



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

DANIELLE SOUTO DE MEDEIROS

**UMA LECTINA D-LACTOSE ESPECÍFICA DA ESPONJA
MARINHA *Cinachyrella apion*: PURIFICAÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E INTERAÇÃO COM *Leishmania chagasi***

**NATAL
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DANIELLE SOUTO DE MEDEIROS

**UMA LECTINA D-LACTOSE ESPECÍFICA DA ESPONJA
MARINHA *Cinachyrella apion*: PURIFICAÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E INTERAÇÃO COM *Leishmania chagasi***

Dissertação apresentada ao
Departamento de Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande do
Norte como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica.

Orientador: Dr. Elizeu Antunes dos
Santos

**Natal
2008**

Divisão de Serviços Técnicos

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Central Zila Mamede

Medeiros, Danielle Souto de.

Uma lectina D-lactose específica da esponja marinha *Cinachyrella apion*: purificação, caracterização e interação com *Leishmania chagasi* / Danielle Souto de Medeiros. – Natal, RN, 2008.

76 f.

Orientador: Elizeu Antunes dos Santos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Departamento de Bioquímica. Programa de Pós-Graduação Bioquímica.

1. *Cinachyrella apion* – Dissertação. 2. Esponja – Dissertação. 3. Lectina – Dissertação. 4. *Leishmania chagasi* – Dissertação. I. Santos, Elizeu Antunes dos. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 593.4(043.3)

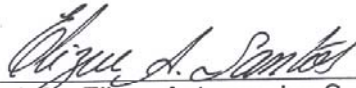
DANIELLE SOUTO DE MEDEIROS

**" UMA LECTINA D-LACTOSE ESPECÍFICA DA ESPONJA MARINHA
Cinachyrella apion: PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E INTERAÇÃO COM
Leishmania chagasi"**

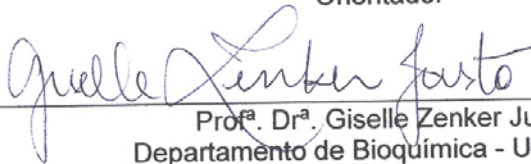
Dissertação apresentada ao
Departamento de Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande do
Norte como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica.

Aprovado em: 29/02/2008

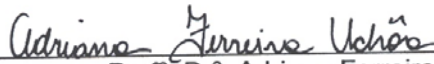
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Elizeu Antunes dos Santos
Departamento de Bioquímica - UFRN
Orientador



Prof.ª Dr.ª Giselle Zenker Justo
Departamento de Bioquímica - UNIFESP
1º Examinador



Prof.ª Dr.ª Adriana Ferreira Uchôa
Departamento de Biologia Celular e Genética - UFRN
2º Examinador

Ao meu marido Lívio e ao meu filho Rafael pelo apoio e incentivo, por abrirem mão da minha presença, mesmo em momentos tão importantes e necessários.

Aos meus pais, Nei e Odília, por todo o auxílio nessa jornada.

Meu agradecimento especial aos Professores Dr. Elizeu Antunes dos Santos e Dr. Maurício Pereira de Sales pela orientação, confiança, paciência e amizade. Essa dissertação é fruto do nosso trabalho, obrigada pelo empenho e esforço para que tudo desse certo.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e luz concedida durante a realização desse trabalho.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica pelos ensinamentos prestados durante esses anos de convivência.

À professora Dra. Selma Jerônimo, coordenadora do Mestrado em Bioquímica – UFRN.

Aos professores da banca de qualificação Dr. Maurício P. de Sales e Dra. Luciana da Matta pelas sugestões e conselhos.

Ao professor Dr. Eduardo Hajdu e à técnica Maíra Ventura de Oliveira, do Museu Nacional/UFRJ, pela identificação das esponjas em estudo.

Ao meu fiel ajudante Thales, sem a sua ajuda provavelmente esse trabalho não teria chegado ao fim, obrigada por todo o apoio e dedicação.

A Jannisson por toda a ajuda nos experimentos e nas discussões dos resultados.

A Pedro, muito obrigada pelo tempo gasto com esse trabalho, sua ajuda foi muito importante.

Aos amigos Norberto, Sheyla, Cleysyvan, Anna Celly, Virgínia, Ibson, Ludovico, Rodrigo, Dayse, Adelianna, Lissandra, Daniella, Mila, Ranieri, que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho. Obrigada pela companhia nos momentos mais difíceis.

À turma de mestrado de 2005, Léo, Gigi, Katya, Tici, Duda, Edilson, Robério, Leila, Cybelle, Dani, Héryca e Josane, obrigada a todos pela ajuda e amizade.

À professora Adriana Uchoa, da Genética, por todos os conselhos e orientações.

Ao professor Alexandre Flávio Silva de Queiroz, do Departamento de Biofísica Molecular, pela ajuda e doação das Leishmanias.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRN, em especial a Eliene, Ana Katarina, Margarita, Creuza e Jonas. Obrigada pelos momentos de descontração e de desabafo tão necessários.

Ao HEMOCENTRO-RN, pela doação das bolsas de sangue.

Aos órgãos financiadores: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFRN, pelos recursos para a elaboração deste trabalho.

À minha família pelo carinho e apoio constante, por me ajudarem com o meu filho nos momentos em que precisei estar ausente.

A um tio muito especial que me incentivou a iniciar o mestrado. Tio Bráulio, obrigada por ter me ajudado a retomar a direção da minha vida profissional.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

"Quando sopraem os ventos das mudanças, não se ergam abrigos, do contrário, ergam-se cata-ventos".

Sérgio Arouca
(Sanitarista - Fundação Oswaldo Cruz)

RESUMO

Uma varredura de lectinas foi realizada em extratos protéicos de quatro espécies de esponjas utilizando técnicas de imunodifusão para identificar lectinas imunorreativas ao anticorpo policlonal gerado contra CvL, uma lectina de *Cliona varians*. O extrato bruto da esponja *Cinachyrella apion* foi imunorreativo e apresentou atividade hemaglutinante a eritrócitos humanos de todos os grupos do sistema ABO. Assim, ele foi submetido ao fracionamento com acetona, à cromatografia de afinidade com IgG anti-CvL desglicosilada ligada a Sepharose e à cromatografia de gel filtração em uma coluna Superose 6 10 300 GL em sistema FPLC-AKTA (Fast Protein Liquid Chromatography) para a purificação de uma lectina imunorreativa ao anticorpo IgG anti-CvL. A lectina de *C. apion* (CaL) aglutinou todos os tipos de eritrócitos humanos, com preferência por eritrócitos papainizados dos tipos A e O. A atividade hemaglutinante mostrou-se independente dos íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} , e foi fortemente inibida pelo dissacarídeo D-lactose, até a concentração mínima de 6,25 mM. A massa molecular da CaL, determinada por gel filtração em uma coluna Superose 12 10 300 GL em sistema FPLC-AKTA e eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, foi de aproximadamente 124 kDa, consistindo de oito subunidades de 15,5 kDa, unidas por interações hidrofóbicas. A lectina foi relativamente estável em extensas faixas tanto de pH quanto de temperatura. Promastigotos de *Leishmania chagasi* foram aglutinados por CaL, indicando que receptores de lactose podem estar presentes nesse estágio do parasita. Esses achados são indicativos do papel de defesa fisiológica da CaL e do seu possível uso na antibiose de protozoários patogênicos.

Palavras-chave: *Cinachyrella apion*. Lectina. *Leishmania chagasi*. Esponja.

ABSTRACT

Four different sponge species were screened using Ouchterlony agarose gel and immunodiffusion tests to identify cross-reactivity with the polyclonal antibody IgG anti-deglycosylated CvL, a lectin from *Cliona varians*. Crude extract from the sponge *Cinachyrella apion* showed cross-reactivity and also a strong haemagglutinating activity towards human erythrocytes of all ABO groups. Thus, it was submitted to acetone fractionation, IgG anti-deglycosylated CvL Sepharose affinity chromatography, and Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC-AKTA) gel filtration on a Superose 6 10 300 column to purify a novel lectin. *C. apion* lectin (CaL) agglutinated all types of human erythrocytes with preference for papainized type A and O erythrocytes. The haemagglutinating activity is independent of Ca^{2+} , Mg^{2+} and Mn^{2+} ions, and it was strongly inhibited by the disaccharide D-lactose, up to a minimum concentration of 6.25 mM. CaL molecular mass determined by FPLC-AKTA gel filtration on a Superose 12 10 300 column and SDS gel electrophoresis was approximately 124 kDa, consisting of eight subunits of 15.5 kDa, assembled by hydrophobic interactions. The lectin was relatively heat- and pH-stable. *Leishmania chagasi* promastigotes were agglutinated by CaL, indicating that lactose receptors could be presented in this parasite stage. These findings are indicative of the physiological defense roles of CaL and its possible use in the antibiosis of pathogenic protozoa.

Key Words: *Cinachyrella apion*. Lectin. *Leishmania chagasi*. Sponge.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Subdivisão da família das Galectinas..	22
Figura 2 - Estrutura das Esponjas.	28
Figura 3 - Espécies de esponjas marinhas utilizadas no estudo	33
Figura 4 - Técnicas de Imunodifusão	37
Figura 5 - Teste de Imunodifusão radial	46
Figura 6 - Inibição da Hemaglutinação da Fração F1,0	49
Figura 7 - Perfil Cromatográfico de F1,0 na Coluna de Afinidade IgG anti-CvL Sepharose 4B	50
Figura 8 - Perfil Cromatográfico de CaL na Coluna de Exclusão Molecular Superose 6 10 300 GL em sistema de FPLC-AKTA	51
Figura 9 - Perfil Cromatográfico de CaL em Coluna de Exclusão Molecular e Determinação da massa molecular	53
Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida e determinação da massa molecular das subunidades de CaL	55
Figura 11 - Curva de Termoestabilidade da Lectina	57
Figura 12 - Efeito do pH sobre a lectina	58
Figura 13 - Fotomicrografias em microscópio de campo escuro de <i>L. chagasi</i> tratadas com CaL	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lectinas empregadas em parasitologia e suas especificidades quanto aos carboidratos.....	18
Tabela 2 - Classificação das lectinas baseada na especificidade de ligação aos carboidratos, homologia de estruturas primárias e relação evolutiva.....	21
Tabela 3 - Atividade hemaglutinante dos extratos brutos das esponjas.....	47
Tabela 4 - Atividade Hemaglutinante das frações protéicas de <i>Cinachyrella apion</i> ..	48
Tabela 5 - Resultados da purificação da lectina da esponja <i>C. apion</i> em diferentes etapas	52
Tabela 6 - Atividade hemaglutinante de CaL purificada	56

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

CaL	Lectina de <i>Cinachyrella apion</i>
CvL	Lectina de <i>Cliona varians</i>
CRP	Proteína C Reativa
DRC	Domínio de Reconhecimento a Carboidrato
EDTA	Ácido etilenodiamino-tetra-acético
ELISA	Ensaio de ligação imunoenzimática
Femx	Linhagem celular de melanoma
IgG	Imunoglobulina do tipo G
HeLa	Linhagem celular de câncer cervical
kDa	Quilodáltons
RPM	Rotações por minuto
SAP	Componente amilóide P sérico
SDS	Dodecilsulfato de sódio
Siglecs	Lectinas da superfamília das imunoglobulinas com afinidade para ácido siálico
TEMED	N', N', N', N'-Tetrametil-1-2-diaminometano
UH	Unidade de Hemaglutinação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Lectinas	16
1.2	Classificação das Lectinas	19
1.3	Lectinas nos Organismos	22
1.3.1	Lectinas em Invertebrados	24
1.3.2	Esponjas Marinhas e Lectinas	27
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivo Geral	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	Materiais biológicos	32
3.1.1	Esponjas marinhas	32
3.1.2	Coelhos	32
3.1.3	Eritrócitos Humanos	34
3.1.4	Leishmania	34
3.2	Equipamentos	34
3.3	Métodos	35
3.3.1	Produção de Anticorpos contra CvL	35
3.3.1.1	Imunização	35
3.3.1.2	Isolamento de imunoglobulinas do tipo G (IgG)	36
3.3.2	Extração protéica para varredura de lectinas imunorreativas à anti-CvL	36
3.3.3	Técnicas de imunodifusão	37
3.3.3.1	Ouchterlony	37
3.3.3.2	Imunodifusão radial (Mancini)	37
3.3.4	Construção da coluna de afinidade	38
3.3.5	Extração protéica da esponja <i>C. apion</i>	38
3.3.6	Fracionamento Protéico com Acetona	39
3.3.7	Cromatografia de Afinidade	39
3.3.8	Cromatografia de Exclusão Molecular em Superose 6 10 300 GL em Sistema de FPLC-AKTA	39
3.3.9	Preparo do sangue	40
3.3.9.1	Lavagem dos eritrócitos para ensaios de hemaglutinação	40

3.3.9.2	Tratamento dos eritrócitos com Papaína	40
3.3.9.3	Tratamento dos Eritrócitos com Tripsina	40
3.3.10	Ensaio de Hemaglutinação	41
3.3.11	Determinação da Dependência de íons: Ca ²⁺ , Mg ²⁺ e Mn ²⁺	41
3.3.12	Efeito da Temperatura sobre a Atividade da Lectina.....	42
3.3.13	Efeito do pH sobre a Atividade da Lectina.....	42
3.3.14	Ensaio de Inibição da Hemaglutinação por Carboidratos e Glicoproteína	42
3.3.14.1	Determinação da menor concentração inibitória do açúcar	43
3.3.15	Dosagem Protéica	43
3.3.16	Determinação da Massa Molecular por Cromatografia de Exclusão Molecular em Superose 12 10 300 GL em Sistema de FPLC-AKTA	43
3.3.17	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Descontínuo e Desnaturante (SDS-PAGE)	44
3.3.18	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Descontínuo e Não Desnaturante (PAGE)	45
3.3.19	Ensaio de Aglutinação de <i>Leishmania chagasi</i>	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Imunoensaio dos Extratos das Esponjas.....	46
4.2	Caracterização da Atividade Aglutinante das Frações Protéicas da esponja <i>Cinachyrella apion</i>	47
4.3	Inibição da Atividade Hemaglutinante da Fração F1,0	49
4.4	Isolamento da Lectina em Cromatografia de Afinidade	50
4.5	Purificação da Lectina em Superose 6 10 300 GL em Sistema de FPLC-AKTA	51
4.6	Determinação da Massa Molecular da Proteína Nativa por Cromatografia de Exclusão Molecular em Superose 12 10 300 GL em Sistema de FPLC-AKTA	52
4.7	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	54
4.8	Ensaio de Hemaglutinação com a Lectina Purificada.....	56
4.9	Determinação da Dependência de Íons Bivalentes	56
4.10	Curva de Termoestabilidade da CaL	57
4.11	Curva de Efeito do pH sobre a Atividade Hemaglutinante da CaL	57
4.12	Inibição da Atividade Hemaglutinante da Lectina por Carboidratos e Mucina	58

4.13	Aglutinação de <i>Leishmania chagasi</i>	58
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 LECTINAS

As lectinas foram detectadas pela primeira vez na Estônia pelo estudante de medicina Hermann Stillmark (1888) quando trabalhava em sua tese de doutorado com *Ricinus communis*. Naquela época, ele descreveu a presença de um fator tóxico em extratos de mamona que aglutinava células vermelhas do sangue. Este fato foi considerado o marco inicial da pesquisa de lectinas (RUDIGER, 1998).

Posteriormente verificou-se que extratos de plantas não tóxicas, como feijão (*Phaseolus vulgaris*), a ervilha (*Pisum sativum*) e a lentilha (*Lens culinaris*), também causavam aglutinação de eritrócitos (LANDSTEINER; RAUBITSCHKEK, 1907).

Em 1936, Summer e Howell sugeriram pela primeira vez que a aglutinação de eritrócitos produzida pela Concanavalina A (ConA), lectina extraída do feijão-deporco (*Canavalia ensiformes*), seria devido a interações entre a lectina e açúcares presentes na superfície das hemácias, estabelecendo a principal propriedade das lectinas, a afinidade por carboidratos.

Ao analisarem extratos de feijão lima (*Phaseolus limensis*), BOYD e REGUERA observaram a especificidade de aglutinação para hemácias do grupo sanguíneo A (BOYD; REGUERA, 1949). E em 1954, o termo lectina (do latim *legere* que significa selecionar, escolher) foi criado por BOYD e SHAPLEIGH para enfatizar a habilidade de algumas hemaglutininas em diferenciar células sanguíneas do sistema ABO.

Atualmente, o termo lectina é amplamente empregado para designar todas as proteínas que possuem ao menos um domínio não-catalítico, que se liga reversivelmente e especificamente a mono ou oligossacarídeos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; VIJAYAN; CHANDRA, 1999). Alternativamente, lectinas também são definidas como proteínas ou glicoproteínas de origem não-imune, com um ou mais sítios por subunidade, que pode ligar-se reversivelmente a segmentos glicídicos específicos, através de pontes de hidrogênio e interações de Van Der Waals (LIS; SHARON, 1998). Elas interagem com os segmentos glicídicos através de uma

região chamada domínio reconhecedor de carboidratos (DRC) que é altamente conservada em cada tipo de lectina (NI; TIZARD, 1996).

Ao interagirem com gliconjugados de superfície celular, as lectinas podem promover a formação de ligações cruzadas entre células adjacentes, desencadeando o processo denominado aglutinação (ALONSO et al., 2001; PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Ensaio de inibição de aglutinação, em que as lectinas são incubadas com diversos tipos de carboidratos ou glicoproteínas antes da adição das células modelo, constituem um meio de estabelecer a especificidade das lectinas (MARQUES; BARRACO, 2000).

Devido à interação específica das lectinas com glicoconjugados, seja em solução ou em superfície celular, essas proteínas encontram-se envolvidas em uma variedade de atividades biológicas, como: adesão celular, interações célula-matriz, apoptose e citotoxicidade em células e organismos (AKAHANI et al., 1997; DANGUY; CAMBY; KISS, 2002; SALES et al., 2000). Propriedades como atividade mitogênica, efeitos antibacterianos e antitumorais também foram relatadas (ENGERING; GEIJTENBEEK; VAN KOOYK, 2002; HAJTO et al., 2005; MOURA et al., 2006; SHARON; LIS, 2004; TATENO et al., 2002). Essas propriedades tornam tais moléculas poderosas ferramentas nas pesquisas biomédicas e biotecnológicas, com aplicações nos processos de isolamento, caracterização e tipagem de macromoléculas, células e microrganismos; na utilização em procedimentos de diagnóstico e estudo das funções do sistema imune, tais como indução da proliferação de linfócitos e produção de interferon/citocinas, asma e inflamação (TURNER, 2003); na diferenciação de células malignas e benignas e no nível de glicosilação associado à metástase (ARENAS et al., 1999; GORELIK et al., 2001). Além de todas essas citadas, muitas lectinas têm mostrado induzir apoptose em diferentes linhagens de células, dessa maneira destacando mais uma importante propriedade, a citotoxicidade (KIM et al., 1993; MIYOSHI et al., 2001; OHBA et al., 2004; PAJIC et al., 2002; RAO et al., 2005; YOON et al., 1999).

Nos últimos anos houve um aumento no interesse das interações lectinas-parasitas. Isso porque as lectinas tornaram-se ferramentas valiosas para estudar a inserção, distribuição e função de glicoconjugados na superfície e estruturas internas de parasitas (JACOBSON; DOYLE, 1996). Uma lista das lectinas mais comuns empregadas em parasitologia e seus mono e oligossacarídeos específicos são mostrados na tabela 1. Todos os parasitas têm carboidratos na sua superfície

ou na sua estrutura interna. Isso possibilita o uso de lectinas específicas para avaliar a topografia de carboidratos. As lectinas também podem ser utilizadas diretamente em ensaios de aglutinação, na purificação e análise de glicoconjugados. Como exemplos de utilização das lectinas na parasitologia, podem ser citados: definição do estágio de desenvolvimento dos parasitas *Onchocerca lienalis*, *Schistosoma mansoni* e *Leishmania donovani*; testes da viabilidade do parasita *Trypanosoma cruzi* após seu isolamento; marcação de estruturas na superfície de *Onchocerca gibsoni*, *Wuchereria bancrofti* e *Brugia malayi*. Lectinas também podem ser usadas para discriminar entre parasitas patogênicos ou não-patogênicos e na definição de sítios densos de carboidratos de várias formas desses organismos (JACOBSON; DOYLE, 1996).

Tabela 1 - Lectinas empregadas em parasitologia e suas especificidades quanto aos carboidratos.

Lectina	Carboidrato
<i>Arachis hypogaeae</i>	Gal β -1,3GalNAc > Gal
<i>Artocarpus heterophyllus</i>	Gal β -1,3GalNAc
<i>Axinella polypoides</i>	Gal β -1,6Gal
<i>Bauhinia purpúrea</i>	Gal β -1,3GalNAc > Gal β -1,3Gal
<i>Biomphalaria glabrata</i>	NeuAc > Fru > L-Gal > D-Man
<i>Canavalia ensiformis</i>	Man α -1 > Glc α -1 > GlcNAc α -1
<i>Carcinoscorpius rotunda cauda</i>	Ácido siálico (NeuAc α -2,6Gal) > GalNAc > GlcNAc
<i>Dolichos biflorus</i>	GalNAc α -1,3Gal
<i>Eunomymous europaeus</i>	Gal α -1,3Gal
<i>Glycine Max</i>	GalNAc α (or β)-1,3Gal > D-Gal
<i>Griffonia simplicifolia</i>	D-GlcNAc
<i>Helix pomatia</i>	GalNAc α -1,3Gal > GalNAc
<i>Laburnum alpinum</i>	L-Fuc α -1,2Gal
<i>Lens culinaris</i>	Man α -1 > Glc α -1 > GlcNAc α -1
<i>Limax flavus</i>	Ácido Siálico
<i>Lotus tetragonobulus</i>	L-Fuc α -1,2Gal
<i>Maclura pomifera</i>	Gal β -1,3GalNAc
<i>Phytolaca americana</i>	Gal β -1,4(3)GlcNAc; (GlcNAc, β -1,4) _n ; Man α -1,2Man
<i>Pisum sativum</i>	Man α -1 > Glc α -1
<i>Ricinus communis II</i>	Gal β -1,3GalNAc > GalNAc
<i>Ricinus communis I</i>	Gal β -1,4GlcNAc > Gal β -1,4GlcNAc β -1,6Gal
<i>Solanum tuberosum</i>	(GlcNAc β -1,4) ₂₋₅
<i>Sophora japônica</i>	Gal β -1,3GalNAc > Gal β -1,3GluNAc
<i>Triticum vulgare</i>	(GlcNAc β -1,4) _n > ácido siálico
<i>Ulex europaeus I</i>	L-Fuc α -1,2Gal
<i>Ulex europaeus II</i>	(GlcNAc β -1,4) ₂
<i>Vicia fava</i>	Man α -1 > Glc α -1
<i>Wisteria floribunda</i>	GalNAc α -1,6Gal > GalNAc > Gal

Man, manose; Gal, galactose; Fuc, fucose; GalNAc, N-acetilgalactosamina; GlcNAc, N-acetilglucosamina; Glc, D-Glucose; NeuAc, ácido neuramínico; Fru, frutose.
Adaptada de JACOBSON; DOYLE, 1996.

Estudos envolvendo lectinas e aglutinação de *Leishmania* são bastante freqüentes em nossa base de pesquisa. Recentemente duas lectinas purificadas das esponjas marinhas *Cliona varians* e *Tedania ignis* mostraram capacidade de aglutinar formas promastigotas de *Leishmania chagasi* (DIAS, 2006; MOURA et al, 2006), demonstrando que resíduos de D-galactose podem estar presentes na superfície do parasita nessa fase de desenvolvimento.

1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS LECTINAS

Embora tenham sido inicialmente detectadas em plantas, as lectinas são encontradas em muitos outros organismos, desde vírus e bactérias, até animais invertebrados e vertebrados (LIS; SHARON, 1998; LORIS, 2002). O reconhecimento de carboidratos ocorre nos mais variados contextos biológicos e por isso as lectinas são um grupo de proteínas altamente diverso, formado por um grande número de famílias.

As lectinas de plantas foram agrupadas de acordo com sua estrutura quaternária em pelo menos quatro grandes classes: (A) **Merolectinas** que são proteínas de pequeno tamanho e que possuem um único domínio reconhecedor de carboidratos, sendo, portanto, incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células; (B) **Hololectinas** que consistem de moléculas com, no mínimo, dois domínios idênticos ou bastante homólogos que se ligam ao mesmo carboidrato ou a açúcares de estrutura bastante similar. As hololectinas se destacam por exercerem, mais frequentemente, a propriedade principal das lectinas: aglutinar células e glicoconjugados, além de abrangerem a maioria das lectinas estudadas atualmente; (C) **Quimerolectinas**, lectinas que possuem ao menos dois domínios com atividades distintas: um capaz de se ligar a carboidratos ou glicoconjugados, e outro domínio distinto e bem definido, capaz de exercer uma atividade enzimática ou outra atividade biológica qualquer; e (D) **Superlectinas** que correspondem a um tipo especial de quimerolectinas, onde ao menos dois domínios são ligantes de carboidratos, no entanto, apresentam especificidades distintas (VAN DAMME et al., 1996).

Embora as lectinas de plantas sejam consideradas um grupo muito complexo e heterogêneo; levando em consideração suas seqüências, informações estruturais e clonagem de genes, foi possível subdividi-las em sete famílias estruturalmente e evolutivamente relacionadas: Lectinas de leguminosas; Lectinas ligadoras de quitina; Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) do tipo 2 e lectinas relacionadas; Lectinas ligadoras de manose em monocotiledôneas; Lectinas semelhantes à jacalina; Lectinas semelhantes à Amarantina e Lectinas de Cucurbitáceas (MURDOCK; SHADE, 2002) (Tabela 2).

Além da classificação acima, as lectinas em geral (seja de origem animal ou vegetal) também são classificadas dentro de cinco grupos, de acordo com o monossacarídeo pelo qual exibem maior afinidade. Esses monossacarídeos inicialmente foram agrupados conforme a orientação das hidroxilas em C3 e C4 da cadeia piranosídica (MAKELA, 1957). Assim as lectinas foram agrupadas primeiramente em ligantes de L-fucose, D-glucose/D-manose, D-galactose/N-acetil-D-galactosamina, e posteriormente novos grupos foram criados levando em conta substituições no anel, como no caso de N-acetil-D-glucosamina e ácido N-acetilneuramínico (RUDIGER, 1998). Portanto, e dependendo da especificidade com relação ao monossacarídeo, a lectina irá seletivamente ligar-se a um desses açúcares acima citados, que são constituintes típicos de superfície de células eucarióticas (LIS; SHARON, 1998).

Embora sobre as lectinas de origem vegetal haja um maior volume de estudos, as lectinas de origem animal têm sido detectadas desde a mesma época. Provavelmente, durante algum tempo, essas proteínas de origem animal não foram identificadas como moléculas ligadoras de carboidratos, ficando a sua caracterização limitada às suas propriedades secundárias e aplicações biomédicas.

Nos primeiros trabalhos sobre a estrutura primária de lectinas animais foi estabelecido que estas poderiam ser divididas em duas famílias: as Lectinas do Tipo-C (que requerem a presença de Ca^{2+} para sua atividade), e as Lectinas do Tipo-S (que reconhecem resíduos de galactose, hoje conhecidas como galectinas) (DRICKAMER, 1988). A percepção atual sobre esta classificação foi modificada, já que o espectro de estruturas conhecidas tornou-se bastante amplo (GABIUS et al., 2002; LORIS, 2002). A definição atualmente mais aceita está baseada na especificidade de ligação destas proteínas a carboidratos, na homologia de suas estruturas primárias, e na relação evolutiva entre elas, tornando possível agrupá-las

em pelo menos dez famílias de lectinas pertencentes ao reino animal: Lectinas do Tipo-C, Tipo-I, Tipo-P, Tipo-L, Galectinas, Eglectinas, Pentraxinas, Calreticulinas/Calnexinas, Anexinas, Discoidinas (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação das lectinas baseada na especificidade de ligação aos carboidratos, homologia de estruturas primárias e relação evolutiva.

Famílias de Lectinas	
Lectinas de Origem Vegetal	Lectinas de Origem Animal
Lectinas de leguminosas	Lectinas do tipo-C
Lectinas de curcubitáceas	Lectinas do tipo-I
Lectinas ligadoras de manose	Lectinas do tipo-L
Lectinas ligadoras de quitina	Lectinas do tipo-P
Lectinas semelhantes à jacalina	Galectinas ou Lectinas do tipo-S
Lectinas semelhantes à amarantina	Pentraxinas
RIPs do tipo 2	Eglectinas
	Calreticulinas/Calnexinas
	Anexinas
	Discoidinas

Adaptada de KILPATRICK, 2002; GABIUS et al, 2002 e LORIS, 2002.

Esses grupos incluem a maioria das lectinas animais conhecidas, no entanto, existem ainda muitas lectinas que não se enquadram nas características das famílias já estabelecidas, e futuros conhecimentos acerca de suas estruturas e propriedades bioquímicas, poderão levar essas lectinas a se encaixarem em famílias já existentes, ou a formar novas famílias de lectinas animais (KILPATRICK, 2002).

As lectinas do Tipo-C e as Galectinas compreendem as duas maiores famílias de lectinas do reino animal. A família de Lectinas do Tipo-C constitui o grupo mais diversificado com relação à estrutura, localização celular e especificidade de ligação com o monossacarídeo. Além disso, como já foi exposto, é composta por proteínas dependentes do íon Cálcio (Ca^{+2}) para desempenharem sua atividade biológica (KILPATRICK, 2002). As lectinas dessa família apresentam um elevado nível de conservação na estrutura de seus domínios de reconhecimento de carboidratos (DRC), geralmente composto por 120 resíduos de aminoácidos (DRICKAMER, 1988). As lectinas do Tipo-C encontram-se incorporadas em vários contextos de organização celular, o que permite classificá-las em duas categorias: (A) lectinas do Tipo-C solúveis, também chamadas de Colectinas e (B) lectinas do Tipo-C transmembrana, conhecidas também por Selectinas (KILPATRICK, 2002).

As galectinas formam uma família de lectinas altamente conservadas que se ligam a β -galactosídeos (RABINOVICH; RUBINSTEIN; TOSCANO, 2002). Sua atividade independe de íons metálicos, não apresentam pontes dissulfeto e

glicosilações. As galectinas têm sido mencionadas em várias funções essenciais, estando envolvidas nos processos de desenvolvimento e diferenciação celular, apoptose e metástase tumoral. Elas podem ser encontradas no citosol, núcleo ou acumuladas em sítios citosólicos (DANGUY; CAMBY; KISS, 2002). Os membros da família das galectinas contêm no mínimo um DRC com cerca de 130 aminoácidos. Com base na arquitetura estrutural dos domínios de ligação, essas lectinas foram subdivididas em proto (domínios idênticos), quimera (um domínio de galectina e um domínio não lectínico) e tandem (com dois domínios lectínicos distintos) (LIU; PATTERSON; WANG, 2002) (Figura 1).



Figura 1 - Subdivisão da família das Galectinas. Adaptada do site: www.glycoforum.gr.jp/science/word/lectin/LE_E.html (acesso em 10 de janeiro de 2008).

1.3 LECTINAS NOS ORGANISMOS

Abundantes na natureza, as lectinas são encontradas em quase todos os organismos, sendo amplamente distribuídas entre vegetais, vírus, bactérias, mamíferos e vários grupos de invertebrados (GERLACH et al., 2005; KILPATRICK, 2002).

Em bactérias, protozoários e vírus, há indícios de desempenharem um papel auxiliar e/ou promoverem a adesão destes microrganismos às estruturas celulares de seus hospedeiros, um pré-requisito para que a infecção ocorra (LIS; SHARON,

1998). Em trabalho desenvolvido por GLICK e colaboradores (1991), foi constatado que na infecção causada pelo vírus da influenza, o processo de adesão viral à célula alvo era mediado por uma lectina que se liga a resíduos de ácido siálico (ácido N-acetil-neuramínico) presentes na face externa da membrana celular (GLICK et al., 1991). Muitos membros de enterobactérias possuem lectinas na sua parede que permitem o sucesso da adesão ao epitélio intestinal, conduzindo a infecções no trato urinário e gastrointestinal (OFEK; SHARON, 1990). Da bactéria da espécie *Pseudomonas aeruginosa* foi isolada uma lectina que se liga à superfície das células do hospedeiro, causando danos aos tecidos de pacientes infectados (GILBOA-GABER; SUDAKEVITZ, 1999).

PEUMANS e VAN DAMME (1995) estudaram os relatos de ocorrência de lectinas em plantas superiores e observaram que estas proteínas já haviam sido detectadas em cerca de 500 espécies. Muitas das lectinas vegetais são encontradas nas sementes, embora sua presença já tenha sido observada em todos os tipos de tecidos vegetais, como casca, folha, caule, frutos e raízes (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Dentre as várias hipóteses propostas sobre as funções das lectinas em plantas, três são atualmente mais aceitas. A primeira assume a possível participação dessas proteínas nas relações simbióticas entre plantas fixadoras de nitrogênio e bactérias, um processo de importância crucial no ciclo de nitrogênio terrestre. No entanto essa hipótese fica restrita apenas à família de lectinas de leguminosas que representa a família melhor estudada, com mais de 100 representantes isolados e caracterizados (LIS; SHARON, 1998). A segunda hipótese se enquadra de maneira mais geral e pressupõe que as lectinas vegetais são agentes de defesa contra microrganismos fitopatogênicos, insetos fitófagos e animais herbívoros (RUDIGER, 1998; HARPER et al., 1995). Tem sido mostrado, também, que lectinas de plantas possuem propriedades citotóxica, antifúngica e anti-helmíntica (nematóides) tanto *in vitro* quanto *in vivo* e são tóxicas para animais superiores (OLIVEIRA et al., 1994; OKA et al., 1997; RIPOLL et al., 2003). A terceira hipótese sugere que estas moléculas poderiam funcionar como substâncias de reserva, uma vez que, em algumas sementes de plantas, as lectinas representam a principal fração de proteínas solúveis (VAN DAMME et al., 1996; PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Obviamente, as lectinas são degradadas durante a germinação, contribuindo, assim, para o seu conjunto nutricional.

Nos animais vertebrados distinguem-se duas categorias de lectinas: as citoplasmáticas, que são extraídas em soluções aquosas ou salinas, e as lectinas de membrana que requerem o uso de detergentes para sua solubilização. Muitas das lectinas ligadas à membrana são receptores para ligantes fisiológicos, como o receptor manose-6-fosfato que liga enzimas lisossomais (KORNFELD, 1987), e receptores para asialoglicoproteínas, que ligam asialoglicoproteínas do soro (ASHWELL; HARDFORD, 1982). Embora as lectinas presentes nos animais apresentem uma incontestável variedade de funções, a maioria delas é considerada molécula de reconhecimento, uma vez que age no processo de defesa contra patógenos e participa do tráfego celular (KILPATRICK, 2002). O papel biológico destas proteínas tem sido alvo de estudos já há muitas décadas. Esta situação é totalmente compreensível devido à enorme quantidade de interações nas quais as lectinas podem engajar-se. É muito improvável que um papel fisiológico geral para todas as lectinas possa ser encontrado. Mesmo lectinas que são muito similares em suas estruturas primárias e conformações podem servir a diferentes propósitos. Provavelmente, as lectinas encontram-se empregadas pela natureza em diferentes funções, dependentes de sua localização, especificidade e do momento de sua síntese.

1.3.1 Lectinas em Invertebrados

Os invertebrados não possuem um sistema imune adaptativo baseado na magnitude de anticorpos altamente específicos e receptores de antígenos como aqueles que ocorrem em vertebrados (MARQUES; BARRACO, 2000).

Na ausência de imunoglobulinas mediadoras da imunidade adquirida, lectinas presentes em tecidos de organismos invertebrados interagem com macromoléculas de forma a promover uma atividade inata, fornecendo a primeira linha de defesa, podendo desencadear um importante mecanismo efetor na eliminação potencial de patógenos (BAYNE et al., 1985; KILPATRICK, 2002). Devido ao fato das lectinas terem a habilidade de ligar-se a carboidratos e promover a aglutinação de diferentes células, essas moléculas possuem um considerável papel nas reações de

reconhecimento do não-próprio nos invertebrados. Assim como as imunoglobulinas dos vertebrados, as lectinas dos invertebrados podem aglutinar microrganismos e favorecer sua fagocitose, por mediar a ligação entre a superfície do hemócito e o corpo estranho (opsonização). Existem três diferentes rotas para o reconhecimento de partículas estranhas, nas quais as lectinas podem interagir: a primeira é através da interação da lectina do invertebrado com o carboidrato de membrana do microrganismo; a segunda ocorre pela ligação entre a lectina do patógeno e o açúcar presente na membrana das células do invertebrado; e a terceira rota, ocorre através da ligação de lectinas humorais com glicoconjugados presentes nos microrganismos, formando um complexo que se une ao receptor de opsonina da célula de defesa dos invertebrados (REWRANTZ, 1983).

Nos invertebrados, já foram detectadas e estudadas lectinas nos diversos filos. Entre os cnidários, a anêmona *Bunodeopsis antillensis* apresenta duas aglutininas específicas para eritrócitos humanos com características bem distintas (FENTON-NAVARRO et al., 2003). Na espécie de anelídeo marinho *Chaetopterus variopedatus*, pertencente à classe poliqueta, foi isolada uma lectina específica para galactose e com atividade anti-HIV-1 (WANG et al., 2006). Lectinas com especificidade para D-galactosídeos também foram purificadas da parede corporal do equiuróide, *Urechis unicinctus* e dois anelídeos, *Neanthes japonica* e *Marphysa sanguinea* (OZEKI; TAZAWA; MATSUI, 1997).

No filo mollusca, lectinas isoladas do bivalve *Ruditapes philippinarum*, popularmente conhecido mexilhão, exibiram forte atividade anti-bacteriana, indicando que lectinas desencadeiam o papel de eliminação de bactérias, participando desse mecanismo de defesa (BULGAKOV et al., 2004). Na hemolinfa da espécie *Belamya bengalensis*, pertencente à classe Gastropoda, foi purificada uma lectina com forte especificidade para a glicoproteína mucina. A proteína isolada apresentou uma potente atividade mitogênica, uma vez que estimulou a proliferação dos linfócitos T, especificamente do tipo Th1 (BANERJEE et al., 2004). A *Aplysia dactylomela* é uma espécie de molusco que contém em sua glândula púrpura uma lectina com atividade hemaglutinante para eritrócitos de coelhos, a qual é inibida pela glicoproteína fetuína (MELO et al., 2000). Nos ovos e soros do molusco do gênero *Aplysia* também foram encontradas aglutininas que foram inibidas por D-galacturônico (KAMIYA; SHIMIZU, 1981).

Em artrópodes, o subfilo Crustacea tem sido alvo de muitos trabalhos. Lectinas já foram detectadas nas seguintes espécies: *Penaeus indicus* (MAHESWARI; MULLAINADHAN; ARUMUGAN, 1997), *Penaeus japonicus* (KONDO; ITAMI; TAKAHASHI, 1998) e *Penaeus paulensis*. (MARQUES; BARRACO, 2000). A espécie *Peaeus monodon* possui uma lectina PmLec e mostrou dependência por Ca^{2+} e especificidade por lipopolissacarídeos (componentes de superfície em bactérias gram-negativas) (LUO et al., 2005). Na hemolinfa da espécie *Penaeus japonicus* foi detectada e purificada uma lectina (PjLec) capaz de aglutinar eritrócitos de humanos, camundongos, ratos e coelhos, independente da presença do íon Ca^{2+} nos ensaios (YANG et al., 2007). Já na espécie *Litopenaeus schimitti* foi detectada a presença de uma lectina que aglutina eritrócitos de diferentes animais e possui especificidade para açúcares acetilados, particularmente o ácido siálico e diferentes tipos de polissacarídeos, sugerindo um possível papel no reconhecimento de microrganismos (COMINETTI et al., 2002).

Uma aglutinina do soro encontrada na espécie de camarão branco *Fenneropenaeus indicus* foi purificada e caracterizada (MAHESWARI; MULLAINADHAN; ARUMUGAN, 1997). Sua massa molecular nativa, determinada em coluna de gel filtração, foi de 200 kDa e, em SDS-PAGE, sob condições redutoras, foram detectadas subunidades de 27 kDa. Além disso, a aglutinina reconheceu grupos acetilados e sua atividade foi independente de íons bivalentes. No ano de 2005, ALPUCHE e colaboradores isolaram da hemolinfa do camarão *Litopenaeus setiferus* uma lectina com capacidade de aglutinar eritrócitos de coelhos, porquinhos da Índia e ovelhas, no entanto a mesma não aglutinou eritrócitos de humanos, galinha e cavalo, dentre outros. A lectina purificada foi denominada de LsL e se apresentou como uma proteína heterotetrâmera, com duas subunidades de 80 kDa e duas de 52 kDa.

Mais recentemente, pesquisadores da Tailândia purificaram e caracterizaram uma lectina do camarão banana *Fenneropenaeus merguensis*. A lectina foi denominada FmL e teve sua massa molecular nativa determinada em 316,2 kDa. Por análise em SDS-PAGE foi mostrado que a proteína consistia de um oligômero com subunidades de 30,9 e 32,3 kDa. A FmL foi capaz de aglutinar várias espécies do gênero *Vibrio*, indicando contribuir para a resposta de defesa de camarões contra bactérias potencialmente patogênicas (RITTIDACH; PaIJIT; UTARABHAND, 2007).

1.3.2 Esponjas Marinhas e Lectinas

Com origem no período cambriano, o filo Porifera contém atualmente descritas cerca de 6.000 espécies de esponjas. As esponjas são organismos aquáticos primitivos, na maioria marinhos, que não possuem tecidos bem definidos, nem órgãos estabelecidos. Sua organização é muito simples e apresentam um crescimento assimétrico, com grande diversidade de cores e tamanhos. São animais filtradores, que realizam digestão intracelular, e cuja respiração e excreção ocorrem por difusão direta entre células e a água circulante através dos canais do corpo (BELL; BARNES, 2001).

A parede do seu corpo é formada pela epiderme, pelo mesênquima e pelo revestimento interno de células flageladas, chamadas coanócitos, que realizam a digestão do alimento que chega ao interior do animal. No mesênquima, encontram-se os amebócitos que distribuem o alimento pelas diversas células do corpo. Existem poros inalantes (óstios) por onde a água entra no porífero; e um poro exalante (ósculo) por onde a água sai do porífero. A cavidade central, forrada de coanócitos, é denominada de átrio. No mesênquima, podem ser encontradas espículas calcárias ou silicosas que fazem parte da sustentação do corpo do animal (Figura 2). Há, contudo, esponjas sem espículas (esponjas córneas), com esqueleto de fibras de espongina (BELL; BARNES, 2001).

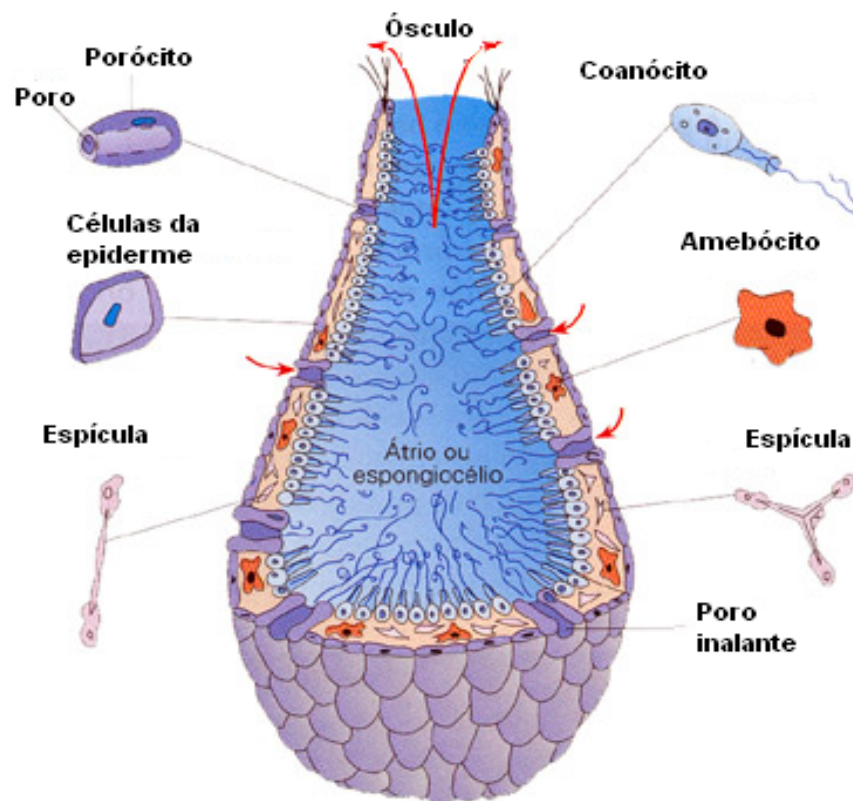


Figura 2 - Estrutura das Esponjas. Adaptada do site: http://fossil.uc.pt/pags/fbm_porifera.dwt (acesso em: 10 de janeiro de 2008).

Esponjas marinhas apresentam-se como um reservatório biológico de moléculas bioativas. Possivelmente esse fato decorre do longo período evolucionário que esses animais percorreram, ao longo de seus 800 milhões de anos de existência, convivendo com uma ampla diversidade de ambientes e outros seres vivos, numa luta incessante pela conquista do *habitat*. As esponjas produzem uma ampla variedade de toxinas e outros componentes moleculares com o objetivo de repelir predadores (PAWLIK; MCFALL; ZEA, 2002), competir por espaço com outros organismos sésseis e para a comunicação e proteção contra infecções (BECERRO; TURON; URIZ, 1997). O interesse em estudar esponjas marinhas foi intensificado após o isolamento e caracterização de um componente anti-HIV chamado niphatevirin presente na esponja *Niphates erecta* (O'KEEFE et al., 1997).

Historicamente, o primeiro registro de lectinas isoladas de esponjas foi feita por DODD e colaboradores em 1968 (DODD; MACLENNAN; HAWKINS, 1968). Em 1985, MEBS e colaboradores testaram a atividade hemaglutinante do extrato bruto de 48 esponjas coletadas do Mar Vermelho, da Barreira de Recifes da Austrália e de

Florida Keys (MEBS; WEILER; HEINKE, 1985). Destas, 42% mostraram a presença de lectinas promovendo hemaglutinação de eritrócitos humanos do sistema ABO. Uma varredura nas espécies de esponjas coletadas no Mediterrâneo (BRETTEING et al., 1981a) e no Mar Adriático (KLJAJIC, 1986) demonstraram efeitos semelhantes.

No ano de 2000, MIARONS e FRESNO investigaram 22 espécies de 12 famílias de esponjas tropicais. Dentre elas, 10 apresentaram atividade hemaglutinante para eritrócitos de vários animais, inclusive quando esses foram submetidos a variados tratamentos enzimáticos. Dessas, três espécies do gênero *Aplysina* se destacaram, e duas tiveram suas lectinas purificadas. As lectinas de *A. lawnosa* e *A. archeri* exibiram uma massa molecular de 63 kDa (em sua forma nativa) e quando submetidas a condições redutoras apresentava massa molecular em torno de 16 kDa, sugerindo serem homotetrâmeras. Elas apresentaram dependência de cátions bivalentes e afinidade para galactosídeos (MIARONS; FRESNO, 2000).

De outra esponja, *Haliclona cratera*, foi isolada uma lectina de 29 kDa, dependente de íons metálicos sem pontes dissulfeto e com afinidade para galactose. Essa lectina apresentou atividade citotóxica sobre células tumorais HeLa (câncer cervical) e FemX (melanoma), e atividade mitogênica em linfócitos (PAJIC et al., 2002). Efeitos mitogênicos em leucócitos também foram observados para lectinas de esponjas de várias espécies como *Pellina semitubulosa* (ENGEL; BACHMAN; SCHROEDER, 1992), *Cinachyrella alloclada* (ATTA et al., 1989) e *Geodia cydonium* (BRETTEING et al., 1981b).

Da espécie *Axinella polypoide* foram isoladas quatro lectinas com especificidade para galactose (lectinas – I, II, III e V) e uma com afinidade para ácido hexurônico (lectina IV) (BUCK et al., 1992). Posteriormente BUCK e colaboradores (1998), observaram que as lectinas I e II dessa espécie apresentavam 65% de homologia em sua região N-terminal, massa molecular muito similar, pontes dissulfeto entre os resíduos 4 e 46 e ausência de glicosilações (BUCK et al., 1998).

Na esponja *Aaptos papillata* já foram isoladas três lectinas, conhecidas como Aaptos lectina I, II e III, respectivamente. A primeira delas apresentou uma especificidade para N-Acetil-glicosamina, enquanto as outras duas foram inibidas por N-Acetil-galactosamina, N-Acetil-glicosamina e ácido siálico (BRETTEING; SCHOTTELIUS, 1978). Uma lectina purificada da espécie *Suberites domuncula*

possuía uma massa molecular de 27 kDa e atividade bactericida (SCHRÖDER et al., 2003). Na espécie *Aphrocallistes vastus* foram encontradas duas lectinas do tipo C com afinidade para galactose e com atividade de adesão celular (GUNDACKER et al., 2001). XIONG e colaboradores (2006) isolaram da esponja *Craniella australiensis* uma lectina com massa molecular de 54 kDa (nativa), a qual apresentava três subunidades de 18 kDa unidas por pontes dissulfeto, especificidade para a glicoproteína mucina e independência dos íons Ca^{+2} e Mg^{+2} para a aglutinação de diferentes eritrócitos.

MOURA e colaboradores, em 2006, mostraram a purificação e caracterização de uma lectina da esponja marinha *Cliona varians*, denominada CvL (MOURA et al., 2006). Esta apresentou dependência pelo íon cálcio, especificidade pelo monossacarídeo galactose, efeito citotóxico sobre bactérias Gram-positivas e a capacidade de aglutinar formas promastigotas de *Leishmania chagasi* coradas com *Coomassie blue*. Em 2008, QUEIROZ e colaboradores mostraram que a CvL apresentou atividade pró-inflamatória, induzindo a migração de neutrófilos em camundongos. Baseado no potencial dessa lectina, anticorpos IgG anti-CvL foram gerados com a finalidade de pesquisar lectinas similares em esponjas diferentes.

A variedade de lectinas presentes em esponjas marinhas e que apresentam características diversificadas intensifica o interesse pela descoberta dessas moléculas em novas espécies de esponjas. As espécies *Cinachyrella apion*, *Amphimedon viridis*, *Haliclona melana* e *Tedania ignis*, utilizadas neste trabalho, são comumente encontradas no litoral brasileiro, principalmente fixadas a substratos rochosos e arenosos. Além da abundância de suas ocorrências no nosso litoral, a seleção das esponjas está relacionada ao fato de não haver relatos na literatura sobre a descrição de lectinas nestas espécies.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Prospecção, purificação e caracterização de uma proteína imunorreativa ao anticorpo gerado contra CvL (IgG-anti CvL) com atividade lectínica de uma esponja marinha (*Cinachyrella apion*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar físico-quimicamente a lectina isolada quanto à (ao):

- Massa molecular;
- Presença de subunidades;
- Especificidade de ligação com diferentes tipos sanguíneos e carboidratos;
- Efeito do pH sobre sua atividade hemaglutinante;
- Efeito da temperatura sobre sua atividade hemaglutinante;
- Dependência por íons bivalentes.

Testar atividade aglutinante sobre promastigotos de *Leishmania chagasi*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS BIOLÓGICOS

3.1.1 Esponjas marinhas

As esponjas marinhas das espécies *Cinachyrella apion*, *Amphimedon viridis*, *Haliclona melana*, *Tedania ignis* e *Cliona varians* foram coletadas na praia de Santa Rita, localizada no litoral Norte da região metropolitana de Natal, Estado do Rio Grande do Norte. Os animais coletados foram acondicionados em caixas de isopor contendo água do mar devidamente refrigerada sendo, em seguida, transportados para o laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, onde foram armazenados a temperaturas inferiores a -20°C . Espécimes das esponjas coletadas, com exceção da *C. varians*, foram enviados para o Museu Nacional, RJ, onde foram feitas as identificações das espécies pelo Professor Dr. Eduardo Hajdu e mantidas na coleção com os números MNRJ 10142, 10077, 10143 e 10010, respectivamente (Figura 3).

3.1.2 Coelhos

Os coelhos da raça Nova Zelândia Branco, de três meses de idade, foram adquiridos numa loja veterinária local, trazidos ao biotério do Departamento de Bioquímica e mantidos em gaiolas individuais, com ciclo claro/escuro de 12h, e água e ração *ad libitum*.

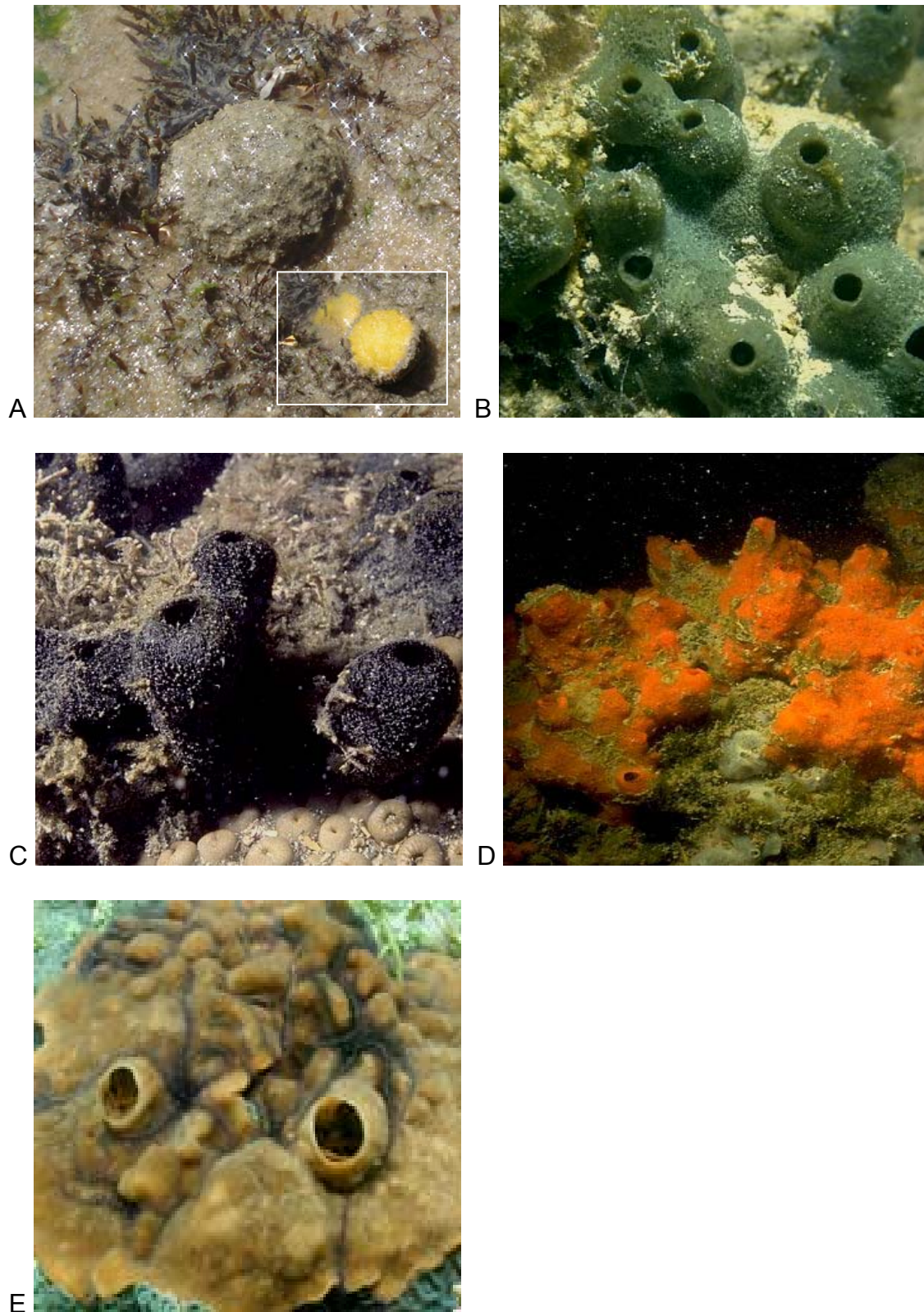


Figura 3 - Espécies de esponjas marinhas utilizadas no estudo. (A) *Cinachyrella apion* (detalhe apresenta a esponja em corte transversal), (B) *Amphimedon viridis*, (C) *Haliclona melana*, (D) *Tedania ignis* e (E) *Cliona varians*.

3.1.3 Eritrócitos Humanos

Os eritrócitos humanos foram obtidos através de doações de bolsas de sangue pelo HEMOCENTRO – RN. As bolsas fornecidas encontravam-se fora do prazo de validade para transfusões.

3.1.4 Leishmania

Formas promastigotas de *Leishmania chagasi* coradas com *Coomassie blue*, foram fornecidos pelo professor Alexandre Flávio Silva de Queiroz, do Laboratório de Biofísica Molecular –UFRN.

3.2 EQUIPAMENTOS

- Banho Maria (Tecnal - Te 056)
- Balança analítica eletrônica – BEL Engineering.
- Balança eletrônica –Tecnal (mod. B-tec 2200)
- Centrífuga refrigerada HITACHI CR G
- Espectrofotômetro Pharmacia Biotec (mod, ultrospec 2100 - pro)
- Microcentrífuga para Eppendorf 5410
- Fonte de eletroforese BIORAD (mod. Power pac 300)
- Cuba de eletroforese BIORAD
- Liquidificador industrial Skymesen
- Peagâmetro Analyser (pH 300)
- Microscópio óptico de campo escuro Studart
- Aparelho de fotodocumentação da BIO-RAD Gel Doc XR 170-8170 e 170-8171
- FPLC AKTA Purifier (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Produção de Anticorpos contra CvL

3.3.1.1 Imunização

Os coelhos de três meses de idade foram imobilizados e sangrados através de corte na extremidade da orelha feito com bisturi cirúrgico, para obtenção do soro pré-imune. Após a coleta de 5 mL de sangue este material foi deixado em repouso por 16 horas a 5°C. O soro foi separado do coágulo formado, centrifugado para clarificar e reservado a -20°C, para utilização em ensaios posteriores como controle negativo.

Após a obtenção do soro pré-imune, amostras de CvL, gentilmente cedidas pelo professor Maurício Pereira de Sales, do Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas, foram desglicosiladas por meio de um kit próprio (Native Protein Deglycosylation Kit – SIGMA) e preparadas a uma concentração de 1 mg/mL em solução salina, NaCl 150 mM. Este material foi emulsificado em Adjuvante Completo de Freund (ACF) na proporção 1:1 (solução de CvL desglicosilada: ACF). Após 30 dias, novas aplicações de antígenos emulsificados em adjuvante incompleto de Freund (AIF) foram realizadas regularmente. O protocolo utilizado para imunização do coelho com obtenção de anticorpos policlonais seguiu o método descrito por THORPE (1994):

1° dia – imunização subcutânea do antígeno + ACF (0,5 mL)

30° dia – imunização subcutânea do antígeno + AIF (0,5 mL)

60° dia – imunização subcutânea do antígeno + AIF (0,5 mL) + 1° sangria

90° dia – imunização subcutânea do antígeno + AIF (0,5 mL) + 2° sangria

120° dia – imunização subcutânea do antígeno + AIF (0,5 mL) + 3° sangria

A obtenção e estocagem do soro após imunização seguiram o mesmo procedimento do soro pré-imune. Reforços foram aplicados semanalmente e antissoros obtidos regularmente.

3.3.1.2 Isolamento de imunoglobulinas do tipo G (IgG)

As amostras de antissoros obtidas foram passadas em uma coluna de proteína A-Sepharose previamente equilibrada com tampão NaH_2PO_4 0,02M, pH 8,0, 150 mM NaCl. O material não adsorvido foi eluído com tampão de equilíbrio. A eluição de IgGs adsorvidas na coluna foi realizada com tampão Na_2HPO_4 50mM, Acido cítrico 25mM, pH 3,0. As IgGs isoladas foram neutralizadas com NaOH 0,1M, dialisadas contra água e liofilizadas. Soluções estoques de IgG foram preparadas em PBS pH 7,5, BSA 2% na concentração de 10 mg/mL. Os anticorpos assim obtidos foram utilizados para testes de imunodifusão radial e Ouchterlony e para a construção da coluna de afinidade (IgG anti-CvL desglicosilada Sepharose 4B).

3.3.2 Extração protéica para varredura de lectinas imunorreativas à anti-CvL

Cerca de 500 mg de cada esponja foram congelados em nitrogênio líquido e pulverizados em gral de porcelana. Esse material foi acondicionado em tubos Falcon e liofilizado para obtenção de um pó. Um kit de extração de proteínas (Sample Grinding Kit – Amersham Biosciences) foi utilizado para a preparação dos extratos brutos a partir de cerca de 100 mg do pó obtido anteriormente. O tampão de extração utilizado continha uréia 8M, CHAPS 2% e DTT 0,5%. Todo o procedimento de extração ocorreu conforme instruções do fabricante.

3.3.3 Técnicas de imunodifusão

3.3.3.1 Ouchterlony

Lâminas contendo gel de agarose 1% em tampão borato pH 7,5, acrescido de clorexedine 0,01%, foram preparadas e orifícios de 2-3 mm de diâmetro foram cortados e distribuídos de forma radial (Figura 4A), utilizando um molde e uma bomba a vácuo. Todos os extratos brutos foram acrescidos de galactose até uma concentração final de 200 mM e deixados em repouso por 30 min. Após esse período, os extratos foram aplicados nos orifícios radialmente ao local de aplicação do anticorpo policlonal anti-CvL desglicosilada. Solução salina (NaCl 150 mM) contendo 200 mM de galactose foi utilizada como controle negativo e o extrato bruto de CvL como controle positivo. A formação de halos foi observada após 24h de reação à temperatura ambiente (25°C), em câmara úmida.

3.3.3.2 Imunodifusão radial (Mancini)

O mesmo procedimento anterior foi repetido acrescentando, dessa vez, o anticorpo (IgG anti-CvL desglicosilada) ao gel na proporção de 1:80 (MANCINI; CARBONARA; HEREMANS, 1965). Orifícios circulares de 2-3 mm de diâmetro foram cortados (Figura 4B), utilizando uma bomba a vácuo, e todos os extratos brutos, acrescidos de galactose 200 mM, foram aplicados. A formação de halos foi observada após 24h de reação à temperatura ambiente (25°C), em câmara úmida.

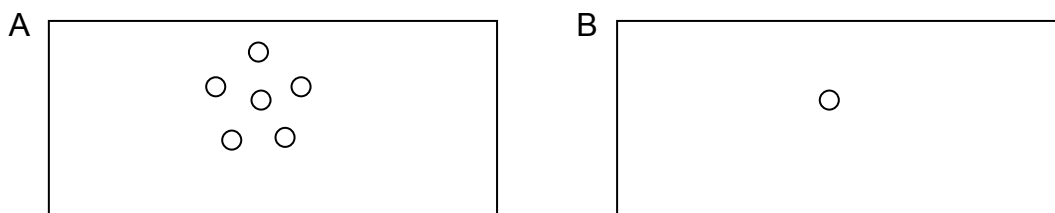


Figura 4 - Técnicas de Imunodifusão. (A) Ouchterlony e (B) Mancini.

3.3.4 Construção da coluna de afinidade

Para a cromatografia de afinidade foi feita a acoplagem de anticorpo policlonal IgG anti-CvL desglicosilada a uma resina de Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio, seguindo instruções do fabricante (SIGMA). Para seu preparo, pesou-se 1 g da resina para cada 3,5 mL final de gel. O pó foi ressuspendido em 50 mL de HCl 1mM e lavado por 15 min, sendo filtrado várias vezes com o auxílio de bomba à vácuo. O gel foi retirado do filtro e a ele adicionou-se 15 mL de HCl 1 mM e deixou-se em repouso por 15 min.

O anticorpo para ligação foi preparado dissolvendo-se 10 mg, por mL de gel, em tampão bicarbonato de sódio 100 mM, pH 8,3, contendo NaCl 500 mM. A solução de anticorpo foi então adicionada ao gel, que foi incubado por 16 h a 4°C. Decorrido o tempo, lavou-se o excesso do ligante (anticorpo) com 5 volumes de tampão bicarbonato de sódio 100 mM, pH 8,3, contendo NaCl 500 mM. Em seguida, o gel foi transferido para um recipiente contendo tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, por 2 h para bloquear quaisquer grupos ativos remanescentes na resina. Decorrido esse tempo, o gel foi lavado com 5 volumes de tampão acetato de sódio 100 mM contendo NaCl 500 mM, pH 8,0. Após esse procedimento, o gel foi transferido para uma coluna e equilibrado com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5.

3.3.5 Extração protéica da esponja *C. apion*

As esponjas foram limpas, fragmentadas e trituradas em um liquidificador com o tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5, na proporção 1:2 (p/v), em temperatura ambiente, por 2h. As partículas insolúveis, como cascalho e areia, foram retiradas com o uso de uma peneira comum. Após tal procedimento, o material foi centrifugado a 8000 x g por 30 min a 4°C, para separar o precipitado da fração solúvel que foi designada de extrato bruto.

3.3.6 Fracionamento Protéico com Acetona

O extrato bruto foi fracionado em três etapas de precipitação com acetona: 0,5, 1,0 e 2,0 volumes. Em cada etapa, após a adição da acetona, a solução foi deixada em repouso por no mínimo quatro horas, refrigerada a 4°C. Após esse período, as frações foram centrifugadas a 8000 x g por 30 minutos a 4°C. Os precipitados resultantes de cada fracionamento foram recolhidos, secos a vácuo e, então, dissolvidos em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e armazenados a -20 °C. As frações obtidas foram denominadas de F0,5; F1,0 e F2,0 de acordo com a faixa de concentração.

3.3.7 Cromatografia de Afinidade

Cerca de 10 mL de F1,0 foram aplicados em uma coluna de afinidade de IgG anti-CvL desglicosilada Sepharose 4B (2,0 X 1,5 cm), contendo tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. As proteínas não retidas foram eluídas com o mesmo tampão e o pico retido foi eluído com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 11,5. Os eluatos (2 mL) foram monitorizados por espectrofotometria a 280 nm. O pico retido foi reunido, dialisado contra água, liofilizado e dissolvido em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 para dar continuidade à purificação.

3.3.8 Cromatografia de Exclusão Molecular em Superose 6 10 300 GL em Sistema de FPLC-AKTA

Para purificar a lectina isolada na etapa anterior, 1 mL de solução da proteína foi submetido à cromatografia de exclusão molecular em Superose 6 10 300 GL, em sistema de FPLC-AKTA em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Frações de 0,5 mL

foram coletadas sob um fluxo de 0,5 mL/min e absorvância medida a 280 e 215 nm. As frações que apresentaram atividade hemaglutinante foram reunidas e denominadas CaL.

3.3.9 Preparo do sangue

3.3.9.1 Lavagem dos eritrócitos para ensaios de hemaglutinação

Alíquotas de 2 mL de sangue foram lavadas com 8 mL de solução salina fisiológica e centrifugadas a 924 x g, até a obtenção de uma massa de eritrócitos íntegros livre de soro e material hemolisado.

3.3.9.2 Tratamento dos eritrócitos com Papaína

Uma solução estoque de papaína de 1 mg/mL em solução salina foi e adicionada aos eritrócitos, previamente lavados, na proporção de 1:1 (v/v). A mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C, com leve agitação ocasional. Em seguida, foi centrifugada a 924 x g, por 5 minutos e seu precipitado foi lavado 6 vezes com solução salina. Em seguida uma solução de eritrócitos na concentração de 4% foi preparada.

3.3.9.3 Tratamento dos Eritrócitos com Tripsina

Uma solução estoque de tripsina na concentração de 1 mg/mL foi preparada e adicionada a 1 mL de eritrócitos, previamente lavados. A mistura foi deixada em repouso por 1 hora, à temperatura ambiente, com leve agitação ocasional. Em seguida, foi centrifugada a 924 x g, por 5 minutos e seu precipitado lavado por 6

vezes com solução salina. Realizou-se o hematócrito e uma solução de eritrócitos diluída a 4% em solução salina foi preparada.

3.3.10 Ensaio de Hemaglutinação

Os testes de hemaglutinação foram realizados por meio de diluição seriada das amostras testes (1/2, 1/4, 1/8, 1/16...) em microplacas com fundo em "V", tanto na presença como na ausência dos íons metálicos: Ca^{+2} , Mn^{+2} e Mg^{+2} (200 mM). No primeiro poço foram adicionados 25 μL da amostra e 25 μL de uma suspensão de eritrócitos a 4% tratados enzimaticamente enquanto que, a partir do segundo em diante foram adicionados 25 μL de solução salina contendo ou não íons, 25 μL da amostra diluída seriadamente e 25 μL de uma suspensão de eritrócitos a 4%, submetidos a tratamentos enzimáticos. A reação foi incubada por 1 hora, à temperatura ambiente. O grau de aglutinação foi observado visualmente e o título expresso em unidades de hemaglutinação (UH), que foi definido como o inverso da maior diluição da amostra que tenha apresentado nítida aglutinação (Moreira *et al.*, 1977). Para se estabelecer o padrão de hemaglutinação nos primeiros ensaios, Con A foi utilizada como controle positivo da aglutinação.

3.3.11 Determinação da Dependência de íons: Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+}

Para determinar a curva de dependência de íons bivalentes, a lectina foi dialisada por uma noite em solução de Tris-HCl 50 mM, 20 mM EDTA, pH 7,5. Após esse período uma nova diálise em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 foi feita. Alíquotas de lectinas foram diluídas em soluções com os íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} na concentração de 100 mM. A atividade da lectina com este tratamento foi visualizada e quantificada pelo ensaio de hemaglutinação, descrito anteriormente.

3.3.12 Efeito da Temperatura sobre a Atividade da Lectina

O efeito da temperatura sobre a atividade da lectina foi investigado, usando alíquotas da solução de lectina em Tris HCl 50 mM pH 7,5, as quais foram incubadas as temperaturas de 4, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C por uma hora. Sendo após esse período analisada sua atividade pelo ensaio de hemaglutinação, à temperatura ambiente.

3.3.13 Efeito do pH sobre a Atividade da Lectina

Alíquotas da lectina foram dialisadas a 4°C por 24 horas contra tampões com pH variando entre 2,0 e 11,0, com a realização de 3 trocas para cada tampão. Os tampões utilizados foram glicina-HCl 50 mM (pH 2,0 e 3,0), acetato de sódio-HCl 50 mM (pH 5,0), Tris-HCl 50 mM (pH 7,5, 8,0 e 9,0) e glicina-NaOH 50 mM (pH 11,0). Após esse tratamento, uma nova diálise foi realizada contra tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 a 4°C por 24 horas. Ensaio de hemaglutinação foram realizados em seguida.

3.3.14 Ensaio de Inibição da Hemaglutinação por Carboidratos e Glicoproteína

Os ensaios de inibição da hemaglutinação foram realizados da mesma forma que descrito no item anterior, no entanto, após a diluição seriada da amostra foram adicionados 25 µL do inibidor teste, na concentração de 1,0 mg/mL para a mucina e 200 mM para os demais carboidratos, e deixados em contato por 1 hora, antes da adição dos eritrócitos. Os inibidores testados foram os monossacarídeos: D-glucose, D-galactose, D-frutose, L-fucose, D-manose, D-arabinose, D-xilose, N-aceti-D-glucosamina, D-glucosamina, D-galactosamina; os dissacarídeos D-melibiose, D-lactose e sacarose; e a glicoproteína mucina.

3.3.14.1 Determinação da menor concentração inibitória do açúcar

O dissacarídeo D-lactose, na concentração inicial de 200 mM, foi submetido à diluição seriada em solução de NaCl 150 mM, de forma semelhante ao descrito anteriormente. Vinte e cinco microlitros da amostra foram adicionados e deixados em contato por 1 hora, antes da adição dos eritrócitos. A menor concentração de lactose capaz de inibir a hemaglutinação da preparação de lectina foi calculada.

3.3.15 Dosagem Protéica

A determinação da concentração de proteínas das amostras foi realizada pela técnica do ácido bicinonínico (BCA, SMITH et al., 1985), utilizando um kit de quantificação por BCA (SIGMA), conforme instruções do fabricante, e albumina sérica bovina como padrão.

3.3.16 Determinação da Massa Molecular por Cromatografia de Exclusão Molecular em Superose 12 10 300 GL em Sistema de FPLC-AKTA

Para confirmação da purificação e determinação da massa molecular de CaL em condições nativas, um mililitro de solução da proteína foi submetido à cromatografia de exclusão molecular Superose 12 10 300 GL, em sistema de FPLC-AKTA em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Esta coluna foi previamente calibrada com o seguinte padrão de proteínas: β -amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). Frações de 0,5 mL foram coletadas sob um fluxo de 0,5 mL/min e absorvância medida a 280 e 215 nm. A massa molecular aparente da lectina foi estimada a partir da interpolação logarítmica entre massas moleculares dos diferentes marcadores protéicos utilizados e os seus respectivos volumes de eluição.

3.3.17 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Descontínuo e Desnaturante (SDS-PAGE)

Com o intuito de avaliar o grau de pureza das amostras protéicas, as mesmas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% e 15% em presença de SDS, de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). O gel de separação foi preparado com 1,25 mL de acrilamida-bisacrilamida 30%; 1,25 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 2,425 mL de água destilada; 50 µL de SDS 10%; 5 µL de TEMED concentrado e 25 µL de persulfato de amônio 30%. O gel de concentração continha 0,33 mL de acrilamida-bisacrilamida 30%; 625 µL de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; 1,5 mL de água destilada; 25 µL de SDS 10%; 5 µL de TEMED e 12,5 µL de persulfato de amônio. O tampão de corrida consistia de Tris 25 mM; glicina 192 mM e SDS 10%. Uma vez diluída em tampão de amostra Tris-HCl 0,0625 M, SDS 2%, glicerol 10% v/v, 0,01% de azul de bromofenol, num volume de 20 µL, a alíquota foi aplicada no gel (10 x 14 cm, com espaçadores de 0,75 mm), o qual foi submetido a uma corrente constante de 20 mA por, aproximadamente, 2 horas. O gel foi corado em solução de *Coomassie Blue* R 250 a 1%, etanol 40% e ácido acético 10 % em água. As bandas protéicas foram descoradas após a imersão do gel em uma solução descorante (etanol 30% e ácido acético 10%). Para determinar a massa molecular da proteína isolada, foram utilizados marcadores padrão de proteínas.

Após a eletroforese, o gel foi desidratado gradativamente, por três lavagens consecutivas com a solução de etanol 50%, tendo cada lavagem, a duração de 20 minutos. Uma solução de tiosulfato de sódio (0,2 mg/mL) foi adicionada em seguida e mantida sob agitação por 1 minuto. Efetuaram-se três lavagens rápidas com água destilada, adicionando depois, uma solução de nitrato de prata (200 mg + 74 µL formaldeído em 100 mL de H₂O), mantido em agitação por 20 minutos. O gel foi lavado novamente em água destilada (três vezes), e imerso na solução reveladora (carbonato de sódio 6 g + 50 µL de formaldeído + 2 mL de tiosulfato de sódio 0,2 mg/mL para um total de 100 mL de H₂O). Foi usado ácido acético 13% para cessar a revelação.

3.3.18 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Descontínuo e Não Desnaturante (PAGE)

A metodologia estabelecida por Laemmli (1970) foi modificada para a análise de CaL. O protocolo do item 3.3.17 foi repetido, sem a adição de SDS. A eletroforese foi realizada sob corrente constante de 20 mA por aproximadamente 2 horas até que o marcador de corrida (azul de bromofenol) atingisse o final do gel.

3.3.19 Ensaio de Aglutinação de *Leishmania chagasi*

Os ensaios de aglutinação de *Leishmania chagasi* foram realizados em microplacas com fundo em "V". Uma diluição seriada de CaL, a partir de 20 µg, foi realizada em solução salina (NaCl 150 mM) a partir de uma solução com concentração conhecida e em cada poço foram adicionados 25 µL de *Leishmania* de cor azul (concentração de 8×10^4 *Leishmania*/µL), totalizando um volume final de 50 µL. A reação foi incubada à temperatura de 4°C por 24 horas. A aglutinação foi observada e fotografada em um microscópio óptico de campo escuro e a menor concentração de lectina capaz de promover a aglutinação foi determinada.

4 RESULTADOS

4.1 IMUNOENSAIO DOS EXTRATOS DAS ESPONJAS

Com a finalidade de identificar lectinas imunorreativas à CvL, cinco diferentes espécies de esponjas foram coletadas (*Cliona varians* – controle positivo, *Cinachyrella apion*, *Amphimedon viridis*, *Haliclona melana* e *Tedania ignis*) e seus extratos brutos obtidos foram submetidos a testes de imunodifusão. Todos os extratos apresentaram, em diferentes proporções, reação cruzada com o anticorpo anti-CvL desglicosilada (Figura 5). Ensaio de hemaglutinação com eritrócitos humanos nativos foram realizados com os mesmos e os resultados estão apresentados na tabela 3.

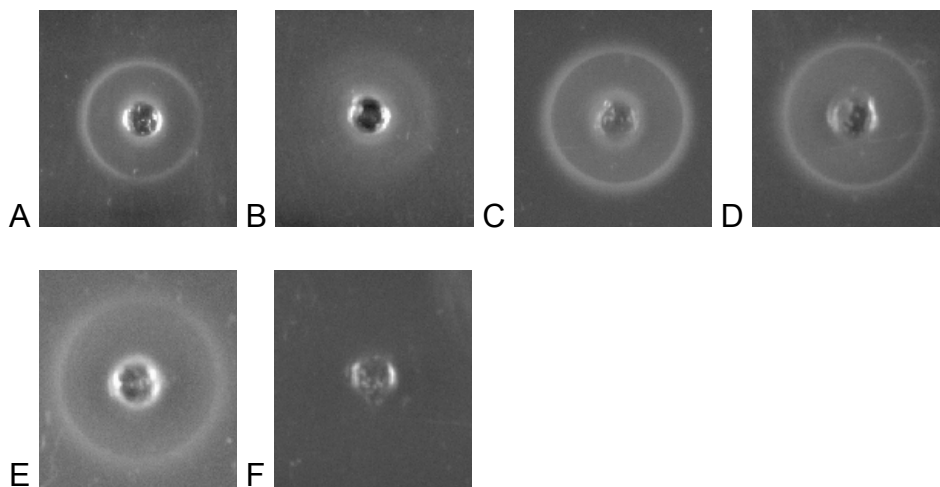


Figura 5 - Teste de Imunodifusão radial. Formação de halos nos géis após imunodifusão radial e reação cruzada com o anticorpo policlonal IgG anti-CvL desglicosilada incorporado ao gel. Os extratos brutos das esponjas (A) *T. ignis*, (B) *A. viridis* (C) *C. apion*, (D) *H. melana*, (E) Controle positivo com *C. varians* e (F) controle negativo com solução salina (NaCl 150 mM).

Tabela 3 - Atividade hemaglutinante dos extratos brutos das esponjas em eritrócitos nativos.

ESPONJA MARINHA	TIPO SANGUÍNEO (UH)		
	A	B	O
<i>A. viridis</i>	0	0	0
<i>C. apion</i>	16	16	16
<i>H. melana</i>	0	0	4
<i>T. ignis</i>	0	0	0

UH - unidades de hemaglutinação.

A atividade hemaglutinante também foi testada com eritrócitos humanos submetidos a tratamentos enzimáticos com papaína e tripsina, na presença ou ausência de íons. Para o extrato bruto da esponja *A. viridis*, os resultados com maior título hemaglutinante foram observados após adição dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} , preferencialmente para sangue do tipo A tratado com tripsina ou papaína. Os títulos de hemaglutinação observados para o extrato bruto de *H. melana* não sofreram alteração após os tratamentos ou adição de íons. O extrato bruto da esponja *T. ignis*, apesar de não demonstrar atividade hemaglutinante sobre eritrócitos nativos, apresentou atividade após tratamento dos eritrócitos com papaína, preferencialmente para o tipo B, na presença de íons bivalentes (Ca^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+}).

A esponja *C. apion* apresentou atividade hemaglutinante para todos os eritrócitos do sistema ABO humano, submetidos ou não a tratamentos enzimáticos (Tabela 4), não demonstrando sofrer interferências pela adição dos íons bivalentes testados. Dessa forma, devido à expressividade dos resultados e por não haver estudos realizados com essa espécie, ela foi selecionada para dar continuidade aos estudos.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE AGLUTINANTE DAS FRAÇÕES PROTÉICAS DA ESPONJA *CINACHYRELLA APION*

Uma nova extração a partir de uma biomassa maior foi realizada e o extrato bruto submetido ao fracionamento com acetona. Com o objetivo de caracterizar a atividade aglutinante das frações protéicas da esponja *C. apion*, foram realizadas

hemaglutinações com eritrócitos do sistema ABO tratados ou não com enzimas, visando elucidar qual dos tipos sanguíneos apresentava maior título de hemaglutinação e qual tratamento enzimático se apresentava mais eficiente na exposição de carboidratos na superfície das células (Tabela 4).

Tabela 4 - Atividade Hemaglutinante das frações protéicas de *Cinachyrella apion*.

SISTEMA ABO	FRAÇÕES PROTEICAS (UH/ μ g*)			
	Extrato Bruto	F 0,5	F 1,0	F 2,0
Sem tratamento				
A	0,02	0,10	0,87	0,00
B	0,02	0,21	0,87	0,00
O	0,02	0,21	0,87	0,00
Tratamento com Tripsina				
A	0,35	3,30	13,91	0,00
B	0,35	6,61	6,95	0,00
O	0,35	1,65	3,48	0,00
Tratamento com Papaína				
A	1,39	26,43	27,82	0,00
B	0,70	6,61	6,95	0,00
O	1,39	13,21	27,82	0,00

* UH/ μ g – Atividade específica: unidades de hemaglutinação por micrograma de proteína.

Os resultados apontaram os eritrócitos dos tipos A e O com os mais elevados títulos de aglutinação, e, com menor título, o tipo B. O melhor tratamento enzimático realizado foi com papaína.

As maiores atividades específicas observadas encontram-se na faixa de fracionamento F1,0. A F0,5 também apresentou elevada atividade aglutinante, contudo um pouco menos expressiva. A F2,0 não apresentou aglutinação, possivelmente indicando a ausência de lectinas que aglutinam sangue humano nessa faixa de fracionamento. Com base nos resultados supracitados, a fração 1,0 obtida da esponja *C. apion* foi selecionada para as próximas etapas de purificação e caracterização, e eritrócitos do tipo A papainizados foram utilizados para os demais ensaios de hemaglutinação.

4.3 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DA FRAÇÃO F1,0

Monossacarídeos (D-glucose, D-galactose, D-frutose, L-fucose, D-manose, D-arabinose, D-xilose, N-acetil-D-glucosamina, D-glucosamina, D-galactosamina), dissacarídeos (D-melibiose, D-lactose e sacarose) e uma glicoproteína (mucina) foram utilizados objetivando identificar a especificidade da(s) lectina(s) presente(s) na fração F1,0 da esponja *C. apion*.

Dentre os inibidores testados o dissacarídeo lactose se destacou por reduzir 100% da atividade hemaglutinante. Os demais carboidratos apresentaram pouco ou nenhum efeito sobre a fração utilizada (Figura 6).

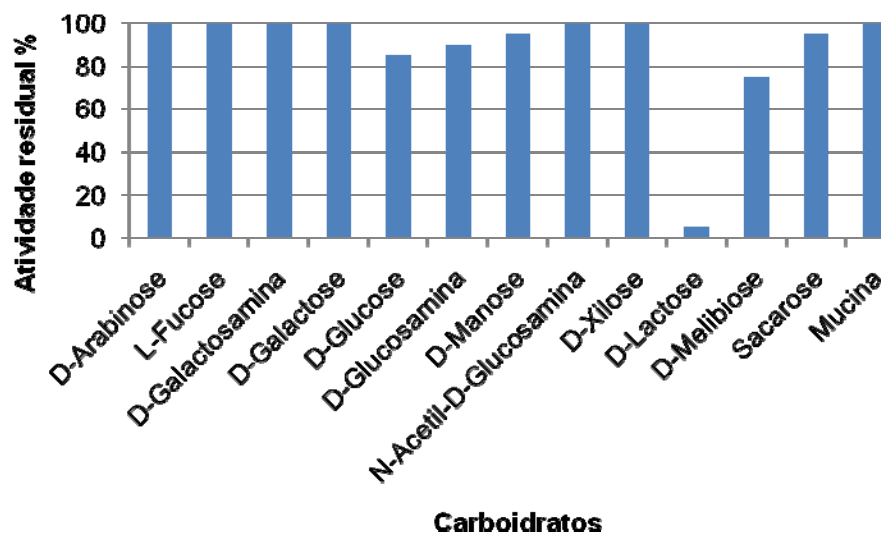


Figura 6 - Inibição da Hemaglutinação da Fração F1,0. Após diluição seriada da amostra foram adicionados 25 μ L do inibidor teste, na concentração de 100 mM, e deixados em contato por 1 hora, antes da adição dos eritrócitos.

4.4 ISOLAMENTO DA LECTINA EM CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Uma vez que ocorreu reação cruzada entre o anticorpo policlonal gerado (IgG anti-CvL) e o extrato bruto da esponja *C. apion*, o anticorpo purificado foi acoplado a uma coluna de Sepharose 4B e a mesma foi utilizada como afinidade para isolamento da lectina. Um volume aproximado de 10 mL da F1,0 foi aplicado e o pico retido e coincidente com a atividade hemaglutinante foi reunido (frações 16 a 22, Figura 7), dialisado contra água e dissolvido em Tris-HCl 50mM pH 7,5. A proteína com atividade hemaglutinante isolada foi denominada CaL, sendo nesse passo purificada 579 vezes.

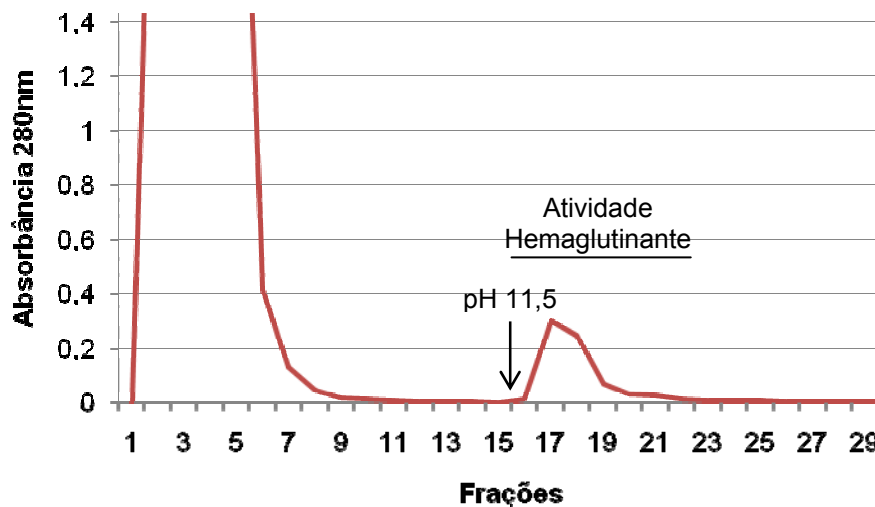


Figura 7 - Perfil Cromatográfico de F1,0 na Coluna de Afinidade IgG anti-CvL Sepharose 4B. A coluna foi equilibrada e inicialmente eluída com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. O pico retido foi eluído com o mesmo tampão pH 11,5. Coluna 2,0 x 1,5 cm. Frações: 2 mL/tubo, monitoradas a 280 nm. A atividade hemaglutinante foi detectada na presença de 4% de eritrócitos humanos do tipo A. A barra horizontal representa a atividade hemaglutinante.

4.5 PURIFICAÇÃO DA LECTINA EM SUPEROSE 6 10 300 GL EM SISTEMA DE FPLC-AKTA

A lectina isolada na etapa anterior foi aplicada numa coluna de exclusão molecular Superose 6 10 300 GL em sistema de FPLC-AKTA e as frações 31, 32 e 33, com atividade hemaglutinante, foram reunidas para efetuar a caracterização (Figura 8). A lectina apresentou atividade específica de aproximadamente 1211 UH/ μ g e foi purificada 871 vezes, conforme mostra a tabela de purificação (Tabela 5).

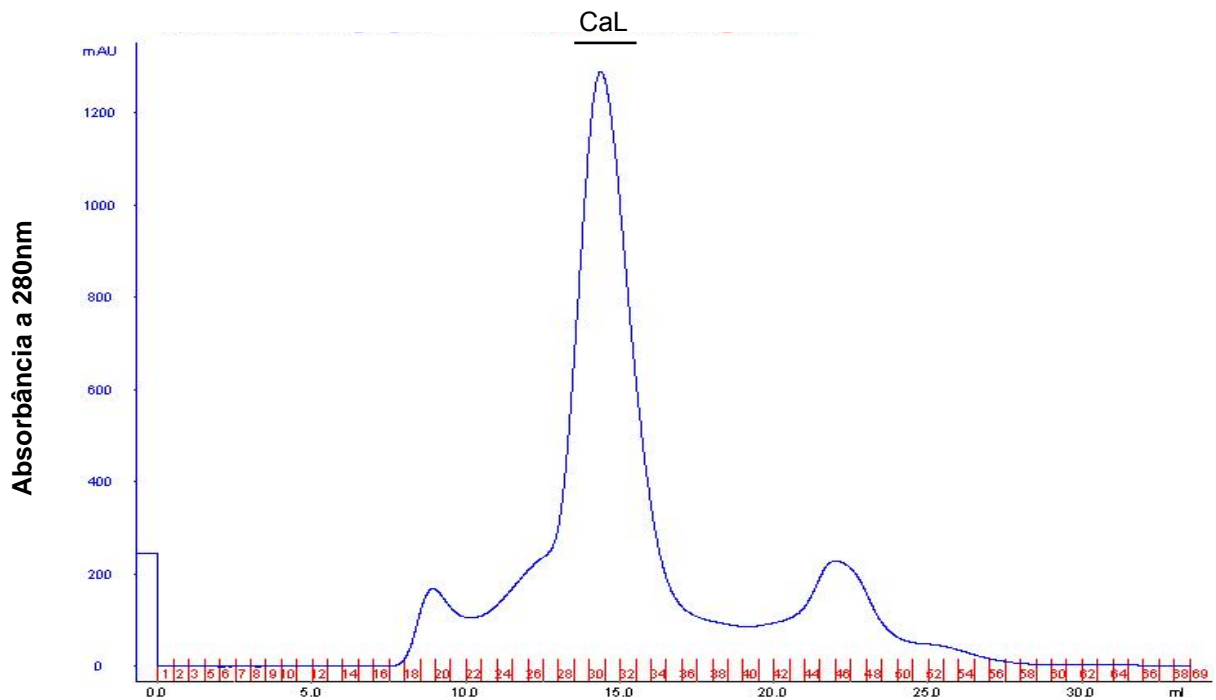


Figura 8 - Perfil Cromatográfico de CaL na Coluna de Exclusão Molecular Superose 6 10 300 GL em sistema de FPLC-AKTA. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. As frações (0,5 mL/tubo) foram monitoradas a 280 e 215nm. A atividade hemaglutinante foi detectada na presença de 4% de eritrócitos humanos do tipo A. A barra horizontal representa a atividade hemaglutinante.

Tabela 5 - Resultados da purificação da lectina da esponja *C. apion* em diferentes etapas.

Fração	Total de proteína (μg) $\times 10^3$	Atividade total (UH) $\times 10^3$	Atividade específica (UH/ μg)	Purificação (vezes)	Rendimento (%)
Extrato Bruto	475,49	660,93	1,39	1	100
F ₁	28,26	786,19	27,82	20	5,944
CaL isolada pós-afinidade	0,05	40,26	805,22	579	0,011
CaL purificada	0,02	34,22	1211,18	871	0,005

UH: Unidade de Hemaglutinação.

4.6 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA PROTEÍNA NATIVA POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR EM SUPEROSE 12 10 300 GL EM SISTEMA DE FPLC-AKTA

Para confirmar a purificação e determinar a massa molecular de CaL, a proteína foi submetida à cromatografia de exclusão molecular Superose 12 10 300 GL, em sistema de FPLC-AKTA, previamente calibrada com proteínas de massas moleculares conhecidas (Figura 9A). Após determinação dos volumes de eluição das proteínas marcadoras e da proteína teste foi construída uma curva em escala semi-log (Figura 9B), e calculada a massa molecular da CaL, em sua forma nativa, apresentando uma massa molecular de aproximadamente 124 kDa.

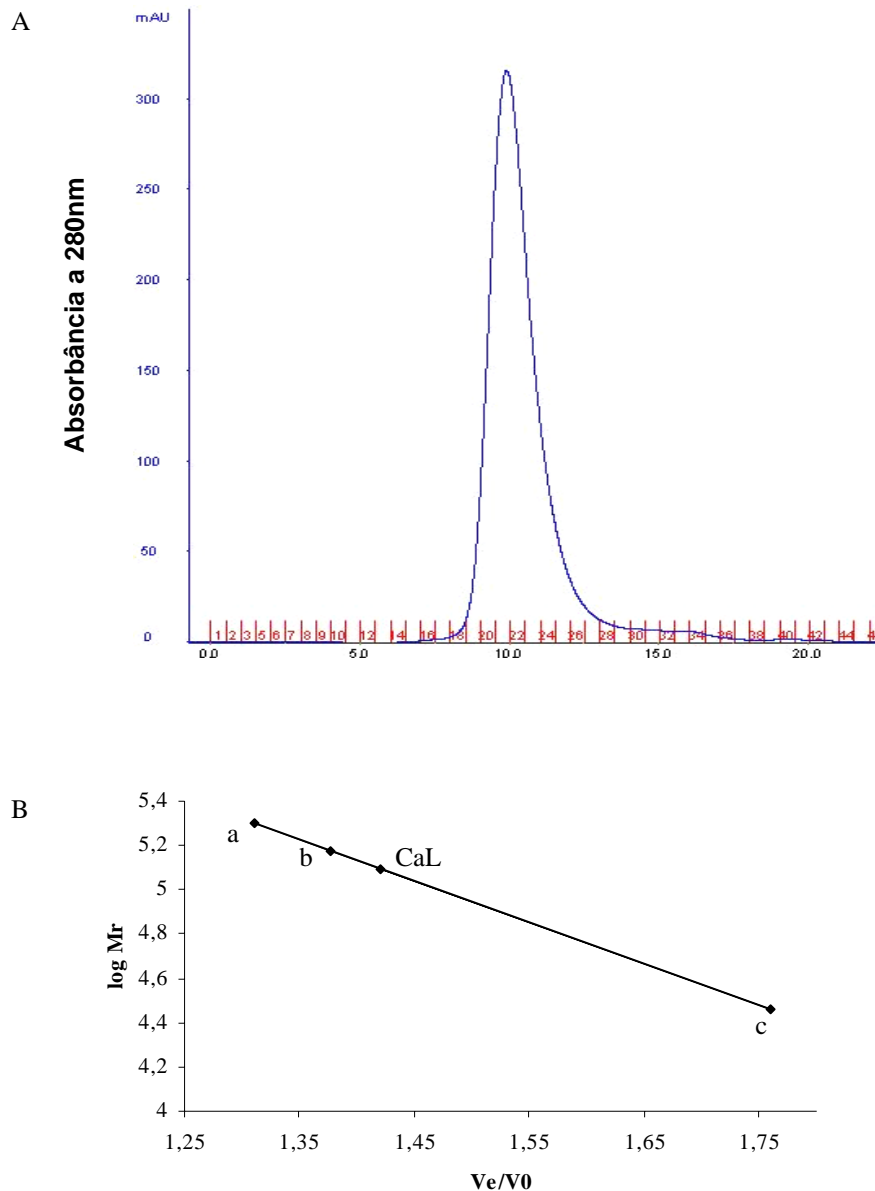


Figura 9 - Perfil Cromatográfico de CaL em Coluna de Exclusão Molecular e Determinação da massa molecular. (A) Perfil Cromatográfico de CaL na Coluna de Exclusão Molecular Superose 12 10 300 GL em sistema de FPLC-AKTA, em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. As frações (0,5mL/tubo) foram monitoradas a 280 e 215nm. A atividade hemaglutinante foi detectada na presença de 4% de eritrócitos humanos do tipo A. (B) Determinação da massa molecular de CaL (~124 kDa). Os marcadores de massa molecular padrão utilizados foram: (a) β -amilase (200 kDa), (b) álcool desidrogenase (150 kDa) e (c) anidrase carbônica (29 kDa). Log Mr – logaritmo da massa molecular, V_e/V_0 – relação entre o volume de eluição da proteína e o volume total da coluna.

4.7 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

As diversas etapas de purificação da lectina da esponja *C. apion* foram analisadas por eletroforese em condições desnaturantes por SDS-PAGE (12%) e não-desnaturantes por PAGE (15%) (Figura 10A e B). Por SDS-PAGE foi possível observar duas bandas protéicas, uma delas apresentou uma massa molecular de aproximadamente 15,5 kDa e a outra de 35 kDa, calculada por regressão linear (Figura 10C), tendo por base padrões protéicos de massas moleculares conhecidas. A banda protéica em torno de 35 kDa se deve, provavelmente, a um aglomerado de subunidades que não se desfez completamente durante o processo de fervura. Uma única banda corada por *Comassie blue* foi observada no PAGE para a CaL, revelando que, de fato, a lectina foi purificada.

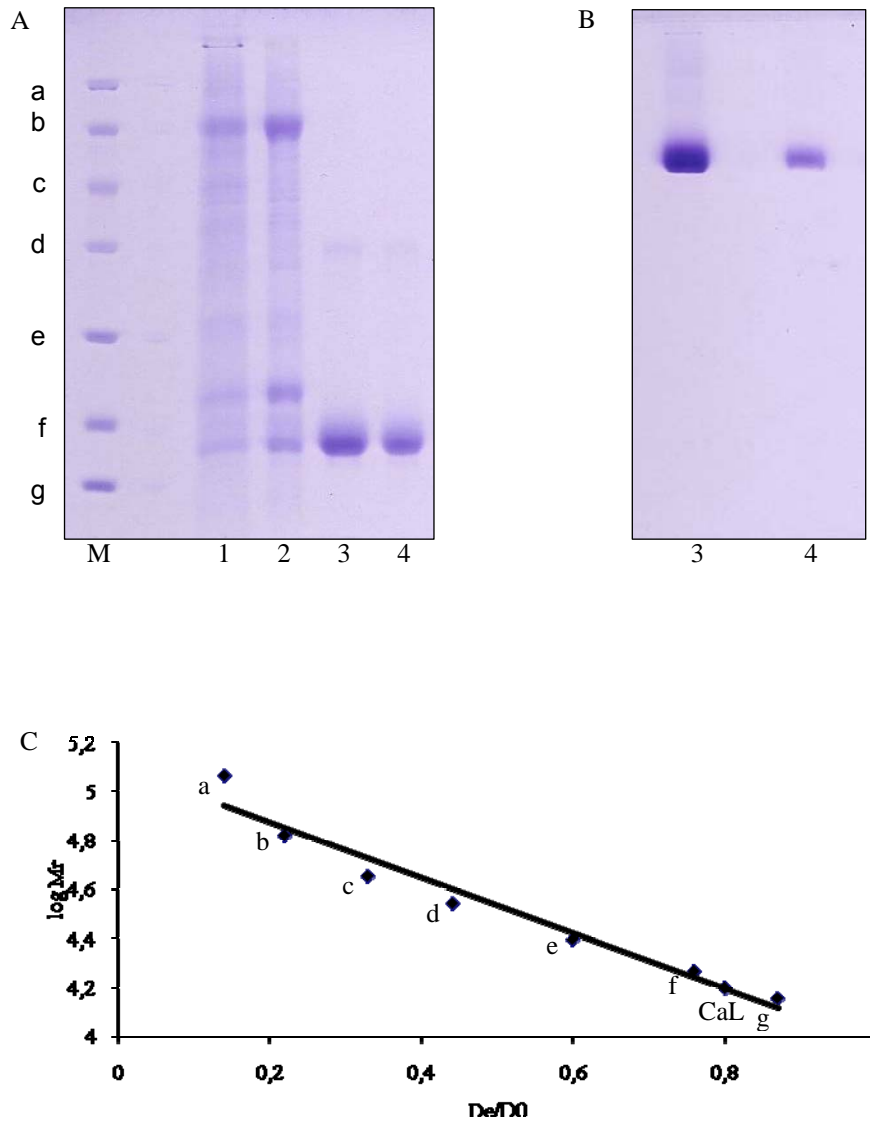


Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida e determinação da massa molecular das subunidades de CaL. Eletroforese em gel de poliacrilamida (A) desnaturante a 12% (SDS-PAGE) e (B) não desnaturante a 15% (PAGE): linha 1 – extrato bruto; linha 2 – F1,0; linha 3 – material pós-coluna de afinidade; linha 4 – CaL; M - Marcadores de massa molecular (kDa): (a) β -galactosidase (116,0); (b) Albumina Sérica Bovina (66,2); (c) Ovalbumina (45,0); (d) Lactato desidrogenase (35,0), (e) Endonuclease de restrição BAP 981 (25,0); (f) β -lactoglobulina (18,4) e (g) Lisozima (14,4). As proteínas foram coradas com Comassie blue. (C) Determinação da massa molecular das subunidades de CaL (~15,5 kDa). Log Mr – logaritmo da massa molecular, De/D0 – relação entre a distância percorrida pela proteína no gel e a comprimento total do gel.

4.8 ENSAIO DE HEMAGLUTINAÇÃO COM A LECTINA PURIFICADA

A lectina isolada da esponja *C. apion* foi novamente submetida a ensaios de hemaglutinação, apresentando os resultados descritos na tabela 6. Apesar de demonstrar atividade hemaglutinante para todos os tipos de eritrócitos do sistema ABO, submetidos ou não a tratamentos enzimáticos, eritrócitos dos tipos A e O demonstraram os mais elevados títulos de aglutinação, preferencialmente após tratamento com papaína.

Tabela 6 - Atividade hemaglutinante de CaL purificada.

SISTEMA ABO	Atividade específica (UH/ μ g*)
Sem tratamento	
A	4,73
B	4,73
O	151,48
Tratamento com Tripsina	
A	75,74
B	151,48
O	151,48
Tratamento com Papaína	
A	1211,18
B	151,48
O	1211,18

*UH/ μ g – Atividade específica: unidades de hemaglutinação por micrograma de proteína.

4.9 DETERMINAÇÃO DA DEPENDÊNCIA DE ÍONS BIVALENTES

CaL apresentou atividade hemaglutinante independente da presença de quaisquer íons testados, Ca^{+2} , Mg^{+2} e Mn^{+2} até a concentração de 100mM.

4.10 CURVA DE TERMOESTABILIDADE DA CAL

A lectina CaL apresentou-se estável até a temperatura de 60°C, perdendo sua atividade total em temperaturas superiores a 90°C. Temperaturas inferiores à temperatura ambiente (25°C) não afetaram sua atividade (Figura 11).

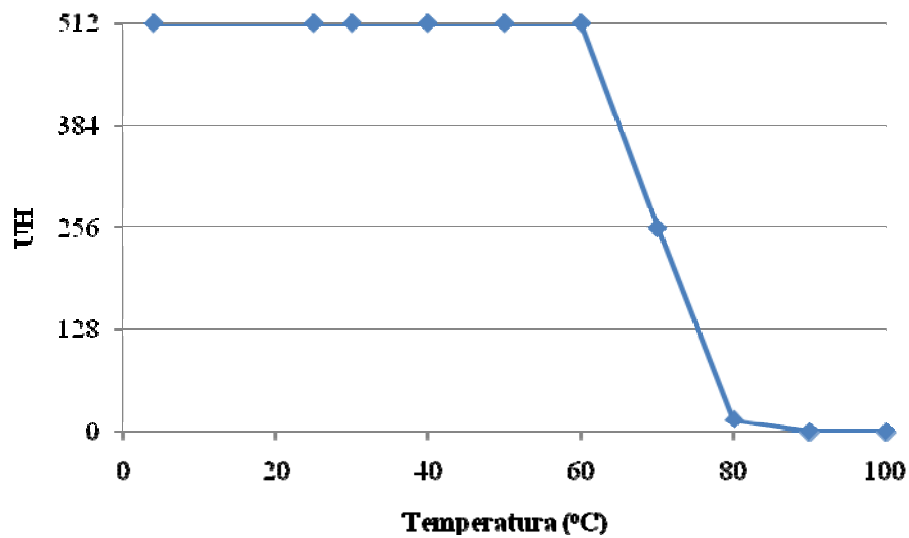


Figura 11 - Curva de Termoestabilidade da Lectina. A lectina foi submetida a temperaturas de 4, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C durante 1 hora. Após a incubação, ensaios de hemaglutinação com a lectina foram realizados à temperatura ambiente.

4.11 CURVA DE EFEITO DO PH SOBRE A ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DA CAL

A figura 12 mostra o efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante após diálise da lectina em diferentes tampões e retorno ao seu tampão inicial. Observa-se uma atividade constante independentemente do pH ao qual a mesma foi submetida.

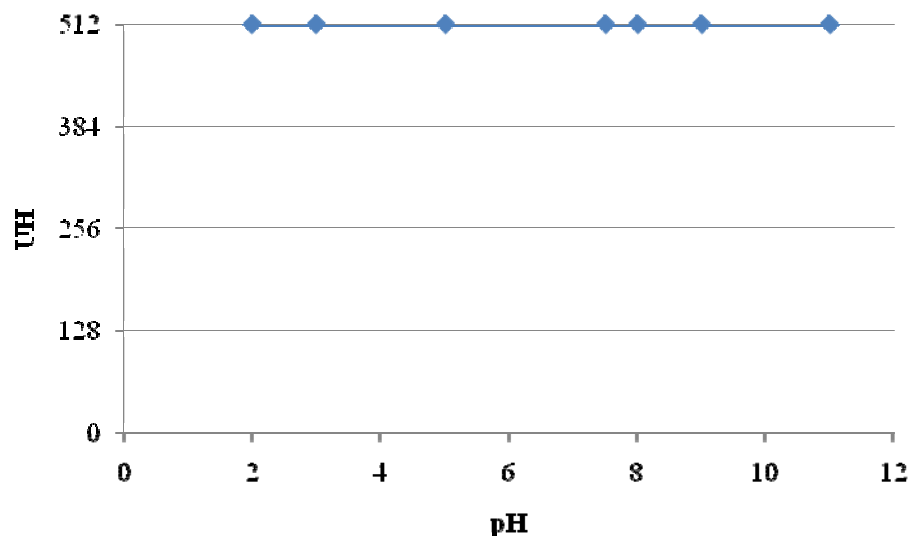


Figura 12 - Efeito do pH sobre a lectina. A lectina isolada da esponja *C. apion* foi submetida aos diferentes tampões: Glicina-HCl 50 mM pH 2 e 3; Acetato de sódio 50mM pH 5; Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 8 e 9; Glicina-NaOH 50 mM pH 11. Seguida de uma nova diálise contra o tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 a 4°C durante 24 horas. Terminando esse tratamento ensaios de hemaglutinação foram realizados.

4.12 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DA LECTINA POR CARBOIDRATOS E MUCINA

Utilizando os mesmos inibidores empregados na inibição da F1,0, foi realizado o ensaio de inibição da atividade da lectina purificada. Foi possível observar que a CaL apresentou 100% de inibição apenas para D-lactose, o que indica sua especificidade para esse dissacarídeo. A menor concentração de D-lactose capaz de inibir a sua atividade hemaglutinante foi de 6,25 mM.

4.13 AGLUTINAÇÃO DE *Leishmania chagasi*

Como algumas lectinas purificadas de esponjas possuem habilidade de aglutinar Tripanosomatídeos foi realizado um teste para averiguar se a CaL também apresentava essa capacidade. Os resultados indicaram que CaL foi capaz de

aglutinar formas promastigotas de *Leishmania chagasi* coradas com *coomassie blue* (Figura 13B). Utilizando o padrão de atividade aglutinante referente aos eritrócitos o título atingido foi de 2^4 , correspondendo à aglutinação de $6,7 \times 10^5$ células por $1 \mu\text{g}$ de lectina. Na presença de lactose (50 mM) a aglutinação das células pela lectina foi suprimida (Figura 13C). A figura 13A corresponde ao controle negativo com solução salina.

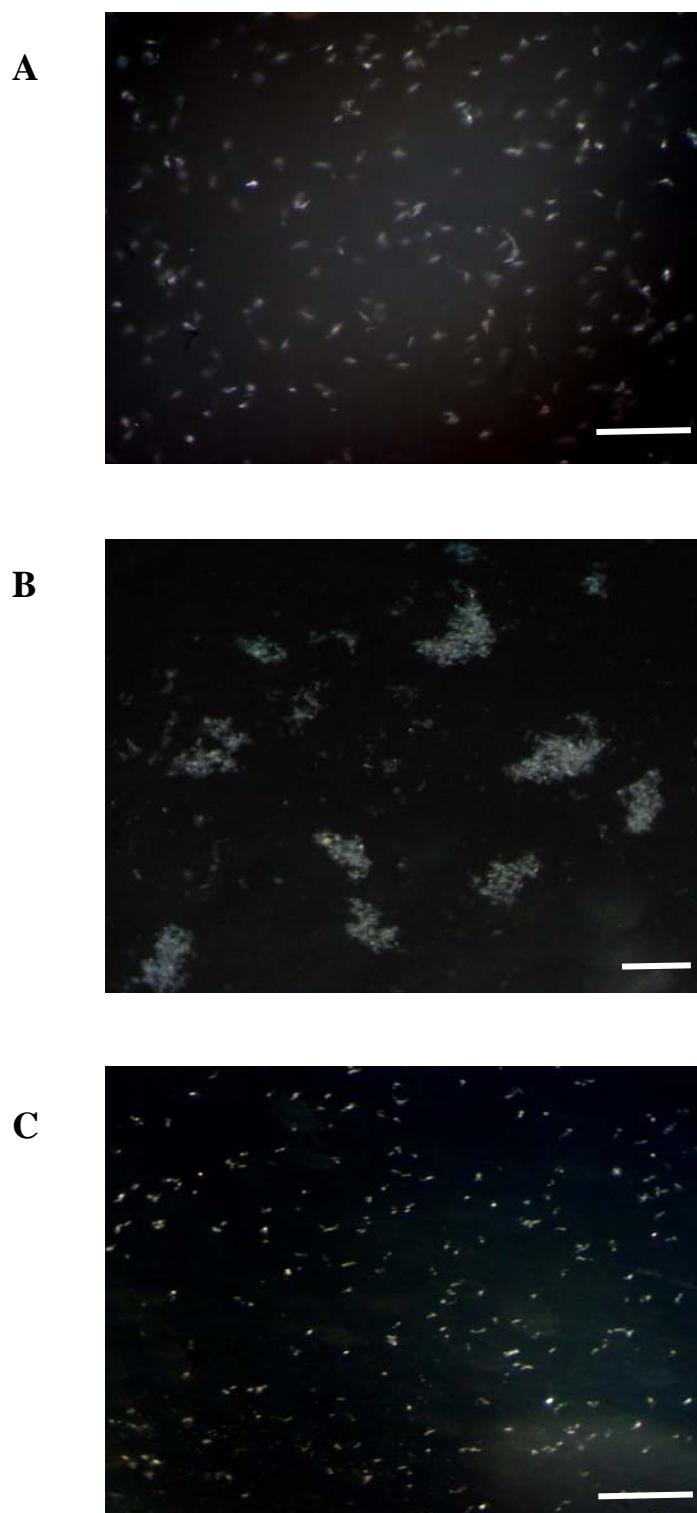


Figura 13 - Fotomicrografias em microscópio de campo escuro de *L. chagasi* tratadas com CaL. A - Promastigotas de *Leishmania chagasi* com solução salina – NaCl 150mM (controle negativo); B - *Leishmania* + CaL (3 µg); C - *Leishmania* + CaL (3 µg) + Lactose (50 mM). Barras horizontais = 100µm.

5 DISCUSSÃO

O anticorpo policlonal gerado contra CvL desglicosilada mostrou ser uma ferramenta bastante interessante na identificação e isolamento de novas lectinas de esponjas marinhas. Na esponja marinha *Cinachyrella apion*, ele possibilitou a descoberta de uma lectina específica para lactose, com atividade aglutinante sobre promastigotos de *Leishmania chagasi*.

A esponja *C. apion* constitui uma rica fonte de lectinas, uma vez que apresentou títulos hemaglutinantes bastante superior às demais esponjas pesquisadas nesse trabalho, além de, após ser submetida ao fracionamento com acetona, apresentar atividade elevada na maioria das frações (0,5 e 1,0).

A lectina purificada da esponja *C. apion* apresentou uma massa molecular de aproximadamente 124 kDa, determinada por cromatografia de gel filtração em Superose 12 10 300 em sistema FPLC-AKTA. Este valor foi maior do que o encontrado para as lectinas das esponjas *Haliclona cratera* (PAJIC et al., 2002), *Craniella australiensis* (XIONG et al., 2006) e *Geodia cydonium* (MÜLLER et al., 1983), as quais apresentaram uma massa molecular de 29, 54 e de 36,5 kDa, respectivamente. Lectinas de massas moleculares elevadas têm sido bastante relatadas para invertebrados, como é o caso da lectina de *Pellina semitubulosa* (ENGEL; BACHMAN; SCHROEDER, 1992), *Cliona varians* (MOURA et al., 2006) e do camarão *Penaeus japonicus* (YANG et al., 2007), com massas moleculares de 200, 114 e 452 kDa, respectivamente.

A análise eletroforética em condições não desnaturantes (PAGE), permitiu a visualização de uma única banda protéica, demonstrando a pureza da amostra aplicada. Em condições desnaturantes (SDS-PAGE) duas bandas protéicas com massas moleculares de aproximadamente 15,5 e 35 kDa foram observadas com diferentes intensidades. A banda protéica observada de massa molecular em torno de 35 kDa se deve, provavelmente, a um aglomerado de subunidades que não se desfez completamente durante o processo de fervura. Provavelmente essa lectina é uma proteína octaédrica, em que subunidades de 15,5 kDa são unidas por interações hidrofóbicas. Tal organização estrutural é rara e não foram encontrados relatos na literatura similares a este. Estruturas tetraédricas apresentando subunidades ligadas por pontes dissulfeto, organizadas em tetrâmero, são relatadas

para a poliqueta *Serpula vermiculares* (MOLCHANOVA et al., 2007). Estruturas também tetraédricas são observadas para lectinas do camarão branco *Litopenaus setiferus* (ALPUCHE et al., 2005), das esponjas tropicais *Aplysina archeri* e *A. lawnosa* (MIARONS; FRESNO, 2000) e da esponja *C. varians*, a qual apresenta subunidades de cerca de 28 kDa ligadas por pontes dissulfeto (MOURA et al., 2006). A lectina de *P. semitubulosa* possui seis subunidades de 34 kDa, ligadas por pontes dissulfeto, apresentando massa molecular superior à encontrada para CaL (ENGEL; BACHMAN; SCHROEDER, 1992). Outros relatos de proteínas multiméricas também podem ser encontrados na literatura para lectinas de crustáceos, como para o camarão *P. japonicus*, do qual foi isolada uma lectina de alta massa molecular, contendo 12 subunidades de aproximadamente 37,5 kDa, provavelmente ligadas por pontes dissulfeto. COMINETTI e colaboradores (2002) também purificaram uma lectina de crustáceo (camarão *Litopenaeus schimitti*) com cerca de 153 kDa, composta de múltiplas subunidades de 31 e 34 kDa. Estes fatos demonstram que a massa molecular, o número e o tamanho das subunidades das lectinas de invertebrados podem ser bastante diferentes, mesmo que haja semelhanças na especificidade de ligação a açúcares.

CaL promoveu aglutinação de todos os tipos de eritrócitos humanos, em todas as condições testadas, principalmente quando tratados com a enzima papaína. A preferência por eritrócitos humanos papainizado também foi relatada para as lectinas isoladas das esponjas *H. cratera* (PAJIC et al., 2002), *C. varians* (MOURA et al., 2006) e *T. ignis* (DIAS, 2006).

A atividade hemaglutinante da CaL mostrou ser independente de íons bivalentes. Resultados semelhantes que corroboram com esse trabalho foram também observados para as lectinas do mexilhão *Crenomytilus grayanus* (BELOGORTSEVA et al., 1998b), da poliqueta *Chaetopterus variopedatus* (MIKHEYSKAYA et al., 1995), da ascídia *Disemnum tertanum* (BELOGORTSEVA et al., 1998a) e da esponja *C. australiensis* (XIONG et al., 2005).

A termoestabilidade observada para CaL foi semelhante à descrita para a lectina do bivalve marinho *Pteria penguin* (NAGANUMA et al., 2006), mantendo sua atividade até a temperatura máxima de 60°C, apresentando uma redução em 50% da sua atividade à temperatura de 70°C, e perdendo-a completamente após 60 min a 100°C. Entre as lectinas de esponjas, a lectina de *Craniella australiensis* também demonstra forte estabilidade térmica até 70°C (XIONG et al., 2006). Apesar de ser,

de um modo geral, aceito que pontes dissulfeto estabilizem proteínas (MATSUMURA et al., 1989), estruturas reduzidas em loop também podem ser consideradas fatores estabilizantes da estrutura protéica (WALLON et al., 1997). Esse parece ser o caso da lectina de *P. penguim*. A lectina de *C. australiensis* apresenta pontes dissulfeto unindo suas três subunidades. Para CaL, no entanto, são necessários mais estudos para esclarecer maiores detalhes acerca da sua estrutura protéica.

A lectina demonstrou uma atividade hemaglutinante constante quando submetida à faixa de pH entre 2,0 e 11,0. Estes resultados diferem da maioria dos relatos encontrados na literatura para lectinas de invertebrados, como as das espécies de camarão *P. japonicus*, *L. schmitti* e *L. vannamei* (COMINETTI et al., 2002; SUN et al., 2007; YANG et al., 2007), das poliquetas *Chaetopterus variopedatus* e *Serpula vermiculares* (MIKHEYSKAYA et al., 1995; MOLCHANOVA et al., 2007), dos moluscos *Belamyia bengalensis* e *P. penguim* (BANERJEE et al., 2004; NAGANUMA et al., 2006), e das esponjas *H. cratera*, *C. australiensis* e *C. varians* (MOURA et al., 2006; PAJIC et al., 2002; XIONG et al., 2006).

A lectina D-lactose específica purificada apresentou uma atividade específica de 1.211,180 UH/ μ g e grau de purificação de 871 vezes. A concentração inibitória mínima do açúcar encontrada foi de 6,25 mM. A especificidade ao dissacarídeo lactose já havia sido relatada para outras lectinas também de esponjas, como as lectinas isoladas de *Haliclona sp.* e *Cinachyra tenuifolia* (MEBS; WEILER; HEINKE, 1985) e *Geodia cydonium* (BRETTEING et al., 1981b) e de outros invertebrados marinhos, como a poliqueta *C. variopedatus* (MIKHEYSKAYA et al., 1995) e o bivalve *P. penguim* (NAGANUMA et al., 2006). Esses últimos, no entanto, diferem da CaL uma vez que a inibição também ocorre na presença de outros açúcares além de lactose. Uma comparação entre a atividade hemaglutinante da lectina após a interação com lactose e melibiose demonstra que o sítio de ligação da lectina reconhece lactose Gal ($\beta_{1\rightarrow 4}$) Glc, no entanto não demonstra efeito inibitório com melibiose Gal ($\alpha_{1\rightarrow 6}$) Glc. Esse achado sugere que a presença de D-galactose como resíduo terminal (não redutor) e D-glucose subterminal não é suficiente para a ligação à lectina, mas a configuração anomérica e o tipo de ligação podem ser determinantes para a interação lectina-carboidrato. Os dados do presente trabalho diferem dos encontrados para a maior parte das lectinas purificadas de esponjas, como as lectinas D-galactose específicas de *Cinachyrella alloclada* (ATTA et al., 1989), *P. semitubulosa* (ENGEL; BACHMAN; SCHROEDER, 1992), *A. polypoides*

(BUCK et al., 1992) e *H. cratera* (PAJIC et al., 2002); a lectina inibida por glicoproteínas de *C. australiensis* (XIONG et al., 2006); e as lectinas específicas para açúcares N-acetilados (HOL-I) e para N-acetil-lactosamina (HOL-II) de *Halimnchondria okadai* (KAWAGISHI et al., 1994). Estes resultados ilustram a diversidade de especificidade das lectinas de esponjas por carboidratos.

A lectina da esponja *C. apion* apresentou a capacidade de aglutinar *Leishmania chagasi* coradas com *Coomassie blue*, provavelmente através de sítios contendo resíduos terminais de D-galactose, unidos a D-glicose por meio de ligações $\beta_{1\rightarrow4}$, presentes na superfície do parasita. A habilidade que algumas lectinas têm de aglutinar *Leishmania* foi reconhecida por SCHOTTELIUS, 1982. Tal característica foi primordial para a sua utilização como ferramenta para a diferenciação, *in vitro*, das formas amastigotas das promastigotas de *Leishmania donovani* (WILSON; PEARSON, 1984). O conhecimento da interação carboidrato/lectina também pode ser utilizado no controle de vetores de *Leishmania*, onde os carboidratos presentes no intestino do vetor que interferem na interação da lectina da superfície do parasita impedem o crescimento de formas promastigotas (SVOBODOVA, 2000). Lectinas marcadas com isótopos radioativos também podem ser utilizadas para um estudo comparativo de glicoconjugados de *Leishmania* (ROSSEAL et al., 1990). A inibição da hemaglutinação e da aglutinação de *Leishmania* pela lectina na presença de D-lactose sugere que CaL é responsável por essas propriedades aglutinantes através da ligação à membrana celular em estruturas semelhantes à lactose. Dessa forma, CaL poderia ser utilizada, no futuro, como ferramenta de diagnóstico e análises envolvendo esses organismos patogênicos. MOURA e colaboradores, em 2006, mostraram que a lectina de *C. varians*, D-galactose específica, aglutinou promastigotos de *L. chagasi*. As especificidades dos receptores de lectinas no parasita têm sido extremamente estudadas em Tripanossomatídeos (GAZZINELLI et al., 1991; JACOBSON; DOYLE, 1996; SCHOTTELIUS; ALSIEN, 1994). Mais recentemente AFONSO-CARDOSO e colaboradores, 2007, relataram um efeito protetor da lectina de *Synadenium carinatum* na infecção por *Leishmania amazonensis* em camundongos BALB/c. Isso demonstra como as lectinas que interagem com esses parasitas podem ser ferramentas valiosas.

6 CONCLUSÕES

- O anticorpo policlonal gerado contra CvL mostrou ser uma ferramenta promissora na identificação e isolamento de novas lectinas de esponjas marinhas.
- Uma lectina foi purificada da esponja *Cinachyrella apion* e apresentou atividade aglutinante preferencial para os eritrócitos do tipo A e O, submetidos ao tratamento com papaína, independente da presença de íons bivalentes.
- CaL foi fortemente inibida pelo dissacarídeo D-lactose até a concentração mínima de 6,25 mM.
- A massa molecular da lectina, determinada em condições nativas por gel filtração em Superose 12 10 300 em sistema FPLC-AKTA, foi de 124 kDa, e uma SDS-PAGE revelou ser essa proteína octaédrica, com subunidades de 15,5 kDa.
- A atividade hemaglutinante da lectina foi termoestável, até 60°C, e pH estável, na faixa de 2,0 a 11,0.
- A lectina apresentou a capacidade de aglutinar promastigotos de *Leishmania chagasi*, provavelmente através de sítios contendo lactose presentes na superfície do parasita, uma vez que esse dissacarídeo foi capaz de inibir a aglutinação de promovida pela lectina.

REFERÊNCIAS

- AKAHANI, S.; INOHARA, H.; NANGI-MAKKER, P.; RAZ, A. Galectin-3 in tumor Metastasis. **Trends in Glycotechnology**, v. 9, p. 69-77, 1997.
- AFONSO-CARDOSO, S. R., RODRIGUES, F. H., GOMES, M. A., SILVA, A. G., ROCHA, A., GUIMARAES, A. H., CANDELORO, I., FAVORETO, S. J., FERREIRA, M. S., SOUZA, M. A. Protective effect of lectin from *Synadenium carinatum* on *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. **Korean Journal of Parasitology**, v. 45, n. 4, p. 255-266, 2007.
- ALONSO, R.; RUBIO, L. A.; MUZQUIZ, M.; MARZO, F. The effect of extrusion cooking on mineral bioavailability in pea and kidney bean seed meals. **Animal Feed Science and Technology**, v. 94, p. 1-13, 2001.
- ALPUCHE, J.; PEREYRA, A.; AGUNDIS, C.; ROSAS, C.; PASCUAL, C.; STOMIANNY, M.; VÁZQUES L.; CENTENO, E. Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, n. 1-2, p. 86-93, 2005.
- ARENAS, M. I.; ROMO, E.; DE GASPAR, I.; DE BETHENCOURT, F. R.; SANCHEZ-CHAPADO, M.; FRAILE, B.; PANIAGUA, R. A lectin histochemistry comparative study in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostatic carcinoma. **Glycoconjugate Journal**, v. 16, n. 7, p. 375-382, 1999.
- ASHWELL, G.; HARFORD, J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. **Annual Review of Biochemistry**, v. 51, p.531-534, 1982.
- ATTA, A. M.; BARRAL-NETO, M.; PEIXINHO, S.; SOUSA-ATTA, M. L. Isolation and functional characterization of a mitogenic lectin from the marine sponge *Cinachyrella alloclada*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, p.379-385, 1989.
- BANERJEE, S.; CHAKI, S.; BHOWAL, J.; CHATTERJEE, B. P. Mucin binding mitogenic lectin from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 421, p. 125-134, 2004.
- BAYNE, C. Y.; BOSWELL, C. A.; LOKER, E. S.; YUI, M. A. Plasma components which mediate cellular defenses in the gastropod mollusc *Biomphalaria glabrata*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 9, n. 3, p. 523-532, 1985.
- BECERRO, M. A.; TURON, X.; URIZ, M. J. Multiple functions for secondary metabolites in encrusting marine invertebrates. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, p. 333-337, 1997.

BELL, J. J.; BARNES, D. K. A. Sponge morphological diversity: a qualitative predictor of species diversity? **Aquatic Conservation Marine and Fresh Water Ecosystems**, v. 11, n. 2, p. 109-121, 2001.

BELOGORTSEVA, N.; MOLCHANOVA, V.; GLAZUNOV, V.; EVTUSHENKO, E.; LUK'YANOV, P. N-Acetyl-D-glucosamine-specific lectin from the ascidian *Didemnum ternatanum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1380, p. 249–256, 1998a.

BELOGORTSEVA, N. I.; MOLCHANOVA, V. I.; KURIKA, A. V.; SKOBUN, A. S.; GLAZKOVA, V.E. Isolation and characterization of new GalNAc/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus Grayanus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 119, n. 1, p. 45–50, 1998b.

BOYD, W. C.; REGUERA, R. M. Studies on hemaegglutinins presents in seeds of some representatives of the family leguminosae. **Journal of Immunology**, v. 62, p.333-339, 1949.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Separation of individuals of any blood group into secretors and non-secretors by use of a plant agglutinin (lectin). **Blood**, v.9, p.1195-1198, 1954.

BRETING, H.; SCHOTTELIUS, J. Differentiation by microimmunofluorescence of *T. cruzi* and *T. cruzi*-like strain from *T. conorhini* and *T. rangeli*, using protection from the sponge *Aaptos papilata* (author's transl.) *Cell. Tissue Res.*, v. 57, p. 213-219, 1978.

BRETTING, H., DONADEY, C., VACELET, J., JACOBS, G. Investigation on the occurrence of lectins in marine sponges with special regard to some species of the family Axinellidae. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 708, p. 69–76, 1981a.

BRETTING, H., PHILLIPS, S., KLUMPART, H., KABAT, E. A mitogenic lactose binding lectin from the sponge *Geodia cydonium*. **Journal of Immunology**, v. 127, p. 1652–1658, 1981b.

BUCK, F., LUTH, C., STRUPART, K., BRETTING, H. Comparative investigations on the amino acid sequences of different isolectins from the sponge *Axinella polypoides*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1159, p. 1–8, 1992.

BUCK, F.; SCHULZE, C.; BRELOER, M.; STRUPAT, K.; BRETTING, H. Amino acid sequence of the D-galactose binding lectin II from the sponge *Axinella polypoides* and identification of the carbohydrate binding site in lectin II and related lectin I. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 121, n. 2, p. 153-160, 1998.

- BULGAKOV, A. A.; PARK, K.; CHOI, K.; LIM, H.; CHO, M. Purification and characterization of a lectin isolated from the clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 16, n. 4, p. 487-499, 2004.
- COMINETTI, M. R.; MARQUES, M. R. F.; LORENZINI, D. M.; LOFGREN, S. E.; DAFFRE, S.; BARRACO, M. A. Characterization and partial purification of a lectin from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schmitti*. **Developmental and Compative Immunology**, v. 26, n. 8, p. 715-721, 2002.
- DANGUY, A. CAMBY, I.; KISS, R. Galectins and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 285–293, 2002.
- DIAS, A. S. F. Lectina da esponja marinha *Tedania ignis*: purificação, caracterização e interação com Leishmanias. 2006. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica/UFRN.
- DODD, R. Y.; MACLENNA, A. P.; HAWKINS, D. C. Haemahhlutinins from marine sponges. **Vox Sanguinis**, v. 15, n. 5, p. 386, 1968.
- DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 9557–9560, 1988.
- ENGEL, M., BACHMAN, M., SCHRO DER, H.C. A novel galactose- and arabinose-specific lectin from the sponge *Pellina semitubulosa*: isolation, characterization and immunobiological properties. **Biochimie**, v. 74, p. 527-537, 1992.
- ENGERING, A.; GEIJTENBEEK, T. B.; VAN KOOYK, Y. Immune escape through C-type lectins on dendritic cells. **Trends in Immunology**, v. 23, n.10, p. 480-485, 2002.
- FENTON-NAVARRO, B.; ARREGUIN-L, B.; GARCIA-HERNANDES, E.; HEIMER, E.; AGUILAR, M. B.; RODRIGUEZ-A, C.; ARREGUIN-ESPINOSA, R. Purification and structural characterization of lectins from the cnidarian *Bunodeopsis antillienis*. **Toxicon**, v. 42, n. 5, p. 525-532, 2003.
- GABIUS, H. – J. ANDRÉ, S.; KALTNER, H.E. E SIEBERT, H. C. The sugar code: functional lectinomics. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572 (2-3), p. 165-177, 2002.
- GAZZINELLI, R.T., ROMANHA, A.J., FONTES, G., CHIARI, E., GAZZINELLI, G., BRENNER, Z. Distribution of carbohydrates recognized by the lectins *Euonymus europaeus* and Concanavalin A in Monoxenic and Heteroxenic trypanosomatids. **Protozoology**, v. 38, p. 320–325, 1991.

- GERLACH, D.; SCHLOTT, B. ZHRINGER, V.; SCHIMIDT, K. N-Acetyl- D-galactosamine/ N-acetyl-D- glucosamine-recognizing lectin from the snail *Cepaea hortensis*: purification, chemical characterization, cloning and expression in *E. coli*. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 43. p. 223-232, 2005.
- GILBOA – GARBER, N.; SUDAKEVITZ, D. The hemagglutinating activities of *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA –II and Pa –III exhibit opposite temperature profiles to different receptor types. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.25, n. 4, p. 365-369, 1999.
- GLICK, G. D.; TOOGOOD, P. L. ; WILEY, D. C. ; SKEHEL, J. J. E KOWLES, J. R. Ligand recognition by Influenza virus. The binding of bivalents sialosides. **The Biochem. Chem.**, v. 266, p. 23660 – 23669, 1991.
- GORELIK, E.; GALILI, U.; RAZ, A. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 20, n.3-4, p. 245-277, 2001.
- GUNDAKER, D.; LEYS, S. P.; SCHRODER, H. C.; MULLER, I. M. E MULLER, W. E. G. Isolation and cloning of a C-type lectin from the hexactinellid sponge *Aphrocallistes vastus*: a putative aggregation factor. **Glycobiology**, v. 11, p. 21-29, 2001.
- HAJITO, T.; HOSTANSKA, K.; BERKI, T.; PALINKAS, L.; BOLDIZSAR, F.; NAMETH, P. Oncopharmacological perspectives of a plant lectin (*Viscum album* agglutinin-I): Overview of recent results from *in vitro* experiments and *in vivo* animal models, and their possible relevance for clinical applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n.1, p. 59-67, 2005.
- HARPER, S.M.; CRENCHEW, R. W.; MULLINS, M. A. & PRIVALLE, L. S. Lectin binding to insect brush border membranes. **Journal of Economic Entomology**, v.88, p. 1197-1202, 1995.
- HECHTEL, G. J. Zoogeography of Brazilian Demospongiae, p: 237-260. In: F.W. Harrison e R.R. Cowden (eds.). Aspects of Sponge Biology. Academic Press, 1976. 354p.
- JACOBSON, R.L.; DOYLE, R. J. Lectin-Parasite Interactions. **Parasitology Today**, v. 12, n. 2, p. 55-61, 1996.
- KAMYIA, H.; SHIMIZU, Y. A natural agglutinin inhibitable by D-galacturonic acid in the sea hare *Aplysia* eggs: characterization and purification, **Bull., Jpn. Soc. Sci. Fish**, v. 47, p. 255–259, 1981.

-
- KAWAGISHI, H., YAMAWAKI, M., ISOLE, S., USUI, T., KIMURA, A., CHIBA, S. Two lectins from the marine sponge *Halichondria okadae*; an *N*-acetyl-sugar specific lectin (HOL-I) and an *N*-acetyllactosamine specific lectin (HOLII). **J. Biol. Chem.** v. 269, p. 1375-1379, 1994.
- KLJAJIC, Z. [PhD Thesis (Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Belgrade)], 1986.
- KILPATRICK, D.C. Animal lectin: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 187-197, 2002.
- KIM, M.; RAO, M. V.; TWEARDY, D. J.; PRAKASH, M.; GALILI, U.; GORELIK, E. Lectin-induced apoptosis in tumor cells. **Glycobiology**, v. 3, n. 5, p. 447-453, 1993.
- KONDO M.; ITAMI, T.; TAKAHASHI, Y. Preliminary characterization of lectin in the hemolymph of kuruma prawn. **Fish Pathology**, v. 33, p. 429-435, 1998.
- KORNFELD, S. Trafficking of lysosomal enzymes. **Faseb Journal**, v. 1, p.462-468, 1987.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the ready bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LANDSTEINER, K.; RAUBITSCHKE, H. Beobachtungen über hamolyse and hamagglutination. **Zentralbl. Bakteriol. Parasit. Infektionskr. Hyg. Abt. 1**, v.45, p. 660-667, 1907.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v.98, n.2, p. 637-674, 1998.
- LIU, F.; PATTERSON, R. J.; WANG J. L. Intracellular functions of galectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 263 -273, 2002.
- LORIS, R. Principle of Structures of Animal and Plant Lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 198-208, 2002.
- LUO, T.; YANG, H.; LI, F.; ZHANG, X.; XU, X. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 20, p.1-11, 2005.
- MAHESWARI, R.; MULLAINADHAN, P.; ARUMUGAN, M. Characterization of a natural haemagglutinin with affinity for acetylated aminosugars in the serum of the marine prawn, *Penaeus indicus* (H. Milne Edwards). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 7, p.17-28, 1997.

MAKELA, D. Studies on hemagglutinins of Leguminous seeds. **Annals of Medical and Experimental Biology Fenniae**, v.35, p. 1-156, 1957.

MANCINI, G., CARBONARA, A.O., HEREMANS, J.F. Immunochemical Quantitation of Antigens by Single Radial Immunodiffusion. **Immunochemistry**, v. 2, p. 235, 1965.

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

MATSUMURA, M., BECKTEL, W.J., LEVITT, M. & MATTHEWS, B.W. Stabilization of phage T4 lysozyme by engineered disulfide bonds. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 6562 –6566, 1989.

MEBS, D., WEILER, I., HEINKE, F. Bioactive proteins from marine sponges: screening of sponge extracts for hemagglutinating, hemolytic, ichthyotoxic and lethal properties and isolation and characterization of hemagglutinins. **Toxicon**, v. 6, p. 955–962, 1985.

MELO, V. M. M. ; DUARTE, A. B. G. ; CARVALHO, A. F. F. U. ; SIEBRA, E. A. ; VASCONCELOS, I. M. Purification of a novel antibacterial and haemagglutinating protein from the purple gland of the sea hare, *Aplysia dactylomela*. **Toxicon**, v. 38, p. 1415-427, 2000.

MIARONS, P. B.; FRESNO, M. Lectins from tropical sponges - purification and characterization of lectins from genus *Aplysina*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29283-29289, 2000.

MIKHEYSKAYA, L. V.; EVTUSHENKO, E. V.; OVODOVA, R. G.; BELOGORTSEVA, N. I.; OVODOV, Y. S. Isolation and characterization of a new β -galactose-specific lectin from the sea worm *Chaetopterus variopedatus*. **Carbohydrate Research**, v. 275, p. 193-200, 1995.

MIYOSHI, N.; KOYAMA, Y.; KATSUNO, Y.; HAYAKAWA, S.; MITA, T.; OHTA, T.; KAJI, K.; ISEMURA, M. Apoptosis induction associated with cell cycle dysregulation by rice bran agglutinin. **Journal of Biochemistry**, v. 130, n. 6, p. 799-805, 2001.

MOLCHANOVA, V., CHIKALOVETS, I., LI, W., KOBELLEV, S., KOZYREVSKAYA, S., BOGDANOVICH, R., HOWARD, E., BELOGORTSEVA, N. New GlcNAc/GalNAc-specific lectin from the ascidian *Didinium tertanatum*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1723, p. 82-90, 2007.

MOREIRA, R. A.; MONTEIRO, A. C. O.; HORTA, A. C. G.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B.S. Isolation and characterization of *Dioclea altissima* var. *megacarpa* seed lectin. **Phyto-chemistry**, v. 46, p.139-144, 1977.

MOURA, G. E. D. D.; MACEDO, L. L. P., SANTOS, E. A., DE SALES, M. P. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: isolation, characterization and its effect on pathogenic bacteria and Leishmania promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 145, p. 517-523, 2006.

MULLEK, W. E. G.; CONRAD, J.; SCHRODER, 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.

MURDOCK, L. L.; SHADE, R. E. Lectins and proteases inhibitors as plant defense against insects. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p.6605-6611, 2002.

NAGANUMA, T.; OGAWA, T.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.; KAMIYA, H.; MURAMOTO, K. Isolation, characterization and molecular evolution of a novel pearl shell lectin from a marine bivalve, *Pteria penguin*. **Molecular Diversity**, v. 10, p. 607-618, 2006.

NI, Y.; TIZARD, I. Lectin- carbohydrate interaction in the immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 55, p. 205-223, 1996.

OFEK, I.; SHARON, N. Adhesins as lectins: specificity and role in infection. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 151, p. 91-113, 1990.

OHBA, H.; MORIWAKI, S.; BAKALOVA, R.; YASUDA, S.; YAMASAKI, N. Plant-derived abrin-a induces apoptosis in cultured leukemic cell lines by different mechanisms. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.195, n. 2, p. 182-193, 2004.

OKA, Y.; CHET, I.; SPIEGEL, Y. Accumulation of lectins in cereal roots invaded by cereal cyst nematode *Heterodera avenae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 51, p.333-345, 1997.

O'KEEF, B. R.; BEUTLER, J. A.; CARDELLINA, J. A.; GULAKOWSHY, R. J.; KREPPS, B. L.; MCMAHON, J. B. ; SOWDER, R. C.; HENDERSON, L. E.; PANNELL, L. K.; POMPONI, S. A.; BOYD, M. R. Isolation and characterization of niphateverin, a human-immunodeficiency-virus-inhibitory glycoprotein from the marine sponge *Niphates erecta*. **European Journal of Biochemistry**, v. 245, p. 47-53, 1997.

OLIVEIRA, J.T.A.; VASCONCELOS, I.M.; GONDIM, M.J.L.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; SANTOS, C.F.; MOREIRA, L.I.M. *Canavalia brasiliensis* seeds. Protein quality and nutritional implications of dietary lectin. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 64, p. 417-424, 1994.

OLIVEIRA, A.S.; MIGLIOLO, L.; AQUINO, R.A.; RIBEIRO, J.K.C.; MACEDO, L.L.P.; ANDRADE, L.B.S.; BEMQUERER, M.Q.; SANTOS, E.A.; KIYOTA, S.; DE SALES, M.P. Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and its *in vitro* effects towards digestive enzymes from insect pests. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p. 858-865, 2007.

OZEKI, Y.; TAZAWA, E.; MATSUI, T. D-Galactoside-Specific Lectins from the body Wall of an Echiuroi (*Urechis unicinctus*) and Two Annelids (*Neanthes japonica* and *Marphysa sanguinea*). **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 118B, n. 1, p. 1-6, 1997.

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.

PAWLIK, J. R.; MCFALL, G.; ZEA, S. Does the odor from sponges of the genus *Ircinia* protect them from fish predators? **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 6, p. 1103-1115, 2002.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as Plant Defense Proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347-352, 1995.

QUEIROZ, A. F., MOURA, R. M., RIBEIRO, J. K., LYRA, I.L., CUNHA, D.C., SANTOS, E.A., DE SALES, M. P. 2008. Pro-inflammatory effect in mice of CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 147 (2), p. 216-221, 2008.

RABINOVICH, G. A.; RUBINSTEIN, N.; TOSCANO, M. A. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 274-284, 2002.

RAO, P. V. L.; JAYARAJ, R.; BHASCAR, A. S. B.; KUMAR, O.; BATTACHARYA, R.; SAXENA, P.; DASH, P. K.; VIJAYARAGHAVAN, R. Mechanism of ricin-induced apoptosis in human cervical cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 5, p. 855-865, 2005.

REWRANTS, L. Involvement of Agglutinins (Lectins) in Invertebrate Defense Reactions: The immunological importance of carbohydrate-specific binding molecules. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 7, n. 4, p. 603-608, 1983.

RIPOLL, C.; FAVERY, B.; LECOMTE, P.; VAN DAMME, E.; PEUMANS, W.; ABAD, P.; JOUANIN, L. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. **Plant Science**, v.164, p.517-523, 2003.

RITTIDACH, W.; PALJIT, N.; UTARABHAND, P. Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* hemolymph. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, p.106-114, 2007.

ROSSEAL, R.J, STEVENS, A.F, MILES, M.A.; ALLEN, A.K. A comparison of the lectin-binding properties of glycoconjugates from a range of *Leishmania* species. **Parasitol Res.** v.76, p. 294-300, 1990.

RUDIGER, H. Plant lectins – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure and possible functions of plant lectins. **Acta Anat. (Basel)**, v.161, p.130-152, 1998.

SALES, M. P.; GERHARDT, I. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; XAVIER-FILHO, J. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? **Plant Physiology**, v.124, p. 515-522, 2000.

SCHOTTELIUS, J. The diagnostic value of lectins for the epidemiology of chagas' disease and differentiation of *Leishmania* from Old and New World. **Immun. Infekt.**, v. 10, p. 142-150, 1982.

SCHOTTELIUS, J.; ALSIEN, M.S.O. In: DOYLE, R.J., SLIFKIN, M. (Eds.), *Lectin–Microorganisms Interactions*, p. 225–248, 1994.

SCHRÖDER, H. C.; USHIJIMA, H.; KRASCO, A.; GARMULIN, V.; THAKUR, N. L.; DIEHL-SEIFERT, B.; MULLER, I. M.; MULLER, W. E. G. Emergence and Disappearance of an immune Molecular, an Antimicrobial Lectin, in Basal Metazoa. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 32810-32817, 2003.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53-62, 2004.

SMITH, P.K., KROHN, R.L., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GORKE, N.M., OLSON, B.J., KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, 11, p. 76-85, 1985.

SUMMER, J. B. & HOWELL, S. F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalina A. **Journal of Bacteriology**, v. 32, n. 2, 227-237, 1936.

SUN, J.; WANG, L.; WANG, B.; GUO, Z.; LIU, M.; JIANG, K.; LUO, Z. Purification and characterization of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, p. 292-299, 2007.

SVOBODOVA, M. Influence of lectin inhibitors on *Leishmania major* growth and morphology. **Acta Tropica**, v. 76, p. 285-288, 2000.

TATENO, H.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H.; SANEYOSHI, M. Rhamnose-binding lectins from steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs recognize bacterial lipopolysaccharides and lipoteichoic acid. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 66, n. 3, p.604-612, 2002.

THORPE, R. Producing antibodies. In: THORPE, R., KERR, M.A. (Eds), *Immunochemistry Labfax*, 1 ed. BIOS Scientific Publishers Ltd., Academic Press, San Diego, 1994.

TURNER, M. W.; The role of mannose-binding lectin health and disease. **Molecular immunology**, v.40, p.423-429, 2003.

VAN DAMME, V. A. J.; PEUMANS, W. Y.; BANE, A.; ROUGE, P. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct families of Structurally and Evolutionary Related proteins With Diverse Biology Roles. **Critical Reviews Plant Science**, v. 17, p. 575-692, 1996.

VIJAYAN, M.; CHANDRA, N. Lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, p.707-714, 1999.

WALLON, G., KRYGER, G., LOVETT, S.T., OHSHIMA, T., RINGE, D.; PETSKO, G.A. Crystal structures of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* 3-isopropylmalate dehydrogenase and comparison with their thermophilic counterpart from *Thermus thermophilus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 266, p. 1016 -1031, 1997.

WANG, JIAN-HUA; KONG, J.; LI, W.; MOLCHANOVA, V.; CHIKALOVETS, I.; BELOGORTSEVA, N.; YANOV, P. L.; ZHENG, Y. A β -galactose-specific lectin isolated from the marine worm *Chaetopterus variopedatus* possesses anti-HIV – 1 activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 142, p. 111-117, 2006.

WILSON, M.E.; PEARSON, R.D. Stage-Specific Variations in Lectin Binding to *Leishmania donovani*. **Infect. Immun.**, v. 46, p.128-134, 1984.

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.

YANG, H.; LUO, T.; LI, F.; LI, S.; XU, X. Purification and Characterization of a calcium-independent lectin (PjLec) from the haemolymph of the shrimp *Penaeus japonicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, p. 88-97, 2007.

YOON, T. J.; YOO, Y. C.; KANG, T. B.; SHIMAZAKI, K.; SONG, S. K.; LEE, K. H.; KIM, S. H.; PARK, C. H.; AZUMA, I.; KIM, J. B. Lectins isolated from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) induce apoptosis in tumor cells. **Cancer Letters**, V. 136, n.1, p. 33-40, 1999.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)