, os carboidratos expressos no glicocálix das diferentes células transformadas são distintos quimicamente e topograficamente dos das células normais, o que torna a interação seletiva para a lectina que reconhece tal arranjo glicídico (Sharon; Lis, 1972).

O reconhecimento de células mediante uso de lectinas também depende da distribuição de carboidratos na superfície celular. As células transformadas apresentam ampla variação no padrão de glicosilação da membrana (quali e quantitativa), formando-se grupamentos de carboidratos que ocupam regiões restritas da superfície celular, favorecendo sua interação com as lectinas, ao passo que nas células normais tal distribuição é homogênea. Tal fato reflete a maior fluidez da membrana plasmática das células transformadas, bem como, outras alterações a nível de citoesqueleto periférico (Sharon; Lis, 1972; Carvalho, 1990). Além disso, células cancerosas *in vitro* são aglutinadas com uma concentração muito menor de lectinas, quando comparadas às células normais (Brown, Hunt, 1978).

O perfil de carboidratos da membrana celular de uma célula transformada pode demonstrar seu potencial metastático. Glicanos com D-galactose são responsáveis por metástases, pois podem ser reconhecidos por lectinas de tecidos, como, por exemplo, lectinas hepáticas. Da mesma forma, asialoconjugados também são internalizados por lectinas do tecido hepático (Singh; Tiwary; Kennedy, 1999). Outro mecanismo proposto de metástase é a ligação de carboidratos de membrana das células cancerosas às selectinas presentes no endotélio vascular, representando uma etapa inicial no processo metastático (Brockhausen; Schutzbach; Kuhns, 1998). Além disso, em células malignas de glioma de rato da linhagem C6 há expressão de LacNAc (Sasaki *et al.*, 2002). Por sua vez, em humanos já foi constatado um incremento no grau de expressão de ácido siálico e de D-galactose em neoplasias de pulmão e estômago e de L-fucose e de ácido siálico em células leucêmicas, em neoplasias de próstata e em câncer cervical uterino (Smets; Beek, 1983; David *et al.*, 1992; Ogawa *et al.*, 1992; Jorgensen *et al.*, 1995; Singh; Tiwary; Kennedy, 1999; Peracaula *et al.*, 2003; Pal *et al.*, 2004). Por outro lado, ácido siálico, GalNAc, D-galactose e L-fucose são expressos em células metastáticas de intestino (Singh *et al.*, 2001; Gisbergen *et al.*, 2005; Lescar *et al.*, 2007) e GalNAc, D-galactose, GlcNAc e ácido siálico em neoplasias de mama (Brockhausen *et al.*, 1995; Whitehouse *et al.*, 1997; Burchell *et al.*, 1999; Irimura *et al.*, 1999). Ainda, *N*-glicanos do tipo GlcNAc $\beta$ 1,6Man estão presentes em tumores metastáticos de mama e cólon (Fernandes *et al.*, 1991) e *N*-glicanos  $\alpha$ 1,6-fucosilados em células metastáticas de pulmão e de fígado (Sakuma *et al.*, 2006), além de glicanos com galactose e GalNAc e gangliosídeos com resíduo terminal de

ácido siálico-O-acetilado em melanoma (Cheresh *et al.*, 1984; Thies *et al.*, 2001a; Thies *et al.*, 2001b).

Lectinas bacterianas poderiam ser bons marcadores histoquímicos para tumores, infectando seletivamente as células do tumor e matando-as (Kocourek; Freed, 1990). Por outro lado, lectinas de macrófagos com especificidade para D-galactose e N-acetil-D-galactosamina têm sido isoladas de diferentes animais e são responsáveis por distinguir células normais de tumorais. Câncer de mama humano interage com as lectinas de *Helix pomatia*, *Griffonia simplicifolia* e *Ulex europeus* (Singh; Tiwary; Kennedy, 1999).

Dessa maneira, as lectinas podem ser usadas como ferramentas importantes para a obtenção de informações quanto ao desenvolvimento, estágio de diferenciação, nível de malignidade e capacidade para metástases de células tumorais (Schumacher *et al.*, 1992).

Mas há casos em que lectinas da célula cancerosa são responsáveis pelo tumor metastático. O primeiro registro de lectina em célula neoplásica foi em neuroblastoma de camundongo em 1975 por Teichberg e colaboradores. Melanoma e fibrosarcoma de camundongo e humano exibem um alto potencial metastático porque expressam mais lectinas em sua superfície (Kocourek; Freed, 1990; Singh; Tiwary; Kennedy, 1999). Com relação a diagnóstico de tumores, localização imuno-histoquímica de galectinas foi introduzida por Gabius *et al.* (1986) em diferentes tipos de tumores de rato.

Tumores secundários formados por células tumorais circulantes que se agregam com outras células tumorais formando êmbolos são desencadeados por lectinas presentes na membrana de células metastáticas de humanos e camundongos (Singh; Tiwary; Kennedy, 1999).

Com o avanço da engenharia genética será possível obter-se células que expressem carboidratos ou lectinas, conduzindo a uma utilização mais precisa das lectinas para reconhecimento celular e para modificação do comportamento das células, fornecendo uma base mais sólida para o diagnóstico e tratamento de muitas doenças (Singh; Tiwary; Kennedy, 1999).

O objetivo deste capítulo consiste na investigação da ligação da lectina ACL-I a diferentes linhagens de células transformadas, visando o seu possível uso futuro como instrumento de diagnóstico de tumores malignos.

## **V.1 Materiais e Métodos**

### **V.1.1 Obtenção da lectina ACL-I:**

ACL-I foi obtida conforme o método de isolamento e de purificação descritos no capítulo II.

### **V.1.2 Produtos, reagentes químicos e equipamentos:**

A seguir está relacionada a procedência das matérias-primas e equipamentos mais importantes para a realização desse trabalho:

Dimetilformamida, glicerol e 4-cloronaftol - Merck (Darmstadt, Alemanha).

Albumina bovina cristalina fração V (BSA), *N*-hidroxisuccinimidabiotina, estreptoavidina-peroxidase, RPMI 1640 e GlcNAc - Sigma (St. Louis, MO, EUA).

Estreptoavidina-Alexa 488 - Molecular Probes (Eugene, OR, EUA).

DMEM - Gibco (Grand Island, NY, EUA).

Microscópio óptico Axioplan - Carl Zeiss (Göttingen, Alemanha).

Microscópio óptico Eclipse TE300 – Nikon (Tóquio, Japão).

Microcentrifuga *Eppendorf* Spin IE - Bioanalytical Systems (West Lafayette, EUA).

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

Todas as soluções foram preparadas com água destilada purificada no sistema Milli-Q Plus, Millipore (Bedford, MA, EUA).

### **V.1.3 Linhagens celulares:**

As linhagens celulares (tabela 5.1) foram obtidas junto ao Laboratório de Culturas de Células do Departamento de Química Biológica/ Faculdade de Ciências Químicas, da Universidade Nacional de Córdoba, Córdoba/Argentina (CHO-K1; HT-29; MCF7; T-47D) e dos Departamentos de Biofísica (H460; OVCAR-3; V79-4) e de Bioquímica (astrócito de rato; C6; T24; U-138 MG) da UFRGS/Brasil.

Tabela 5.1: Linhagens celulares empregadas para marcação com ACL-I.

<b>Linhagens</b>	<b>Denominação</b>	<b>Procedência</b>
—	Astrócito de rato ( <i>Rattus norvegicus</i> ) - cultura primária	—
V79-4	Fibroblasto de pulmão de hamster chinês ( <i>Cricetulus griseus</i> )	ATCC (CCL-93)
CHO-K1	Célula imortalizada de ovário de hamster chinês ( <i>Cricetulus griseus</i> )	ICLC (ATL 98003)
C6	Glioma de rato ( <i>Rattus norvegicus</i> )	ATCC (CCL-107)
U-138 MG	Glioblastoma de cérebro humano	ATCC (HTB-16)
H460	Carcinoma de pulmão humano	ATCC (HTB-177)
HT-29	Adenocarcinoma de cólon humano	ATCC (HTB-38)
MCF7	Adenocarcinoma epitelial mamário humano	ATCC (HTB-22)
T-47D	Carcinoma ductal mamário humano	ATCC (HTB-133)
OVCAR-3	Adenocarcinoma epitelial de ovário humano	ATCC (HTB-161)
T24	Carcinoma de bexiga humano	ATCC (HTB-4)

A manutenção das linhagens celulares foi feita da seguinte maneira:

- Astrócito: meio DMEM suplementado com FCS (soro fetal de bezerro) 10 %, anfotericina B 0,1 % e gentamicina 0,032 %.
- C6: meio DMEM suplementado com FBS (soro fetal bovino) 5 % e penicilina/estreptomicina 0,5 UI/mL.
- CHO-K1: meio DMEM suplementado com FBS 10 %, penicilina 200 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL.
- H460; HT-29; MCF7; OVCAR-3: meio RPMI 1640 suplementado com FBS 10 %, penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL.
- T24: meio RPMI 1640 suplementado com FCS 10 % e penicilina/estreptomicina 0,5 UI/mL.
- U-138 MG: meio DMEM suplementado com FBS 15 % e penicilina/estreptomicina 0,5 UI/mL.
- V79-4: meio DMEM suplementado com FBS 10 %, penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL.

Todas as culturas foram mantidas a 37 °C em estufa sob atmosfera úmida, contendo 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### **V.1.4 Biotinização de ACL-I:**

A lectina foi biotinizada conforme Jorgensen *et al.* (2000). A princípio, foi preparada uma solução de *N*-hidroxi-succinimidobiotina em dimetilformamida a 1 %. A solução lectínica (200 µg/mL em PBS), pH 9,0, foi adicionada a esta solução, na proporção de 24:1, com incubação de 2 h. Este procedimento foi seguido de diálise contra PBS, a 4 °C, durante 2 h, com troca de solução a cada 2 h por mais 3 vezes consecutivas. O material dialisado foi centrifugado a 11000 rpm, por 10 min, a 4 °C, sendo o sobrenadante armazenado a -18 °C até o momento do uso.

#### **V.1.5 Verificação da biotinização da lectina:**

Em uma mesma membrana de nitrocelulose foram pipetados, pontualmente, e em paralelo, 0,2 µg de lectina que havia passado pelo processo de biotinização e uma amostra de lectina não biotinizada. Como controle positivo foi utilizado albumina bovina biotinizada. A membrana de nitrocelulose contendo as amostras foi tratada, durante 15 min, com PBS contendo 0,1 % de Tween 20. Após, o material foi lavado 3 vezes com PBS, quando então foi incubado com uma solução contendo estreptoavidina-peroxidase a 0,0001 % em água pura e glicerol (1:1) (v/v), diluída com PBS contendo Tween 20 a 0,05 % na proporção de 1:1000 (v/v), por um período de 30 min. O material foi novamente lavado com PBS, como descrito anteriormente, e revelado no escuro durante 3 min com uma solução tampão Tris 20 mM, pH 7,5, contendo 4-cloronaftol a 0,015 % e peróxido de hidrogênio a 0,03 %. A formação de cor azul-violeta a cinza indica sucesso na biotinização.

#### **V.1.6 Marcação das linhagens celulares com a lectina biotinizada:**

A marcação das linhagens celulares foi segundo Irazoqui *et al.* (2005) e Grün *et al.* (2006). As lamínulas com as células aderidas a serem analisadas foram lavadas com PBS e fixadas por imersão em acetona, durante 5 min a 0 °C. Todos os procedimentos, após a fixação das células, foram realizados à temperatura ambiente de 20 ± 1 °C. A seguir, o material foi bloqueado com albumina bovina a 1 % em PBS,

durante 1 h, seguido de tratamento com solução lectínica biotinizada diluída em albumina bovina a 1 % em PBS (1:10), por 2 h. O material foi novamente lavado com PBS e incubado com estreptoavidina-Alexa 488, diluído em PBS (1:1000; v/v), durante 35 min, no escuro. Após nova lavagem rápida com PBS, o material foi montado entre lâmina e lamínula, com bálsamo do Canadá sintético.

As células assim tratadas foram visualizadas em microscópios ópticos de fluorescência Carl Zeiss Axioplan e Nikon Eclipse TE300, utilizando filtro com excitação em 445 nm e emissão em 575 nm. Os resultados foram registrados por microfotografias.

Como controle negativo foi utilizado nas células uma solução lectínica biotinizada, previamente incubada com GlcNAc 0,2 M ou ainda, apenas material celular bloqueado, sem incubação com lectina biotinizada. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## Resultados e Discussão

ACL-I biotinizada foi usada na marcação de 9 linhagens de células transformadas, além de células imortalizadas de ovário de hamster chinês e de células de fibroblasto de pulmão de hamster chinês. Nos ensaios realizados, ACL-I marcou as linhagens cancerosas HT-29, MCF7, T-47D, OVCAR-3, H460 e T24, além das células CHO-K1, conforme é especificado na tabela 5.2 abaixo.

Tabela 5.2: Marcação das linhagens celulares com ACL-I.

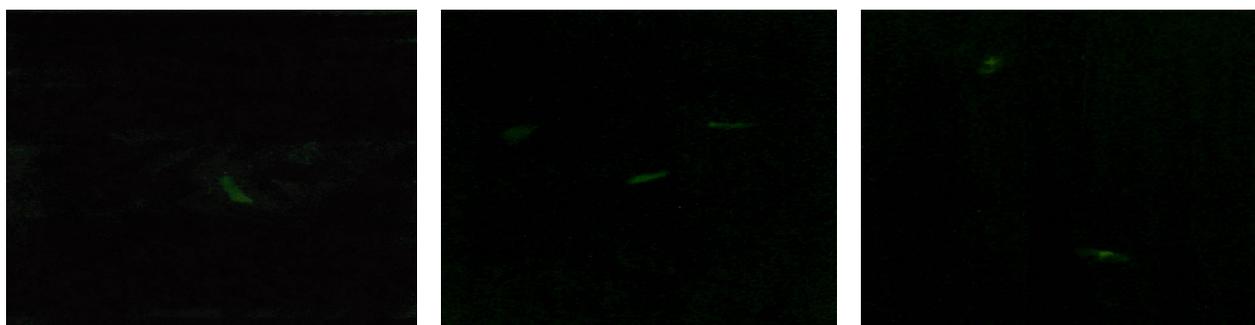
Linhagens	Denominação	Marcação
—	Astrócito de rato ( <i>Rattus norvegicus</i> ) - cultura primária	—
V79-4	Fibroblasto de pulmão de hamster chinês ( <i>Cricetulus griseus</i> )	—
CHO-K1	Célula imortalizada de ovário de hamster chinês ( <i>Cricetulus griseus</i> )	+
C6	Glioma de rato ( <i>Rattus norvegicus</i> )	—
U-138 MG	Glioblastoma de cérebro humano	—
H460	Carcinoma de pulmão humano	+
HT-29	Adenocarcinoma de cólon humano	+
MCF7	Adenocarcinoma epitelial mamário humano	+
T-47D	Carcinoma ductal mamário humano	+
OVCAR-3	Adenocarcinoma epitelial de ovário humano	+
T24	Carcinoma de bexiga humano	+



A visualização da marcação das linhagens celulares pode ser observada nas figuras 5.1 a 5.9 abaixo.

Não houve marcação nas células de astrócitos e linhagem C6, indicando ausência de afinidade de ACL-I para estas células do sistema nervoso central (resultados não mostrados). Esse fato é constatado por ser a LacNAc um fraco inibidor de ACL-I, ou seja, a lectina liga-se pouco a este carboidrato. Assim, os glicanos do tipo *N*-acetilactosamina ( $\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}$ ) característicos em gliomas de rato tipo C6 não são marcados.

As células da linhagem V79-4, que representam células de fibroblastos de pulmão de hamster chinês, constituem células não tumorais. Como se pode observar, a lectina não reconheceu a célula não transformada (figura 5.1a), o que poderia torná-la útil na distinção entre células normais e tumorais. A pequena fluorescência visualizada nas fotografias dessa linhagem é devida à fluorescência emitida pelas próprias células e não decorrente da marcação da lectina.



5.1a

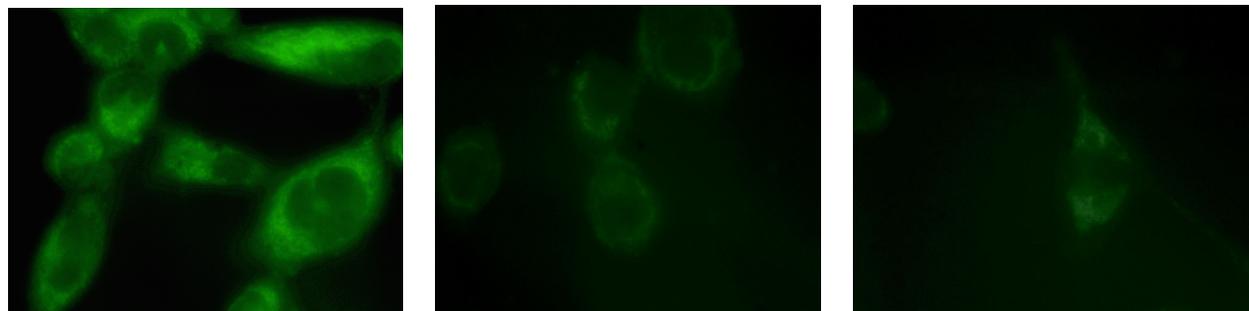
5.1b

5.1c

Figura 5.1: Marcação de células da linhagem V79-4 com ACL-I biotinizada e revelada com estreptoavidina-Alexa 488 (400X). Figura 5.1a: células marcadas com ACL-I biotinizada e reveladas com estreptoavidina-Alexa 488; Figura 5.1b: controle 1 – células tratadas com ACL-I biotinizada e previamente inibida por GlcNAc 0,2 M e, posteriormente, incubadas com estreptoavidina-Alexa 488; Figura 5.1c: controle 2 – células tratadas com estreptoavidina-Alexa 488, sem incubação com a lectina biotinizada.



Por outro lado, a lectina apresentou especificidade para a linhagem CHO-K1 (figura 5.2a), que consiste de células imortalizadas, uma forma intermediária entre célula normal e transformada.



5.2a

5.2b

5.2c

Figura 5.2: Marcação de células da linhagem CHO-K1 com ACL-I biotinizada e revelada com estreptoavidina-Alexa 488 (1000X). Figura 5.2a: células marcadas com ACL-I biotinizada e reveladas com estreptoavidina-Alexa 488; Figura 5.2b: controle 1 – células tratadas com ACL-I biotinizada e previamente inibida por GlcNAc 0,2 M e, posteriormente, incubadas com estreptoavidina-Alexa 488; Figura 5.2c: controle 2 – células tratadas com estreptoavidina-Alexa 488, sem incubação com a lectina biotinizada.

Da mesma maneira como para C6, houve ausência de marcação para a linhagem U-138 MG (figura 5.3a).

Assim como ocorreu para a linhagem V79-4, a fluorescência visualizada nas fotografias da linhagem U-138 MG é devida à fluorescência emitida pelas próprias células e não em virtude da marcação da lectina.



5.3a

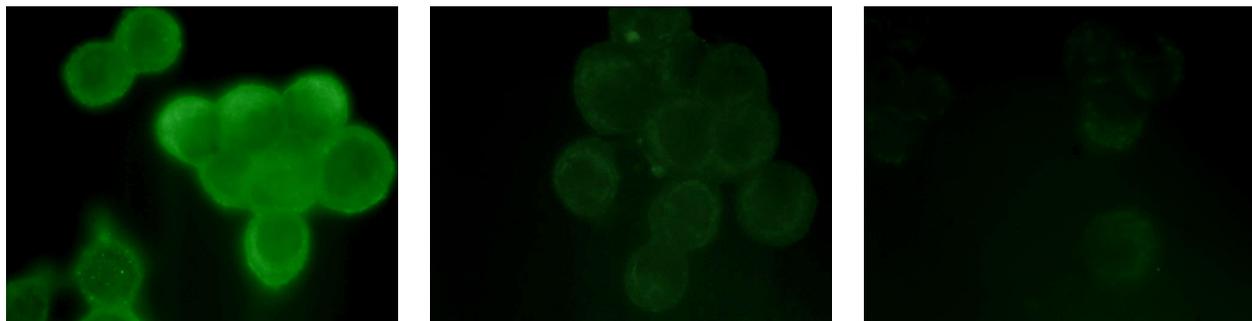
5.3b

5.3c

Figura 5.3: Marcação de células da linhagem U-138 MG com ACL-I biotinizada e revelada com estreptoavidina-Alexa 488 (400X). Figura 5.3a: células marcadas com ACL-I biotinizada e reveladas com estreptoavidina-Alexa 488; Figura 5.3b: controle 1 – células tratadas com ACL-I biotinizada e previamente inibida por GlcNAc 0,2 M e, posteriormente, incubadas com estreptoavidina-Alexa 488; Figura 5.3c: controle 2 – células tratadas com estreptoavidina-Alexa 488, sem incubação com a lectina biotinizada.



Como pode ser constatado nas figuras 5.4a, 5.5a, 5.6a e 5.8a e 5.9a, ACL-I marcou também as células transformadas HT-29, OVCAR-3, T-47D, H460 e T24, respectivamente, mas com mais intensidade a linhagem MCF7, conforme figura 5.7a.

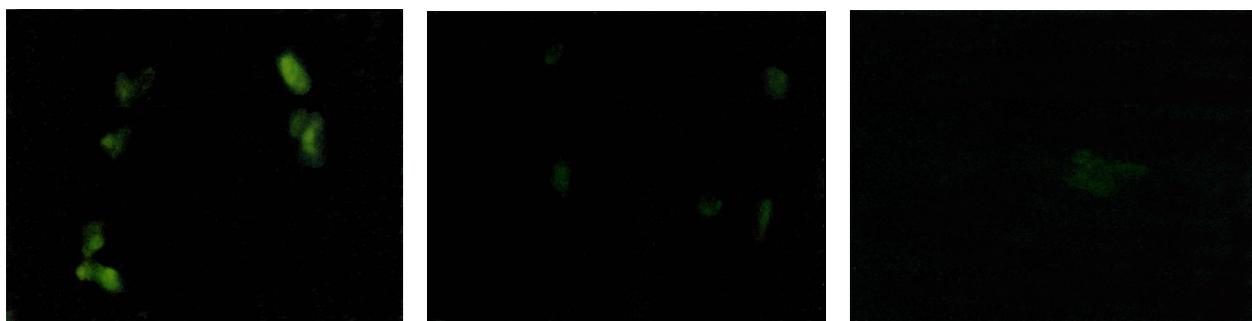


5.4a

5.4b

5.4c

Figura 5.4: Marcação de células da linhagem HT-29 com ACL-I biotinizada e revelada com estreptoavidina-Alexa 488 (1000X). Figura 5.4a: células marcadas com ACL-I biotinizada e reveladas com estreptoavidina-Alexa 488; Figura 5.4b: controle 1 – células tratadas com ACL-I biotinizada e previamente inibida por GlcNAc 0,2 M e, posteriormente, incubadas com estreptoavidina-Alexa 488; Figura 5.4c: controle 2 – células tratadas com estreptoavidina-Alexa 488, sem incubação com a lectina biotinizada.



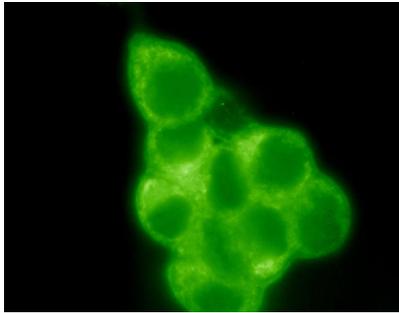
5.5a

5.5b

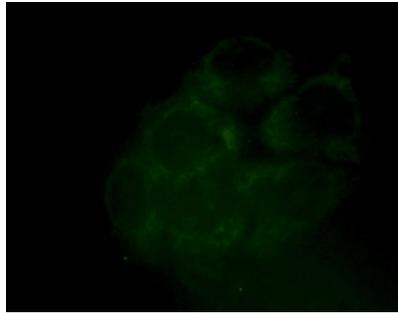
5.5c

Figura 5.5: Marcação de células da linhagem OVCAR-3 com ACL-I biotinizada e revelada com estreptoavidina-Alexa 488 (400X). Figura 5.5a: células marcadas com ACL-I biotinizada e reveladas com estreptoavidina-Alexa 488; Figura 5.5b: controle 1 – células tratadas com ACL-I biotinizada e previamente inibida por GlcNAc 0,2 M e, posteriormente, incubadas com estreptoavidina-Alexa 488; Figura 5.5c: controle 2 – células tratadas com estreptoavidina-Alexa 488, sem incubação com a lectina biotinizada.

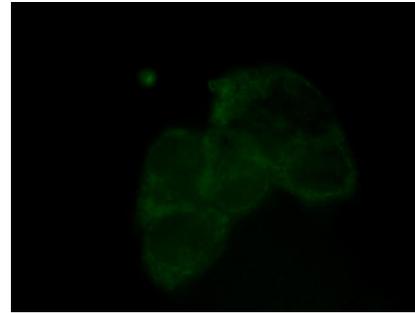




5.6a

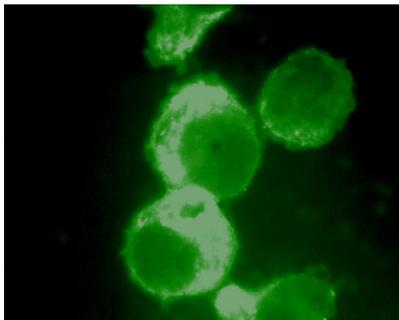


5.6b

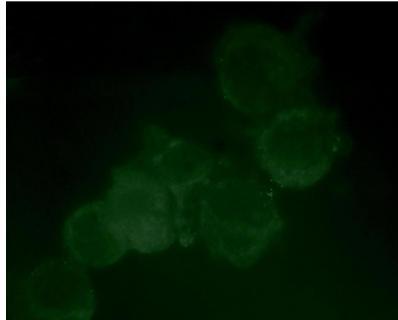


5.6c

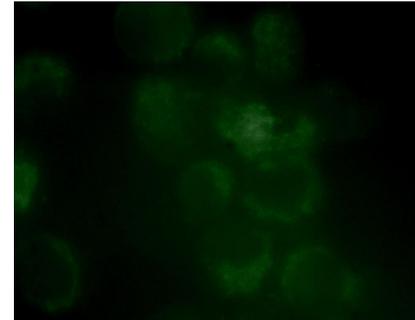
Figura 5.6: Marcação de células da linhagem T-47D com ACL-I biotinizada e revelada com estreptoavidina-Alexa 488 (1000X). Figura 5.6a: células marcadas com ACL-I biotinizada e reveladas com estreptoavidina-Alexa 488; Figura 5.6b: controle 1 – células tratadas com ACL-I biotinizada e previamente inibida por GlcNAc 0,2 M e, posteriormente, incubadas com estreptoavidina-Alexa 488; Figura 5.6c: controle 2 – células tratadas com estreptoavidina-Alexa 488, sem incubação com a lectina biotinizada.



5.7a



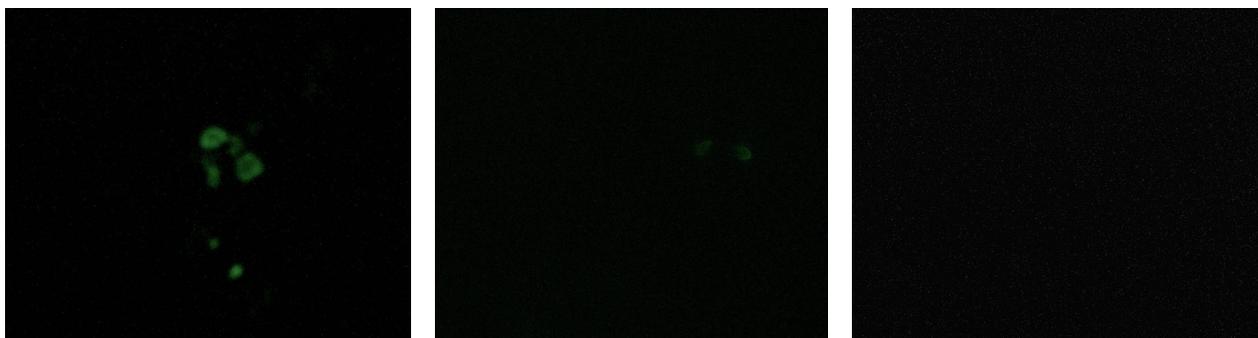
5.7b



5.7c

Figura 5.7: Marcação de células da linhagem MCF7 com ACL-I biotinizada e revelada com estreptoavidina-Alexa 488 (1000X). Figura 5.7a: células marcadas com ACL-I biotinizada e reveladas com estreptoavidina-Alexa 488; Figura 5.7b: controle 1 – células tratadas com ACL-I biotinizada e previamente inibida por GlcNAc 0,2 M e, posteriormente, incubadas com estreptoavidina-Alexa 488; Figura 5.7c: controle 2 – células tratadas com estreptoavidina-Alexa 488, sem incubação com a lectina biotinizada.



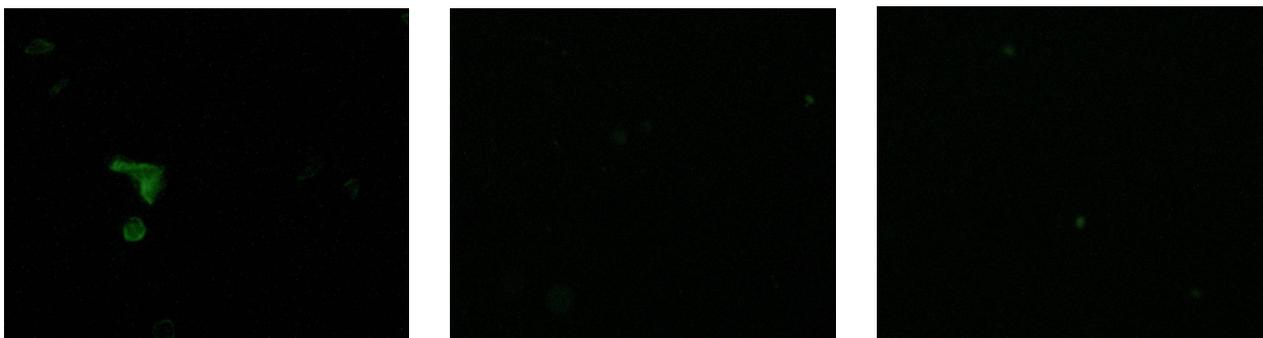


5.8a

5.8b

5.8c

Figura 5.8: Marcação de células da linhagem H460 com ACL-I biotinizada e revelada com estreptoavidina-Alexa 488 (400X). Figura 5.8a: células marcadas com ACL-I biotinizada e reveladas com estreptoavidina-Alexa 488; Figura 5.8b: controle 1 – células tratadas com ACL-I biotinizada e previamente inibida por GlcNAc 0,2 M e, posteriormente, incubadas com estreptoavidina-Alexa 488; Figura 5.8c: controle 2 – células tratadas com estreptoavidina-Alexa 488, sem incubação com a lectina biotinizada.



5.9a

5.9b

5.9c

Figura 5.9: Marcação de células da linhagem T24 com ACL-I biotinizada e revelada com estreptoavidina-Alexa 488 (400X). Figura 5.9a: células marcadas com ACL-I biotinizada e reveladas com estreptoavidina-Alexa 488; Figura 5.9b: controle 1 – células tratadas com ACL-I biotinizada e previamente inibida por GlcNAc 0,2 M e, posteriormente, incubadas com estreptoavidina-Alexa 488; Figura 5.9c: controle 2 – células tratadas com estreptoavidina-Alexa 488, sem incubação com a lectina biotinizada.



Os carboidratos exibem uma grande diversidade na configuração de oligossacarídeos, para um pequeno número de monômeros de carboidratos, baseada nos seguintes aspectos: ligação glicosídica pode ser alfa ou beta no carbono anomérico, diferentes posições das hidroxilas nos monossacarídeos adjacentes, capacidade de ramificação da cadeia oligossacarídica (com ligações entre duas porções de carboidrato através de união 1-2, 1-3, 1-4 ou 1-6), ligação *N*- ou *O*-osídica e flexibilidade da ligação glicosídica. Todos estes fatores geram uma vasta possibilidade de topologia de carboidratos para o reconhecimento lectínico, o que não é encontrado no código de informação presente no DNA, RNA e nas proteínas, cuja forma de informação biológica é estritamente linear. Como consequência disso, a formação de complexos com distinta estequiometria é pré-requisito para a iniciação de eventos de sinalização que conduzem a uma variedade de efeitos pós-ligação (Gabiús *et al.*, 1996; Kaltner; Stierstorfer, 1998; Loris, 2002; Irazoqui *et al.*, 2005).

Os monossacarídeos que predominantemente ocorrem nos glicoconjugados das membranas celulares humanas são manose, galactose e fucose, além de glicosamina, galactosamina e seus derivados acetilados (GlcNAc, GalNAc e ácido siálico) (Smets; Beek, 1983). A mudança no padrão de glicosilação celular leva a uma alteração no comportamento da célula, associado à possível capacidade do desenvolvimento de metástases e de prognóstico desfavorável em inúmeros adenocarcinomas humanos. Um exemplo é a super expressão de glicoconjugados de GalNAc. A significância funcional destes glicoconjugados no mecanismo metastático é ainda desconhecida (Brooks; Carter, 2001; Brooks; Hall, 2002). Cerca de 80 % das proteínas secretadas e de membrana celular são glicosiladas. As mudanças celulares no padrão de glicosilação mais freqüentes que levam a um aumento de agressividade da célula cancerosa e capacidade de gerar metástases são: aumento na ramificação dos *N*-glicanos (presente em inúmeros tipos de câncer), incremento na síntese de ácido siálico (câncer epitelial) e de polímeros deste carboidrato (câncer de pulmão, rim, músculo e cérebro), aumento na expressão de antígenos tipo Lewis em glicoproteínas e glicolipídios (câncer epitelial e leucemia) e incremento de *O*-glicanos tipo Gal $\beta$ 1,3GalNAc (câncer de mama e cólon), além do aparecimento de glicosfingolipídeos em inúmeros tipos de câncer (Shimodaira *et al.*, 1997; Hakomori, 2000; Aamoudse *et al.*, 2006). Transformação

maligna também tem comumente sido associada com o aumento de expressão de oligossacarídeos com ligação *N*-osídica com a asparagina, como glicanos do tipo GlcNAc $\beta$ 1,6Man- $\alpha$ 1,6Man- $\beta$ 1,6, presentes em carcinomas de cólon e mama humanos (Mitchell *et al.*, 1998) e glicanos do tipo *N*-acetilactosamina (Gal $\beta$ 1,4GlcNAc), em gliomas de rato tipo C6 (Sasaki *et al.*, 2002).

Mudanças na glicosilação durante transformação maligna criam estruturas de carboidratos específicas que interagem com lectinas, como lectinas tipo C de células dendríticas. Recentes descobertas revelaram que glicoproteínas de tumores, como antígeno carcinoembrionário e mucina 1, interagem com lectinas tipo MGL (lectina de macrófago tipo galactose) e lectinas tipo C DC-SIGN (ligante de molécula de adesão intercelular não integrina específica de célula dendrítica) (Aamoudse *et al.*, 2006).

O reconhecimento de carboidratos por lectinas é muito complexo, pois vai além da ligação a mono ou dissacarídeos. O arranjo tridimensional dos glicanos pode ser crítico ao reconhecimento. Lectinas com afinidade ao mesmo carboidrato podem reconhecer um arranjo muito diferente de complexos de carboidratos, o que ocorre naturalmente em estruturas de oligossacarídeos. A lectina HPA (aglutinina de *Helix pomatia*), por exemplo, reconhece uma faixa heterogênea de glicoproteínas e glicanos (predominantemente glicanos contendo na região terminal GalNAc, mas também liga-se a resíduos de GlcNAc, contudo, com baixa afinidade) expressadas em células cancerosas. A HPA é uma ferramenta útil na detecção de diferenças sutis no arranjo de glicanos, não detectados por outras lectinas que reconhecem o mesmo carboidrato, como DBA e SBA, afins a GalNAc (Brooks; Carter, 2001).

Os resíduos terminais de GalNAc e de GlcNAc nos glicanos de células normais são incomuns. ACL-I reconhece tanto GlcNAc quanto GalNAc, podendo ainda ser, portanto, uma ferramenta útil no estudo da mudança no padrão de glicosilação celular. Avaliações neste sentido já foram feitas com HPA. A ligação de HPA a linhagens de células cancerosas é um indicador de metástase e/ou prognóstico desfavorável em um grande número de carcinomas humanos, incluindo câncer de mama, estômago, esôfago, cólon, tireóide, próstata e de pulmão (Brooks; Wilkinson, 2003). Brooks e Carter (2001) compararam o padrão de ligação de HPA a seções de inúmeros tecidos apresentando distintas linhagens de câncer de mama, em relação às lectinas SBA e DBA, bem como, à lectina GSA II (aglutinina II de

*Griffonia simplicifolia*) (afim a GlcNAc), com o objetivo de verificar se a ligação de HPA é o resultado de reconhecimento de ambos os carboidratos GalNAc e GlcNAc. A lectina HPA marcou as linhagens cancerosas, tanto nos grânulos citoplasmáticos quanto no glicocálix, o mesmo ocorrendo com SBA e DBA. Por outro lado, a lectina GSA II teve um padrão de ligação profundamente distinto das demais lectinas, com marcação apenas citoplasmática, possivelmente nos glicanos associados ao complexo de Golgi. Os resultados indicaram que a maioria da ligação de HPA é resultante do reconhecimento de glicanos contendo GalNAc. Por sua vez, estudos conduzidos por Brooks, Hall e Buley (2001) revelaram intensa marcação de culturas de células da linhagem MCF7 na região perinuclear, citoplasmática e de membrana celular por parte de HPA. Tendo em vista estes fatos, pode-se sugerir que ACL-I, que também possui afinidade para GalNAc, marcou o citoplasma das linhagens tumorais de mama T-47D (figura 5.6a) e MCF7 (figura 5.7a) por meio de reconhecimento de GalNAc, muito embora o melhor inibidor de sua atividade lectínica é *N, N', N''*-triacetilquitotriose, derivado oligossacarídico da GlcNAc.

Resultados comparáveis aos dos alcançados no presente trabalho foram obtidos por Mitchell e colaboradores (1998) no estudo das linhagens T-47D e MCF7, frente às lectinas PHA-L e HPA. PHA-L liga-se a oligossacarídeos  $\text{GlcNAc}\beta 1,2\text{GlcNAc}-\beta 1,6\text{Man}-\alpha 1,6\text{Man}-\beta 1,6$ , os quais também estão associados à malignidade (Dennis *et al.*, 1987; Bill; Revers; Wilson, 1998). Ambas as lectinas marcaram apenas o citoplasma das linhagens de mama metastáticas. Resultados obtidos com HPA mostraram haver uma menor intensidade de fluorescência, segundo Schumacher e colaboradores (1995a). No caso, a lectina foi internalizada ou marcou o glicocálix das linhagens T-47D e MCF7. Por outro lado, resultados mais significativos ocorreram usando-se WGA, cujo inibidor é GlcNAc. A marcação intensa de ACL-I na linhagem MCF7 (figura 5.7a) denota a possibilidade do reconhecimento por parte dessa lectina de outros carboidratos, além de GalNAc, como, por exemplo, GlcNAc, visto que a lectina PHA-L liga-se a oligossacarídeos contendo GlcNAc e a lectina WGA ao monossacarídeo GlcNAc e ambas marcadoras da linhagem MCF7.

ACL-I marcou o citoplasma da linhagem HT-29 (figura 5.4a). Há uma ampla variação na literatura quanto ao padrão de ligação de lectinas a células

transformadas de cólon humano. Por exemplo, Redondo e colaboradores (2004) constataram que as lectinas HPA e WGA marcaram a membrana celular de duas linhagens de adenocarcinoma de cólon humano com distintos potenciais metastáticos, CACO-2 e HCT-116. Mitchell e colaboradores (1998), por sua vez, analisaram as lectinas PHA-L e HPA quanto à marcação das linhagens HT-29 e CACO-2. A linhagem HT-29 foi reconhecida por ambas as lectinas (com ligação no citoplasma e na membrana celular para HPA e marcação variável para PHA-L), ao passo que a CACO-2 teve uma ligação moderada a PHA-L e negativa para HPA. Além disso, um estudo inédito foi realizado por Heinrich e colaboradores (2005), onde as lectinas WGA e PHA-L foram imobilizadas numa massa de agarose, e, então, utilizadas para a marcação de duas linhagens de cólon humanas, uma cancerosa (CCL-220) e outra não (CRL-1459), do mesmo tipo de tecido. Ambas as lectinas ligaram-se à linhagem CCL-220, sem reconhecimento para a linhagem não cancerosa. Posteriormente, este ensaio foi repetido com as mesmas linhagens comparando-se a ligação daquelas lectinas às células mediante o uso de fluorescência (Welty *et al.*, 2006). Houve correlação entre a fluorescência das células marcadas e a técnica de imobilização das lectinas em agarose, validando, portanto, este ensaio.

A capacidade de lectinas de ligarem-se ao glicocálix de células cancerosas com super expressão de glicoconjugados do tipo GalNAc também foi investigada por Irazoqui e colaboradores (2005). A lectina EML (lectina de *Euphorbia milii*) marcou as linhagens cancerosas TA3-Ha (carcinoma mamário de camundongo), HT-29 e T-47D. ACL-I marcou apenas o citoplasma das células HT-29 e T-47D. EML marcou o citoplasma da linhagem T-47D e parte do conteúdo intracelular das células HT-29. Os autores afirmaram que HPA reconhece resíduos terminais de GalNAc através da ligação com uma aglicona hidrofóbica adicional em posição  $\alpha$ -anomérica, enquanto que EML liga-se a GalNAc através de um resíduo adicional hidrofóbico em posição  $\beta$ , mais precisamente pNP (resíduo *p*-nitrofenil). Mediante os estudos supracitados pode-se inferir que ACL-I reconheça carboidratos do tipo GalNAc e GlcNAc na linhagem HT-29.

ACL-I também marcou a linhagem cancerosa de ovário OVCAR-3 (figura 5.5a). Resultados similares foram obtidos por Schumacher e colaboradores (1996),

os quais constataram que HPA ligou-se intensamente no citoplasma de seções de tecidos de uma linhagem de tumor de ovário humano. Os resultados sugerem uma possibilidade de ACL-I reconhecer resíduos de GalNAc de OVCAR-3, como ocorreu com HPA, mas é difícil correlacionar os resultados por não se tratar da mesma linhagem celular. Tendo em vista esta intensa ligação de ACL-I em OVCAR-3, acredita-se que a lectina reconheceu uma mistura complexa de mono ou oligossacarídeos na linhagem em questão.

ACL-I marcou igualmente a linhagem H460 (figura 5.8a). Num estudo realizado por Laack e colaboradores (2002) foi verificado que as lectinas HPA e PHA-L marcaram a maioria das seções de tecidos dos tumores pulmonares humanos testados. Thöm *et al.* (2007) chegaram aos mesmos resultados, entretanto verificaram significativa associação da ligação das lectinas às seções pulmonares com metástase. Contudo, encontra-se novamente dificuldade em comparar estes estudos com os resultados obtidos com ACL-I, pois dentre as linhagens avaliadas pelos autores supracitados pode estar presente ou não a linhagem H460.

Resultados com marcação não tão intensa aos alcançados nesse trabalho foram conseguidos com a marcação de duas linhagens de carcinoma de bexiga (T24 e RT-4) com a lectina de *Helix pomatia* (Hammarström, 1973).

Poucos trabalhos foram descritos na literatura com registros de lectinas isoladas de esponjas marinhas marcando células transformadas. Opric e colaboradores (1996) estudaram a marcação de seções neoplásicas de tecidos humanos de mama, tireóide e de melanoma com as lectinas de *Chondrilla nucula* e de *Geodia cydonium*. Em ambos os casos a ligação das lectinas não foi suficientemente específica nem consistente, o que não ocorreu para ACL-I. As duas lectinas apenas marcaram poucas seções de carcinoma de mama de lesão benigna e de lesão maligna. Por sua vez, em algumas dessas, houve ligação à região citoplasmática.

ACL-I mostrou ser um marcador viável para células de linhagens de câncer de cólon, mama, pulmão, ovário e de bexiga. Apesar de ligar-se a inúmeras linhagens tumorais e a outras não, a lectina mostrou ser específica na marcação do citoplasma celular, podendo talvez ser utilizada como instrumento para verificar a funcionalidade

de carboidratos e o metabolismo de glicoconjugados citoplasmáticos. A marcação do citoplasma das linhagens T-47D, MCF7 e HT-29 pode ser devida à internalização, por endocitose, da lectina, após sua ligação a receptores das membranas das células transformadas.

Não foi o objetivo desse trabalho o estudo das estruturas de glicoconjugados aos quais a lectina se ligou. Acredita-se que a marcação por ACL-I das células cancerosas das linhagens T-47D, MCF7, HT-29, OVCAR-3, H460 e T24 deva-se apenas à presença de grupamentos *N*-acetil em C<sub>2</sub>, visto que ManNAc é um epímero de GlcNAc, mas GalNAc não. Por esse motivo, a orientação do grupamento *N*-acetil (axial para ManNAc e equatorial para GlcNAc e GalNAc) não é importante. Além disso, ACL-I reconhece GlcNAc e GalNAc, epímeros na hidroxila em C<sub>4</sub> (axial para GalNAc e equatorial para GlcNAc). Como ambos inibem a lectina com igual intensidade (tabela 3.1), isso significa que a hidroxila em C<sub>4</sub> não é uma região crítica para o reconhecimento pelo CRD. Assim, pode-se afirmar que ACL-I possivelmente liga-se a mono ou oligossacarídeos do tipo GalNAc e GlcNAc das estruturas dos glicanos das células tumorais.

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho verifica-se que ACL-I é uma lectina que marca células tumorais, podendo ser utilizada com ferramenta de reconhecimento laboratorial de células transformadas.

As lectinas não são utilizadas apenas como marcadores e como instrumentos de diagnóstico, mas também auxiliam no mapeamento de neoplasias ou tecidos com indicação para tal, além de propiciar uma melhor compreensão a nível citológico e molecular das neoplasias. Pode-se concluir que o uso de marcadores de potencial metastático, como as lectinas, é crucial para o desenvolvimento de ferramentas bem sucedidas para a terapia contra o câncer. O potencial metastático de tumores humanos marcados com lectinas já foi constatado em mama, cólon e pulmão para as lectinas HPA e PHA-L (Schumacher; Adam, 1997; Mitchell *et al.*, 1998; Seelentag *et al.*, 1998; Valentiner *et al.*, 2005; Thöm *et al.*, 2007). Além disso, a ligação tecidual com PNA e UEA-I foi relacionada a metástases de pulmão/mama e pulmão, respectivamente (Mustac *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 2002; Thöm *et al.*, 2007), enquanto que a com HPA foi associada a neoplasias de estômago e próstata (Kakeji *et al.*, 1991; Shirashi, Atsumi; Yatani, 1992). Ainda, revelou-se que a marcação com

as lectinas HPA, PNA e com a lectina I de *Viscum album* está envolvida com metástases de melanoma, ao passo que a ligação a VVA e AAA relaciona-se a neoplasias de cólon (Cochran *et al.*, 1999; Thies *et al.*, 2001a; Thies *et al.*, 2001b; Konno *et al.*, 2002; Thies *et al.*, 2007). Estudos são necessários para verificar se o mesmo ocorre para ACL-I, não sendo o objetivo desse trabalho.



## DISCUSSÃO GERAL

A extensa costa brasileira apresenta uma importante fauna marinha praticamente inexplorada. Dentre os organismos presentes e ainda pouco estudados destacam-se as esponjas. As esponjas tornaram-se uma das fontes mais promissoras de isolamento de novos metabólitos primários e secundários, dos quais vários com importantes atividades biológicas relatadas e fontes potenciais de fármacos para tratamento de diversas doenças humanas (Carté, 1996; O'Keefe *et al.*, 1997; Berlinck *et al.*, 2004).

Em vista disso, foi realizada uma análise da atividade hemaglutinante do extrato aquoso de 20 espécies de esponjas marinhas coletadas no litoral de Santa Catarina, Paraíba e Pernambuco, com o objetivo de pesquisar novas lectinas com distintas estruturas e propriedades. Conforme descrito em Dresch *et al.* (2005), os extratos aquosos de *Axinella corrugata*, *Chondrilla nucula*, *Chondrosia collectrix* e de *Cinachyrella alloclada* apresentaram a maior atividade hemaglutinante, com destaque para *Axinella corrugata*, em especial na aglutinação com eritrócitos de coelho. Assim, esta esponja foi a escolhida para a purificação, caracterização e estudo das propriedades de suas lectinas, sendo o objetivo da presente tese.

A aglutinação não é uma característica exclusiva das lectinas, pois bactérias, vírus, anticorpos, taninos, dentre outros, também apresentam essa propriedade. Dessa maneira, com a finalidade de certificar que a aglutinação é mediada via lectinas, torna-se necessário comprovar a inibição da atividade hemaglutinante da lectina com incubação prévia da mesma com carboidratos e/ou glicoproteínas. A inibição da hemaglutinação de ACL-I e de ACL-II ocorreu mais intensamente com inibidores contendo grupamento *N*-acetil. Assim, ficou mostrada a presença de lectinas nos extratos aquosos de *Axinella corrugata*. Cabe ressaltar que ACL-I é a primeira lectina de esponjas marinhas inibida por GlcNAc, GalNAc, ManNAc e

também por LacNAc. Várias outras lectinas também reconhecem grupamentos *N*-acetilados, como as de *Halichondria okadai* (Kawagishi *et al.*, 1994), *Aaptos papillata* (Bretting *et al.*, 1976), *Haliclona cratera* (Pajic *et al.*, 2002) e *Suberites domuncula* (Schröder *et al.*, 2003). Além disso, ACL-I e ACL-II foram inibidas em maior intensidade por *N*, *N'*, *N''*-triacetilquitotriose, indicando que ambas possuem no seu CRD múltiplos pontos de ligação com carboidratos e que provavelmente reconheçam estruturas polissacarídicas possuidoras de ligação GlcNAc $\beta$ 1,4. Por outro lado, ACL-II não foi inibida por GalNAc, mas sim por D-galactose, indicando a existência de CRDs com especificidades diferentes na molécula.

Uma característica comum à maioria das lectinas de esponjas marinhas é a aglutinação de eritrócitos humanos. O mesmo ocorreu para ACL-I e ACL-II, mas em menor intensidade. ACL-I aglutinou em especial eritrócitos de coelho, caninos e caprinos, enquanto que ACL-II aglutinou principalmente eritrócitos de coelho e caninos, além do fato de nenhuma das duas lectinas apresentarem especificidade eritrocitária absoluta.

São poucos os grupos de pesquisa que se dedicam à purificação de lectinas de esponjas marinhas. Para o isolamento e purificação das lectinas de *Axinella corrugata* foi utilizada matriz contendo estroma de coelho-poliacrilamida, única matriz de afinidade capaz de eliminar um contaminante de cor marrom escura presente no extrato aquoso da esponja. Por outro lado, ACL-I e ACL-II foram separadas entre si pelo uso subsequente de gel filtração em coluna Ultrogel AcA 44.

Uma propriedade seguida por grande parte das lectinas é sua estabilidade frente a amplas faixas de pH e de temperatura. ACL-I e ACL-II tiveram um pico de atividade lectínica até 70 °C e 65 °C por 30 min, com perda total somente a 90 °C por 30 min e a 100 °C por 10 min, respectivamente. Lectinas igualmente resistentes à temperatura foram a lectina IV de *Axinella polypoides* (Bretting; Kalthoff; Fehr, 1978) e a lectina de *Craniella australiensis* (Xiong *et al.*, 2006). Em relação ao pH, a maior atividade hemaglutinante ficou em torno de pH 7,0 para ACL-I, semelhante à lectina de *Cliona varians*, com pH ótimo em 7,5 (Moura *et al.*, 2006). ACL-II teve maior estabilidade na faixa de pH de 2,0 a 6,0. Inúmeras lectinas não perderam sua atividade em extensa faixa de pH, como as lectinas I e II de *Halichondria okadai*

(Kawagishi *et al.*, 1994), a lectina de *Craniella australiensis* (Xiong *et al.*, 2006) e a de *Haliclona cratera* (Pajic *et al.*, 2002).

A análise eletroforética de ACL-I mostrou a complexidade do arranjo das subunidades constituintes da molécula, indicando o envolvimento de pontes de dissulfeto na manutenção da estrutura quaternária da lectina. ACL-I exibiu ser uma glicoproteína hexamérica, com subunidades monoméricas com *Mr* de 13.900. A lectina de *Pellina semitubulosa* também é hexamérica com subunidades mantidas por pontes de dissulfeto, apresentando *Mr* de 34.000, e uma *Mr* da lectina nativa muito superior à de ACL-I, na ordem de 205.000 (Engel *et al.*, 1992).

O *pI* na faixa ácida encontrado para ACL-I (6,3) está de acordo com o que ocorre para grande maioria das lectinas de esponjas marinhas, visto que estas proteínas apresentam em sua constituição química um predomínio de aminoácidos ácidos e hidrofóbicos, exceção feita para a lectina de *Haliclona cratera* que possui um *pI* de 8,6 em vista do seu alto conteúdo de aminoácidos básicos (Pajic *et al.*, 2002), o que não sucedeu com ACL-I, cuja composição de aminoácidos revelou um conteúdo de 54,97 % de aminoácidos hidrofóbicos e 22,66 % de aminoácidos ácidos.

As lectinas são amplamente usadas como reagentes específicos a carboidratos para investigar a estrutura, a organização e a função dos glicoconjugados da superfície celular e extracelular, além das mudanças que ocorrem durante a diferenciação, crescimento celular e a transformação maligna (Lis; Sharon, 1981; Danguy; Kiss; Pasteels, 1988). ACL-I marcou inúmeras linhagens de células tumorais, como HT-29, OVCAR-3, T-47D, H460, T24 e MCF7, mas não as linhagens C6 e U-138 MG. O estudo de lectinas de esponjas marinhas na marcação de células transformadas foi feito por Opric e colaboradores (1996) com as lectinas de *Chondrilla nucula* e de *Geodia cydonium*, mas cuja ligação a células tumorais de mama foi bem inferior à obtida com ACL-I. A partir dos resultados alcançados com ACL-I pode-se conjecturar que esta lectina é passível de ser usada como sonda na identificação de células transformadas, para estudo da estrutura de glicanos expressos pelas mesmas e para prognóstico da evolução de metástase.

Imuno-histoquímica de ACL-I revelou que a mesma está presente em vesículas de células esferulosas. Estudos anteriores comprovaram que as lectinas I e II de *Axinella polypoides* são sintetizadas e estocadas no interior de vesículas de células esferulosas (Bretting; Königsmann, 1979; Bretting *et al.*, 1983), o que se acredita que ocorra para ACL-I de *Axinella corrugata*. Não foi estudada a localização de ACL-II nos tecidos desta esponja.

Muitas lectinas de esponjas marinhas são mitogênicas, assim como ocorreu para ACL-I. No que se refere à atividade quimiotática, poucos estudos são realizados com lectinas de esponjas marinhas. Queiroz e colaboradores (2008) constataram que a migração de neutrófilos desencadeada pela lectina de *Cliona varians in vivo* é mediada via liberação de citocinas por macrófagos residentes na cavidade peritoneal de camundongos. Por outro lado, ACL-I induziu migração de neutrófilos *in vitro*, mas não sabe-se qual o mecanismo envolvido na quimiotaxia desencadeada por esta lectina. Contudo, para ambas as atividades quimiotática e mitogênica, o efeito de ACL-I foi abolido por incubação prévia da mesma com GlcNAc, confirmando que sua ação está relacionada com o domínio de reconhecimento de carboidrato da lectina. Ainda, ACL-I foi citotóxica contra náuplios de *Artemia salina*, o que é um indicador de atividade antitumoral. Por sua vez, a lectina de *Haliclona cratera* exibiu citotoxicidade para células cancerosas de melanoma e cervicais humanas (Pajic *et al.*, 2002). No presente trabalho não foi avaliada esta propriedade de ACL-I em relação a células tumorais.

## CONCLUSÕES

O protocolo de purificação e isolamento das lectinas da esponja marinha *Axinella corrugata* foi eficiente e simples, sendo a matriz de afinidade com estroma de eritrócitos de coelho-poliacrilamida pela primeira vez usada na purificação de lectinas de esponjas marinhas. A subsequente gel filtração mostrou a existência de duas lectinas (ACL-I e ACL-II) nos extratos aquosos da esponja.

ACL-I é uma glicoproteína hexamérica, fato pouco comum na natureza, apresentando pontes de dissulfeto ligando as subunidades, e cuja atividade hemaglutinante é inibida por carboidratos contendo o grupamento 2-*N*-acetilado. ACL-II se diferencia de ACL-I quanto à pequena variação na massa molecular relativa e principalmente pelo fato de ter afinidade para D-galactose, além de fetuína, mas não para GalNAc e ainda por não aglutinar eritrócitos caprinos, ovinos e bovinos. Além disso, as duas lectinas possuem pequenas diferenças na estabilidade face à variação de pH e de temperatura, dentre as características estudadas em ambas as lectinas.

Por imuno-histoquímica, demonstrou-se que ACL-I está localizada em vesículas de células esferulosas, sendo que essa técnica não foi utilizada para a localização de ACL-II nos tecidos de *Axinella corrugata*.

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho verifica-se que ACL-I é uma lectina com potencial uso para estudo de processos biológicos, decorrente das atividades biológicas comprovadas experimentalmente, como quimiotáxica, citotóxica e mitogênica.

ACL-I marcou células transformadas de linhagens de ovário, bexiga, cólon, mama e pulmão, mas não gliomas, nem astrócitos e fibroblastos, mostrando relativa especificidade para as células analisadas. A marcação de células transformadas por

ACL-I faz dessa lectina uma ferramenta importante para o estudo de eventos ligados a biologia celular e possível instrumento de reconhecimento laboratorial de células transformadas.

## PERSPECTIVAS

Dentro do grande leque de perspectivas de trabalho que se abrem, baseado nos resultados experimentais obtidos nesta tese e nas possíveis aplicações das lectinas I e II, cabe citar as seguintes:

- poucas são as lectinas que possuem estrutura hexamérica. O seqüenciamento de ACL-I, esclarecendo se suas subunidades são todas iguais ou não, aliado à definição das estruturas terciária e quaternária da lectina por técnica de difração de raios X, são ferramentas úteis para compreender a real estrutura molecular de ACL-I.

- análise da porção glicídica da glicoproteína.

- apenas algumas das características e propriedades foram verificadas para ACL-II, tendo em vista sua presença nos extratos aquosos da esponja em muita pequena concentração. A obtenção de maior quantidade desta lectina poderia permitir um estudo mais aprofundado da mesma, incluindo o esclarecimento de sua estrutura molecular.

- produção de interleucinas como decorrência da atividade mitogênica de ACL-I necessita ser investigada, como contribuição ao estudo dos processos imunológicos.

- a atividade quimiotóxica de ACL-I sobre neutrófilos pode estar associada à liberação de citocinas e ao envolvimento de macrófagos, que merece ser investigado, auxiliando na compreensão dos processos inflamatórios, cujos estudos não foram o objetivo desse trabalho.

- em vista da marcação de células transformadas por ACL-I, esta pode ser utilizada no aprofundamento de estudos relacionados à análise dos glicoconjugados reconhecidos pela mesma.

- estudo sobre a possibilidade de efeito citotóxico sobre as linhagens de células transformadas que ACL-I se liga.

- avaliação da atividade pró-oxidante de ACL-I.

- ACL-I marcou algumas das linhagens tumorais conhecidas. Cabe verificar se as linhagens normais correspondentes às células dos tecidos tumorais marcados por ACL-I são também reconhecidas pela lectina. Caso não o forem, tal fato permitiria o seu uso laboratorial para diferenciar células normais de transformadas.

- mais estudos são necessários para constatar se ACL-I é também expressa na membrana celular das células esferulosas, participando na síntese de fibras de esponjina e/ou na agregação celular.

- em consequência da pequena quantidade de ACL-I purificada a partir da esponja marinha, há a possibilidade da investigação de qual gene é o responsável pela expressão da lectina e então partir para a sua expressão heteróloga. Assim, será possível a produção da lectina em escala laboratorial e em quantidade compatível ao avanço dos estudos com a mesma.

## REFERÊNCIAS

AAMOUDSE, C. A.; VALLEJO, J. J. G.; SAELAND, E.; KOOYK, Y. van. Recognition of tumor glycans by antigen-presenting cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, p. 105-111, 2006.

ALENCAR, N. M. N.; ASSREUY, A. M. S.; ALENCAR, V. B. M.; MELO, S. C.; RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces *in vivo* neutrophil migration by indirect mechanism. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 35, p. 1674-1681, 2003.

ALENCAR, V. B. M.; ALENCAR, N. M. N.; ASSREUY, A. M. S.; MOTA, M. L.; BRITO, G. A. C.; ARAGÃO, K. S.; BITTENCOURT, F. S.; PINTO, V. P. T.; DEBRAY, H.; RIBEIRO, R. A.; CAVADA, B. S. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, p. 1805-1814, 2005.

ALVAREZ, B.; CRISP, M. D. A preliminary analysis of the phylogenetic relationships of some Axinellid sponges. In: SOEST, R. W. M. van; BRAEKMAN, J. C.; KEMPEN, T. M. G. van; BIANCHI, F. R.; BRINK, A. **Sponges in time and space**. Rotterdam: Balkema, 1994. p. 117-122.

ALVAREZ, B.; SOEST, R. W. M. van; RUTZLER, K. A revision of Axinellidae (Porifera: Demospongiae) of the central west Atlantic region. **Smithsonian Contributions to Zoology**, v. 598, p. 1-47, 1998.

ALVAREZ, E.; CRISP, M. D.; DRIVER, F.; HOOPER, J. N. A.; SOEST, R. W. M. van. Phylogenetic relationships of the family Axinellidae (Porifera: Demospongiae) using morphological and molecular data. **Zoologica Scripta**, v. 29, n. 2, p. 169-198, 2000.

ANDRADE, C. A. S.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; NASCIMENTO, S. C.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 435-445, 2004.

ARANGO, M. A.; PONCHEL, G.; ORECCHIONI, A. M.; RENEDO, M. J.; DUCHÊNE, D.; IRACHE, J. M. Bioadhesive potential of gliadin nanoparticle systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, p. 333-341, 2000.

ARBÓS, P.; ARANGO, M. A.; CAMPANERO, M. A.; IRACHE, J. M. Quantification of the bioadhesive properties of protein-coated PVM/MA nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 129-136, 2002.

ATHERTON, D. Successful PTC amino acid analysis at the picomol level. In: **Techniques in Protein Chemistry** (Hugly, T. E., ed.). San Diego: Academic Press, 1989. cap. 27, p. 273-283.

ATTA, A. M.; BARRAL-NETO, M.; PEIXINHO, S.; SOUSA-ATTA, M. L. B. Isolation and functional characterization of a mitogenic lectin from the marine sponge *Cinachyrella alloclada*. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 22, n. 3, p. 379-385, 1989.

ATTA, A. M.; CUNHA, A. P.; PEIXINHO, S. Partial Characterization of Hemagglutinin Activity of the Marine Sponge *Anthosigmella varians*. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 25, p. 53-55, 1992.

ATTA, A. M.; MENEZES, E. P.; PEIXINHO, S.; SOUSA-ATTA, M. L. B. Isolation of a Lectin from the Marine Sponge *Desmapsama anchorata* by Affinity Chromatography on Raffinose-Sepharose 6B. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 23, p. 191-194, 1990.

AUB, J. C.; TIESLAU, C.; LANKESTER, A. Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes, I. Wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 50, p. 613-619, 1963.

BANTEL, H.; ENGELS, I. H.; VOELTER, W.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; WESSELBORG, S. Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. **Cancer Research**, v. 59, n. 1, p. 2083-2090, 1999.

BARONDES, S. H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 13, p. 480-482, 1988.

BASU, P. S.; MAJHI, R.; BATABYAL, S. K. Lectin and serum-PSA interaction as a screening test for prostate cancer. **Clinical Biochemistry**, v. 36, p. 373-376, 2003.

BAUMGARTNER, S.; HOFMANN, K.; CHIQUET-EHRISMANN, R.; BUCHER, P. The discoidin domain family revisited: New members from prokaryotes and a homology-based fold prediction. **Protein Science**, v. 7, p. 1626-1631, 1998.

BELITZ, H.-D.; WEDER, J. K. P. Protein inhibitors of hydrolases in plants foodstuffs. **Food Reviews International**, v. 6, p. 151-211, 1990.

BENJAMIN, C. F.; FIGUEIREDO, R. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; BARJA-FIDALGO, C. Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean agglutinin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 873-881, 1997.

BERLINCK, R. G. S.; HAJDU, E.; ROCHA, R. M. da; OLIVEIRA, J. H. H. L. de; HERNÁNDEZ, I. L. C.; SELEGHIM, M. H. R.; GRANATO, A. C.; ALMEIDA, E. V. R.

de; NUÑEZ, C. V.; MURICY, G.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; THIEMANN, O.; SILVA, M.; SOUZA, A. O.; SILVA, C. L.; MINARINI, P. R. R. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 510-522, 2004.

BÉTAIL, G.; COULET, M.; GENAUD, L.; GUILLOT, J.; SCANDARIATO, M. Les stromas érythrocytaires inclus en gel de polyacrylamide. Applications à la chromatographie d'affinité. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiars**, v. 169, n. 3, p. 561-566, 1975.

BETTLER, E.; IMBERTY, A.; LORIS, R. **Lectines**, 2005. Disponível em <<http://www.cermav.cnrs.fr/glyco3d/index.php>>. Acesso em: 25 jan. 2007.

BEUTH J. Clinical relevance of immunoactive mistletoe lectin-I. **Anticancer Drugs**, v. 8, suppl. 1, p. 53-55, 1997.

BEUTH, J.; KO, H. L.; GABIUS, H. J.; BURRICHTER, H.; OETTE, K.; PULVERER, G. Behavior of lymphocyte subsets and expression of activation markers in response to immunotherapy with galactoside-specific lectin from mistletoe in breast cancer patients. **The Clinical Investigator**, v. 70, p. 658-661, 1992.

BIDLINGMEYER B. A.; COHEN, S. A.; TARVIN, T. L. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 336, n. 1, p. 93-104, 1984.

BILL, R. M.; REVERS, M.; WILSON, I. B. H. **Protein Glycosylation**. Boston: Kluwer, 1998. 528 p.

BLUMBACH, B.; PANCER, Z.; DIEHL-SEIFERT, B.; STEFFEN, R.; MÜNKNER, J.; MÜLLER, I.; MÜLLER, W. E. G. The putative sponge aggregation receptor. Isolation and characterization of a molecule composed of scavenger receptor cysteine-rich domains and short consensus repeats. **Journal of Cell Science**, v. 111, p. 2635-2644, 1998.

BORDET, J.; GAY, F. P. Sur les relations des sensibilisatrices avec l'alexine. **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 20, p. 467-498, 1906.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, p. 419, 1954.

BOYDEN, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 115, p. 453-466, 1962.

BRANDO-LIMA, A. C.; SALDANHA-GAMA, R. F.; HENRIQUES, M. das G. M. O.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MOREIRA, R. A.; BARJA-FIDALGO, C. Frutalin, a galactose-binding lectin, induces chemotaxis and rearrangement of actin cytoskeleton in human neutrophils: Involvement of tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 208, p. 145-154, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 153, 24 de junho de 2004a**. Disponível em <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=11662&word=>>>. Acesso em: 27 mai. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 306, 10 de dezembro de 2004b**. Disponível em <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=13554>>. Acesso em: 27 mai. 2007.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **RDC nº 358, 04 de maio de 2005**. Disponível em <<http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/legnorbra.htm>>. Acesso em: 08 mai. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Saúde lança campanha de doação de sangue**, 2006. Disponível em <[http://portal.saude.gov.br/portal/aplicações/noticias/noticias\\_detalle.cfm?co\\_seq\\_noticia=28320](http://portal.saude.gov.br/portal/aplicações/noticias/noticias_detalle.cfm?co_seq_noticia=28320)>. Acesso em: 15 set. 2007.

BRETTING, H.; DONADEY, C.; VACELET, J.; JACOBS, G. Investigations on the occurrence of lectins in marine sponges with special regard to some species of the family Axinellidae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 70, p.69-76, 1981a.

BRETTING, H.; JACOBS, G.; DONADEY, C.; VACELET, J. Immunohistochemical studies on the distribution and the function of the D-galactose-specific lectins in the sponge *Axinella polypoides* (Schmidt). **Cell and Tissue Research**, v. 229, p. 551-571, 1983.

BRETTING, H.; KABAT, E. A. Purification and Characterization of the Agglutinins from the Sponge *Axinella polypoides* and a Study of Their Combining Sites. **Biochemistry**, v. 15, n. 15, p. 3228-3236, 1976.

BRETTING, H.; KABAT, E. A.; LIAO, J.; PEREIRA, M. E. A. Purification and Characterization of the Agglutinins from the Sponge *Aaptos papillata* and a Study of Their Combining Sites. **Biochemistry**, v. 15, n. 23, p. 5029-5038, 1976.

BRETTING, H.; KALTHOFF, H.; FEHR, S. Studies on the Relationship between Lectins from *Axinella polypoides* Agglutinating Bacteria and Human Erythrocytes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 32, p. 151-157, 1978.

BRETTING, H.; KÖNIGSMANN, K. Investigations on the lectin-producing cells in the sponge *Axinella polypoides* (Schmidt). **Cell and Tissue Research**, v. 201, p. 487-497, 1979.

BRETTING, H.; PHILLIPS, S. G.; KLUMPART, H. J.; KABAT, E. A. A Mitogenic Lactose-Binding Lectin from the Sponge *Geodia cydonium*. **The Journal of Immunology**, v. 127, n. 4, p. 1652-1658, 1981b.

BROCKHAUSEN, I.; SCHUTZBACH, J.; KUHNS, W. Glycoproteins and their relationship to human disease. **Acta Anatomica**, v. 161, p. 36-78, 1998.

BROCKHAUSEN, I.; YANG, J.-M.; BURCHELL, J.; WHITEHOUSE, C.; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. **European Journal of Biochemistry**, v. 233, p. 607-617, 1995.

BROOKS, S. A.; CARTER, T. M. *N*-acetylgalactosamine, *N*-acetylglucosamine and sialic acid expression in primary breast cancer. **Acta Histochemica**, v. 103, p. 37-51, 2001.

BROOKS, S. A.; HALL, D. M. S. Investigations into the potential role of aberrant *N*-acetylgalactosamine glycans in tumour cell interactions with basement membrane components. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 19, p. 487-493, 2002.

BROOKS, S. A.; HALL, D. M. S.; BULEY, I. GalNAc glycoprotein expression by breast cell lines, primary breast cancer and normal breast epithelial membrane. **British Journal of Cancer**, v. 85, p. 1014-1022, 2001.

BROOKS, S. A.; LEATHEM, A. J. C. Expression of alpha-GalNAc glycoproteins by breast cancers. **British Journal of Cancer**, v. 71, p. 1033-1038, 1995.

BROOKS, S. A.; WILKINSON, D. Validation of a simple avidin-biotin detection method for *Helix pomatia* lectin (HPA) binding as a prognostic marker in cancer. **Acta Histochemica**, v. 105, n. 3, p. 205-212, 2003.

BROWN, J. C.; HUNT, R. C. Lectins. **International Review of Cytology**, v. 52, p. 277-349, 1978.

BRUEHL, R. E.; SPRINGER, T. A.; BAINTON, D. Quantitation of L-selectin distribution on human leukocyte microvilli by immunogold labeling and electron microscopy. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, n. 8, p. 835-844, 1996.

BUCK, F.; LUTH, C.; STRUPAT, K.; BRETTEING, H. Comparative investigations on the amino-acid sequences of different isolectins from the sponge *Axinella polypoides* (Schmidt). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1159, p. 1-8, 1992.

BUCK, F.; SCHULZE, C.; BRELOER, M.; STRUPAT, K.; BRETTEING, H. Amino acid sequence of the D-galactose binding lectin II from the sponge *Axinella polypoides* (Schmidt) and identification of the carbohydrate binding site in lectin II and related lectin I. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 121, p. 153-160, 1998.

BURCHELL, J.; POULSOM, R.; HANBY, A.; WHITEHOUSE, C.; COOPER, L.; CLAUSEN, H.; MILES, D.; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. An  $\alpha$ 2,3 sialyltransferase (ST3Gal I) is elevated in primary breast carcinomas. **Glycobiology**, v. 9, p. 1307-1311, 1999.

CALVETE, J. J.; SANTOS, C. F.; MANN, K.; GRANGEIRO, T. B.; NIMTZ, M.; SOUSA-CAVADA, B. Primary Structure and Post-translational Processing of *Vatairea Macrocarpa* Seed Lectin. **Journal of Protein Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 545-547, 1998.

CALVETE, J. J.; THOLE, H. H.; RAIDA, M.; URBANKE, C.; ROMERO, A.; GRANGEIRO, T. B.; RAMOS, M. V.; ROCHA, I. M. A. da.; GUIMARÃES, F, N.; CAVADA, B. S. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1430, p. 367-375, 1999.

CAMUS, M. L. Recherches experimentales sur une agglutinine produite par la glande de l' albumen chez l' *Helix pomatia*. **Comptes Rendus. Academie des Sciences**, v. 129, p. 233, 1899.

CARTÉ, B. K. Biomedical Potential of Marine Natural Products. **BioScience**, v. 46, n. 4, p. 271-286, 1996.

CARVALHO, H. F. de. Aspectos biológicos e moleculares das lectinas. **Ciência e Cultura**, v. 42, n. 11, p. 884-893, 1990.

CASO, L. V. The effects of phytohemagglutinin on the growth and histochemical properties of mammalian cells in tissue culture. **The Anatomical Record**, v. 162, p. 459-466, 1968.

CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. de; GRANGEIRO, T. B. Primary Structures and Functions of Plant Lectins. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, n. 2, p. 193-201, 1993.

CAVIN, A.; POTTERAT, O.; WOLFENDER, J.-L.; HOSTETTMANN, K.; DYATMYKO, W. Use of On-flow LC/<sup>1</sup>H NMR for the Study of an Antioxidant Fraction from *Orophea enneandra* and Isolation of a Polyacetylene, Lignans, and a Tocopherol Derivative. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1497-1501, 1998.

CHANAS, B.; PAULIK, J. R.; LINDEL, T.; FENICAL, W. Chemical defense of the Caribbean sponge *Agelas clathrodes* (Schmidt). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 208, p. 185-196, 1996.

CHERESH, D. A.; VARKI, A. P.; VARKI, N. M.; STALLCUP, W. B.; LEVINE, J.; REISFELD, R. A. A Monoclonal Antibody Recognizes an *O*-Acylated Sialic Acid in a Human Melanoma-associated Ganglioside. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 7453-7459, 1984.

CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N. V. Lectins, Lectin Genes, and Their Role in Plant Defense. **The Plant Cell**, v. 3, p. 1-9, 1991.

COCHRAN, A. J.; WEN, D.-R.; BERTHIER-VERGNES, O.; BAILLY, C.; DORÉ, J.-F.; BÉRARD, F.; MOULIN, G.; THOMAS, L. Cytoplasmic accumulation of peanut agglutinin-binding glycoconjugates in the cells of primary melanoma correlates with clinical outcome. **Human Pathology**, v. 30, p. 556-561, 1999.

COUTO, R. C.; PEDROSA, T. M. G.; NOGUEIRA, J. M. **Infecção Hospitalar – Epidemiologia, controle, gestão para a qualidade**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1999. 749 p.

CRUZ, P. H.; CAMPOS, E. P.; MARTÍNEZ, L. M.; ORTIZ, B.; MARTÍNEZ, G. Las Lectinas Vegetales como Modelo de Estudio de las Interacciones Proteína-carbohidrato. **Revista de Educación Bioquímica**, v. 24, n. 1, p. 21-27, 2005.

DABELSTEEN, E.; CLAUSEN, H.; MANDEL, U. Carbohydrate changes in squamous cell carcinomas. **Acta pathologica, microbiologica et immunologica Scandinavica**, v. 100, suppl. 27, p. 130-138, 1992.

DAMME, E. J. M. van; BARRE, A.; ROUGÉ, P.; PEUMANS, W. J. Cytoplasmic/nuclear plant lectins : a new story. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 10, p. 484-489, 2004.

DAMME, E. J. M. van; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant Lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.

DANGUY, A.; KISS, R.; PASTEELS, J.-L. Lectins in Histochemistry. **Biological Structures and Morphogenesis**, v. 1, n. 3, p. 93-106, 1988.

DAVID, L.; NESLAND, J. M.; CLAUSEN, H.; CARNEIRO, F.; SOBRINHO-SIMÕES, M. Simple mucin-type carbohydrate antigens (Tn, sialosyl-Tn and T) in gastric mucosa, carcinomas and metástases. **Acta pathologica, microbiologica et immunologica Scandinavica**, v. 100, suppl. 27, p. 162-172, 1992.

DENNIS, J. W.; LAFERTE, S.; WAGHORNE, C.; BREITMAN, M. L.; KERBEL, R. S. Beta 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. **Science**, v. 236, p. 582-584, 1987.

DEVARAJAN, P. V.; SONAVANE, G. S. **Lectin mediated drug delivery systems**, 2003. Disponível em <<http://www.expresspharmapulse.com>>. Acesso em: 18 jul. 2003.

DIAS-BARUFFI, M.; SAKAMOTO, M.; ROSSETTO, S.; VOZÁRI-HAMPE, M. M.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Neutrophil migration and aggregation induced by euphorbin, a lectin from the latex of *Euphorbia milii*, var. *milii*. **Inflammation Research**, v. 49, p. 732-736, 2000.

DODD, R. Y.; MACLENNAN, A. P.; HAWKINS, D. C. Haemagglutinins from marine sponges. **Vox Sanguinis**, v. 15, p. 386-391, 1968.

DOGOVIC, N.; SLADIC, D.; KLJAJIC, Z.; POZNANOVIC, S.; GASIC, M. J. Isolation and partial characterization of a lectin from the marine sponge *Crambe crambe*. **Journal Serbian Chemical Society**, v. 60, n. 2, p. 83-88, 1996.

DRESCH, R. R.; HAESER, A. S.; LERNER, C.; MOTHES, B.; VOZÁRI-HAMPE, M. M.; HENRIQUES, A. T. Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porifera) nativas da costa atlântica do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 16-22, 2005.

DRICKAMER, K. **The Genomics Resource for Animal Lectins**. London, 2006. Disponível em <<http://www.imperial.ac.uk/research/animallelectins/>>. Acesso em: 25 jan. 2007.

DRICKAMER, K. Two Distinct Classes of Carbohydrate-recognition Domains in Animal Lectins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 20, p. 9557-9560, 1988.

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

DUBOIS, M.; GILES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EDELHOCH, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. **Biochemistry**, v. 6, p. 1948-1954, 1967.

ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, p. 462-467, 1997.

ENDO, Y.; MITSUI, K.; MOTIZUKI, M.; TSURUGI, K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eucaryotic ribosomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 12, p. 5908-5912, 1987.

ENDO, Y.; OKA, T.; TSURUGI, K.; FRANZ, H. The mechanism of action of the cytotoxic lectin from *Phoradendron californicum*: the RNA *N*-glycosidase activity of the protein. **FEBS Letters**, v. 248, p. 115-118, 1989.

ENGEL, M.; BACHMANN, M.; SCHRÖDER, H. C.; RINKEVICH, B.; KLJAJIC, Z.; UHLENBRUCK, G.; MÜLLER, W. E. G. A novel galactose and arabinose-specific lectin from the sponge *Pellina semitubulosa*: isolation, characterization and immunobiological properties. **Biochimie**, v. 74, p. 527-537, 1992.

EZPELETA, I.; ARANGO, M. A.; IRACHE, J. M.; STAINMESSE, S.; CHABENAT, C.; POPINEAU, Y.; ORECCHIONI, A.-M. Preparation of *Ulex europaeus* lectin-gliadin nanoparticle conjugates and their interaction with gastrointestinal mucus. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 191, p. 25-32, 1999.

FAPESP/USP, BARREIRA, M. C. R.; GOLDMAN, M. H. de S.; Silva, L. L. da; CASTELO, A.; OLIVEIRA, R. S. de; BARUFFI, M.; MACHADO, J. B. **Lectina KM+ Recombinante para Uso Farmacêutico**. Int. Cl. A61K 38/16; A61P 17/02; A61P 31/04; A61P 31/12; A61P 33/02. B.R. n. PI0301547-5 19 mai. 2003.

FENLON, S.; ELLIS, I. D.; BELL, J.; TODD, J. H.; ELSTON, C. W.; BLAMEY, R. W. *Helix pomatia* and *Ulex europeus* lectin binding in human breast carcinoma. **The Journal of Pathology**, v. 152, p. 169-176, 1987.

FERNANDES, B.; SAGMAN, U.; AUGER, M.; DEMETRIO, M.; DENNIS, J. W.  $\beta$ -1-6 Branched Oligosaccharides as a Marker of Tumor Progression in Human Breast and Colon Neoplasia. **Cancer Research**, v. 51, p. 718-723, 1991.

FINNEY, D. J. **Statistical method in biological assay**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Griffin, 1971, 668 p.

FLETCHNER, S.; NOGUCHI, H. Snake venom in relation to haemolysis, bacteriolysis, and toxicity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 6, p. 277-301, 1902.

GABIUS, H.-J. Animal lectins. **European Journal of Biochemistry**, v. 243, p. 543-576, 1997.

GABIUS, H.-J. Cell surface glycans: the why and how of their functionality as biochemical signals in lectin-mediated information transfer. **Critical Reviews in Immunology**, v. 26, n. 1, p. 43-80, 2006.

GABIUS, H.-J.; ANDRÉ, S.; KALTNER, H.; SIEBERT, H.-C. The sugar code: functional lectinomics. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 165-177, 2002.

GABIUS, H.-J.; ENGELHARDT, R.; REHM, S.; BARONDES, S. H.; CRAMER, F. Presence and relative distribution of three endogenous  $\beta$ -galactoside-specific lectins in different tumor types of rat. **The Cancer Journal**, v. 1, p. 19-22, 1986.

GABIUS, S.; KAYSER, K.; BOVIN, N. V.; YAMAZAKI, N.; KOJIMA, S.; KALTNER, H.; GABIUS, H.-J. Endogenous lectins and neoglycoconjugates: a sweet approach to tumor diagnosis and targeted drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 42, p. 250-261, 1996.

GAINO, E.; MANCONI, R.; PRONZATO, R. Organizational plasticity as a successful conservative tactics in sponges. **Animal Biology**, v. 4, p. 31-43, 1995.

GAINO, E.; REBORA, M. Ability of mobile cells of the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis* (Porifera, Demospongiae) to digest diatoms. **Italian Journal of Zoology**, v. 70, p. 17-22, 2003.

GENAUD, L.; GUILLOT, J.; BÉTAIL, G.; COULET, M. Purification of lectins from *Ricinus communis* by combination of affinity and ion-exchange chromatography and characterization of the isolated proteins. **Journal of Immunological Methods**, v. 49, p. 323-332, 1982.

GEORGE, W. C.; WILSON, H. van P. Sponges of Beaufort (N. C.) Harbor and Vicinity. **Bulletin of the Bureau of Fisheries**, v. 36, p. 130-179, 1919.

GHOSH, S.; MANDAL, D. K. Kinetic stability plays a dominant role in the denaturant-induced unfolding of *Erythrina indica* lectin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 1021-1028, 2006.

GISBERGEN, K. P. J. M. van; AARNOUDSE, C. A.; MEIJER, G. A.; GEIJTENBEEK, T. B. H.; KOOYK, Y. van. Dendritic Cells Recognize Tumor-Specific Glycosylation of Carcinoembryonic Antigen on Colorectal Cancer Cells through Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Nonintegrin. **Cancer Research**, v. 65, p. 5935-5944, 2005.

GRAHAM JR., R. C.; KARNOVSKY, M. J. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 14, n. 4, p. 291-302, 1966.

GRANGEIRO, T. B.; SCHRIEFER, A.; CALVETE, J. J.; RAIDÁ, M.; URBANKE, C.; BARRAL-NETO, M.; CAVADA, B. S. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. **European Journal of Biochemistry**, v. 248, p. 43-48, 1997.

GRÜN, C. H.; VLIET, S. J. van; SCHIPHORST, W. E. C. M.; BANK, C. M. C.; MEYER, S.; DIE, I. van; KOOYK, Y. van. One-step biotinylation procedure for carbohydrates to study carbohydrate-protein interactions. **Analytical Biochemistry**, v. 354, p. 54-63, 2006.

GUNDACKER, D.; LEYS, S. P.; SCHRÖDER, H. C.; MÜLLER, I. M.; MÜLLER, W. E. G. Isolation and cloning of a C-type lectin from the hexactinellid sponge *Aphrocallistes vastus*: a putative aggregation factor. **Glycobiology**, v. 11, n. 1, p. 21-29, 2001.

HAJTO, T.; HOSTANSKA, K.; FREI, K.; RORDORF, C.; GABIUS, H.-J. Increased secretion of tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to  $\beta$ -galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. **Cancer Research**, v. 50, n. 1, p. 3322-3326, 1990.

HAJTO, T.; HOSTANSKA, K.; GABIUS, H.-J. Modulatory potency of the  $\beta$ -galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system *in vivo* in rabbits and patients. **Cancer Research**, v. 49, n. 1, p. 4803-4808, 1989.

HAKOMORI, S. Traveling for the glycosphingolipid path. **Glycoconjugate Journal**, v. 17, p. 627-647, 2000.

HAMMARSTRÖM, S. Binding of *Helix pomatia* A Hemagglutinin to Human Erythrocytes and their Cells. Influence of Multivalent Interaction on Affinity. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 2, p. 53-66, 1973.

HAMMARSTRÖM, S.; WESTÖÖ, A.; BJÖRK, I. Subunit structure of *Helix pomatia* - A hemagglutinin. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 1, n. 4, p. 295-309, 1972.

HAMMERSCHMIDT, P. A.; PRATT D. E. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **Journal of Food Science**, v. 43, p. 556-559, 1978.

HANISCH, F.-G.; SAUR, A.; MÜLLER, W. E. G.; CONRAD, J.; UHLENBRUCK, G. Further characterization of a lectin and its *in vivo* receptor from *Geodia cydonium*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 801, p. 388-395, 1984.

HARWOOD, A.; COATES, J. C. A prehistory of cell adhesion. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, p. 470-476, 2004.

HEINRICH, E. L.; WELTY, L. A. Y.; BANNER, L. R.; OPPENHEIMER, S. B. Direct targeting of cancer cells: A multiparameter approach. **Acta Histochemica**, v. 107, p. 335-344, 2005.

HEINY, B.-M.; ALBRECHT, V.; BEUTH, J. Stabilization of quality of life of patients with advanced colorectal carcinoma through standardized mistletoe-lectin-I extract. **Onkologe**, v. 4, p. 35-39, 1998.

HENTSCHEL, U.; USHER, K. M.; TAYLOR, M. W. Marine sponges as microbial fermenters. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology**, v. 55, p. 167-177, 2006.

HERNÁNDEZ, E.; ORTIZ, R.; LÓPEZ, F.; MASSO, F.; MONTAÑO, L. F.; MARTINAGE, A.; ZENTENO, E. Purification and characterization of a galactose-specific lectin from *Psilocybe barrerae*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 1209-1211, 1993.

HIRABAYASHI, J. **Lectin**. Tokyo, 1997. Disponível em <[http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/lectin/LE\\_E.html](http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/lectin/LE_E.html)>. Acesso em: 21 fev. 2007.

HIRABAYASHI, J. KOJIMA, K. **Lectin**. Tokyo, 1997. Disponível em <[http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/lectin/LE\\_E.html](http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/lectin/LE_E.html)>. Acesso em: 25 jan. 2007.

HOLMSKOV, U.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. Collectins and Ficolins: Humoral Lectins of the Innate Immune Defense. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 547-578, 2003.

HOOPER, J. N. A.; CAPON, R. J.; KEENAN, C. P.; PARRY, D. L.; SMIT, N. Chemotaxonomy of marine sponges: families Microcionidae, Raspailiidae, Axinellidae and their relationships with other families in the orders Poecilosclerida and Axinellida (Porifera: Demospongiae). **Invertebrate Taxonomy**, v. 6, p. 261-301, 1992.

HOOPER, J. N. A.; LÉVI, C. Axinellida (Porifera: Demospongiae) from the New Caledonia Lagoon. **Invertebrate Taxonomy**, v. 7, p. 1395-1472, 1993.

HOOPER, J. N. A.; SOEST, R. W. M. van; DEBRENNE, F. **Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges**. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2002. v. 1.

IRAZOQUI, F. J.; VOZARI-HAMPE, M. M.; LARDONE, R. D.; VILLARREAL, M. A.; SENDRA, V. G.; MONTICH, G. G.; TRINDADE, V. M.; CLAUSEN, H.; NORES, G. A. Fine carbohydrate recognition of *Euphorbia milii* lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 336, p. 14-21, 2005.

IRIMURA, T.; DENDA, K.; IIDA, S.-I.; TAKEUCHI, H.; KATO, K. Diverse Glycosylation of MUC1 and MUC2: Potential Significance in Tumor Immunity. **The Journal of Biochemistry**, v. 126, p. 975-985, 1999.

IWANAGA, S.; KAWABATA, S.; MUTA, T. New Types of Clotting Factors and Defense Molecules Found in Horseshoe Crab Hemolymph: Their Structures and Functions. **The Journal of Biochemistry**, v. 123, n. 1, p. 1-15, 1998.

JANSSEN, O.; SCHEFFLER, A.; KABELITZ, D. *In vitro* effects of mistletoe extracts and mistletoe lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis). **Drug Research**, v. 43, p. 1221-1227, 1993.

JOHNSON, H. M. Human blood group A<sub>1</sub> specific agglutinin of the butter clam *Saxidomus giganteus*. **Science**, v. 146, p. 548, 1964.

JONSSON, B. **Acta pathologica et microbiologica Scandinavica**, suppl. 54, p. 456-464, 1944.

JORGENSEN, C. S.; HEEGAARD, N. H. H.; HOLM, A.; HOJRUP, P.; HOUEN, G. Polypeptide binding properties of the chaperone calreticulin. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 2945-2954, 2000.

JORGENSEN, T.; BERNER, A.; KAALHUS, O.; TVETER, K. J.; DANIELSEN, H. E.; BRYNE, M. Up-Regulation of the Oligosaccharide Sialyl Lewis<sup>x</sup>: A New Prognostic Parameter in Metastatic Prostate Cancer. **Cancer Research**, v. 55, p. 1817-1819, 1995.

KAKEJI, Y.; TSUJITANI, S.; MORI, M.; MAEHARA, Y.; SUGIMACHI, K. *Helix pomatia* binding activity is a predictor of survival time for patients with gastric carcinoma. **Cancer**, v. 68, p. 2438-2442, 1991.

KALTNER, H.; STIERSTORFER, B. Animal Lectins as Cell Adhesion Molecules. **Acta Anatomica**, v. 161, p. 162-179, 1998.

KAMIYA, H.; MURAMOTO, K.; GOTO, R. Purification and characterization of a lectin from a marine sponge *Halichondria panicea*. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 56, n. 7, p. 1159, 1990.

KAMIYA, H.; MURAMOTO, K.; HOSHINO, T.; RAJ, U. Isolation and characterization of hemagglutinins from the sponge *Dysidea herbacea*. **Experientia**, v. 41, p. 1201-1202, 1985.

KAMIYA, H.; MURAMOTO, K.; HOSHINO, T.; YAMAZAKI, M.; RAJ, U. A hemagglutinin in the sponge *Phyllospongia foliascens*: isolation and characterization. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 52, n. 12, p. 2205, 1986.

KAWABATA, S.; IWANAGA, S. Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 23, p. 391-400, 1999.

KAWABATA, S.; NAGAYAMA, R.; HIRATA, M.; SHIGENAGA, T.; AGARWALA, K. L.; SAITO, T.; CHO, J.; NAKAJIMA, H.; TAKAGI, T.; IWANAGA, S. Tachycitin, a Small Granular Component in Horseshoe Crab Hemocytes, Is an Antimicrobial Protein with Chitin-Binding Activity. **The Journal of Biochemistry**, v. 120, p.1253-1260, 1996.

KAWAGISHI, H.; YAMAWAKI, M.; ISOBE, S.; USUI, T.; KIMURA, A.; CHIBA, S. Two Lectins from the Marine Sponge *Halichondria okadai*. An *N*-acetyl-sugar-specific lectin (Hol-I) and *N*-acetyllactosamine-specific lectin (Hol-II). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 2, p. 1375-1379, 1994.

KENNEDY, J. F.; PALVA, P. M. G.; CORELLA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230, 1995.

KIENLE, G. S.; BERRINO, F.; BUSSING, A.; PORTALUPI, E.; ROSENZWEIG, S.; KIENE, H. Mistletoe in cancer - a systematic review on controlled clinical trials. **European Journal of Medical Research**, v. 8, p. 109-119, 2003.

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

KILPATRICK, D. C. **Handbook of Animal Lectins - Properties and Biomedical Applications**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000. 468 p.

KILPATRICK, D. C.; YEOMAN, M. M. Purification of the lectin from *Datura stramonium*. **Biochemical Journal**, v. 175, p. 1151-1153, 1978.

KIM, B.-Y.; JEONG, J. H.; PARK, K.; KIM, J.-D. Bioadhesive interaction and hypoglycemic effect of insulin-loaded lectin-microparticle conjugates in oral insulin delivery system. **Journal of Controlled Release**, v. 102, p. 525-538, 2005.

KOCOUREK, J.; FREED, D. L. J. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. St. Louis: Sigma Chemical Company, 1990. v. 7.

KOJIMA, S.; JAY, M. Application of lectins to tumor imaging radiopharmaceuticals. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 12, p. 385-389, 1986.

KONNO, A.; HOSHINO, Y.; TERASHIMA, S.; MOTOKI, R.; KAWAGUCHI, T. Carbohydrate expression profile of colorectal cancer cells is relevant to metastatic pattern and prognosis. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 19, p. 61-70, 2002.

KULKARNI, G. V.; LEE, W.; SETH, A.; McCULLOCH, C. A. G. Role of mitochondrial membrane potential in concanavalin A-induced apoptosis in human fibroblasts. **Experimental Cell Research**, v. 245, p. 170-178, 1998.

LAACK, E.; NIKBAKHT, H.; PETERS, A.; KUGLER, C.; JASIEWICZ, Y.; EDLER, L.; HOSSFELD, D. K.; SCHUMACHER, U. Lectin Histochemistry of Resected Adenocarcinoma of the Lung. *Helix pomatia* Agglutinin Binding Is an Independent Prognostic Factor. **American Journal of Pathology**, v. 160, n. 3, p. 1001-1008, 2002.

LAEMMLI, J. F. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAVELLE, E. C. Lectins and microparticles for enhanced oral vaccination. **Methods**, v. 38, p. 84-89, 2006.

LEERAPUN, A.; SURAVARAPU, S. V.; BIDA, J. P.; CLARK, R. J.; SANDERS, E. L.; METTLER, T. A.; STADHEIM, L. M.; ADERCA, I.; MOSER, C. D.; NAGORNEY, D. M.; LARUSSO, N. F.; GROEN, P. C. de; NARAYANAN-MENON, K. V.; LAZARIDIS,

K. N.; GORES, G. J.; CHARLTON, M. R.; ROBERTS, R. O.; THERNEAU, T. M.; KATZMANN, J. A.; ROBERTS, L. R. The utility of lens culinaris agglutinin-reactive  $\alpha$ -fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: evaluation in a United States referral population. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, p. 394-402, 2007.

LEHR, C.-M. Lectin-mediated drug delivery: The second generation of bioadhesives. **Journal of Controlled Release**, v. 65, p. 19-29, 2000.

LENARTZ, D.; DOTT, U.; MENZEL, J.; SCHIERHOLZ, J. M.; BEUTH, J. Survival of glioma patients after complementary treatment with galactoside-specific lectin from mistletoe. **Anticancer Research**, v. 20, p. 2073-2076, 2000.

LERNER, C. B. Esponjas da Ilha da Galé, Reserva Marinha Biológica do Arvoredo, Santa Catarina, Brasil (Porifera; Demospongiae). **Biociências**, v. 4, n. 2, p. 101-129, 1996.

LERNER, C. B. **Inventariamento da Fauna de Poríferos da Costa do Estado de Santa Catarina**. 2001. 239 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Departamento de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

LESCAR, J.; SANCHEZ, J.-F.; AUDFRAY, A.; COLL, J.-L.; BRETON, C.; MITCHELL, E. P.; IMBERTY, A. Structural basis for recognition of breast and colon cancer epitopes Tn antigen and Forssman disaccharide by *Helix pomatia* lectin. **Glycobiology**, v. 17, p. 1077-1083, 2007.

LIENER, I. E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. **The Lectins – Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine**. Orlando: Academic Press, 1986. 600 p.

LIRA, S. P. de; SELEGHIM, M. H. R.; WILLIAMS, D. E.; MARION, F.; HAMILL, P.; JEAN, F.; ANDERSEN, R. J.; HAJDU, E.; BERLINCK, R. G. S. A SARS-coronavirus 3CL protease inhibitor isolated from the marine sponge *Axinella cf. corrugata*: Structure elucidation and synthesis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 440-443, 2007.

LIS, H.; SHARON, N. Affinity Chromatography for the Purification of Lectins. **Journal of Chromatography**, v. 215, p. 361-372, 1981.

LIU, J.; XU, X.; LIU, J.; BALZARINI, J.; LUO, Y.; KONG, Y.; LI, J.; CHEN, F.; DAMME, E. van; BAO, J. A novel tetrameric lectin from *Lycoris aurea* with four mannose binding sites per monomer. **Acta Biochimica Polonica**, v. 54, n. 1, p. 159-166, 2007.

LIU, Y.; ENDO, Y.; IWAKI, D.; NAKATA, M.; MATSUSHITA, M.; WADA, I.; INOUE, K.; MUNAKATA, M.; FUJITA, T. Human M-Ficolin Is a Secretory Protein That Activates the Lectin Complement Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 175, p. 3150-3156, 2005.

- LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 198-208, 2002.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MARGOT, H.; ACEBAL, C.; TORIL, E.; AMILS, R.; PUENTES, J. L. F. Consistent association of crenarchaeal Archaea with sponges of the genus *Axinella*. **Marine Biology**, v. 140, p. 739-745, 2002.
- MATSUMOTO, I.; OSAWA, T. Purification and Characterization of a *Cytisus*-type Anti-H(O) Phytohemagglutinin from *Ulex europaeus* Seeds. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 140, p. 484-491, 1970.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: a Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-34, 1982.
- MIARONS, P. B.; FRESNO, M. Lectins from Tropical Sponges. Purification and Characterization of Lectins from Genus *Aplysina*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29283-29289, 2000.
- MICUCCI, H. A.; CAMPS, E. Lectinas: Obtención, estrutura química, propiedades y aplicaciones diagnósticas y farmacológicas. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 6, n. 1, p. 35-54, 1987.
- MITCHELL, B. S.; BROOKS, S. A.; LEATHEM, A. J. C.; SCHUMACHER, U. Do HPA and PHA-L have the same binding pattern in metastasizing human breast and colon cancers? **Cancer Letters**, v. 123, p. 113-119, 1998.
- MODY, R.; JOSHI, S.; CHANEY, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 33, p. 1-10, 1995.
- MONKS, N. R.; LERNER, C.; HENRIQUES, A. T.; FARIAS, F. M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; SUYENAGA, E. S.; ROCHA, A. B. da; SCHWARTSMANN, G.; MOTHES, B. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 281, p. 1-12, 2002.
- MONZO, A.; BONN, G. K.; GUTTMAN, A. Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 423-432, 2007.
- MOURA, R. M.; QUEIROZ, A. F. S.; FOOK, J. M. S. L. L.; DIAS, A. S. F.; MONTEIRO, N. K. V.; RIBEIRO, J. K. C.; MOURA, G. E. D. D.; MACEDO, L. L. P.; SANTOS, E. A.; SALES, M. P. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 145, p. 517-523, 2006.

MÜLLER, W. E. G. Origin of metazoan adhesion molecules and adhesion receptors as deduced from cDNA analyses in the marine sponge *Geodia cydonium*: a review. **Cell and Tissue Research**, v. 289, p. 383-395, 1997.

MÜLLER, W. E. G. Review: How was metazoan threshold crossed? The hypothetical Urmetazoa. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 129, p. 433-460, 2001.

MÜLLER, W. E. G.; BLUMBACH, B.; MÜLLER, I. M. Evolution of the Innate and Adaptive Immune Systems. Relationships between Potential Immune Molecules in the Lowest Metazoan Phylum (Porifera) and Those in Vertebrates. **Transplantation**, v. 68, n. 9, p. 1215-127, 1999.

MÜLLER, W. E. G.; CONRAD, J.; PONDELJAK, V.; STEFFEN, R.; ZAHN, R. K. Electron microscopical characterization of sponge aggregation factors. **Tissue and Cell**. v. 14, n. 2, p. 219-223, 1982.

MÜLLER, W. E. G.; CONRAD, J.; SCHRÖDER, C.; ZAHN, R. K.; KURELEC, B.; DREESBACH, K.; UHLENBRUCK, G. Characterization of the Trimeric, Self-Recognizing *Geodia cydonium* Lectin I. **European Journal of Biochemistry**, v. 133, p. 263-267, 1983.

MÜLLER, W. E. G.; KORZHEV, M.; LE PENNEC, G.; MÜLLER, I. M.; SCHRÖDER, H. C. Origin of metazoan stem cell system in sponges: first approach to establish the model (*Suberites domuncula*). **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 369-379, 2003.

MURICY, G.; HAJDU, E. **Porifera Brasilis – guia de identificação das esponjas marinhas mais comuns do sudeste do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2006.

MURICY, G.; HAJDU, E.; ARAUJO, F. V.; HAGLER, A. N. Antimicrobial activity of Southwestern Atlantic shallow-water marine sponges (Porifera). **Scientia Marina**, v. 57, n. 4, p. 427-432, 1993.

MURICY, G.; MORAES, F. Marine sponges of Pernambuco State, NE Brazil. **Revista Brasileira de Oceanografia**, v. 46, n. 2, p. 213-217, 1998.

MUSTAC, E.; MELATO, M.; SASSO, F.; VALKOVIC, T.; BOTTIN, C.; JONJIC, N. The lectin-binding sites for peanut agglutinin in invasive breast ductal carcinomas and their role as a prognostic factor. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 122, p. 693-697, 1996.

NAISBETT, B.; WOODLEY, J. The potential use of tomato lectin for oral drug delivery: 3. Bioadhesion *in vivo*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 114, p. 227-236, 1995.

NEUMANN, D.; LEHR, C.-M.; LENHOF, H.-P.; KOHLBACHER, O. Computational modeling of the sugar-lectin interaction. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 437-457, 2004.

NEWBOLD R. W.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W.; PAWLIK, J. R. Antimicrobial activity of caribbean sponge extracts. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 19, p. 279-284, 1999.

NICOLSON, G. L. The interactions of lectins with animal cell surfaces. **International Review of Cytology**, v. 39, p. 89-190, 1974.

NOGUCHI, H. On the multiplicity of serum haemagglutinins of cold blooded animals. **Zentralblatt fuer Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten, und Hygiene. Abteilung 1 Originale**, v. 34, p. 286-288, 1903.

NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in culture of animal and human leukocytes. **Cancer Research**, v. 20, p. 462-466, 1960.

OGAWA, H.; INOUE, M.; TANIZAWA, O.; MIYAMOTO, M.; SAKURAI, M. Altered expression of sialyl-Tn, Lewis antigens and carcinoembryonic antigen between primary and metastatic lesions of uterine cervical cancers. **Histochemistry**, v. 97, p. 311-317, 1992.

O'KEEFE, B. R.; BEUTLER, J. A.; CARDELLINA, J. H.; GULAKOWSKI, R. J.; KREPPS, B. L.; MCMAHON, J. B.; SOWDER, R. C.; HENDERSON, L. E.; PANNEL, L. K.; POMPONI, S. A.; BOYD, M. R. Isolation and characterization of niphatevirin, a human-immunodeficiency-virus-inhibitory glycoprotein from the marine sponge *Niphates erecta*. **European Journal of Biochemistry**, v. 245, p. 47-53, 1997.

OLSNES, S.; HEIBERG, R.; PIHL, A. Inactivation of eucaryotic ribosomes by the toxic plant proteins abrin and ricin. **Molecular Biology Reports**, v. 1, p. 15-20, 1973.

OPRIC, M. M.; POZNANOVIC, S.; KLJAJIC, Z.; SLADIC, D.; PUPIC, G.; PERUNOVIC, B.; GASIC, M. J. Labelling of breast carcinoma, thyroid carcinoma and melanoma with manno- and galacto-specific lectins from marine invertebrates. **European Journal of Histochemistry**, v. 40, p. 211-218, 1996.

PAJIC, I.; KLJAJIC, Z.; DOGOVIC, N.; SLADIC, D.; JURANIC, Z.; GASIC, M. J. A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 132, p. 213-221, 2002.

PAL, S.; GHOSH, S.; MANDAL, C.; KOHLA, G.; BROSSMER, R.; ISECKE, R.; MERLING, A.; SCHAUER, R.; SCHWARTZ-ALBIEZ, R.; BHATTACHARYA, D. K.; MANDAL, C. Purification and characterization of 9-O-acetylated sialoglycoproteins from leukemic cells and their potential as immunological tool for monitoring childhood acute lymphoblastic leukemia. **Glycobiology**, v. 14, p. 859-870, 2004.

PAWLIK, J. R.; CHANAS, B.; TOONEN, R. J.; FENICAL, W. Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical deterrence. **Marine Ecology Progress Series**, v. 127, p. 183-194, 1995.

PERACAULA, R.; TABARÉS, G.; ROYLE, L.; HARVEY, D. J.; DWEK, R. A.; RUDD, P. M.; DE LLORENS, R. Altered glycosylation pattern allows the distinction between prostate-specific antigen (PSA) from normal and tumor origins. **Glycobiology**, v. 13, p. 457-470, 2003.

PETTIT, G. R. ; COLLINS, J. C.; HERALD, D. L.; DOUBEK, D. L.; BOYD, M. R.; SCHMIDT, J. M.; HOOPER, J. N. A.; TACKETT, L. P. Isolation and structure of cribrostatins 1 and 2 from the blue marine sponge *Cribrochalina* sp. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 70, p.1170-1175, 1992.

PEUMANS, W. J. **Inducible plant lectins: A new class of lectins with a specific role in the plant?** In: Interlec, 20, 2002, Copenhagen. Disponível em <<http://plab.ku.dk/tcbh/interlec20.htm>>. Acesso em: 25 ago. 2003.

PEUMANS, W. J.; DAMME, E. J. M. van. Lectins as Plant Defense Proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347-352, 1995.

PHILLIPS, S. G.; BRETTING, H.; KABAT, E. A. A Galactose-Inhibitible Mitogen for Human Lymphocytes from the Sponge *Axinella polypoides*. **The Journal of Immunology**, v. 117, n. 4, p. 1226-1232, 1976.

PONCHEL, G.; IRACHE, J-M. Specific and non-specific bioadhesive particule systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 34, p. 191-219, 1998.

PRESTON, C. M.; WU, K. Y.; MOLINSKI, T. F.; DELONG, E. F. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 6241-6246, 1996.

QUEIROZ, A. F. S.; MOURA, R. M.; RIBEIRO, J. K. C.; LYRA, I. L.; CUNHA, D. C. S.; SANTOS, E. A.; SALES, M. P. de. Pro-inflammatory effect in mice of CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 147, p. 216-221, 2008.

RAMOS, M. V.; TEIXEIRA, C. R.; LOPES, R. O. M; CAVADA, B. S. Evaluation of the proteolytic susceptibility of three lectins from subtribe *Diocleinae* using enzymatic action, heat treatment and molecular modeling. **Journal of Food Biochemistry**, v. 23, p. 559-570, 1999.

RANGEL, M.; SANCTIS, B. de; FREITAS, J. C. de; POLLATO, J. M.; GRANATO, A. C.; BERLINCK, R. G. S.; HAJDU, E. Cytotoxic and neurotoxic activities in extracts of marine sponges (Porifera) from Southeastern Brazilian Coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 262, p. 31-41, 2001.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae pv mori*. **Plant Science**, v. 160, p. 739-744, 2001.

REDONDO, P. de A. G.; NAKAMURA, C. V.; SOUZA, W. de; MORGADO-DÍAZ, J. A. Differential Expression of Sialic Acid and *N*-acetylgalactosamine Residues on the Cell Surface of Intestinal Epithelial Cells According to Normal or Metastatic Potential. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 52, n. 5, p. 629-640, 2004.

REISNER, Y.; KIRKPATRICK, D.; DUPONT, B.; KAPOOR, N.; POLLACK, M. S.; GOOD R. A. Transplantation for acute leukaemia with HLA-A and B nonidentical

parental marrow cells fractionated with soybean agglutinin and sheep red blood cells. **The Lancet**, v. 2, p. 327-331, 1981.

RENANI, P.; PILLAI, K. R.; HASEENABEEVI, V. M. ; ANKATHIL, R. ; BHATTATHIRI, M. ; NAIR, M. K.; VIJAYAKUMAR, T. Lectin cytochemistry in the exfoliative cytology of uterine cervix. **Neoplasma**, v. 41, p. 39-42, 1994.

RIOS, F. J. B.; CAVADA, B. S.; MEDEIROS, D. A.; MOREIRA, R. A.; VASCONCELOS, L. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Digestibility of plant lectins from *Canavalia*, *Cratylia*, *Dioclea* and *Artocarpus* genera. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, v. 11, p. 277-284, 1996.

ROSEN, S. D.; KAFKA, J. A.; SIMPSON, D. L.; BARONDES, S. H. Discoidin, a Developmentally Regulated, Carbohydrate-Binding Protein in *Dictyostelium discoideum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 9, p. 2554-2557, 1973.

RUOSLAHTI, E. RGD and other Recognition Sequences for Integrins. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 12, p. 697-715, 1996.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996. 1029 p.

SAKUMA, K.; FUJIMOTO, I.; HITOSHI, S.; TANAKA, F.; IKEDA, T.; TANABE, K.; TOYOKUNI, S.; WADA, H.; MIO, T.; MISHIMA, M.; IKENAKA, K. An *N*-glycan structure correlates with pulmonary metastatic ability of cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 340, p. 829-835, 2006.

SANZ, L.; CALVETE, J. J.; MANN, K.; SCHÄFER, W.; SCHMID, E. R.; TÖPFER-PETERSEN, E. The complete primary structure of the boar spermadhesin AQN-1, a carbohydrate-binding protein involved in fertilization. **European Journal of Biochemistry**, v. 205, p. 645-652, 1992.

SASAKI, T.; YAMAZAKI, K.; YAMORI, T.; ENDO, T. Inhibition of proliferation and induction of differentiation of glioma cells with *Datura stramonium* agglutinin. **British Journal of Cancer**, v. 87, p. 918-923, 2002.

SAVAN, R.; ENDO, M.; SAKAI, M. Characterization of a new C-type lectin from common carp *Cyprinus carpio*. **Molecular Immunology**, v. 41, p. 891-899, 2004.

SCHLEPER, C.; DELONG, E. F.; PRESTON, C. M.; FELDMAN, R. A.; WU, K.; SWANSON, R. V. Genomic Analysis Reveals Chromosomal Variation in Natural Populations of the Uncultured Psychrophilic Archaeon *Cenarchaeum symbiosum*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 19, p. 5003-5009, 1998.

SCHRÖDER, H. C.; KLJAJIC, Z.; WEILER, B. E.; GASIC, M.; UHLENBRUCK, G.; KURELEC, B.; MÜLLER, W. E. G. The galactose-specific lectin from the sponge *Chondrilla nucula* displays anti-human immunodeficiency virus activity *in vitro* via stimulation of the (2'-5') oligoadenylate metabolism. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 1, p. 99-105, 1990.

SCHRÖDER, H. C.; USHIJIMA, H.; KRASKO, A.; GAMULIN, V.; THAKUR, N. L.; DIEHL-SEIFERT, B.; MÜLLER, I. M.; MÜLLER, W. E. G. 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, n. 35, p. 32810-32817, 2003.

SCHUMACHER, U.; ADAM, E. Lectin histochemical HPA binding pattern of human breast and colon cancers is associated with metastases formation in SCID mice. **The Histochemical Journal**, v. 29, p. 677-684, 1997.

SCHUMACHER, U.; ADAM, E.; BROOKS, S. A.; LEATHEM, A. J. Lectin-binding Properties of Human Breast Cancer Cell Lines and Human Milk with Particular Reference to *Helix pomatia* Agglutinin. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 43, n. 3, p. 275-281, 1995a.

SCHUMACHER, U.; ADAM, E.; HORNY, H.-P.; DIETL, J. Transplantation of a human ovarian cystadenocarcinoma into severe combined immunodeficient (SCID) mice – formation of metastases without significant alteration of the tumor cell phenotype. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 77, p. 219-227, 1996.

SCHUMACHER, U.; KRETZSCHMAR, H.; BROOKS, S.; LEATHEM, A. *Helix pomatia* lectin binding pattern of brain metastases originating from breast cancers. **Pathology, Research and Practice**, v. 188, p. 284-286, 1992.

SCHUMACHER, K.; SCHNEIDER, B.; REICH, G.; STIEFEL, T.; STOLL, G.; BOCK, P.R.; HANISCH, J.; BEUTH, J. Influence of postoperative complementary treatment with lectin-standardized mistletoe extract on breast cancer patients. A controlled epidemiological multicentric retrolective cohort study. **Anticancer Research**, v. 23, p. 5081-5087, 2003.

SCHUMACHER, U.; STAMOULI, A.; ADAM, E.; PEDDIE, M.; PFÜLLER, U. Biochemical, histochemical and cell biological investigations on the actions of mistletoe lectins I, II and III with human breast cancer cell lines. **Glycoconjugate Journal**, v. 12, p. 250-257, 1995b.

SCISCIOLI, M.; FERRI, D.; LIQUORI, G. E.; LEPORE, E.; SANTARELLI, G. Lectin histochemistry and ultrastructure of microgranular cells in *Cinachyra tarentina* (Porifera, Demospongiae). **Acta Histochemica**, v. 102, p. 219-230, 2000.

SEELENTAG, W. K. F.; LI, W.-P.; SCHMITZ, S.-F. H.; METZGER, U.; AEBERHARD, P.; HEITZ, P. U.; ROTH, J. Prognostic Value of  $\beta$ 1,6-Branched Oligosaccharides in Human Colorectal Carcinoma. **Cancer Research**, v. 58, p. 5559-5564, 1998.

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

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 2004.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: Cell-Agglutinating and Sugar-Specific Proteins. **Science**, v. 177, n. 4053, p. 949-959, 1972.

- SHARON, N.; LIS, H. **Lectins**. Londres/Nova Iorque: Chapman/Hall, 1989. 127 p.
- SHEN, Z.; JACOBS-LORENA, M. Evolution of Chitin-Binding Proteins in Invertebrates. **Journal of Molecular Evolution**, v. 48, p. 341-347, 1999.
- SHIMODAIRA, K.; NAKAYAMA, J.; NAKAMURA, N.; HASEBE, O.; KATSUYAMA, T.; FUKUDA, M. Carcinoma-associated expression of core  $\beta$ -1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferase gene in human colorectal cancer: role of *O*-glycans in tumor progression. **Cancer Research**, v. 57, p. 5201-5206, 1997.
- SHIRASHI, T.; ATSUMI, S.-I.; YATANI, R. Comparative study of prostatic carcinoma bone metastasis among Japanese in Japan and Japanese Americans and Whites in Hawaii. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 324, p. 7-16, 1992.
- SILVA, A. C. da; KRATZ, J. M.; FARIAS, F. M.; HENRIQUES, A. T.; SANTOS, J. dos; LEONEL, R. M.; LERNER, C.; MOTHES, B.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. *In vitro* antiviral activity of marine sponges collected off Brazilian coast. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 1, p. 135-140, 2006.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003. 1102 p.
- SINGH, R.; CAMPBELL, B. J.; YU, L. G.; FERNIG, D. G.; MILTON, J. D.; GOODLAD, R. A.; FITZGERALD, A. J.; RHODES, J. M. Cell surface-expressed Thomsen-Friedenreich antigen in colon cancer is predominantly carried on high molecular weight splice variants of CD44. **Glycobiology**, v. 11, p. 587-592, 2001.
- SINGH, R. S.; TIWARY, A.K.; KENNEDY, J.F. Lectins: Sources, Activities and Applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 145-178, 1999.
- SLADOWSKI, D.; STEER, S. J.; CLOTHIER, R. H.; BALLS, M. An improved MTT assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 57, n. 1-2, p. 203-207, 1993.
- SLIFKIN, M.; DOYLE, R. J. Lectins and Their Application to Clinical Microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, p. 197-218, 1990.
- SMETS, L. A.; BEEK, W. P. van. Carbohydrates of the tumor cell surface. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 738, n. 4, p. 237-249, 1983.
- SOL, F. G. del; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Lectinas. **Investigación y Ciencia**, p. 58-67, 2006.
- STEBBINS, R. C. Filo Porifera: esponjas. In: STORER, T. I.; USINGER, R. L.; STEBBINS, R. C.; NYBAKKEN, J. W. **Zoologia Geral**. 6. ed. São Paulo: Companhia Nacional, 1991. cap. 16, p. 323-332.
- STEUER-VOGT, M. K.; BONKOWSKY, V.; AMBROSCH, P.; SCHOLZ, M.; NEIß, A.; STRUTZ, J.; HENNIG, M.; LENARZ, T.; ARNOLD, W. The effect of an adjuvant mistletoe treatment programme in resected head and neck cancer patients: a randomised controlled clinical trial. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. 23-31, 2001.

STILMARK, P. H. **Über rizin, ein giftiges fermenta us dem samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen.** 1888. Tese (Doutorado) – Universidade de Dorpat (Tartu), Tartu, 1888.

STORER, T. I.; USINGER, R. L.; STEBBINS, R. C.; NYBAKKEN, J. W. **Zoologia Geral.** 6. ed. São Paulo: Companhia Nacional, 1984. 816 p.

SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with Concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, v. 32, n. 2, p. 227-237, 1936.

SUZUKI, H.; KAWAGUCHI, T.; HIGUCHI, M.; SHIO, Y.; FUJII, K.; KANNO, R.; OHISHI, A.; MOTOKI, R.; GOTOH, M. Expression of peanut agglutinin-binding carbohydrates correlates with nodal involvement in human lung adenocarcinoma. **Cancer Letters**, v. 187, p. 215-221, 2002.

SWEARINGEN, D. C.; PAWLIK, J. R. Variability in the chemical defense of the sponge *Chondrilla nucula* against predatory reef fishes. **Marine Biology**, v. 131, n. 4, p. 619-627, 1998.

THIES, A.; BERLIN, A.; BRUNNER, G.; SCHULZE, H.-J.; MOLL, I.; PFÜLLER, U.; WAGENER, C.; SCHACHNER, M.; ALTEVOGT, P.; SCHUMACHER, U. Glycoconjugate profiling of primary melanoma and its sentinel node and distant metastases: implications for diagnosis and pathophysiology of metastases. **Cancer Letters**, v. 248, p. 68-80, 2007.

THIES, A.; MOLL, I.; BERGER, J.; SCHUMACHER, U. Lectin binding to cutaneous malignant melanoma: HPA is associated with metastasis formation. **British Journal of Cancer**, v. 84, p. 819-823, 2001a.

THIES, A.; NUGEL, D.; PFÜLLER, U.; MOLL, I.; SCHUMACHER, U. Influence of mistletoe lectins and cytokines induced by them on cell proliferation of human melanoma cells *in vitro*. **Toxicology**, v. 207, p. 105-116, 2005.

THIES, A.; PFÜLLER, U.; SCHACHNER, M.; HORNY, H.-P.; MOLL, I.; SCHUMACHER, U. Binding of Mistletoe Lectins to Cutaneous Malignant Melanoma: Implications for Prognosis and Therapy. **Anticancer Research**, v. 21, p. 2883-2887, 2001b.

THÖM, I.; SCHULT-KRONEFELD, O.; BURKHOLDER, I.; GOERN, M.; ANDRITZKY, B.; BLONSKI, K.; KUGLER, C.; EDLER, L.; BOKEMEYER, C.; SCHUMACHER, U.; LAACK, E. Lectin histochemistry of metastatic adenocarcinomas of the lung. **Lung Cancer**, v. 56, p. 391-397, 2007.

TÖPFER-PETERSEN, E. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. **Human Reproduction Update**, v. 5, n. 4, p. 314-329, 1999.

TÖPFER-PETERSEN, E.; ROMERO, A.; VARELA, P. F.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; DOSTÁLOVÁ, Z.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Spermadhesins: A new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. **Andrologia**, v. 30, p. 217-224, 1998.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electroforetic transfer of protein from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 176, p. 4350-4354, 1979.

VALENTINER, U.; HALL, D. M. S.; BROOKS, S. A.; SCHUMACHER, U. HPA binding and metastasis formation of human breast cancer cell lines transplanted into severe combined immunodeficient (scid) mice. **Cancer Letters**, v. 219, p. 233-242, 2005.

VALENTINER, U.; PFÜLLER, U.; BAUM, C.; SCHUMACHER, U. The cytotoxic effect of mistletoe lectins I, II and III on sensitive and multidrug resistant human colon cancer cell lines *in vitro*. **Toxicology**, v. 171, p. 187-199, 2002.

VARKI, A.; CUMMINGS, R.; ESKO, J.; FREEZE, H.; HART, G.; MARTH, J. **Essentials of Glycobiology**. Nova Yorque: Cold Spring Harbor Laboratory Spress, 1999. 653 p.

VASTA, G. **Lectinas em moluscos marinos y dulce-acuícolas**. 1978. Tese (Doutorado) – Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, 1978.

VASTA, G. R.; AHMED, H.; ODOM, E. W. Structural and functional diversity of lectin repertoires in invertebrates, protochordates and ectothermic vertebrates. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 14, p. 617-630, 2004.

VASTA, G. R.; AHMED, H.; TASUMI, S.; ODOM, E. W.; SAITO, K. Biological roles of lectins in innate immunity: molecular and structural basis for diversity in self/non-self recognition. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 598, p. 389-406, 2007.

VIJAYAN, M.; CHANDRA, N. Lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, p. 707-714, 1999.

VILLATE, M. L.; PÉREZ, M. D. F.; ALFONSO, A. R. C. Pesquisaje de propiedades antiinflamatorias y analgésicas en extractos de origen marino de Cuba. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 3, n. 2, p. 69-71, 1998.

WAGNER-HÜLSMANN, C.; BACHINSKI, N.; DIEHL-SEIFERT, B.; BLUMBACH, B.; STEFFEN, R.; PANCER, Z.; MÜLLER, W. E. G. A galectin links the aggregation factor to cells in the sponge (*Geodia cydonium*). **Glycobiology**, v. 6, n. 8, p. 785-793, 1996.

WANG, H.; NG, T. B.; OOI, V. E. C.; LIU, W. K. Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 32, p. 365-372, 2000.

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. 722-731, 2007.

WATKINS, W. M.; MORGAN, W. T. J. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. **Nature**, v. 169, p. 825-826, 1952.

WEBSTER, N. S.; NEGRI, A. P.; MUNRO, M. M. H. G.; BATTERSHILL, C. N. Diverse microbial communities inhabit Antarctic sponges. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 288-300, 2004.

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K. Structural Basis of Lectin-Carbohydrate Recognition. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, p. 441-473, 1996.

WELTY, L. A. Y.; HEINRICH, E. L.; GARCIA, K.; BANNER, L. R.; SUMMERS, M. L.; BARESI, L.; METZENBERG, S.; COYLE-THOMPSON, C.; OPPENHEIMER, S. B. Analysis of unconventional approaches for the rapid detection of surface lectin binding ligands on human cell lines. **Acta Histochemica**, v. 107, p. 411-420, 2006.

WESTERMEIER, R. **Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations**. 2<sup>nd</sup> ed. Weinheim: UCH, 1997. 331 p.

WHITEHOUSE, C.; BURCHELL, J.; GSCHMEISSNER, S.; BROCKHAUSEN, I.; LLOYD, K. O.; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. A. Transfected sialyltransferase that is elevated in breast cancer and localizes to the medial/trans-Golgi apparatus inhibits the development of core-2-based O-glycans. **The Journal of Cell Biology**, v. 137, p. 1229-1241, 1997.

WIEDENMAYER, F. **A monograph of the shallow-water sponges of the Western Bahamas**. Basel und Stuttgart: Birkhäuser, 1977. 287 p. (Experientia suppl. 28).

WILSON, D. M.; PUYANA, M.; FENICAL, W.; PAWLIK, J. R. Chemical defense of the caribbean reef sponge *Axinella corrugata* against predatory fishes. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 12, p. 2811-2823, 1999.

WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; SAKULBORIRUG, C. A Lectin from the Bark of the Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*). **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p. 183-187, 1998.

WOODLEY, J. F. Lectins for gastrointestinal targeting – 15 years on. **Journal of Drug Targeting**, v. 7, n. 5, p. 325-333, 2000.

XIONG, C.; LI, W.; LIU, H.; ZHANG, W.; DOU, J.; BAI, X.; DU, Y.; MA, X. A normal mucin-binding lectin from the sponge *Craniella australiensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 143, p. 9-16, 2006.

YIN, Y.-S.; CHEN, D.-W.; QIAO, M.-X.; LU, Z.; HU, H.-Y. Preparation and evaluation of lectin-conjugated PLGA nanoparticles for oral delivery of thymopentin. **Journal of Controlled Release**, v. 116, p. 337-345, 2006.

YU, X.-Q.; KANOST, M. R. *Manduca sexta* lipopolysaccharide-specific immulectin-2 protects larvae from bacterial infection. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 27, p. 189-196, 2003.

ZATTA, P. F.; CUMMINGS, R. D. Lectins and their uses as biotechnological tools. **Biochemical Education**, v. 20, n. 1, p. 2-9, 1992.

ZHANG, N.; PING, Q. N.; HUANG, G. H.; XU, W. F. Investigation of lectin-modified insulin liposomes as carriers of oral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 294, p. 247-259, 2005.

ZHANG, N.; PING, Q.; HUANG, G.; XU, W.; CHENG, Y.; HAN, X. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 327, p. 153-159, 2006.

ZHAO, J.; PATWA, T. H.; QIU, W.; SHEDDEN, K.; HINDERER, R.; MISEK, D. E.; ANDERSON, M. A.; SIMEONE, D. M.; LUBMAN, D. M. Glycoprotein microarrays with multi-lectin detection: unique lectin binding patterns as a tool for classifying normal, chronic pancreatitis and pancreatic cancer sera. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 1864-1874, 2007.

ZIGMOND, S. H.; HIRSCH, J. G. Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 137, p. 387-410, 1973.



*ANEXOS*

*PARECERES DOS MEMBROS DA COMISSÃO EXAMINADORA*



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MATÉRIAS-PRIMAS  
FARMACÊUTICAS

Título: Purificação e caracterização físico-química e biológica da(s) lectina(s) de *Axinella  
corrugata* (ACL-I e ACL-II), imuno-histoquímica da ACL-I e marcação de células  
transformadas

Doutorando: ROGER REMY DRESCH

PARECER

O trabalho é muito interessante pela  
exatidão do material, poucas lectinas são  
descritas em livros, pela relevância  
do tema, purificação e caracterização  
de lectinas e por abordar aplicações  
biológicas para uso medicinal das  
lectinas purificadas. Está bem apresen-  
tada e bem discutida, com resulta-  
do de importância para estudos de  
estruturas de proteínas, bem como  
suas suas aplicações. Apresentação geral  
do trabalho foi excelente e que con-  
firmou a qualidade do Brasil.  
Considerando o exposto acima sou de  
parecer que a Tese está aprovada.

  
Profa. Dr. Maria Tereza dos Santos Correia  
Porto Alegre, 2008.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MATÉRIAS-PRIMAS  
FARMACÊUTICAS

Título: Purificação e caracterização físico-química e biológica da(s) lectina(s) de *Axinella corrugata* (ACL-I e ACL-II), imuno-histoquímica da ACL-I e marcação de células transformadas

Doutorando: ROGER REMY DRESCH

**PARECER**

A tese defendida trata de tema de grande importância dada a possibilidade de utilização das lectinas na medicina. A revisão de literatura é extensa e atualizada. A metodologia é adequada, considerando os objetivos propostos. Os resultados apresentados em 5 capítulos são relevantes e bem discutidos, gerando uma publicação científica em periódico internacional. Assim, considero a tese aprovada pela excelente qualidade do trabalho realizado.

  
Prof. Dr. Carmen Regla Vargas  
Porto Alegre, 31 / março / 2008.



*ARTIGOS PUBLICADOS - PUBLICAÇÃO 1*





## Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porifera) nativas da costa atlântica do Brasil

R.R. Dresch<sup>1</sup>, A.S. Haeser<sup>1</sup>, C. Lerner<sup>2</sup>, B. Mothes<sup>2</sup>, M.M. Vozári-Hampe<sup>3\*</sup>, A.T. Henriques<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil,

<sup>2</sup>Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Museu de Ciências Naturais, Rua Dr. Salvador França 1427, Jardim Botânico, 90690-000, Porto Alegre, RS, Brasil,

<sup>3</sup>Laboratório de Lectinas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil,

<sup>4</sup>Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Produção de Matéria-Prima, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil

**RESUMO:** Extratos aquosos de vinte espécies de esponjas da costa Atlântica brasileira foram testados para verificação da presença de atividade lectínica e atividade hemolítica. Hemaglutinação para eritrócitos humanos e de distintos animais foi evidenciada em 12 dos 20 extratos testados. Os extratos das espécies *Axinella corrugata*, *Chondrilla nucula*, *Chondrosia collectrix*, *Cinachyrella alloclada* e *Guitarra* sp. foram os que apresentaram maior atividade hemaglutinante. Dos doze extratos com atividade hemaglutinante dez tiveram a atividade inibida por um ou mais açúcares e/ou glicoproteínas. A lectina do extrato de *Chondrilla nucula* foi resistente à desnaturação térmica quando aquecida a 100 °C por 60 minutos. Atividade hemolítica foi encontrada apenas nos extratos de *Petromica citrina* e *Acervochalina* sp. As espécies que apresentaram maior potencial para futuros estudos de suas lectinas foram *Axinella corrugata*, *Chondrilla nucula* e *Chondrosia collectrix*, em vista da maior atividade hemaglutinante apresentada por seus extratos, aliada à maior atividade específica.

**Unitermos:** Esponjas, lectinas, atividade hemaglutinante, atividade hemolítica.

**ABSTRACT:** "Detection of lectinic activity and hemolytic activity in extracts of native sponges (Porifera) of atlantic coast of Brazil". Aqueous extracts of twenty species of sea sponges of the Brazilian Atlantic coast were tested with the aim of searching the presence of lectinic and hemolytic activity. Hemagglutinating activity for human erythrocytes and for distinct animals were found in 12 of the 20 tested extracts. The extracts of *Axinella corrugata*, *Chondrilla nucula*, *Chondrosia collectrix*, *Cinachyrella alloclada* and *Guitarra* sp. were the ones that presented highest hemagglutinating activity. Ten of the 12 hemagglutinating extracts had the activity inhibited by one or more sugars or glycoproteins. The lectin from *Chondrilla nucula* was resistant to thermal denaturation when heated up to 100 °C for 60 minutes. Hemolytic activity was only found in the extracts from *Petromica citrina* and *Acervochalina* sp. The species of sea sponges that showed major potential for futures studies of their lectins were *Axinella corrugata*, *Chondrilla nucula* and *Chondrosia collectrix*, due to the highest hemagglutinating activity presented by their extracts, allied to the highest specific activity.

**Keywords:** Sponges, lectins, hemagglutinating activity, hemolytic activity.

### INTRODUÇÃO

A costa brasileira com 8000 Km apresenta uma importante fauna marinha praticamente inexplorada (Berlinck et al., 2004). Dentre os organismos presentes destacam-se as esponjas, um dos animais multicelulares mais simples. Devido à sua prevalência, distribuição e habilidade de sintetizar uma gama de compostos de diferentes classes estruturais, as esponjas tornaram-se uma das fontes mais promissoras de isolamento de novos

metabólitos primários e secundários, dos quais vários com importantes atividades biológicas e fontes potenciais de fármacos para tratamento de diversas doenças humanas (Berlinck et al., 2004; Carté, 1996).

Foi o isolamento do C-nucleosídeo da esponja *Cryptotheca crypta* há quatro décadas que forneceu a base para a síntese de citarabina, o primeiro agente anticâncer derivado de fonte marinha a ser desenvolvido para uso clínico em casos de linfoma e leucemia (Cragg; Newman, 1999). O'Keefe et al. (1997) isolaram uma nova proteína

Tabela 1. Avaliação da atividade hemaglutinante dos extratos aquosos de esponjas para eritrócitos de diferentes espécies animais

Espécies testadas	Atividade hemaglutinante específica (UH/mg de proteína)								
	*Coelho	*Hum A	*Hum AB	*Hum O	*Hum B	*Cão	*Ovelha	*Cavalo	*Boi
<i>Acervochalina</i> sp. (PB) MCN 4266	103,22	103,22	51,61	25,81	25,81	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Agelas</i> sp. (PB) MCN 4269	1,34x10 <sup>3</sup>	2,69x10 <sup>3</sup>	83,96	21,00	10,49	335,87	0,00	335,87	0,00
<i>Axinella corrugata</i> (SC) MCN 3772	1,74x10 <sup>5</sup>	681,66	1,09x10 <sup>3</sup>	5,45x10 <sup>3</sup>	5,45x10 <sup>3</sup>	2,18x10 <sup>4</sup>	340,81	0,00	170,40
<i>Chondrosia collectrix</i> (PE) MCN 4656	0,00	615,38	307,69	2,46x10 <sup>3</sup>	307,69	0,00	0,00	7,88x10 <sup>4</sup>	0,00
<i>Chondrilla nucula</i> (PB) MCN 5139	5,42x10 <sup>5</sup>	3,39x10 <sup>5</sup>	3,39x10 <sup>5</sup>	6,67x10 <sup>3</sup>	6,67x10 <sup>3</sup>	5,42x10 <sup>4</sup>	137,93	8,83x10 <sup>3</sup>	275,86
<i>Cinachyrella alloclada</i> (PE) MCN 4659	1,01x10 <sup>5</sup>	316,04	79,01	632,10	5,06x10 <sup>3</sup>	632,10	39,51	1,27x10 <sup>3</sup>	79,01
<i>Guitarra</i> sp1. (SC)	9,62x10 <sup>3</sup>	9,62x10 <sup>3</sup>	600,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Guitarra</i> sp2. (SC)	0,00	0,00	29,21	58,63	58,63	229,14	0,00	469,03	0,00
<i>Guitarra sepia</i> (SC) MCN 3413	2,42x10 <sup>3</sup>	75,47	0,00	0,00	75,47	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Haliclona tubifera</i> (SC) MCN 3771	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NT	NT	NT	NT
<i>Monanchora arbuscula</i> (PB) MCN 4268	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Mycale arcuiris</i> (SC) MCN 3984	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Niphates</i> sp. (PB) MCN 4263	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Petromica citrina</i> (SC) MCN 3395	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Placospongia carinata</i> (PE) MCN 4658	1,58x10 <sup>3</sup>	98,76	197,53	395,06	395,06	790,12	0,00	3,16x10 <sup>3</sup>	0,00
<i>Polymastia janeirensis</i> (SC) MCN 3569	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Pseudaxinella reticulata</i> (SC) MCN 3425	2,20x10 <sup>3</sup>	2,20x10 <sup>3</sup>	2,20x10 <sup>3</sup>	2,20x10 <sup>3</sup>	2,20x10 <sup>3</sup>	8,81x10 <sup>3</sup>	NT	NT	NT
<i>Raspailia</i> sp. (SC) MCN 4004	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	735,97	1,47x10 <sup>3</sup>	0,00
<i>Suberitidae</i> (PB) MCN 4262	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Tedania ignis</i> (SC) MCN 3397	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

\*Suspensão de eritrócitos a 2% em PBS SC= Santa Catarina PB= Paraíba PE=Pernambuco NT= não testado  
MCN= número de depósito junto ao Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do RS

a partir de extratos aquosos da esponja marinha *Niphates erecta*, com atividade contra o vírus da Imunodeficiência Humana e que denominaram nifatevirina. Uma proteína com atividade hemolítica, ATPásica e neurotóxica, denominada de suberitina, foi isolada de outra espécie, a *Suberites domuncula* (Cariello; Zanetti, 1979). Monks et al. (2002), trabalhando com extratos orgânicos e aquosos de 10 espécies de esponjas marinhas coletadas na costa do Estado de Santa Catarina, constataram atividade citotóxica em 4 extratos orgânicos, atividade antimicrobiana em 2 extratos aquosos e um orgânico e atividade antiquimiotáxica em 6 extratos aquosos.

Lectinas, um tipo especial de proteínas ou glicoproteínas capazes de reconhecer e ligar reversivelmente e com certa especificidade carboidratos livres ou complexados (Peumans, 2002), foram descritas em esponjas marinhas, pela primeira vez, por Doods, Maclennan e Hawkin (1968) *apud* Kilpatrick (2000) em extratos de *Cliona celata* e em espécies do gênero *Axinella*. Nestes organismos, as lectinas teriam o papel de transportadoras de glicídios, de substâncias importantes para o crescimento e nutrição do animal, de receptores para agregação celular, de substâncias de defesa contra bactérias e parasitas, dentre outros (Buck et al., 1992; Kilpatrick, 2000; Micucci; Camps, 1987). O interesse pelas lectinas é devido às várias atividades biológicas que as mesmas apresentam, como hemaglutinante (Sepcic et al., 1997), mitogênica (Engel et al., 1992), citotóxica

(Pajic et al., 2002), hemolítica (Hatakeyama; Nagatomo; Yamasaki, 1995), antibacteriana (Tunkijjanukij; Olafsen, 1998), dentre outras, as quais podem ensejar uma gama de aplicações biológicas, tecnológicas e inclusive terapêuticas.

No presente trabalho foram avaliadas a atividade lectínica e a hemolítica de extratos aquosos de 20 espécies de esponjas marinhas coletadas ao longo do litoral Atlântico brasileiro, o efeito da temperatura sobre ambas as atividades e determinados os inibidores da atividade hemaglutinante.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material animal e reagentes químicos

As esponjas foram coletadas no litoral do Estado de Santa Catarina (*Axinella corrugata*, *Guitarra* sp1., *Guitarra* sp2., *Guitarra sepia*, *Haliclona tubifera*, *Mycale arcuiris*, *Petromica citrina*, *Polymastia janeirensis*, *Pseudaxinella reticulata*, *Raspailia* sp., *Tedania ignis*) e no litoral dos Estados de Pernambuco (*Chondrosia collectrix*, *Cinachyrella alloclada*, *Placospongia carinata*) e Paraíba (*Acervochalina* sp., *Agelas* sp., *Chondrilla nucula*, *Monanchora arbuscula*, *Niphates* sp., *Suberitidae*). Amostra de cada espécie está depositada no Museu de Ciências Naturais (MCN) da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. Sangue humano foi

obtido junto ao Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, de coelho junto ao Biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e o dos demais animais na Faculdade de Veterinária da UFRGS. Açúcares e glicoproteínas usadas foram da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). Todos os reagentes foram de grau analítico e as soluções preparadas em água purificada em sistema Milli-Q.

#### Preparação dos extratos brutos

Imediatamente após a coleta, as esponjas foram lavadas exaustivamente com água corrente e armazenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Para a extração das proteínas, as esponjas congeladas foram trituradas e maceradas em graal com água destilada e deionizada e deixadas em repouso durante 30 minutos à temperatura ambiente de  $20^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). A solução obtida foi filtrada através de papel de filtro e estocada a  $0^{\circ}\text{C}$ . O sedimento foi reextraído, nas mesmas condições experimentais, tantas vezes quantas necessárias, até o sobrenadante não apresentar mais atividade hemaglutinante. Os filtrados aquosos resultantes foram reunidos, liofilizados e armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$  até o uso.

#### Preparação dos extratos aquosos para os ensaios

O material liofilizado foi pesado e solubilizado em tampão fosfato salino (PBS:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 mM e NaCl 136 mM, contendo  $\text{NaN}_3$  20 mg/L - pH 7,2), obtendo-se uma solução a 10% (m/v). Em seguida, a solução foi centrifugada a 11000 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  em microcentrifuga Eppendorf. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante (extrato aquoso) foi coletado e usado para os ensaios.

#### Avaliação das atividades hemaglutinante, hemolítica e determinação dos inibidores da hemaglutinação

A atividade hemaglutinante foi testada com suspensão, em PBS, de eritrócitos nativos a 2%, previamente lavados, pertencentes aos grupos sanguíneos A, B, O e AB humanos e de distintas espécies animais (coelho, cão, ovelha, cavalo e boi). Os ensaios foram realizados em triplicata pelo método da dupla diluição serial em placas de microtitulação com fundo em U, usando-se 25  $\mu\text{L}$  do extrato aquoso e 25  $\mu\text{L}$  da suspensão de eritrócitos. A observação da hemaglutinação foi feita a olho nu, após incubação das placas a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 16 horas.

A atividade hemolítica para eritrócitos nativos a 2% em PBS, previamente lavados, pertencentes a distintas espécies animais, foi testada em placa de dupla diluição serial com 25  $\mu\text{L}$  de extrato aquoso de esponjas adicionados a 25  $\mu\text{L}$  da suspensão de eritrócitos. Paralelamente, um controle negativo constituído de suspensão de eritrócitos em PBS e um positivo de eritrócitos a 1% em água purificada foram submetidos às mesmas condições experimentais. A hemólise foi observada a olho nu após incubação das placas a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 2 horas e confirmada por análise em microscopia óptica (Mebs; Veiler; Heinke, 1985 modificado).

A atividade hemaglutinante e hemolítica foram expressas em unidades hemaglutinantes e unidades hemolíticas por mg de proteína (UH/mg e UHI/mg - atividade específica), respectivamente, considerando-se unidades hemaglutinantes e/ou hemolíticas o inverso da maior diluição de 25  $\mu\text{L}$  de extrato capaz de produzir o efeito, extrapolado para 1 mL, de acordo com Kilpatrick e Yeomann (1978). A atividade hemolítica específica do extrato aquoso de cada espécie de esponja foi considerada como 100%.

**Tabela 2.** Efeito de açúcares e glicoproteínas sobre a atividade hemaglutinante dos extratos aquosos de esponjas

Espécies testadas	*Inibidores
<i>Acervochalina</i> sp.	Não inibido
<i>Agellas</i> sp.	L-fucose, N-acetil-D-glicosamina, N-acetil-D-galactosamina
<i>Axinella corrugata</i>	N-acetil-D-glicosamina, N-acetil-D-galactosamina, D-galactose
<i>Chondrosia collectrix</i>	fetuína
<i>Chondrilla nucula</i>	fetuína
<i>Cinachyrella alloclada</i>	$\beta$ -lactose
<i>Guitarra</i> sp1.	D-glicose, L-ramnose, D-lixose, L-sorbose
<i>Guitarra</i> sp2.	Não inibido
<i>Guitarra sepia</i>	D-galactose, D-xilose, L-arabinose, $\beta$ -lactose, rafinose, $\alpha$ (D)-melibiose, asialofetuína
<i>Placospongia carinata</i>	D-galactose, fetuína, asialofetuína, $\beta$ -lactose
<i>Pseudaxinella reticulata</i>	ácido D-glicurônico, D-xilose, L-fucose, L-sorbose
<i>Raspailia</i> sp.	L-sorbose, ácido D-glicurônico

\*Concentração final: açúcares 0,2 M e glicoproteínas 0,5%

Inibição da hemaglutinação foi realizada incubando-se previamente o extrato aquoso durante 20 minutos a 20 °C ( $\pm 2$  °C) com o açúcar na concentração final de 0,2M ou com a glicoproteína a 0,5%. Imediatamente após, foi adicionada a suspensão de eritrócitos nativos a 2% da espécie animal que havia apresentado maior suscetibilidade à hemaglutinação. A leitura da atividade hemaglutinante foi realizada após incubação durante 120 minutos da mistura à temperatura de 20 °C ( $\pm 2$  °C). Foram utilizados os seguintes açúcares e glicoproteínas para os testes: D-manose, D-glicose, D-galactose, L-fucose, L-ramnose, ácido D-glicurônico, N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glicosamina, L-sorbose, D-lixose, D-xilose, L(+)-arabinose,  $\beta$ -lactose, sacarose, rafinose,  $\alpha$ (D)-melibiose, quitobiase, quitotriose, quitotetraose, fetuína e asialofetuína.

#### Determinação de proteínas

O conteúdo de proteína dos extratos aquosos foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina bovina, fração V (Sigma) como padrão.

#### Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante e hemolítica

Amostras dos extratos aquosos que apresentaram atividade hemaglutinante ou hemolítica foram submetidas, em tubos de Eppendorf, a aquecimento em banho de água, por 10 e/ou por 30 ou por 60 minutos, a temperaturas de 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C e 100 °C, respectivamente. Imediatamente após, os tubos foram resfriados em banho de gelo. Quando necessário, os tubos foram centrifugados à temperatura ambiente, com fins de eliminar eventuais precipitados de proteínas formados durante o aquecimento. A atividade hemaglutinante ou a hemolítica foi analisada pelo método da dupla diluição serial em placa de microtitulação, usando-se a suspensão de eritrócitos a 2% da espécie animal mais sensível ao efeito hemaglutinante ou hemolítico da amostra analisada.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extratos aquosos de 12 das 20 espécies de esponjas estudadas apresentaram atividade hemaglutinante para os eritrócitos testados, mas apenas 11 aglutinaram eritrócitos humanos, segundo se pode verificar na tabela 1. Os extratos aquosos de *Axinella corrugata*, *Chondrilla nucula*, *Chondrosia collectrix*, *Cinachyrella alloclada* e *Guitarra* sp1. foram os que apresentaram maior atividade lectínica específica. O extrato de *Chondrilla nucula* aglutinou todos os eritrócitos testados, mas apresentou maior atividade hemaglutinante para eritrócitos de cão e coelho. De modo semelhante, o extrato de *Cinachyrella alloclada* aglutinou todos os eritrócitos testados, com maior atividade específica para

eritrócitos humanos do grupo B, de coelho e de cavalo. Contudo, o extrato aquoso de *Axinella corrugata*, com maior atividade lectínica para eritrócitos de coelho, não aglutinou eritrócitos de cavalo. Não foi detectada atividade lectínica em extratos de *Haliclona tubifera*, *Monanchora arbustula*, *Mycale arcuiris*, *Niphates* sp., *Polymastia janeirensis*, *Suberitidae*, *Petromica citrina* e *Tedania ignis* para os eritrócitos testados. Nenhum dos extratos hemaglutinantes mostrou especificidade absoluta para eritrócitos de um dos grupos sanguíneos humanos ou das diferentes espécies animais, o que faz com que estas aglutininas não possam ser utilizadas na tipificação de grupos sanguíneos humanos.

Em estudo de ocorrência de lectinas em esponjas, realizado por Bretting et al. (1981), os extratos brutos de *Cacospongia scalaris* apresentaram maior seletividade para eritrócitos humanos pertencentes ao grupo sanguíneo O. Os mesmos autores verificaram que os das espécies *Dysidea fragilis*, *Reniera fulva*, *Acenthella acuta* e de *Chondrosia reniformis* não mostraram atividade hemaglutinante para eritrócitos humanos, sendo que os das três primeiras espécies citadas aglutinaram apenas eritrócitos de coelho.

A lectina de *Haliclona cratera* aglutinou eritrócitos de humanos pertencentes aos grupos sanguíneos A, B, O e AB e de ovelhas nativos ou tratados por enzimas (papaína, tripsina e neuraminidase), com intensidade similar (Pajic et al., 2002). Extratos aquosos de *Callispongia fallax* mostraram atividade hemaglutinante somente após tratamento dos eritrócitos de coelho e de hamster com tripsina e com pronase, respectivamente. Além disso, a atividade hemaglutinante do extrato da esponja *Aplysina cauliformis* aumentou significativamente após tratamento dos eritrócitos de coelho e de hamster com enzimas proteolíticas (Miarons; Fresno, 2000). No presente trabalho não foi realizado tratamento dos eritrócitos usados com enzimas proteolíticas. O fato de não ter sido encontrada atividade lectínica em alguns dos extratos analisados no presente trabalho, não descarta a possibilidade da presença das mesmas nestas espécies, em vista da limitação dos tipos de eritrócitos utilizados e/ou por não terem sido usados eritrócitos tratados com enzimas.

A tabela 2 apresenta os resultados da inibição da atividade hemaglutinante dos extratos aquosos por açúcares e/ou por glicoproteínas. Como pode ser verificado, a aglutinabilidade dos extratos de *Cinachyrella alloclada*, *Chondrilla nucula* e *Chondrosia collectrix* foi inibida por um único açúcar ou por uma glicoproteína apenas. A inibição total da lectina dos extratos de *Cinachyrella alloclada* apenas por  $\beta$ -lactose confirmou os resultados descritos por Atta et al. (1989). Não foi possível obter inibição da atividade hemaglutinante dos extratos de *Guitarra* sp2. e de *Acervochalina* sp. com as glicoproteínas ou açúcares testados, sendo que os mesmos não são eritrócito específicos. Atta et al. (1992) analisando a lectina isolada de *Anthosigmella varians*

**Tabela 3.** Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante dos extratos aquosos de esponja

Espécies testadas	*Temperatura de inibição total
<i>Acervochalina</i> sp.	não inibida
<i>Agellas</i> sp.	80 °C
<i>Axinella corrugata</i>	90 °C
<i>Chondrosia collectrix</i>	80 °C
<i>Chondrilla nucula</i>	não inibida
<i>Cinachyrella alloclada</i>	100 °C
<i>Guitarra</i> sp1.	80 °C
<i>Guitarra</i> sp2.	80 °C
<i>Guitarra sepiæ</i>	70 °C
<i>Placospongia carinata</i>	80 °C
<i>Pseudaxinella reticulata</i>	80 °C
<i>Raspailia</i> sp.	100 °C

\*Tempo de aquecimento :10 min

não determinaram o inibidor da mesma com os açúcares testados. Supõe-se que, nestes casos, o açúcar inibidor tenha uma estrutura complexa, a exemplo do inibidor da lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA).

Por outro lado, um considerável número de lectinas de esponjas marinhas são inibidas por D-galactose e N-acetil-D-galactosamina (Bretting et al., 1981; Schröder et al., 1990). Os resultados descritos na tabela 2 mostram que apenas extratos aquosos de *Axinella corrugata* foram inibidos por D-galactose e N-acetil-D-galactosamina, além de N-acetil-D-glicosamina. Kawagishi et al. (1994) constataram que a lectina HOL-I de *Halichondria okadai* foi inibida por oses contendo grupamento N-acetil, como N-acetil-D-galactosamina e N-acetil-D-glicosamina. Este comportamento é indicio de que a HOL-I reconhece e liga especificamente grupamentos N-acetil de açúcares. O fato da atividade hemaglutinante dos extratos pertencentes a distintas espécies de esponjas ter sido inibida por mais de um tipo de açúcar, pode indicar a presença de mais de uma lectina no extrato ou de isoformas ou de isolectinas, além da possibilidade de uma mesma lectina ser específica para porções similares da estrutura dos diferentes açúcares ou glicoproteínas.

Os extratos de esponjas pertencentes ao gênero *Guitarra* sp. apresentaram atividade hemaglutinante

para diferentes tipos de eritrócitos e distintos inibidores, fornecendo indícios de tratar-se de duas espécies diferentes. Estes resultados poderiam ser aplicados na identificação e caracterização taxonômica destas esponjas.

A tabela 3 exibe o efeito da temperatura sobre atividade hemaglutinante dos extratos aquosos. *Raspailia* sp. e *Cinachyrella alloclada* perderam a atividade hemaglutinante após aquecimento a 100 °C, durante 10 min. A lectina de *Acervochalina* sp. não perdeu a atividade por efeito de aquecimento a 100 °C por 30 min, e a atividade lectínica de *Chondrilla nucula* foi resistente ao aquecimento a 100 °C por 60 min. Este comportamento é bastante raro, porém presente em lectinas de baixo peso molecular, como a da alga marinha *Bryothamnion triquetrum* que apresentou, segundo Calvete et al. (2000), resistência à desnaturação térmica e cuja atividade hemaglutinante foi inibida somente por açúcares ou glicoproteínas complexas. Pajic et al. (2002) constataram que a atividade hemaglutinante da lectina de *Haliclona cratera* diminuiu após 15 min de aquecimento a 95 °C e desapareceu completamente após 60 min.

Os testes de hemólise, realizados com os distintos eritrócitos nativos e lavados, mostraram que dentre os vinte extratos analisados, somente dois, os de *Petromica citrina* e *Acervochalina* sp., possuíam atividade hemolítica (tabela 4). O extrato de *Acervochalina* sp. apresentou

**Tabela 4.** Avaliação da atividade hemolítica dos extratos aquosos de esponjas para eritrócitos de diferentes espécies de animais e efeito da temperatura sobre a atividade

Espécie	Atividade hemolítica específica (UHI/mg proteína)				Efeito da Temperatura 100 °C /10 min
	*Cavalo	*Boi	*Cão	*Ovelha	
<i>Acervochalina</i> sp.	1,65x10 <sup>3</sup>	206,45	825,81	1,65x10 <sup>3</sup>	825,81
<i>Petromica citrina</i>	731,34	731,34	2,93x10 <sup>3</sup>	2,93x10 <sup>3</sup>	1,17x10 <sup>4</sup>

\* Suspensão de eritrócitos a 2% em PBS

tanto atividade hemolítica quanto hemaglutinante. O mesmo tipo de comportamento foi relatado por Mebs, Weiler e Heinke (1985) para frações de extratos aquosos de esponjas marinhas eluídas de coluna de Sephadex G-75, indicando, neste caso, componentes com peso molecular elevado como sendo os responsáveis por ambas as atividades.

Os extratos de *Acervochalina* sp. apresentaram redução de 50% de sua atividade hemolítica após aquecimento a 100 °C, durante 10 min, o que poderia levar a supor que, ao menos parte dessa atividade, deve-se à ação de compostos suscetíveis à elevação de temperatura. De um modo geral, proteínas são compostos que perdem sua atividade biológica, por desnaturação, quando submetidas ao efeito de elevação de temperatura, geralmente acima de 50 °C. Contudo, não foi verificado se o responsável pelo efeito hemolítico dos extratos analisados teria natureza protéica e se o mesmo seria a proteína hemaglutinante. Por outro lado, o extrato de *Petromica citrina* apresentou aumento de atividade hemolítica após ter sido submetido ao aquecimento em banho de água a 100 °C por 10 min, o que poderia ser indicativo de que um fator lábil à temperatura poderia estar associado ao fator hemolítico diminuindo a sua ação a baixas temperaturas. Não foram encontrados na literatura estudos relacionando efeito da temperatura e atividade hemolítica em extratos de esponjas marinhas.

Segundo Miarons e Fresno (2000), extratos de espécies do gênero *Agelas* e *Ircinia* mostraram atividade hemolítica para eritrócitos de diferentes espécies animais. O extrato da esponja *Iothrocota birotulata* exibiu atividade hemolítica para praticamente todos os eritrócitos testados, enquanto que o de *Callispongia fallax* exibiu apenas para eritrócitos de coelho nativos, mas não para os tratados com tripsina. Também não foi encontrado na literatura referência de atividade hemolítica devido a lectinas em extratos de esponjas marinhas. No entanto, além da proteína tóxica suberitina, foram descritos como responsáveis pela atividade hemolítica em extratos de esponjas polímeros de alquilpiridinas e outros compostos não identificados (Berlinck et al., 1996; Bourget et al., 1988; Cariello; Zanetti, 1979; Mangel et al., 1992; Sepcic et al., 1997).

## CONCLUSÃO

Neste trabalho, as espécies de esponjas marinhas que apresentaram maior potencial para futuros estudos de purificação, caracterização e determinação das propriedades biológicas de lectinas para fins de aplicação foram *Axinella corrugata*, *Chondrilla nucula* e *Chondrosia collectrix*, em vista da maior atividade hemaglutinante apresentada por seus extratos, aliada à maior atividade específica.

## AGRADECIMENTOS

À farmacêutica Fabiane Moreira Farias, do Departamento de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por ceder as esponjas utilizadas neste trabalho. Às estagiárias Michele P. Beier e Josiane W. Bortolotto por auxílio técnico na execução dos trabalhos. Este trabalho foi financiado pela CAPES/PPI e CNPq.

## REFERÊNCIAS

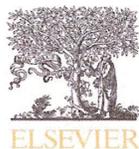
- Atta AM, Barral-Netto M, Peixinho S, Sousa-Atta MLB 1989. Isolation and functional characterization of a mitogenic lectin from the marine sponge *Cinachyrella alloclada*. *Braz J Med Biol Res* 22: 379-385.
- Atta AM, Cunha AP, Peixinho S. 1992. Partial characterization of the hemagglutinin activity of the marine sponge *Anthosigmella varians*. *Braz J Med Biol Res* 25: 53-55.
- Berlinck RGS, Ogawa CA, Almeida AMP, Sanchez MAA, Malpezzi ELA, Costa LV, Hajdu E, Freitas JC 1996. Chemical and pharmacological characterization of halitoxin from *Amphimedon viridis* (Porifera) from the southeastern Brazilian coast. *Comp Biochem Phys C* 115: 155-163.
- Berlinck RGS, Hajdu E, Rocha RM, Oliveira JHHL, Hernandez ILC, Seleguim MHR, Granato AC, Almeida EVR, Nunez CV, Muricy G, Peixinho S, Pessoa C, Moraes MO, Cavalcanti BC, Nascimento GGF, Thiemann O, Silva M, Souza AO, Silva CL, Minarini PRR 2004. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. *J Nat Prod* 67: 510-522.
- Bourget G, More MT, More P, Guimbretiere L, Leboterff J, Verbist JF 1988. Cytotoxicity and hemolysis by an extract of the sponge *Pachymatisma johnstonii*. *Toxicon* 26: 324-327.
- Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bretting H, Donadey C, Vacelet J, Jacobs G 1981. Investigations on the occurrence of lectins in marine sponges with special regard to some species of the family Axinellidae. *Comp Biochem Phys B* 70: 69-76.
- Buck F, Luth C, Strupat K, Bretting H 1992. Comparative investigations on the amino-acid sequences of different isolectins from the sponge *Axinella polypoides* (Schmidt). *Biochem Biophys Acta* 1159: 1-8.
- Calvete JJ, Costa FHF, Saker-Sampaio S, Murciano MPM, Nagano CS, Cavada BS, Grangeiro TB, Ramos MV, Bloch C, Silveira SB, Freitas BT, Sampaio AH 2000. The amino acid sequence of agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. *Cell Mol Life Sci* 57: 343-350.
- Cariello L, Zanetti L 1979. Suberitine, the toxic protein from the marine sponge, *Suberites domuncula*. *Comp Biochem Phys C* 64: 15-19.
- Carté BK 1996. Biomedical potential of marine natural products.

- BioScience* 46: 271-286
- Cragg GM, Newman DJ 1999. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Invest* 17: 153-163.
- Doods RY, MacLennan AP, Hawkin DC 1968. Haemagglutination from marine sponges. *Vox Sanguinis*, 15: 386-391, *apud* Kilpatrick DC 2000. *Handbook of animal lectins - Properties and biomedical applications*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Engel M, Bachmann M, Schröder HC, Rinkevich B, Kljajic Z, Uhlenbruck G, Müller WEG 1992. A novel galactose and arabinose-specific lectin from the sponge *Pellina semitubulosa*: Isolation, characterization and immunobiological properties. *Biochimie* 74: 527-537.
- Hatakeyama T, Nagatomo H, Yamasaki N 1995. Interaction of the hemolytic lectin cel-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* with the erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 270: 3560-3564.
- Kawagishi H, Yamawaki M, Isobe S, Usui T, Kimura A, Chiba S 1994. Two lectins from the marine sponge *Halichondria okadae*. *J Biol Chem* 269: 1375-1379.
- Kilpatrick DC 2000. *Handbook of animal lectins - Properties and biomedical applications*. 1. ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. England.
- Kilpatrick DC, Yeoman MM 1978. Purification of the lectin from *Datura stramonium*. *Biochem J* 175: 1151-1153.
- Mangel A, Leitão JM, Batel R, Zimmermann H, Müller WEG, Schröder HC 1992. Purification and characterization of a pore-forming protein from the marine sponge *Tethya lyncurium*. *Eur J Biochem* 210: 499-507.
- Mebs D, Weiler I, Heinke HF 1985. Bioactive proteins from marine sponges: screening of sponge extracts for hemagglutinating, hemolytic, ichthyotoxic and lethal properties and isolation and characterization of hemagglutinins. *Toxicon* 23: 955-962.
- Miarons PB, Fresno M 2000. Lectins from tropical sponges: purification and characterization of lectins from genus *Aplysina*. *J Biol Chem* 275: 29283-29289.
- Micucci HA, Camps E 1987. Lectinas: Obtención, estructura química, propiedades y aplicaciones diagnósticas y farmacológicas. *Acta Farm Bonaerense* 6: 35-54.
- Monks NR, Lerner C, Henriques AT, Farias FM, Schapoval EES, Suyenaga ES, da Rocha AB, Schwartzmann G, Mothes B 2002. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected of the coast of Santa Catarina, southern Brazil. *J Exp Mar Biol Ecol* 281: 1-12.
- O'Keefe BR, Beutler JA, Cardellina JA, Gulakowski RJ, Krepps BL, McMahan JB, Sowder RC, Henderson LE, Pannell LK, Pomponi SA, Boyd MR 1997. Isolation and characterization of niphatevirin, a human-immunodeficiency-virus-inhibitory glycoprotein from the marine sponge *Niphates erecta*. *Eur J Biochem* 245: 47-53.
- Pajic I, Kljajic Z, Dogovic N, Sladic D, Juranic Z, Gasic MJ 2002. A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. *Comp Biochem Phys C* 132: 213-221.
- Peumans WJ 2002. Oral communication. Interlec 20, Helsinki, Dinamarca.
- Schröder HC, Kljajic Z, Wegner R, Reuter P, Gasic M, Uhlenbruck G, Kurelac B, Müller WEG 1990. The galactose-specific lectin from the sponge *Chondrilla nucula* displays anti-human immunodeficiency virus activity "in vitro" via stimulation of the (2'-5') oligoadenylate metabolism. *Antivir Chem Chemother* 1: 99-105.
- Sepeć K, Batista U, Vacelet J, Macek P, Turk T 1997. Biological activities of aqueous extracts from marine sponges and cytotoxic effects of 3-alkylpyridinium polymers from *Reniera sarai*. *Comp Biochem Phys C* 117: 47-53.
- Tunkijjanukij S, Olafsen JA 1998. Sialic acid-binding lectin with antibacterial activity from the horse mussel: further characterization and immunolocalization. *Dev Comp Immunol* 22: 39-150.



*PUBLICAÇÃO 2*





Contents lists available at ScienceDirect

## Comparative Biochemistry and Physiology, Part C

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cbpc](http://www.elsevier.com/locate/cbpc)

## ACL-I, a lectin from the marine sponge *Axinella corrugata*: Isolation, characterization and chemotactic activity

Roger R. Dresch<sup>a</sup>, Gilberto D. Zanetti<sup>b</sup>, Cléa B. Lerner<sup>c</sup>, Beatriz Mothes<sup>c</sup>, Vera M.T. Trindade<sup>d</sup>, Amélia T. Henriques<sup>c</sup>, Magdolna M. Vozári-Hampe<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

\* Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 7 February 2008

Received in revised form 5 March 2008

Accepted 5 March 2008

Available online xxxx

## Keywords:

*Axinella corrugata*

Chemotaxis

Lectin

Marine sponge

## ABSTRACT

The lectin from the marine sponge *Axinella corrugata* (ACL-I) was purified by affinity chromatography on rabbit erythrocytic stroma incorporated into a polyacrylamide gel followed by gel filtration on Ultrogel ACA 44 column. Purified ACL-I is a hexameric glycoprotein with a Mr of 82.3 kDa estimated by SDS-PAGE and 78.5 kDa by FPLC on Superose 12 HR column. The pI of lectin is 6.3 and ACL-I is constituted of 13.9 kDa similar subunits some of them linked by disulphide bridges. This lectin agglutinates native rabbit, goat and dog erythrocytes and in less extent human erythrocytes. The hemagglutinating activity is independent of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>, but it is strongly inhibited by carbohydrates containing N-acetyl groups. ACL-I is stable up to 70 °C for 30 min, with optimum pH between 7 and 8, and it is also resistant to enzymatic proteolysis *in vitro*. In the presence of reducing or denaturant agents, the lectin activity decreases. ACL-I displays chemotactic effect on rat neutrophil *in vitro* which is inhibited by N-acetyl-D-glucosamine.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Sponges (Phylum Porifera) are among the oldest metazoan animals and are the simplest of the multicellular animals. Because of their prevalence, distribution and ability to biosynthesize a variety of classes of natural compounds, the sponges have become one of the dominant sources of biologically active marine natural products. Among these compounds are the lectins (Carté, 1996; Hentschel et al., 2006).

Lectins are (glyco)proteins that possess at least one noncatalytic domain able to recognize and to bind, in a reversible manner and with certain specificity, carbohydrates free or complexed, without modifying them (Peumans and van Damme, 1995). Lectins show considerable differences in their proteic structures, characteristics and consequently in their biological properties.

Because of their capacity to detect subtle differences among complex carbohydrate structures binding to them and their high stability (relatively good resistance to acidic pH and degradation by gastrointestinal proteolytic enzymes), lectins are valuable tools for detection, isolation and characterization of glycoconjugates, for cyto and histochemistry, for the examination of changes that occur on cell

surfaces during physiological and pathological processes, from cell differentiation to cancer and for the study of immunological and inflammatory processes (Zatta and Cummings, 1992; Ponchel and Irache, 1998; Ezepeleta et al., 1999; Dias-Baruffi et al., 2000; Gabius et al., 2002; Sharon and Lis, 2004; Sharon, 2007).

Although lectins are largely found in nature and have countless biological and medical applications, their physiological roles in marine invertebrates and especially in marine sponges are not well known. The lectin from the marine sponge *Cliona varians* was described and displays cytotoxic effect on Gram positive bacteria and agglutinates *Leishmania* promastigotes, indicating physiological defense roles of the protein (Moura et al., 2006). The lectin of the sponge *Haliclona cratera* also showed cytotoxicity towards HeLa and FemX cells (Pajic et al., 2002). Furthermore, this lectin displays mitogenic effect *in vitro* on human T lymphocytes, as well as *Axinella polyoides* lectin I (Phillips et al., 1976). Mitogenic activity was also a characteristic of the lectin isolated from the sponge *Craniella australiensis* (Xiong et al., 2006). On the other hand, one feature of *Geodia cydonium* lectin I is to link the aggregation factor to cells in the adhesion systems of the sponge (Wagner-Hülsmann et al., 1996).

During the screening for lectin activity in aqueous extracts from marine sponges of Brazilian South Atlantic Coast with the aim to search for new lectins with distinct structures and properties (Dresch et al., 2005), we found that the extracts from *Axinella corrugata* strongly agglutinated rabbit erythrocytes. In the present work we

\* Corresponding author. Tel.: +55 51 33085561; fax: +55 51 33085534.  
E-mail address: rogdresch@gmail.com (M.M. Vozári-Hampe).

describe the isolation, characterization and properties of *A. corrugata* lectin I (the main lectin in this sponge).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

The sponge *A. corrugata* (George and Wilson, 1919) was collected by scuba diving, at depths between 0.5 and 14 m, at Atlantic coastline of Santa Catarina (southern Brazil). After the collection, the fresh sponges were washed exhaustively with sea water and frozen at  $-18^{\circ}\text{C}$  until use. Taxonomic designation was based on scanning electron microscope studies and on skeletal slides and dissociated spicule mounts. A fragment was deposited in the Museu de Ciências Naturais-Porifera (MCNPOR) collection of the Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (RS), Brazil under number MCN 6296.

Fresh human blood was obtained from the Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and those of healthy animals from the Animal House of Faculdade de Farmácia and from the Faculdade de Veterinária /UFRGS. The blood samples were collected on 0.2 M EDTA in PBS as an anticoagulant.

Glycogen, LPS (lipopolysaccharide from *Escherichia coli*), PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride), Coomassie brilliant blue R 250, BSA (bovine serum albumin), Blue Dextran, proteolytic enzymes, carbohydrates and glycoproteins were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Molecular weight markers for molecular mass estimation were purchased from Amersham (Uppsala, Sweden), Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) and from GE Healthcare (Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, England). Cellulose nitrate filter was obtained from Millipore (Bedford, MA, USA), Immobiline Drystrip (pH 3-10) from Amersham, 2-mercaptoethanol from Calbiochem (San Diego, CA, USA), DTT (dithiothreitol) from Fluka (Buchs, Switzerland) and Ultrogel AcA 44 from LKB (Villeneuve-la-Garenne, France). All other chemicals were reagent grade. All the solutions were prepared with Milli-Q purified water, Millipore system (Bedford, MA, USA), designated as water in the text.

### 2.2. Extraction and purification of the lectins

To extract *Axinella* proteins, the frozen sponges were defrosted at room temperature ( $20^{\circ}\text{C}$ ), cut into small pieces, triturated in grill and

extracted with water on ice bath, for 30 min. After centrifugation in an Excelsa clinical centrifuge (Fanem, São Paulo, Brazil) for 10 min at 3000 rpm, the supernatant was collected and the sediment reextracted with water. This procedure was repeated until the supernatant did not present any hemagglutinating activity. The supernatants were combined, concentrated in speed-vac (UniEquip, München, Germany) and freeze-dried.

The freeze-dried material was suspended with pH 7.2 phosphate buffered saline (PBS), and soon after centrifuged at 16,000 g for 10 min. The supernatant (crude extract) was collected and applied to a rabbit stroma-polyacrylamide gel column ( $9 \times 3$  cm) equilibrated with PBS and prepared according to Betail et al. (1975). The crude extract was recirculated through the column until all the hemagglutinating proteins were bound to the affinity matrix.

The column was washed exhaustively with PBS until the absorbance of unbound proteins was less than 0.010 at 280 nm. The adsorbed proteins were eluted with 0.035 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  in 0.154 M NaCl and the collected fractions were assayed for hemagglutinating activity using 2% suspension (v/v) of native rabbit erythrocytes in PBS.

The active fractions were collected, dialyzed against water at  $4^{\circ}\text{C}$  and concentrated in speed-vac. The concentrated material was solubilized in PBS and applied on Ultrogel – AcA 44 column ( $75 \times 1.6$  cm), previously equilibrated and eluted with PBS at a flow rate of  $18 \text{ mL h}^{-1}$ . The purified lectin (ACL-I) eluted from the column with PBS was dialyzed against water and if not used immediately it was concentrated and freeze-dried until use. A second lectin (ACL-II) bound to the gel filtration column was subsequently eluted with water. Lectin purification procedures were accompanied by PAGE performed with 11% polyacrylamide gel in pH 9.2 Tris-HCl buffer and by SDS-PAGE using 11% polyacrylamide as separation gel in Tris-HCl, pH 8.3, containing 2% SDS and 5% 2-mercaptoethanol, as separating buffer according to the procedure of Laemmli (1970), but without pre-heating the samples. Protein content from chromatography eluates was monitored by absorbance at 280 nm. Protein content from samples was determined by the Lowry method (Lowry et al., 1951) using BSA as standard.

### 2.3. Hemagglutination assay and lectin specificity

Hemagglutinating activity of the lectin was assayed on U bottomed microtiter plates towards rabbit erythrocytes by the twofold serial dilution method using 25  $\mu\text{L}$  of lectin solution in PBS. A volume of

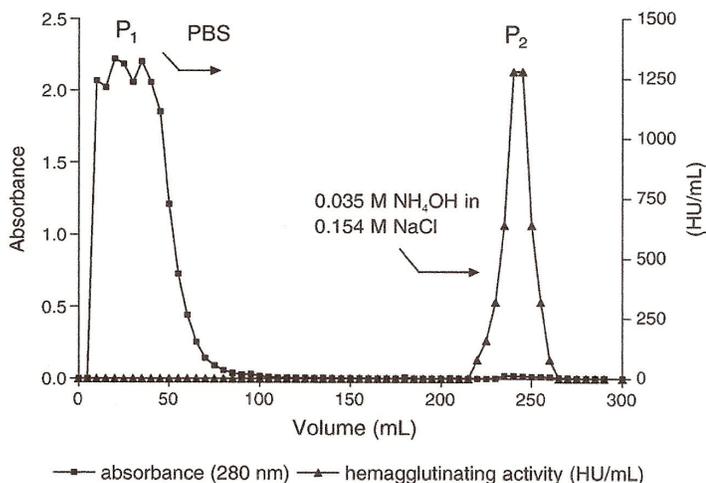


Fig. 1. Affinity chromatography of the crude extract of sponge *Axinella corrugata* on rabbit stroma-polyacrylamide gel column.

Please cite this article as: Dresch, R.R., et al., ACL-I, a lectin from the marine sponge *Axinella corrugata*: Isolation, characterization and chemotactic activity, Comp. Biochem. Physiol. (2008), doi:10.1016/j.cbpc.2008.03.003

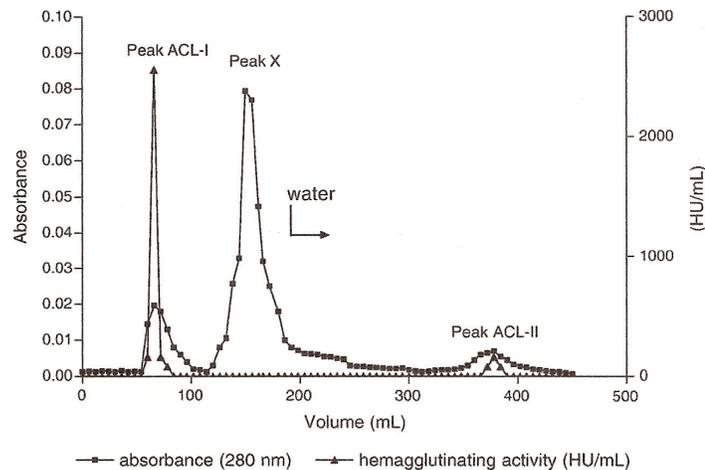


Fig. 2. Gel filtration of peak P2 eluted from rabbit stroma-polyacrylamide column on Ultrogel AcA 44 column.

25  $\mu$ L of 2% suspension (v/v) of native erythrocytes previously washed three times with PBS by centrifugation (3000 r.p.m., for 10 min at 20 °C) was added to each well. The hemagglutination was visually evaluated after 120 min of incubation at 4 °C. Lectin specificity towards human erythrocytes and from distinct animals was assayed by the same method. Hemagglutination units (HU) were defined as the reciprocal of the titre which corresponds to the higher dilution giving visible hemagglutination. HU/mL were calculated according to Kilpatrick and Yeoman (1978). Lectin specific activity was defined as the activity in such units per mg of protein.

To determine the inhibitory effect of carbohydrates on the hemagglutinating activity of ACL-I and ACL-II, the substances were twofold diluted serially in 12.5  $\mu$ L of PBS on the microtiter plates and 12.5  $\mu$ L of 0.1 mg/mL of lectin solution was added to each sample. After 30 min incubation, a 2% suspension (v/v) of native rabbit erythrocytes in PBS was added (25  $\mu$ L). The hemagglutination was visually evaluated after 120 min of incubation at 4 °C. The minimal inhibitory concentration of each substance which caused complete inhibition was recorded.

The following carbohydrates were assayed: 2-deoxy-D-ribose, L-arabinose, D-xylose, D-lyxose, D-glucose, 2-deoxy-D-glucose, D-mannose, D-fructose, D-glucose-1-phosphate, D-glucose-6-phosphate, D-glicuronic acid, D-galacturonic acid, L-sorbose, D-maltose, L-fucose, L-rhamnose, D-cellobiose, D-threose,  $\alpha$ -(D)-mellibiose, sucrose, D-galactose, L-galactose,  $\beta$ -D-lactose,  $\alpha$ -D-lactose, methyl- $\alpha$ -(D)-mannopyranoside, methyl- $\alpha$ -(D)-galactopyranoside, D-galactosamine, D-glucosamine, sialic acid, N-acetyl-D-mannosamine, N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-D-galactosamine, N-acetyl-D-lactosamine, p-nitrophenyl- $\beta$ -D-

galactopyranoside, D-melezitose, raffinose, N, N', N''-triacylchitotriose, dextrane and chitin.

#### 2.4. Molecular mass estimation

The relative molecular mass ( $M_r$ ) of the native ACL-I and of its subunits were estimated by SDS-PAGE (Laemmli, 1970) using 11% polyacrylamide separation gel, in the presence or absence of 5% 2-mercaptoethanol and 2% SDS, without or pre-heating the samples in a waterbath at 100 °C for 3 and in 30 min. Staining of proteins in the gel slabs was performed with 0.2% Coomassie brilliant blue R 250.

In a second approach the molecular mass of the native lectin was estimated by gel filtration on a FPLC System (Pharmacia, Uppsala, Sweden) using a Superose 12 HR column (30 $\times$ 1 cm) equilibrated and eluted with PBS containing 0.2 M N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc). Ribonuclease A (13.7 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), ovalbumin (43 kDa) and conalbumin (75 kDa) were used as molecular weight markers.

#### 2.5. Isoelectric point determination

Isoelectric point determination of ACL-I was performed on LKB Multiphor II (Pharmacia, Uppsala, Sweden) using Immobiline Drystrip

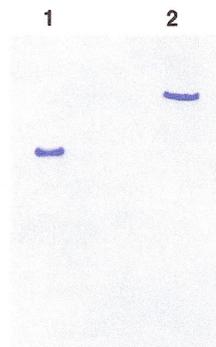


Fig. 3. Electrophoresis of ACL-I in 11% polyacrylamide gel (PAGE), at pH 9.2. Lane 1 – ovalbumin; Lane 2 – ACL-I (20  $\mu$ g).

Table 1  
Purification of the ACL-I of *Axinella corrugata*

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (HU)	Specific activity (HU/mg)	Purification (-fold)	Recovery in protein (%)
Crude extract	30	191,066	6368	1	100
Affinity chromatography on rabbit stroma-polyacrylamide matrix	0.276	23,705	86,200	13.53	0.9
Gel filtration on chromatography on Ultrogel AcA 44	0.061	14,621	239,688	37	0.2

Please cite this article as: Dresch, R.R., et al., ACL-I, a lectin from the marine sponge *Axinella corrugata*: Isolation, characterization and chemotactic activity, Comp. Biochem. Physiol. (2008), doi:10.1016/j.cbpc.2008.03.003

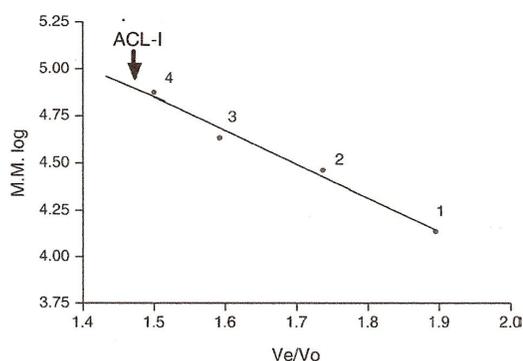


Fig. 4. Estimation of molecular mass of ACL-I by gel filtration chromatography on Superose 12 HR 10/30 equilibrated and eluted with 0.2 M GlcNAc in PBS. The eluted fractions (1.0 mL each) were monitored at 280 nm. Molecular weight markers (kDa) were: (1) ribonuclease A (13.7); (2) carbonic anhydrase (29); (3) ovalbumin (45) and (4) conalbumin (75).

3-10 and buffer solution containing 8 M urea, 0.05 M DTT and 2% CHAPS detergent. A voltage of 300 V was applied for the electro-phocussing run for 30 min, followed by 3000 V for 5 h.

#### 2.6. Effects of pH, temperature and divalent cations on hemagglutinating activity

The effect of pH on the hemagglutinating activity of ACL-I was evaluated by incubation of lectin samples (100 µg/mL) for 1 h at 20 °C with buffers of different pH ranging from pH 3.0 to pH 11.0; the hemagglutinating activity was measured in pH 7.2 PBS. The buffers used were 0.01–0.02 M citrate-phosphate (pH 3.0–5.5), 0.02 M phosphate buffer (pH 6.0–8.0) and 0.02 M glycine-NaOH buffer (pH 8.5–11.0).

The temperature effect on the hemagglutinating activity of ACL-I was studied at temperatures ranging from 0 °C to 100 °C. The lectin

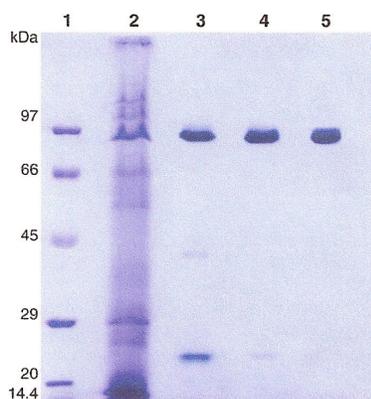


Fig. 5. SDS-PAGE of *Axinella corrugata* proteins and purified ACL-I in 11% polyacrylamide gel. Lane 1 – molecular weight markers (kDa): phosphorylase b (97); bovine serum albumin (66); ovalbumin (45); carbonic anhydrase (29); soybean trypsin inhibitor (20) and  $\alpha$ -lactalbumin (14.4); Lane 2 – crude extract from marine sponge *Axinella corrugata*; Lane 3 – ACL-I heated at 100 °C for 3 min in the presence of 5% 2-mercaptoethanol; Lane 4 – ACL-I without heating in presence of 5% 2-mercaptoethanol; Lane 5 – ACL-I without heating in absence of 5% 2-mercaptoethanol. Staining of proteins in the gel was performed with 0.2% Coomassie brilliant blue.

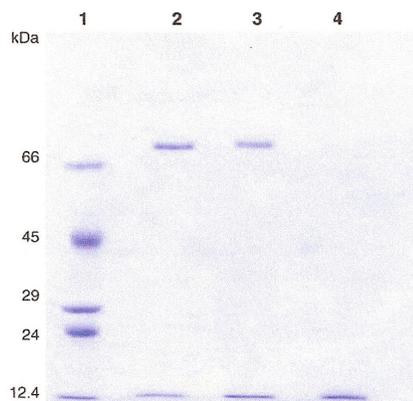


Fig. 6. SDS-PAGE of ACL-I in 11% polyacrylamide gel. All the samples were heated at 100 °C for 30 min. Lane 1 – molecular weight markers (kDa): bovine serum albumin (66); ovalbumin (45); carbonic anhydrase (29); trypsinogen (24); cytochrome C (12.4); Lane 2 – ACL-I heated in absence of 5%  $\beta$ -mercaptoethanol and 2% SDS (before loading into the gel SDS was added to the sample); Lane 3 – ACL-I heated in the presence of 2% SDS without 5%  $\beta$ -mercaptoethanol; Lane 4 – ACL-I heated in the absence of 2% SDS and in presence of 5%  $\beta$ -mercaptoethanol (before loading into the gel SDS was added to the sample).

samples (100 µg/mL) were incubated in waterbath at the distinct temperatures for 10 and 30 min, respectively, and soon after cooled in ice. The hemagglutinating activity was assayed at 20 °C.

The effect of divalent metal ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$ ) on the lectin activity was assayed in the presence of EDTA, as described by Pajic and co-workers (2002) using 100 µg/mL lectin samples and 2.5 and 5 mM EDTA.

#### 2.7. Effect of denaturant, reducing agents and proteolytic enzymes on the hemagglutinating activity

The effect of urea on the lectin activity was evaluated by incubation of the sample (100 µg/mL) for 30 min at 20 °C, in the presence of 4 M urea and after assaying the hemagglutinating activity. The effect of reducing agents on ACL-I activity was studied incubating the lectin samples (100 µg/mL) in the presence of 2.5 and 5.0 mM of DTT or 2-mercaptoethanol, for 30 min at 20 °C, followed by the evaluation of the hemagglutination activity.

To assay the effect of proteolytic enzymes purified ACL-I samples (50 µg) in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, containing trypsin (1 mg/mL) or chymotrypsin (1 mg/mL), were incubated at 37 °C for 3 h, in equivalent amount of 50 µg of enzyme, according to the modified method of Rios et al. (1996). After incubation, the reaction performed with trypsin or with chymotrypsin was stopped with 1 µL PMSF (1 mg/mL) in ethanol diluted in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 (3:1; v:v). The lectin activity was assayed by the twofold serial dilution method, using rabbit erythrocytes in PBS.

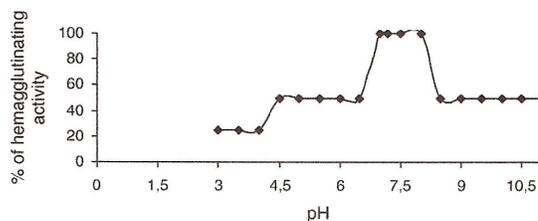


Fig. 7. Effect of pH on the hemagglutinating activity of ACL-I.

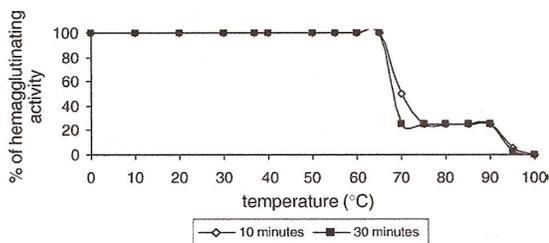


Fig. 8. Effect of temperature on the hemagglutinating activity of ACL-I.

### 2.8. Neutral carbohydrate analysis

Neutral carbohydrate content in ACL-I was evaluated according to the method of Dubois et al. (1956) with D-glucose as the reference substance.

### 2.9. Chemotactic assay

ACL-I chemotactic activity *in vitro* was assayed by modified Boyden method (1962) in 25-well acrylic chambers (15.5×15.5 cm) as described by Monks et al. (2002).

Briefly, to obtain the rat neutrophils, 20 mL of 1% glycogen dissolved in saline was injected i.p. in male wistar rats weighting 150 to 200 g. Four hours later, the animals were killed and peritoneal washing was performed twice with 10 mL of Hanks solution. The washing solutions were pooled and centrifuged for 10 min at 1200 g at room temperature (20 °C). The cells pellet was resuspended in Hanks solution to provide  $1.5 \times 10^6$  cells/mL. Typical preparations contained more than 95% of viable neutrophils.

The chemotactic assay was performed in microchambers. Each microchamber consisted of two distinct compartments separated during the course of the experiment by a filter membrane of cellulose nitrate (Millipore) with 13 mm of diameter and pores of 8 μm of diameter held securely in place with a rubber "O" ring. The volume of 0.5 mL of lectin (0.4 to 12.8 μg/mL) or the reference chemoattractant (LPS – 5 μg/mL) was placed in the lower compartment of each well and 0.5 mL of neutrophils in the upper compartment. The lectin or LPS was previously dissolved in rat homologe plasma and activated for 30 min at 37 °C followed by dilution with Hanks solution. The chambers were incubated during 60 min at 37 °C. To verify the inhibitory effect of carbohydrates on the neutrophil attracting activity of ACL-I, lectin samples were pre-incubated in medium containing 0.2 M GlcNAc for 30 min at room temperature. Each assay was performed three times in duplicate.

After incubation, the filters were removed, fixed, stained with hematoxylin, diafanized and mounted between slide and coverslip. The reading of cell migration was made with a 40× objective by measuring, with the optical micrometer on the fine focus knob of light microscope, the distance from the top of the filter to the furthest plane of focus which contained at least two cells in focus as described by

Zigmond and Hirsch (1973). The measures were taken from five fields across the filter and the data expressed as mean±standard error of the mean (S.E.M.) of the filters. The distance measured in micrometers was compared statistically with the positive control (LPS) using ANOVA (one-way). The Dunnett test was used to identify the different groups when indicated for ANOVA through the statistical program SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## 3. Results

### 3.1. Isolation and purification procedure

Lectins from *A. corrugata* extracts were adsorbed to rabbit stroma-polyacrylamide gel column and was desorbed as an active peak with 0.035 M NH<sub>4</sub>OH in 0.154 M NaCl (Fig. 1, peak 2).

The active material eluted from the stroma column was further submitted to gel filtration on Ultrogel – Aca 44 column and ACL-I lectin was eluted with PBS as a symmetric peak (Fig. 2, peak ACL-I), followed by a second peak devoid of hemagglutinating activity (peak X). A second purified lectin ACL-II retained by the column was subsequently eluted with water (Fig. 2, peak ACL-II).

The recovery of the purified lectin (ACL-I) represented 0.2% of the total soluble proteins in the crude extract with 37-fold purification (Table 1). Taking in consideration that ACL-I was the main lectin extracted from *A. corrugata*, ACL-II was not further examined in detail because its activity corresponds to only 10% of the lectin activity recovered from Aca 44 column.

The ACL-I purified by gel filtration on Aca 44 column appeared as one unique protein band by PAGE at pH 9.2 (Fig. 3), by SDS-PAGE without pre-heating the protein sample (Fig. 5, lane 5) and by isoelectric focusing (result not shown).

### 3.2. Physical and chemical properties of ACL-I

The relative molecular mass of ACL-I was estimated as 78.5 kDa by FPLC performed on Superose 12 HR column in the presence of 0.2 M GlcNAc in PBS (Fig. 4). By SDS-PAGE, the molecular mass of the native protein was estimated as 82.3 kDa (Fig. 5, lane 5) under non denaturing conditions by heat and in the absence of reductant. However, a weak band with molecular mass of 22 kDa appeared when in the presence of reductant without pre-heating the lectin sample (Fig. 5, lane 4).

When ACL-I sample was heated at 100 °C for 3 min in the presence of 5% 2-mercaptoethanol, four protein bands with Mr of 82.3, 40.8 (weak), 22 and 13.9 kDa, respectively, were visualized in the polyacrylamide gel slab after SDS-PAGE (Fig. 5, lane 3).

On the other hand, when SDS-PAGE was performed with the lectin sample pre-heated at 100 °C for 30 min in the presence of 5% 2-mercaptoethanol, only one band of 13.9 kDa appeared (Fig. 6, lane 4). In the absence of reductant, 23% of the protein (evaluated by densitometry scans) remained as a band with Mr of 82.3 kDa and 77% as the band with Mr of 13.9 kDa (Fig. 6, lane 3). The results show that ACL-I consists of six similar monomeric subunits with Mr of 13.9 kDa, and some of them are linked by disulphide bounds.

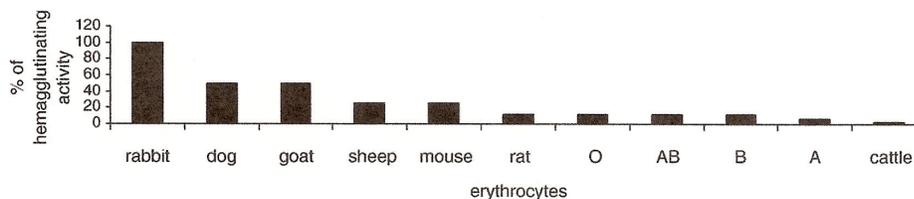


Fig. 9. Hemagglutinating activity of ACL-I on native erythrocytes.

**Table 2**  
Carbohydrate inhibition of the hemagglutination of rabbit erythrocytes by ACL-I

Carbohydrates	Minimal inhibitory concentration (mM)
<i>N</i> -acetyl-D-glucosamine	37.5
<i>N</i> -acetyl-D-galactosamine	37.5
<i>N</i> -acetyl-D-mannosamine	37.5
<i>N</i> , <i>N'</i> , <i>N''</i> - triacetylchitotriose	3,125
<i>N</i> -acetyl-D-lactosamine	>100

Analytical isoelectric focusing of the native lectin in the presence of urea and DTT revealed only one band at pH 6.3 (data not shown).

The lectin maintained its hemagglutinating activity when submitted to pH variation in the range from 3 to 11. The higher activity was observed between pH 7 and 8. (Fig. 7).

The hemagglutinating activity of ACL-I was stable at distinct temperatures from 0 °C at 65 °C, to which the lectin samples was exposed for 10 and 30 min, respectively. The activity decreased considerably from 70 °C for 10 min and it was completely lost by heating the protein at 95 °C and 100 °C for 30 and 10 min, respectively (Fig. 8).

EDTA, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> did not affect the hemagglutinability of the lectin, but incubations with 2.5 and 5 mM DTT or 2-mercaptoethanol, as well as 4 M urea, decreased the activity by 50% (data not shown).

Hemagglutinating activity did not change after incubation of the lectin with trypsin or with chymotrypsin for 3 h at 37 °C. Regarding the possible effect of pepsin on the lectin activity it was not possible evaluate it because the irreversible denaturation of the protein at pH 1.0 (results not shown).

The total neutral carbohydrates content of ACL-I was found to be 19.02%.

### 3.3. Lectin specificity

ACL-I agglutinated native animal erythrocytes to a different extent. Native rabbit, goat and dog erythrocytes were agglutinated with larger intensity and activity on native human erythrocytes of all three blood groups was lower (Fig. 9). Agglutination was not detected with native horse, chicken and pig erythrocytes.

Among the carbohydrates tested on native rabbit erythrocytes, *N*, *N'*, *N''*-triacetylchitotriose were found to display the highest inhibitory potency which was 12 times greater than those of *N*-acetyl-D-glucosamine, *N*-acetyl-D-mannosamine, *N*-acetyl-D-galactosamine and 32 times greater than that of *N*-acetyl-D-lactosamine (Table 2). All other carbohydrates tested were found to be inactive.

### 3.4. Chemotactic assay

ACL-I induced rat neutrophil migration *in vitro* at concentrations from 0.8 to 12.8 µg/mL with results not statistically significant ( $p > 0.05$ ) when compared with the chemoattraction exercised by LPS

(positive control). At lower concentration than 0.8 µg/mL of lectin, the neutrophil migration was statistically significant (Fig. 10). The results also indicated that the chemotactic activity of the lectin was not concentration dependent from 0.8 to 12.8 µg/mL. In the presence of 0.2 M GlcNAc, the chemotactic effect of the lectin was inhibited.

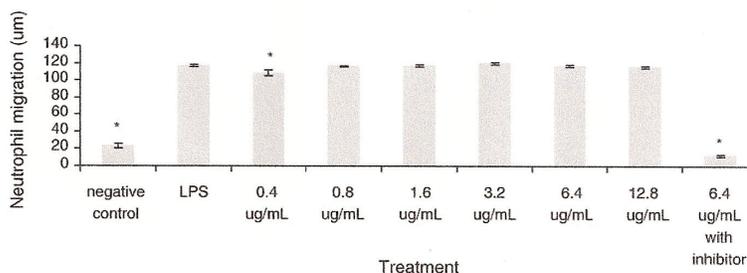
## 4. Discussion

The marine sponge *A. corrugata* contains two lectins which were denominated ACL-I e ACL-II, respectively. Both lectins were isolated by affinity chromatography on rabbit stroma-polyacrylamide gel and purified by gel filtration (ACL-I) and by affinity chromatography (ACL-II) on Ultrogel ACA 44 [ACL-II is also inhibited by D-galactose while ACL-I is not (data not shown)]. Using stroma-polyacrylamide column was possible eliminate completely the dark brown material present in the crude extract. However, using GlcNAc-Agarose column was not possible. ACL-I corresponded to the most active peak (90% of the total hemagglutinating activity recovered from the ACA 44 column) and then it was analysed in more details. Although only 0.2% of the sponge protein extract was recovered as ACL-I lectin with 37-fold of purification, these results show similarities concerning the protein yield obtained in the processes of purification of some lectins from marine sponges (Pajic et al., 2002; Moura et al., 2006). Native ACL-I has a molecular mass of 78.5 kDa estimated by gel filtration on Superose 12 HR and appeared as one unique band of 82.3 kDa by SDS-PAGE, with pI of 6.3 evaluated by native isoelectric focussing. The Mr of 13.9 kDa of its subunits estimated by SDS-PAGE in the presence of 2-mercaptoethanol and after 30 min of heating indicates that ACL-I is likely composed by six similar subunits, some of them joined by disulphide bridges. This lectin has a complex molecular structure.

Marine sponge lectins show diversity in molecular mass and structure. Some are simple monomeric lectins with Mr of 14 kDa (Dogovic et al., 1996) and others are organized in complex hexameric structure maintained by disulphide bridges with molecular mass of 200 kDa as the lectin from *Pellina semitubulosa* (Engel et al., 1992). Among the other invertebrates, the lectin from the mollusc *Helix pomatia* has also an hexameric structure with Mr of 79 kDa and it is composed by six subunits with Mr of 13 kDa (Hammarström et al., 1972).

Similar to most sponge lectins (Müller et al., 1983; Schröder et al., 1990; Pajic et al., 2002; Moura et al., 2006), ACL-I is a glycoprotein. Native ACL-I has a pI of 6.3. This value is in accordance with the prevalence of acidic over basic amino acids in lectins from marine sponges. This value is quite similar to pI of 6.1 of *P. semitubulosa* lectin (Engel et al., 1992), but it is higher than of *Axinella polypoides* lectin I and II (Bretting and Kabat, 1976) and lower than that of basic lectin from *Haliclona cratera* (Pajic et al., 2002).

Like *A. polypoides* lectin I (Bretting and Kabat, 1976), hemagglutinating activity of ACL-I is independent on the presence of divalent cations while *P. semitubulosa* (Engel et al., 1992) and *Cliona varians*



**Fig. 10.** Effect of ACL-I on neutrophil migration *in vitro*. Negative control: plasma solution. LPS: lipopolysaccharide from *Escherichia coli*. Inhibitor: 0.2 M GlcNAc. Results are reported as the mean  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0.05$  indicates significant difference compared to reference chemoattractant (LPS – lipopolysaccharides from *Escherichia coli*) (ANOVA-Dunnnett test).

Please cite this article as: Dresch, R.R., et al., ACL-I, a lectin from the marine sponge *Axinella corrugata*: Isolation, characterization and chemotactic activity, Comp. Biochem. Physiol. (2008), doi:10.1016/j.cbpc.2008.03.003

(Moura et al., 2006) lectins are  $\text{Ca}^{+2}$  dependent. ACL-I activity was stable at a narrow pH range between 6.5 and 8.5 and up to temperature of 65 °C for 30 min, but the activity decreased in the presence of urea and of reducing agents. However, the lectin was resistant to proteolytic action of trypsin and chymotrypsin. The resistance of the lectin to proteolytic enzyme digestion is maybe due to its hexameric arrangement. Jacaline, a lectin from *Artocarpus integrifolia* seeds (Rios et al., 1996), is also resistant to the action of trypsin, chymotrypsin and of pepsin accounted to its tetrameric structure. According to Ramos et al. (1999) the low digestibility of native proteins is related to their highly compacted three dimensional structures, stabilized by numerous hydrophobic interactions and hydrogen bridges.

*A. corrugata* lectin I agglutinates strongly native rabbit erythrocytes and with smaller intensity those from other animals including human erythrocytes. Lectins from the marine sponges of the genus *Axinella* show relative similarity related to erythrocytes specificity (Bretting et al., 1981).

ACL-I activity is inhibited specifically by carbohydrates containing 2-*N*-acetyl groups such as GlcNAc, GalNAc and ManNAc with equal intensity but not by D-galactose (Table 2). LacNAc has weaker inhibitory effect. The high affinity towards triacetylchitotriose, the stronger inhibitor, can be attributed to its high content of 2-*N*-acetyl groups indicating a multi-binding domain in the lectin. Taking in account that none of the not *N*-acetylated carbohydrates tested were effective as inhibitor, and that ManNAc is, it is possible to cogitate that OH groups of the other carbon atoms have little effect on the binding of the lectin to carbohydrates. It has been reported that some other lectins from marine sponges such as HOL-I isolated from *Halichondria okadai* (Kawagishi et al., 1994) and the lectins I and II from *Aaptos papillata* (Bretting et al., 1976) bind preferentially to *N*-acetylated derivatives and that of HOL-II has affinity for LacNAc (Kawagishi et al., 1994). However, the activity of lectins isolated from sponges of *Axinella* and from other genus is inhibited by D-galactose and some of them very weakly by GalNAc (Bretting and Kabat, 1976; Bretting et al., 1981; Schröder et al., 1990), but not by other *N*-acetyl carbohydrates. Considering the great differences related to the affinity to carbohydrates it is difficult to establish similarities between the lectins from the same sponges genus based on their carbohydrate specificity.

ACL-I showed chemotaxis towards rat neutrophils at the concentrations of 0.8 to 12.8 µg/mL, when compared to the effect of the chemoattractant LPS on neutrophil migration *in vitro*. The effect of ACL-I is not concentration dependent. It is supposed that the chemotactic effect of ACL-I is mediated by carbohydrate recognition domain because it is inhibited by pre-incubation of the lectin with GlcNAc, its inhibitor. However, it remains doubts if this lectin exercises chemotaxis by an indirect mechanism, similar to that described by Alencar and co-workers (2003). The findings suggest that ACL-I presents a pro-inflammatory action and it may constitute tool in the study of cellular events related to inflammation.

Lectin chemotaxis had been little studied in marine sponges. Monks et al. (2002) studying antichemotactic effect of aqueous extract from 10 marine sponges found that 6 of them showed this effect. Queiroz and co-workers (2008) reported that intraperitoneal injection into mice of *Cliona varians* lectin (50 µg/cavity) induced a maximal leukocyte migration to the cavity 24 h after the protein administration. On the other hand, several plant lectins were described displaying chemotactic activity (Benjamin et al., 1997; Dias-Baruffi et al., 2000; Alencar et al., 2003; Coelho et al., 2006). Small concentrations as 0.5 to 3 µg/mL of frutalin lectin isolated from *Artocarpus incisa* induced neutrophil migration *in vitro* (Brando-Lima et al., 2005) and *Euphorbia milii* lectin was concentration dependent chemotactic in the range of 10 to 40 µg/mL (Dias-Baruffi et al., 2000). However, it was necessary 300 µg/mL of *Arum maculatum* lectin to show chemotactic activity *in vitro*, although *in vivo* 200 µg/mL was enough to induce neutrophil migration into the intraperitoneal cavity of rats 4 h after the injection (Alencar et al., 2005).

The binding of lectins to the carbohydrates of specific receptors on cell surface triggers an array of biological responses such as cell aggregation, cytotoxicity, mitogenic stimulation of lymphocytes, induction of interleukines secretion, induction of neutrophil migration, etc (Singh et al., 1999; Pajic et al., 2002; Queiroz et al., 2008). Monks and co-workers (2002) working with crude aqueous extracts from *A. corrugata* verified that they display cytotoxicity and some antibacterial effect. Studies are under progress in our laboratory to evaluate other biological activities of ACL-I with the aim of its possible uses.

#### Acknowledgments

The authors thank Miss Cristiana Beatriz Reimann and Miss Silvana Hoff, students of Pharmacy Faculty and Chemistry Faculty, respectively, UFRGS, for technical assistance. This work was supported by Brazilian Agency CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and PROPESQ (Pró-Reitoria de Pesquisa)/UFRGS.

#### References

- Alencar, N.M.N., Assreuy, A.M.S., Alencar, V.B.M., Melo, S.C., Ramos, M.V., Cavada, B.S., Cunha, F.Q., Ribeiro, R.A., 2003. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces *in vivo* neutrophil migration by indirect mechanism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 1674–1681.
- Alencar, V.B.M., Alencar, N.M.N., Assreuy, A.M.S., Mota, M.L., Brito, G.A.C., Aragão, K.S., Bittencourt, F.S., Pinto, V.P.T., Debray, H., Ribeiro, R.A., Cavada, B.S., 2005. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1805–1814.
- Benjamin, C.F., Figueiredo, R.C., Henriques, M.G.M.O., Barja-Fidalgo, C., 1997. Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean agglutinin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30, 873–881.
- Bétail, G., Coulet, M., Genaud, L., Guillot, J., Scandariato, M., 1975. Les stromas érythrocytaires inclus en gel de polyacrylamide. Applications à la chromatographie d'affinité. *C. R. Soc. Biol.* 169, 561–566.
- Boyden, S., 1962. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 115, 453–466.
- Brando-Lima, A.C., Saldanha-Gama, R.F., Henriques, M.dasG.M.O., Monteiro-Moreira, A.C.O., Moreira, R.A., Barja-Fidalgo, C., 2005. Frutalin, a galactose-binding lectin, induces chemotaxis and rearrangement of actin cytoskeleton in human neutrophils: Involvement of tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 208, 145–154.
- Bretting, H., Kabat, E.A., 1976. Purification and characterization of the agglutinins from the sponge *Axinella polyoides* and a study of their combining sites. *Biochemistry* 15, 3228–3236.
- Bretting, H., Kabat, E.A., Liao, J., Pereira, M.E.A., 1976. Purification and characterization of the agglutinins from the sponge *Aaptos papillata* and a study of their combining sites. *Biochemistry* 15, 5029–5038.
- Bretting, H., Donadey, C., Vacelet, J., Jacobs, G., 1981. Investigations on the occurrence of lectins in marine sponges with special regard to some species of the family Axinellidae. *Comp. Biochem. Physiol. B* 70, 69–76.
- Carté, B.K., 1996. Biomedical potential of marine natural products. *BioScience* 46, 271–286.
- Coelho, M.B., DeSouza, I.A., Freire, M.G.M., Marangoni, S., Antunes, E., Macedo, M.L.R., 2006. Neutrophil migration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. *Toxicol.* 48, 529–535.
- Dias-Baruffi, M., Sakamoto, M., Rossetto, S., Vozári-Hampe, M.M., Roque-Barreira, M.C., 2000. Neutrophil migration and aggregation induced by euphorbin, a lectin from the latex of *Euphorbia milii*, var. *milii*. *Inflamm. Res.* 49, 732–736.
- Dogovic, N., Sladic, D., Kljajic, Z., Poznanovic, S., Gasic, M.J., 1996. Isolation and partial characterization of a lectin from the marine sponge *Crambe crambe*. *J. Serb. Chem. Soc.* 60, 83–88.
- Dresch, R.R., Haeser, A.S., Lerner, C., Mothes, B., Vozári-Hampe, M.M., Henriques, A.T., 2005. Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porifera) nativas da costa atlântica do Brasil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 15, 16–22.
- Dubois, M., Giles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- Engel, M., Bachmann, M., Schröder, H.C., Rinkevich, B., Kljajic, Z., Uhlenbruck, G., Müller, W.E.G., 1992. A novel galactose and arabinose-specific lectin from the sponge *Pellina semitubulosa*: isolation, characterization and immunobiological properties. *Biochimie* 74, 527–537.
- Ezpeleta, I., Arango, M.A., Irache, J.M., Stainmesse, S., Chabenat, C., Popineau, Y., Orecchioni, A.-M., 1999. Preparation of *Ulex europaeus* lectin-gliadin nanoparticle conjugates and their interaction with gastrointestinal mucus. *Int. J. Pharmaceut.* 191, 25–32.
- Gabius, H.-J., André, S., Kaltner, H., Siebert, H.-C., 2002. The sugar code: functional lectinomics. *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 165–177.
- George, W.C., Wilson, H.V., 1919. Sponges of Beaufort (N. C.) harbor and vicinity. *Bull. Bur. Fish.* 36, 130–179.
- Hammarström, S., Westöö, A., Björk, I., 1972. Subunit structure of *Helix pomatia* A hemagglutinin. *Scand. J. Immunol.* 1, 295–309.

Please cite this article as: Dresch, R.R., et al., ACL-I, a lectin from the marine sponge *Axinella corrugata*: Isolation, characterization and chemotactic activity, *Comp. Biochem. Physiol.* (2008), doi:10.1016/j.cbpc.2008.03.003

- Hentschel, U., Usher, K.M., Taylor, M.W., 2006. Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55, 167–177.
- Kawagishi, H., Yamawaki, M., Isobe, S., Usui, T., Kimura, A., Chiba, S., 1994. Two lectins from the Marine Sponge *Halichondria okadai*. An *N*-acetyl-sugar-specific lectin (Hol-I) and *N*-acetyllactosamine-specific lectin (Hol-II). *J. Biol. Chem.* 269, 1375–1379.
- Kilpatrick, D.C., Yeoman, M.M., 1978. Purification of the lectin from *Datura stramonium*. *Biochem. J.* 175, 1151–1153.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Monks, N.R., Lerner, C., Henriques, A.T., Farias, F.M., Schapoval, E.E.S., Suyenaga, E.S., da Rocha, A.B., Schwartzmann, G., Mothes, B., 2002. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected of the coast of Santa Catarina, southern Brazil. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 281, 1–12.
- Moura, R.M., Queiroz, A.F.S., Fook, J.M.S.L.L., Dias, A.S.F., Monteiro, N.K.V., Ribeiro, J.K.C., Moura, G.E.D.D., Macedo, L.L.P., Santos, E.A., Sales, M.P., 2006. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania promastigotes*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 145, 517–523.
- Müller, W.E.G., Conrad, J., Schröder, C., Zahn, R.K., Kurelec, B., Dreesbach, K., Uhlenbruck, G., 1983. Characterization of the trimeric, self-recognizing *Geodia cydonium* Lectin I. *Eur. J. Biochem.* 133, 263–267.
- Pajic, I., Kljajic, Z., Dogovic, N., Sladic, D., Juranic, Z., Gasic, M.J., 2002. A novel lectin from the sponge *Haliciona cratera*: isolation, characterization and biological activity. *Comp. Biochem. Physiol. C* 132, 213–221.
- Peumans, W.J., van Damme, E.J.M., 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109, 347–352.
- Phillips, S.G., Bretting, H., Kabat, E.A., 1976. A galactose-inhibitable mitogen for human lymphocytes from the sponge *Axinella polypoides*. *J. Immunol.* 117, 1226–1232.
- Ponchel, G., Irache, J.-M., 1998. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 34, 191–219.
- Queiroz, A.F.S., Moura, R.M., Ribeiro, J.K.C., Lyra, I.L., Cunha, D.C.S., Santos, E.A., De-Sales, M.P., 2008. Pro-inflammatory effect in mice of CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 147, 216–221.
- Ramos, M.V., Teixeira, C.R., Lopes, R.O.M., Cavada, B.S., 1999. Evaluation of the proteolytic susceptibility of three lectins from subtribe Diocleinae using enzymatic action, heat treatment and molecular modeling. *J. Food Biochem.* 23, 559–570.
- Rios, F.J.B., Cavada, B.S., Medeiros, D.A., Moreira, R.A., Vasconcelos, L.M., Oliveira, J.T.A., 1996. Digestibility of plant lectins from *Canavalia*, *Cratylia*, *Dioclea* and *Artocarpus* genera. *Lectins Biol. Biochem. Clin. Biochem.* 11, 277–284.
- Schröder, H.C., Kljajic, Z., Weiler, B.E., Gasic, M., Uhlenbruck, G., Kurelec, B., Müller, W.E.G., 1990. The galactose-specific lectin from the sponge *Chondrilla nucula* displays anti-human immunodeficiency virus activity in vitro via stimulation of the (2'-5') oligoadenylate metabolism. *Antivir. Chem. Chemother.* 1, 99–105.
- Sharon, N., 2007. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J. Biol. Chem.* 282, 2753–2764.
- Sharon, N., Lis, H., 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14, R53–R62.
- Singh, R.S., Tiwary, A.K., Kennedy, J.F., 1999. Lectins: sources, activities and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 19, 145–178.
- Wagner-Hülsmann, C., Bachiński, N., Diehl-Seifert, B., Blumbach, B., Steffen, R., Pancer, Z., Müller, W.E.G., 1996. A galectin links the aggregation factor to cells in the sponge (*Geodia cydonium*). *Glycobiology* 6, 785–793.
- Xiong, C., Li, W., Liu, H., Zhang, W., Dou, J., Bai, X., Du, Y., Ma, X., 2006. A normal mucin-binding lectin from the sponge *Cramiella australiensis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 143, 9–16.
- Zatta, P.F., Cummings, R.D., 1992. Lectins and their uses as biotechnological tools. *Biochem. Educ.* 20, 2–9.
- Zigmond, S.H., Hirsch, J.G., 1973. Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. *J. Exp. Med.* 137, 387–410.

## BIOGRAFIA

- 1990 - 1995** Graduação em Farmácia - Farmacêutico.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS.
- 1995 - 1997** Graduação em Farmácia – Habilitação Bioquímico em Alimentos.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre.
- 1996 - 1998** Responsável técnico pela Farmácia de dispensação Farmasul, Sapiranga.
- 1998 - 2001** Responsável pelo controle de qualidade do Laboratório Cangeri, Porto Alegre.
- 2001 - 2003** Responsável técnico pela Farmácia de dispensação Colla Pharma, Porto Alegre.
- 2002** Estágio no Laboratório de Lectinologia do Departamento de Bioquímica/ICBS/UFRGS, sob orientação da Profa. Dra. Magdolna M. Vozári Hampe.
- 2003 - 2004** Bolsista de Mestrado/CAPES pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, sob orientação da Profa. Dra. Amélia T. Henriques e co-orientação da Profa. Dra. Magdolna M. Vozári Hampe.
- 2003** Estágio no Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina da USP/Ribeirão Preto sob orientação da Profa. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira.

- 2004 - 2008** Bolsista de Doutorado/CAPES pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UFRGS, sob orientação da Profa. Dra. Amélia T. Henriques e co-orientação da Profa. Dra. Magdolna M. Vozári Hampe.
- 2005** Estágio por 2 semanas no Laboratório de Espectrometria de Massas na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia de Brasília sob coordenação do Prof. Dr. Carlos Bloch Júnior.
- 2006** Estágio por 3 semanas na Faculdade de Ciências Químicas da Universidade Nacional de Córdoba, Córdoba/Argentina, sob coordenação do Prof. Dr. Fernando Irazoqui.