

Eduardo Prata Vilanova

**Polissacarídeos sulfatados de esponjas marinhas
(Porífera): interação carboidrato-carboidrato como um
mecanismo ancestral de adesão celular**

Tese submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro visando à
obtenção do grau de Doutor em Química Biológica

**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Bioquímica Médica
Centro de Ciências da Saúde
2008**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**Polissacarídeos sulfatados de esponjas marinhas
(Porífera): interação carboidrato-carboidrato como um
mecanismo ancestral de adesão celular**

Eduardo Prata Vilanova

Tese submetida à Universidade
Federal do Rio de Janeiro visando
A obtenção do grau de doutor em
Química Biológica

Orientador:
Prof. Dr. Paulo Antonio de Souza Mourão
Professor Titular – Instituto de Bioquímica Médica
Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Bioquímica Médica
2008**

**Polissacarídeos sulfatados de esponjas marinhas (Porífera): interação
carboidrato-carboidrato como um mecanismo ancestral de adesão celular**

Eduardo Prata Vilanova

Tese submetida ao corpo docente do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química Biológica.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Mauro Sérgio Gonçalves Pavão

Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

Prof. Dr. Radovan Borojevic

Professor Titular do Instituto de Ciências Biomédicas – UFRJ

Prof^a. Dra. Gisele Lobo Hajdu

Professora Adjunta do Departamento de Biologia Celular e Genética – UERJ

Prof^a. Dra. Mariana Sá Pereira

Professora Adjunta do Instituto de Ciências Biomédicas – UFRJ

(Suplente)

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Bioquímica Médica
2008

VILANOVA, Eduardo

Polissacarídeos sulfatados de esponjas marinhas (Porífera): interação carboidrato-carboidrato como um mecanismo ancestral de adesão celular.

Rio de Janeiro, UFRJ, 2008.

xvi, 82 f.

Tese – Doutor em Química Biológica. Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

Orientador: Paulo Antonio de Souza Mourão

1. Fator de agregação. 2. Proteoglicanos. 3. Síntese de polissacarídeos sulfatados. 4. Espécie-especificidade. 5. Espécies crípticas. 6. Teses

I. Mourão, Paulo Antonio de Souza (orientador)

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica

III. Polissacarídeos sulfatados de esponjas marinhas (Porífera): interação carboidrato-carboidrato como um mecanismo ancestral de adesão celular

Apresentação da Tese

Este trabalho foi realizado durante o curso de pós-graduação em Química Biológica no Laboratório de Tecido Conjuntivo I, Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação do Prof. Paulo Antônio de Souza Mourão. O projeto contou com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Conselho de Capacitação de Pessoal de Nível Superior - Programa de Capacitação de Docentes (CAPES-PROCAD) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) e International Foundation for Sciences (IFS).

Anexo

VILANOVA E.; ZILBERBERG C.; KOCHER M.; CUSTÓDIO M.R.; MOURÃO P.A.S.

A novel biochemical method to distinguish cryptic species of genus *Chondrilla* (Demospongiae: Chondrosida) based on its sulfated polysaccharides. *In:* Custódio M.R.; Lôbo-Hajdu G.; Hajdu E.; Muricy G. (eds). Porifera research: biodiversity, innovation and sustainability. Série Livros 28. Museu Nacional, Rio de Janeiro. pp. 653-659. 2007.

A todos aqueles que se esforçam para
fazer ciência de qualidade num país
escasso de recursos como o Brasil.

Agradecimentos

Ao Professor Paulo Antônio de Souza Mourão, pela orientação, receptividade, confiança, disponibilidade e atenção durante todos esses anos.

Ao professor Marcio Reis Custódio, pela co-orientação essencial para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos Professores Cristiano Coutinho e Radovan Borojevic, pela utilização dos seus respectivos laboratórios para as culturas de células.

Às Professoras Mariana Sá Pereira, Ana Maria Freire Tovar e Ana Cristina Espírito Santo, pela amizade, atenção e convívio constantes.

Aos Professores Mauro Pavão e Luiz Claudio Silva, pela disponibilidade e atenção constantes.

Ao Professor Robson Monteiro, pela ajuda e atenção na elaboração dessa tese.

Ao CNPq, por ter me concedido a bolsa de doutorado.

Ao CNPq, CAPES-PROCAD, FINEP, FAPERJ e IFS, por financiarem as pesquisas no Laboratório de Tecido Conjuntivo.

À todos os amigos do Laboratório de Tecido Conjuntivo, que me acolheram com carinho e paciência desde o início, e fizeram do laboratório um lugar muito agradável. Sem vocês não conseguiria ter desenvolvido este trabalho.

À minha família, pelo carinho e incentivo constante.

Resumo

Polissacarídeos sulfatados de esponjas marinhas (Porífera): interação carboidrato-carboidrato como um mecanismo ancestral de adesão celular

O reconhecimento e adesão célula-célula em esponjas marinhas (Porífera) são mediados por moléculas semelhantes a proteoglicanos denominadas fatores de agregação (AF's). Os AF's são compostos por um core protéico e dois tipos diferentes de unidades polissacarídicas: o primeiro tipo é de baixo peso molecular, não sulfatado e liga o core protéico a receptores putativos na membrana celular; o segundo tipo é sulfatado, de alto peso molecular e se liga homofilicamente com os polissacarídeos sulfatados das membranas de células adjacentes, promovendo a adesão celular. Esta ligação carboidrato-carboidrato é cálcio dependente e altamente espécie-específica. Na presente tese foram abordados alguns aspectos sobre as características e funções dos polissacarídeos sulfatados de esponjas marinhas. Primeiramente foram analisadas a localização celular e a síntese de polissacarídeos sulfatados em culturas de células da esponja *Hymeniacidon heliophila*. Todos os tipos celulares desta esponja possuem polissacarídeos sulfatados na superfície celular, e alguns tipos celulares acumulam estes polímeros intracelularmente em vacúolos. Durante a formação dos primorfos (estruturas formadas a partir de células dissociadas de esponjas) com células da esponja *H. heliophila*, a síntese de polissacarídeos sulfatados é decrescente, e cessa a partir do terceiro dia de cultura. Na segunda parte do trabalho foi determinada a atividade de polissacarídeos sulfatados exógenos na agregação celular da esponja *H. heliophila*, assim como, a afinidade entre estes polissacarídeos. O polissacarídeo sulfatado homólogo (espécie-específico) e a heparina são capazes de diminuir a agregação das células da esponja *H. heliophila*. Em contraste, os polissacarídeos sulfatados heterólogos (das esponjas *Dysidea robusta* e *Aplysina fulva*) não são capazes de diminuir a agregação celular. Os polissacarídeos sulfatados de esponjas apresentam interação espécie-específica, na presença de cálcio, enquanto a heparina apresenta interação inespecífica por esses polímeros, na presença de cálcio. Por fim, foi testada a utilidade dos polissacarídeos sulfatados

para determinar espécies crípticas (impossíveis de serem identificadas morfológicamente) de esponjas marinhas do gênero *Chondrilla*. Os polissacarídeos sulfatados apresentam uma boa resolução para distinguir as espécies co-genéricas *Chondrilla nucula* e *Chondrilla australiensis*, assim como, quatro espécies crípticas de *Chondrilla* do Oceano Atlântico. Além disso, o método foi capaz de utilizar amostras de esponjas fixadas em etanol 70%, formaldeído 4%, secas e congeladas.

Abstract

Sulfated Polysaccharides from marine sponges (Porifera): carbohydrate-carbohydrate interaction as an ancestor mechanism of cellular adhesion

The cell-cell recognition and adhesion in marine sponges (Porifera) are mediated by proteoglycan like molecules called aggregation factors (AF's). These AF's are composed by a protein core attached to two types of polysaccharidic units: The first type has low molecular weight, is not sulfated and attaches the protein core to putative receptors in the cell membrane; the second type is sulfated, has high molecular weight, and binds homophilically to sulfated polysaccharides from the adjacent cell membranes, promoting the cell-cell adhesion. This carbohydrate-carbohydrate interaction is calcium dependent and a highly species-specific event. In the present thesis were approached some aspects about the features and functions of sulfated polysaccharides from marine sponges. In the first chapter were analyzed the cellular location and the synthesis of sulfated polysaccharides by cells of the marine sponge *Hymeniacidon heliophila*. All cell types of this sponge have sulfated polysaccharides on the cell surface, and some cell types accumulates these polymers in intracellular vacuoles. During the primmorph (structures built by dissociated cells of sponges) formation with cells of this sponge, the syntesis of sulfated polysaccharides is decreasing, and stops on the third day of culture. In the second chapter was determined the activity of exogenous sulfated polysaccharides in the cellular aggregation of the sponge *H. Heliophila*, as well as, the affinity among these polysaccharides. The homologous sulfated polysaccharide (species-specific) and heparin are able to diminish the aggregation of *H. heliophila* cells. In contrast, the heterologous sulfated polysaccharides (from the sponges *Dysidea robusta* e *Aplysina fulva*) are not able to diminish the cellular aggregation. The sulfated polysaccharides from sponges shows species-specific interaction, in the presence of calcium, while heparin shows a unespecific interaction to these polymers, in the presence of calcium. In the third chapter was testes the ability of sulfated polysaccharides to distinguish cryptic species (not suitable to morphological identification) of the marine sponge genus *Chondrilla*. The sulfated polysaccharides has a good resolution to

distinguish the co-generic species *Chondrilla nucula* e *Chondrilla australiensis*, as well as, four cryptic species of *Chondrilla* from the Atlantic Ocean. Furthermore, the method was able to use sponge samples fixed in ethanol 70%, formadehyde 4%, dried or frozen.

Índice

Introdução Geral	01
Polissacarídeos sulfatados.....	01
Proteoglicanos.....	02
Fatores de agregação de esponjas (Porífera).....	04
Polissacarídeos sulfatados de esponjas.....	07
Objetivos Gerais	09
Cápitulo 1: Síntese e localização celular de polissacarídeos sulfatado em células da esponja marinha <i>Hymeniacidon heliophila</i>	10
Introdução.....	10
Objetivos.....	13
Materiais e Métodos.....	14
Resultados.....	20
Discussão.....	26
Cápitulo 2: Efeitos da adição de polissacarídeos sulfatados exógenos na agregação celular da esponja marinha <i>Hymeniacidon heliophila</i>	30
Introdução.....	30
Objetivos.....	33
Materiais e Métodos.....	34
Resultados.....	40
Discussão.....	48
Cápitulo 3: Determinação de espécies crípticas de esponjas marinhas (Porífera) através de seus polissacarídeos sulfatados	52
Introdução.....	52
Objetivos.....	56
Materiais e Métodos.....	57
Resultados.....	60
Discussão.....	67
Conclusões Gerais	68
Referências Bibliográficas	71
Anexo	81

Índice de Figuras

Figura 1 – Unidades dissacarídicas constituintes dos glicosaminoglicanos.....	02
Figura 2 – Adesão celular de esponjas mediada pelos fatores de agregação (AF'S).....	06
Figura 3 – Purificação do polissacarídeo sulfatado da esponja <i>H. heliophila</i>	20
Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose e poliacrilamida do polissacarídeo sulfatado de <i>H. heliophila</i>	21
Figura 5 – Células de <i>H. Heliophila</i> coradas com azul de toluidina.....	22
Figura 6 – Cromatografia de troca iônica dos polissacarídeos ³⁵ S-sulfatados de células de <i>H. Heliophila</i>	23
Figura 7 – Dinâmica da formação de primorfos por células de <i>H. heliophila</i>	24
Figura 8 – Incorporação de ³⁵ S-sulfato durante a formação dos primorfos.....	25
Figura 9 – Espécies de esponjas marinhas <i>H. heliophila</i> , <i>D. Robusta</i> e <i>A. Fulva</i> , utilizadas nos experimentos.....	40
Figura 10 – Purificação dos polissacarídeos sulfatados das esponjas marinhas.....	40
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose e poliacrilamida dos polissacarídeos sulfatados de <i>H. heliophila</i> , <i>D. robusta</i> e <i>A. fulva</i>	41
Figura 12 – Culturas de células de <i>H. heliophila</i> em diferentes meios suplementados com polissacarídeos sulfatados exógenos.....	43
Figura 13 – Agregação das células de <i>H. heliophila</i> incubadas com polissacarídeos heterólogos de esponjas.....	44
Figura 14 – Agregação das células de <i>H. heliophila</i> incubadas com diferentes concentrações de SPHh e heparina.....	45
Figura 15 – Afinidade de SPHh por diferentes polissacarídeos sulfatados.....	46
Figura 16 – Afinidade de polissacarídeos sulfatados de esponjas por	

heparina	51
Figura 17 – Purificação dos polissacarídeos sulfatados de <i>C.nucula</i> e <i>C. australiensis</i>	60
Figura 18 – Eletroforese em gel de agarose dos polissacarídeos sulfatados de <i>C. nucula</i> e <i>C. australiensis</i>	61
Figura 19 – Eletroforese em gel de poliacrilamida dos polissacarídeos sulfatados de <i>C. nucula</i> e <i>C. australiensis</i>	62
Figura 20 – Eletroforese em gel de agarose dos extratos crus de polissacarídeos sulfatados de espécies crípticas de <i>Chondrilla</i>	64
Figura 21 – Eletroforese em gel de agarose dos extratos crus de polissacarídeos sulfatados em diferentes fixadores.....	64

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Composição química dos polissacarídeos sulfatados de <i>H. heliophila</i> , <i>D. robusta</i> e <i>A. fulva</i>	42
Tabela 2 – Diferenças químicas entre os polissacarídeos sulfatados de esponjas marinhas.....	53
Tabela 3 – Composição química dos polissacarídeos sulfatados de <i>C. nucula</i> e <i>C. australiensis</i>	63

Abreviações

GAG's	Glicosaminoglicanos
PG's	Proteoglicanos
AF's	Fatores de agregação celular de esponjas
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HEPES	(ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico)
CMFSW+E	Água do mar artificial livre de cálcio e magnésio suplementada com EDTA
SFSW+³⁵S	Água do mar artificial livre de sulfato suplementada com sulfato radioativo (³⁵ SO ₄)
FSW	Água do mar natural filtrada suplementada com antibióticos
HhSP	Polissacarídeo sulfatado da esponja <i>Hymeniacidon heliophila</i>
DrSP	Polissacarídeo sulfatado da esponja <i>Dysidea robusta</i>
AfSP	Polissacarídeo sulfatado da esponja <i>Aplysina fulva</i>
HexUA	Ácido hexurônico
Glc	Glicose
Gal	Galactose
Fuc	Fucose
Ara	Arabinose
Man	Manose
GlcNac	Glicosamina
GalNac	Galactosamina
HexNac	Hexosamina
Gal Py	Galactose piruvatada

Introdução Geral

Polissacarídeos sulfatados

Polissacarídeos sulfatados são macromoléculas compostas por polímeros lineares ou ramificados, formados por carboidratos iguais (homopolissacarídeos) ou diferentes (heteropolissacarídeos), que apresentam ésteres de sulfato ligados a sua estrutura. Os polissacarídeos sulfatados possuem uma grande variedade estrutural devido à possibilidade de várias combinações de monossacarídeos, de diferentes tipos de ligações glicosídicas e da presença de ramificações nos polímeros. Os polissacarídeos sulfatados também podem apresentar grandes diferenças polianiónicas devido às variações nas quantidades de ésteres de sulfato e de grupamentos carboxila presentes nos ácidos hexurônicos (NELSON & COX, 2004). Os polissacarídeos sulfatados são abundantes em tecidos de vertebrados (onde ocorrem sob a forma de glicosaminoglicanos; Fig. 1) e também em invertebrados, algas e plantas superiores (e.g. MATHEWS, 1975; KLOAREG & QUATRONO, 1988; CAVALCANTI *ET AL.*, 1999; ZIERER & MOURÃO, 2000; AQUINO *ET AL.*, 2005).

Esses polímeros são encontrados geralmente associados a proteínas na matriz extracelular, em regiões pericelulares, na membrana mucosa dos tecidos de vertebrados e, em poucos casos, intracelularmente. A função desses polímeros nesses tecidos pode estar associada à comunicação célula-célula, à adesão celular, à reserva de fatores de crescimento, à proteção contra patógenos, entre outros.

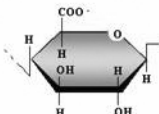
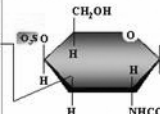
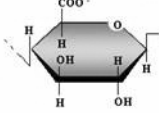
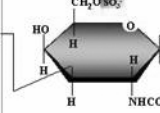
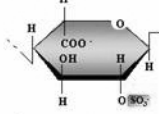
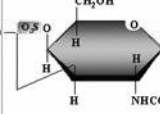
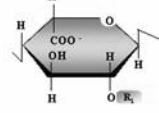
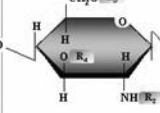
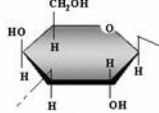
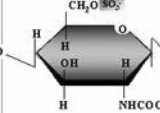
Glicosaminoglicano	Ácido Hexurônico	Hexosamina	Ligação O-glicosídica
Condroitim-4-sulfato	 Ácido Glucurônico (GlcUA)	 N-Acetil-Galactosamina (GalNAc)	GlcUA 1→3 GalNAc
Condroitim-6-sulfato	 Ácido Glucurônico (GlcUA)	 N-Acetil-Galactosamina (GalNAc)	GlcUA 1→3 GalNAc
Dermatam sulfato	 Ácido Idurônico (IdUA)	 N-Acetil-Galactosamina (GalNAc)	IdUA 1→3 GalNAc
Heparina/Heparam sulfato	 Ácido Idurônico/ Glicurônico (IdUA/GlcUA)	 Glucosamina (GlcN)	IdUA/GlcUA 1→4 GlcN
Queratam sulfato	 Galactose (Gal)	 N-Acetil-Glucosamina (GlcNAc)	Gal 1→4 GlcNAc

Figura 1. Unidades dissacarídicas constituintes dos glicosaminoglicanos. Os glicosaminoglicanos são heteropolissacarídeos lineares compostos, na maioria das vezes, por unidades dissacarídicas repetitivas de um ácido hexurônico (ácido glucurônico ou ácido idurônico) e uma hexosamina (glucosamina ou galactosamina).

Proteoglicanos

Os proteoglicanos (PG's) são um grupo diverso de macromoléculas compostas por uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAG's), ligados covalentemente a um core protéico (HASSEL ET AL., 1988). Os principais tipos de GAG's são: heparam sulfato/heparina, dermatam sulfato/condroitim sulfato,

queratam sulfato e ácido hialurônico. Estes GAG's são compostos por unidades dissacarídicas repetitivas e sulfatadas (com exceção do ácido hialurônico; Fig. 1). O número de GAG's ligados ao core protéico (geralmente O-ligados a resíduos de serina) pode variar de 1 a mais de 100 (FERNANDEZ-BUSQUETS & BURGER, 2003).

A enorme diversidade, tanto entre as proteínas quanto entre os GAG's componentes dos PG's, levou a divisão desses compostos em 5 grupos: HSPGs, PG's de membrana basal de heparan sulfato (ex. perlecan); Hialectanas, compostas por múltiplas unidades de ácido hialurônico ligadas ao core protéico (ex. agrecan, versican, neurocan e brevican); PG's pequenos, com uma ou duas cadeias de GAG's (ex. biglican e decorina), esses três grupos são PG's de matriz extracelular; PG's de superfície celular (sindecans e glipicans) e PG's intracelulares (serglicinas) (e.g. HEINEGARD & SOMMARIN, 1987; RUOSLAHTI, 1988; IOZZO, 1998).

Os PG's desempenham várias funções biológicas, variando desde funções simples, como integridade estrutural, até funções complexas, como adesão, mobilidade, reconhecimento, diferenciação e desenvolvimento celular (e.g. KJÉLLEN & LINDHALL, 1991). Alguns exemplos das funções específicas dos PG's são: 1) a angiogênese, que depende da interação entre FGF's e HSPG's da matriz extracelular (IOZZO & SAN ANTONIO, 2001); 2) a adesão de células nervosas, mediada pela interação entre a molécula de adesão celular neuronal (N-CAM) e HSPG's (STORMS *ET AL.*, 1996); 3) a neurogênese e o desenvolvimento sináptico, que depende de interações com PG's da matriz extracelular (YAMAGUCHI, 2001; RAUCH *ET AL.*, 2001).

Alguns PG's são ligados às membranas celulares. O sindecan é ancorado na membrana plasmática através de um domínio transmembrana (CAREY, 1997). Os glipicans se ligam à membrana plasmática através do fosfatidil-inositol (ISHIHARA

ET AL., 1987). Alguns tipos de PG's se ligam à superfície celular através de receptores de membrana, que podem reconhecer especificamente os seus cores protéicos (HAUSSER & KRASSE, 1999).

Fatores de agregação de esponjas (Porífera)

Esponjas são os organismos multicelulares mais primitivos. Elas não possuem órgãos ou tecidos típicos dos outros metazoários. Seus tecidos são formados por alguns tipos celulares altamente móveis, inseridos numa abundante matriz extracelular. Várias moléculas relacionadas à adesão celular já foram identificadas em esponjas, incluindo colágenos fibrilares e não fibrilares como, por exemplo, o colágeno tipo IV (EXPOSITO & GARRONE, 1990; EXPOSITO *ET AL.*, 1991; AHO *ET AL.*, 1993). Evidências imunológicas indicam a presença de proteínas semelhantes à fibronectina em esponjas (LABAT-ROBERT *ET AL.*, 1981; AKIYAMA & JOHNSTON, 1983). Lectinas, com propriedades hemoaglutinantes, também já foram isoladas de esponjas. (BRETTEING & KABAT, 1976; KAWAGISHI *ET AL.*, 1994). Além disso, outras moléculas envolvidas na adesão celular, como a tenascina, a laminina e as subunidades α e β da integrina também já foram identificadas em esponjas (HUMBERT-DAVID & GARONE, 1993; PANCER *ET AL.*, 1997; BROWER *ET AL.*, 1997).

O primeiro modelo de adesão celular em animais foi realizado com esponjas (WILSON, 1907). Nesse modelo foi descrita a reagregação de células de esponja dissociadas mecanicamente. Após a desagregação, as células assentam lentamente e começam a se mover. Após o contato entre as células, ocorre a adesão e a formação de agregados. Todo o processo de reagregação é cálcio dependente. Nesse experimento clássico, Wilson (1907) observou que somente células da

mesma espécie reagregam. Humphreys (1963) e Moscona (1963) inferiram à existência de uma molécula associada à membrana celular, responsável pela agregação das células de esponja, que denominaram como fator de agregação (AF's).

Diversos AF's já foram isolados de células de esponjas (e.g. MISEVIC & BURGER, 1986; POPESCU & MISEVIC, 1997; JARCHOW *ET AL.*, 2000). Os AF's são compostos por proteínas e carboidratos. O conteúdo protéico dessas moléculas varia de 40 e 74% e as massas moleculares são da ordem de milhões de daltons (HENKART *ET AL.*, 1976; MULLER *ET AL.*, 1979; MISEVIC & BURGER, 1986). Com base no conteúdo de carboidratos e de proteínas, e na aparência em imagens de microscopia eletrônica de transmissão e de microscopia de força atômica, os AF's foram classificados como moléculas semelhantes a proteoglicanos (MULLER & ZHAN, 1973; HUMPHREYS *ET AL.*, 1977; JARCHOW *ET AL.*, 2000; Fig. 2). A porção protéica dos AF's é composta por cores protéicos lineares ou circulares, dependendo da espécie estudada (JARCHOW *ET AL.*, 2000). Ligado ao core protéico são encontrados dois tipos de unidades polissacarídicas: o primeiro tipo é de baixo peso molecular, não sulfatada e liga o core protéico a receptores putativos da membrana celular; o segundo tipo é composto por polissacarídeos sulfatados de alto peso molecular, que se ligam homofilicamente com polissacarídeos sulfatados das membranas de células adjacentes, promovendo a adesão celular (e.g. BLUMBACH *ET AL.*, 1998; FERNÁNDEZ-BUSQUETS & BURGER, 2003; BUCIOR & BURGER, 2004).

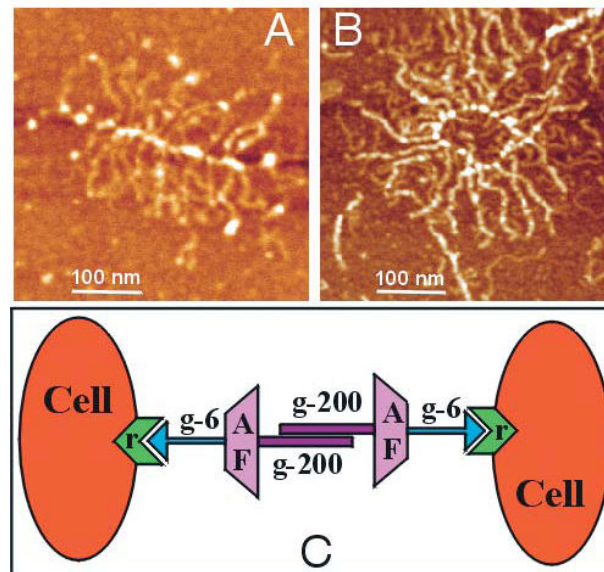


Figura 2. Adesão celular de esponjas mediada pelos fatores de agregação (AF'S). A - Imagem por microscopia de força atômica (AFM) do fator de agregação de *Halicondria panicea*. B - Imagem por microscopia de força atômica (AFM) do fator de agregação de *Microciona prolifera*. C - Modelo de agregação celular de esponjas mediado pelos AF's: O core protéico (AF) se liga a duas unidades polissacarídicas (g-6 e g-200), a primeira (g-6) é de baixo peso molecular, não sulfatada e liga o core protéico a receptores putativos da membrana celular (r), a segunda (g-200) é composta por polissacarídeos sulfatados de alto peso molecular que se ligam homofilicamente com polissacarídeos sulfatados das membranas de células adjacentes. Modificado de JARCHOW ET AL. (2000).

Os AF's isolados das esponjas *Microciona prolifera* e *Haliclona occulata* foram utilizados em experimentos que demonstraram sua participação na agregação celular (HUMPHREYS ET AL., 1977). Em outro experimento AF's de três espécies foram purificados e acoplados a microesferas de diferentes cores. Somente as microesferas com AF's da mesma espécie agregaram, comprovando a espécie-especificidade da interação entre AF's (POPESCU & MISEVIC, 1997). A agregação celular mediada pelos AF's de esponjas marinhas depende de uma concentração extracelular de cálcio de 10 mM, similar à concentração de cálcio da água do mar. AF's também já foram identificados em esponjas de água doce (VAN DE VYVER, 1971). Para essas esponjas, a concentração de cálcio necessária para a agregação celular é de 1 mM (RASMONT, 1961).

Polissacarídeos sulfatados de esponjas

As unidades componentes dos AF's, efetivamente responsáveis pelo reconhecimento e adesão celular em esponjas, são os polissacarídeos sulfatados (SPILLMANN & BURGER, 1996; BUCIOR & BURGER, 2004). Experimentos utilizando microesferas, recobertos por polissacarídeos sulfatados purificados de esponjas, resultaram na agregação dessas microesferas. Também ocorreu agregação entre células vivas de esponjas e microesferas recobertas com seus polissacarídeos sulfatados, confirmando que a agregação mediada pelos polissacarídeos sulfatados também ocorre fisiologicamente. A incubação do anticorpo anti-polissacarídeo sulfatado da esponja *Microciona prolifera* com células vivas ou com microesferas recobertas de polissacarídeos sulfatados dessa espécie, impediu a agregação, confirmando o papel central dos polissacarídeos sulfatados na agregação celular em esponjas (BUCIOR & BURGER, 2004). A força de ligação entre esses polissacarídeos sulfatados foi determinada através de microscopia de força atômica, variando entre 200 e 300 piconewtons, de acordo com a espécie estudada (FERNÁNDEZ-BUSQUETS & BURGER, 2003; BUCIOR & BURGER, 2004).

Em semelhança aos resultados observados para os AF's intactos, os polissacarídeos sulfatados, componentes dessas moléculas, também são altamente espécie-específicos. Tanto nos experimentos utilizando células vivas, quanto em experimentos utilizando microesferas recobertas com polissacarídeos sulfatados de esponjas, a agregação só ocorreu de forma homóloga, ou seja, entre polissacarídeos sulfatados ou células de esponjas da mesma espécie (e.g. POPESCU & MISEVIC, 1997; MISEVIC *ET AL.*, 2004; BUCIOR & BURGER, 2004). Além disso, todas as espécies de esponjas que tiveram seus polissacarídeos

sulfatados caracterizados, apresentaram polímeros com diferentes estruturas, composição de açúcares e conteúdos de sulfato (e.g. ZIERER & MOURÃO, 2000; GUERERDEL *ET AL.*, 2004; BUCIOR & BURGER 2004; VILANOVA *ET AL.*, 2007). Assim como ocorre com os AF's intactos, a interação entre os polissacarídeos sulfatados, componentes dos AF's, é dependente de cátions divalentes, principalmente de cálcio. Na ausência de cálcio ou em concentrações abaixo de 10 mM (concentração fisiológica de cálcio na água do mar) a agregação não ocorre ou diminui drasticamente (e.g. SPILLMANN & BURGER, 1996; BUCIOR & BURGER, 2004).

Objetivos Gerais

1. Determinar a localização celular e a síntese de polissacarídeos sulfatados por células de esponjas em cultura;
2. Avaliar a atividade de polissacarídeos sulfatados exógenos na agregação celular de esponjas;
3. Determinar a utilidade dos polissacarídeos sulfatados para determinação de espécies crípticas de esponjas.

Capítulo 1

Síntese e localização celular de polissacarídeos sulfatado em células da esponja marinha *Hymeniacidon heliophila*

Introdução

Esponjas, filo Porífera, são os organismos multicelulares mais primitivos existentes atualmente. Um grande número de produtos naturais já foi isolado de esponjas, e vários deles se encontram atualmente em fase de teste clínico ou pré-clínico (HAEFNER, 2003). Entretanto, a biomassa de esponjas obtida diretamente do mar não é suficiente para suprir as demandas de pesquisas em larga escala de seus compostos bioativos (OSINGA *ET AL.*, 1999). O problema de suprimento é, portanto, a principal barreira para o desenvolvimento de drogas derivadas de esponjas (BELARBI *ET AL.*, 2003). O método mais adequado para a produção de compostos bioativos de esponjas são as culturas de células *in vitro*, visto que, estes sistemas são livres de contaminantes, como bactérias, fungos e protozoários, e permite a manipulação gênica das células (CARALT *ET AL.*, 2007).

Atualmente, as culturas de células de esponjas são realizadas utilizando células em suspensão (PONPONI, 2006) ou agregados celulares obtidos a partir de células em suspensão, denominados primorfos (CUSTÓDIO *ET AL.*, 1998; MULLER *ET AL.*, 1999). Os primorfos são agregados celulares compostos por uma camada externa recoberta por uma pinacoderme contínua, e uma zona central, composta por células esferulosas e arqueócitos (CUSTÓDIO *ET AL.*, 1998). Essas estruturas são formadas a partir de células dissociadas, que entram em um processo de

reagregação quando incubadas em água do mar. Parte das células dissociadas entra em apoptose ou são fagocitadas por arqueócitos. Outra parte reagrega e se diferencia em pinacócitos, células esferulosas ou arqueócitos (CUSTÓDIO *ET AL.*, 1998). Após a sua formação, os primorfos entram em um estado de latência e podem ser mantidos em cultura por vários meses (SIPEKMA *ET AL.*, 2003).

A esponja marinha *Hymeniacidon heliophila* já foi utilizada como modelo em trabalhos sobre biologia celular e culturas de células (CUSTÓDIO *ET AL.*, 2004; PONPONI, 2006). Essa espécie possui aproximadamente dezessete tipos celulares. Os principais tipos celulares observados após a dissociação são: coanócitos, células pequenas e irregulares com nucléolo marcado, poliblastos, pinacócitos, células esferulosas, colêncitos e arqueócitos (CUSTÓDIO *ET AL.*, 2004). A formação dos primorfos, com células dissociadas dessa esponja, leva em torno de cinco dias, e os principais tipos celulares observados após sua formação são os pinacócitos, arqueócitos e células esferulosas (CUSTÓDIO *ET AL.* 2004).

A adesão e o reconhecimento celular em esponjas são mediados por moléculas semelhantes a proteoglicanos denominadas fatores de agregação (AF's), spongicans ou gliconectinas (e.g. MISEVIC *ET AL.*, 2004; GUERARDEL *ET AL.*, 2004). Essas moléculas são compostas por um core protéico, ligado a varias unidades de polissacarídeos sulfatados (e.g. FERNÁNDEZ-BUSQUETS & BURGER, 2003; JARCHOW *ET AL.*, 2000). O polissacarídeo sulfatado componente do AF da esponja *H. heliophila* é composto por resíduos de galactose, fucose e ácido hexurônico, e difere dos glicosaminoglicanos de mamíferos (ZIERER & MOURÃO, 2000).

Os AF's estão presentes na superfície celular de células de esponjas ligados a receptores putativos, através de unidades polissacarídicas de baixo peso molecular (BLUMBACH *ET AL.*, 1998; FERNÁNDEZ-BUSQUETS & BURGER,

2003). Em vertebrados, os proteoglicanos também se encontram associados a regiões pericelulares. As principais exceções são a presença da serglicina (proteoglicanos de heparina), encontrada em inclusões intracelulares em mastócitos de células de mamíferos (FORSBERG *ET AL.*, 1999), e a presença de heparam sulfato em grânulos intracelulares de células teste de ovos da ascídia *Styella plicata* (CAVALCANTI *ET AL.*, 1999).

No presente trabalho foi analisada a síntese de polissacarídeos sulfatados, componentes dos AF's, por células da esponja *Hymeniacidon heliophila* durante o período de formação dos primorfos. A quantificação da síntese dessas moléculas é importante para avaliar seu papel nas diferentes etapas da reagregação celular, que culminam com a formação dos primorfos. Além disto, também foi descrita, através de histoquímica e de experimentos de incorporação metabólica de ³⁵S-sulfato, a localização celular (pericelular e intracelular) dos polissacarídeos sulfatados nos diferentes tipos celulares desta espécie de esponja.

Objetivos

1. Analisar a síntese de polissacarídeos sulfatados por células em cultura da esponja *H. heliophila*, durante a formação dos primorfos;
2. Determinar a localização celular (intracelular ou pericelular) dos polissacarídeos sulfatados em células da esponja *H. heliophila*.

Materiais e Métodos

Amostras de esponjas

As amostras da esponja *H. heliophila* foram coletadas na Praia Vermelha, Rio de Janeiro através de mergulho autônomo (SCUBA). As amostras coletadas, com a finalidade de extração de polissacarídeos sulfatados, foram automaticamente fixadas em etanol 70%. As amostras coletadas para cultura de células foram transportadas para o laboratório em água do mar e acondicionadas em aquário à 18° C, para posterior utilização.

Extração dos polissacarídeos sulfatados

As amostras de *H. heliophila* foram cortadas em pequenos pedaços (1 mm³), lavadas em etanol 70%, imersas três vezes em acetona e secas em estufa à 60° C. Os polissacarídeos sulfatados foram extraídos, a partir dos tecidos secos (500 mg), através de digestão proteolítica extensiva com papaína. Os extratos foram parcialmente purificados através de precipitações com cloreto de cetilpiridina e etanol. Foram obtidos aproximadamente 10 mg (peso seco) de extratos crus de polissacarídeos sulfatados.

Purificação dos polissacarídeos sulfatados

Os extratos de polissacarídeos sulfatados de *H. heliophila* (10 mg) foram submetidos à cromatografia de troca iônica em uma coluna de DEAE celulose (10 ml), equilibrada com 5 mM de acetato de sódio (pH 5,0) e 10 mM de EDTA (ácido

etilenodiaminotetracético), acoplada a um sistema de FPLC. Os polissacarídeos sulfatados foram eluídos da coluna através de um gradiente linear de 0-3 M de NaCl, a um fluxo de 0,5 ml/min. Frações de 0,5 ml foram coletadas e checadas através do ensaio de metacromasia, utilizando azul de 1,9-dimetilmetileno (FARNDALÉ *ET AL.*, 1986), e através da condutividade. As frações contendo polissacarídeos sulfatados foram agrupadas, dializadas contra água destilada e liofilizadas.

Eletroforese em gel de agarose

O polissacarídeo sulfatado purificado de *H. heliophila* foi analisado através de eletroforese em gel de agarose. O polissacarídeo sulfatado (10 µg) e uma mistura padrão de glicosaminoglicanos (condroitim 4-sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato; 5 µg de cada) foram aplicados em um gel de agarose a 0,5% e submetidos a 110 V por 1 h, em tampão acetato de 1,3-diaminopropano 0,05 M (pH 9,0). Os polissacarídeos sulfatados no gel foram fixados com brometo de *N*-cetil-*N,N,N*-trimetilamonia 0,1%. Após 12 h, o gel foi seco e corado com azul de toluidina 0,1%, em solução 0,1:5:5 v/v ácido acético:etanol:água.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

A massa molecular do polissacarídeo sulfatado purificado de *H. heliophila* foi estimada através de eletroforese em gel de poliacrilamida. O polissacarídeo sulfatado (15 µg) foi aplicado em um gel de poliacrilamida a 6% com 1 mm de espessura em tampão sódio barbital 0,02 M (pH 8,6). Após a eletroforese (100 V por 30 min), o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% em solução de ácido acético 1% e depois lavado por 4 hs em solução de ácido acético 1%. Os marcadores de massa

molecular utilizados foram o dextram sulfato de baixo peso molecular (8 kDa), condroitim 4-sulfato (40 kDa), condroitim 6-sulfato (60 kDa) e dextram sulfato de alto peso molecular (500 kDa).

Dissociação celular

Os tecidos da esponja foram cortados em pedaços de 2-3 mm³, lavados em água do mar natural e incubados em água do mar artificial livre de cálcio e magnésio suplementada com EDTA (CMFSW+E): 460 mM NaCl, 7 mM Na₂SO₄, 10 mM KCl, 10 mM HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico), 2,5 mM EDTA, pH 8,2. As amostras foram incubadas em CMFSW+E por 30 min, em placa agitadora em baixa velocidade. O sobrenadante foi descartado e os fragmentos ressuspendidos em nova solução de CMFSW+E por 45 min, em placa agitadora em baixa velocidade. Após a segunda incubação, o sobrenadante contendo as células foi coletado e filtrado em filtro de nylon de 40 µm. Após a filtração, as células foram centrifugadas (80 g, 10 min) e mantidas em CMFSW+E até a sua utilização.

Preparações histoquímicas

As lâminas contendo as células de *H. heliophila* foram obtidas através de citocentrifugação. As células dissociadas tiveram a sua concentração ajustada para 5x10⁵ células ml⁻¹, através de contagem em câmara de Neubauer, e depois fixadas em solução de glutaraldeído 10%, por 24 hs, a 4° C. As lâminas foram preparadas usando 100 µl da solução de células dissociadas fixadas, centrifugadas por 5 min a 80 g, em uma citocentrífuga FANEM citospin 280. As lâminas foram coradas com

azul de toluidina 4%, pH 4,4 por 5 min e fotografadas em microscópio óptico Zeiss axioscop 2

Marcação metabólica com ^{35}S e isolamento dos polissacarídeos sulfatados intra e pericelulares

Células de *H. heliophila* (8×10^{24} células) foram incubadas por 24 hs a 18°C , em água do mar artificial livre de sulfato suplementada com ^{35}S (SFSW+ ^{35}S): 460 mM NaCl, 20 mM MgCl_2 , 10 mM CaCl_2 , 2 mM NaHCO_3 , 10 mM KCl, 10 mM HEPES e 100 μCi de $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$, pH 8,2. Após a marcação metabólica, as células foram lavadas 5 vezes em CMFSW+E para retirada do $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ livre. Após a lavagem, as células foram submetidas a tripsinização branda por 12 hs, a 18°C , em uma solução de CMFSW+E suplementada com 0,05% de tripsina, para isolar os componentes pericelulares dos intracelulares. Para confirmar a eficiência da tripsinização, amostras das células foram coradas com azul de toluidina, para a observação da metacromasia nas superfícies celulares. Após a tripsinização branda, a suspensão de células foi centrifugada por 10 min a 250 g e o precipitado foi separado do sobrenadante. O sobrenadante, contendo os polissacarídeos sulfatados pericelulares, foi dializado contra água destilada, submetido à digestão proteolítica com papaína por 24 hs, a 60°C , e parcialmente purificados através de precipitação com etanol. O precipitado, contendo os polissacarídeos sulfatados intracelulares, foi imerso em acetona, seco, submetido à digestão proteolítica com papaína por 24 hs, a 60°C , e parcialmente purificado através de precipitação com etanol. Os polissacarídeos sulfatados intra e pericelulares foram analisados por cromatografia de troca iônica em uma coluna de DEAE celulose (3 ml), equilibrada com 5 mM de acetato de sódio (pH 5,0) e 10 mM de EDTA, acoplada a um sistema de FPLC. Os

polissacarídeos sulfatados foram eluídos através de um gradiente linear de 0-3 M de NaCl. As frações foram monitoradas através da radioatividade, em líquido de cintilação (1 l de tolueno e 0,2 g de POP), utilizando um cintilador Beckman modelo LS 6000SC e através da condutividade.

Preparação dos primorfos

Para a formação dos primorfos, as células em suspensão (10^9 células ml^{-1}) foram centrifugadas (80 g, 10 min) e ressuspensas em água do mar artificial filtrada (0,22 μm , FSW), suplementada com antibióticos (kanamicina 100 mg l^{-1} e tilosina 8 mg l^{-1}) e vermelho de fenol (16 mg l^{-1}) ou em SFSW+ ^{35}S . As soluções de FSW ou SFSW+ ^{35}S , com as células em suspensão, foram transferidas para placas de petri estéreis contendo 10 ml de FSW ou SFSW+ ^{35}S . A cada 24 hs as células foram ressuspensas com pipeta Pasteur, e transferidas para placas de petri estéreis contendo 10 ml de FSW ou SFSW+ ^{35}S novo. Este processo foi repetido durante cinco dias até a formação dos primorfos.

Marcação metabólica com ^{35}S e isolamento dos polissacarídeos sulfatados das células durante a formação dos primorfos

Para a quantificação da síntese de polissacarídeos sulfatados, durante a formação dos primorfos, foram feitas 15 culturas de células de *H. heliophila* (10^9 células cada). Para a análise da síntese de polissacarídeos sulfatados nas primeiras 24 hs, três culturas foram feitas diretamente em SFSW+ ^{35}S . Para a análise da síntese de polissacarídeos sulfatados entre 24-48 hs de cultura, as células de três culturas, incubadas previamente por 24 hs em FSW, foram ressuspensas e

incubadas por 24 hs em uma nova placa contendo SFSW+³⁵S. Para a análise da síntese de polissacarídeos sulfatados nos demais dias (48-72 hs, 72-96 hs, 96-120 hs e 120-144 hs) foi utilizado o mesmo método: Incubar as células com FSW, até o momento de quantificar a síntese de polissacarídeos sulfatados, e no momento de quantificação incubar as células por 24 hs em SFSW+³⁵S. Todas as culturas foram feitas em triplicata. Após o período de marcação com ³⁵S as células (1 mg de cada cultura) foram imersas em acetona, secas, submetidas à digestão proteolítica com papaína por 24 hs, a 60° C, e parcialmente purificadas através de precipitação com etanol. Os polissacarídeos sulfatados, de cada cultura, foram submetidos à cromatografia de troca iônica em uma coluna de DEAE celulose (3 ml), equilibrada com 5 mM de acetato de sódio (pH 5,0) e 10 mM de EDTA, acoplada a um sistema de FPLC. A coluna foi lavada com 6 ml de tampão de equilíbrio, e os polissacarídeos sulfatados foram eluídos com 3 M de NaCl. As frações foram monitoradas através da radioatividade em líquido de cintilação (1 l de tolueno e 0,2 g de POP), utilizando um cintilador Beckman modelo LS 6000SC. As culturas foram fotografadas diariamente, utilizando câmera digital Canon D20.

Resultados

A análise dos polissacarídeos sulfatados de *H. heliophila*, através de cromatografia de troca iônica em DEAE celulose, resultou em uma fração única eluída com aproximadamente 0,6 M de NaCl (Fig. 3). Esse resultado sugere a presença de uma única população de polissacarídeos sulfatados nos tecidos de *H. heliophila*.

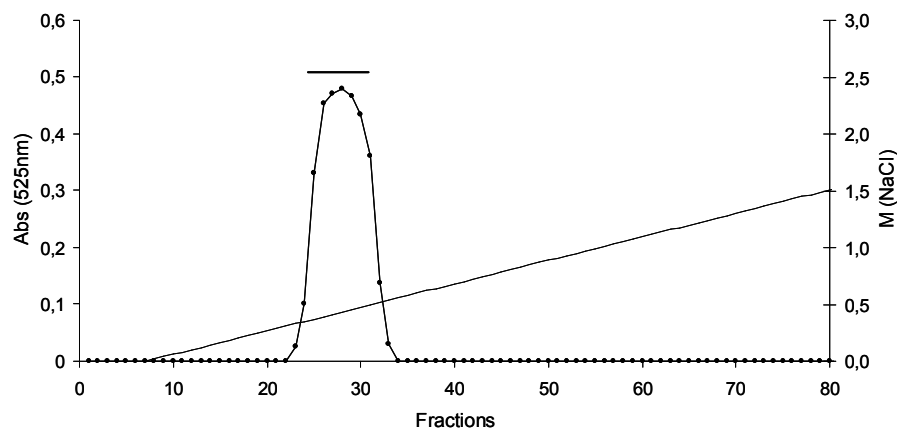


Figura 3. Purificação do polissacarídeo sulfatado da esponja *H. heliophila*. O extrato cru do polissacarídeo sulfatado da esponja (~ 10 mg) foi purificado através de cromatografia de troca iônica (DEAE Celulose). As frações foram cheçadas através da propriedade metacromática (525nm) e da condutividade. As frações indicadas pela barra horizontal foram agrupadas, dializadas contra água destilada e liofilizadas.

A eletroforese em gel de agarose do polissacarídeo sulfatado de *H. heliophila*, purificado no experimento da Fig. 3, mostrou uma única banda (Fig. 4A). A migração eletroforética desse polissacarídeo sulfatado é diferente dos glicosaminoglicanos condroitim 4-sulfato, dermatam sulfato e heparan sulfato. Esse resultado confirma a pureza do polissacarídeo sulfatado encontrado nos tecidos de *H. heliophila* e a sua diferença em relação aos glicosaminoglicanos de mamíferos. O peso molecular do polissacarídeo sulfatado de *H. heliophila* foi estimado em aproximadamente 40 kDa (Fig. 4B)

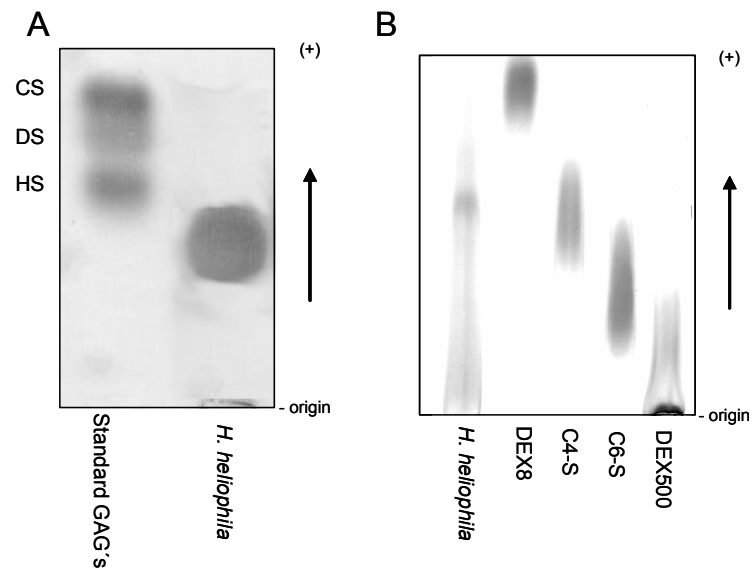


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose e poliacrilamida do polissacarídeo sulfatado de *H. heliophila*. A – O polissacarídeo sulfatado purificado da esponja (~10 µg) e uma mistura padrão de GAG's contendo condroitim 4-sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS; 5 µg de cada) foram aplicados a um gel de agarose a 0,5% e submetidos a 110 V por 1 h em tampão acetato de 1,3-diaminopropano 0,05 M (pH 9,0). Os polissacarídeos sulfatados no gel foram fixados, secos, e corado com azul de toluidina 0,1%. B – O polissacarídeo sulfatado purificado da esponja (~10 µg) foi aplicado em um gel de poliacrilamida a 6% com 1 mm de espessura em tampão sódio barbital 0,02 M (pH 8,6). Após a eletroforese (100 V por 30 min), o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% e depois lavado por 4 hs em solução de ácido acético 1%. Os marcadores de massa molecular utilizados foram o dextram sulfato de baixo peso molecular (8 kDa), condroitim 4-sulfato (40 kDa), condroitim 6-sulfato (60 kDa) e dextram sulfato de alto peso molecular (500 kDa).

Após a dissociação celular dos tecidos de *H. heliophila*, foi possível identificar 12 tipos celulares morfologicamente distintos. Todos os tipos celulares identificados apresentaram uma forte metacromasia na superfície celular, indicando a presença de polissacarídeos sulfatados (Fig. 5). Alguns tipos celulares, como as células globulares (Fig. 5A), arqueócitos (Fig. 5C), esclerócitos (Fig. 5D), cistencitos (Fig. 5G) e os tipos celulares não identificados E e H (Fig. 5E e Fig. 5H, respectivamente), apresentaram grânulos intracelulares metacromáticos, indicando a presença de polissacarídeos sulfatados nessas inclusões intracelulares. Nos demais tipos celulares, identificados como coanócitos (Fig. 5I), lofócitos (Fig. 5J), pinacócitos (Fig. 5K), poliblastos (Fig. 5L) e os tipos celulares não identificados B e F (Fig. 5B e Fig.

5F, respectivamente), não foram visualizadas inclusões intracelulares metacromáticas. Esse resultado indica que metade dos tipos celulares encontrados em tecidos de *H. heliophila* apresenta inclusões intracelulares contendo polissacarídeos sulfatados.

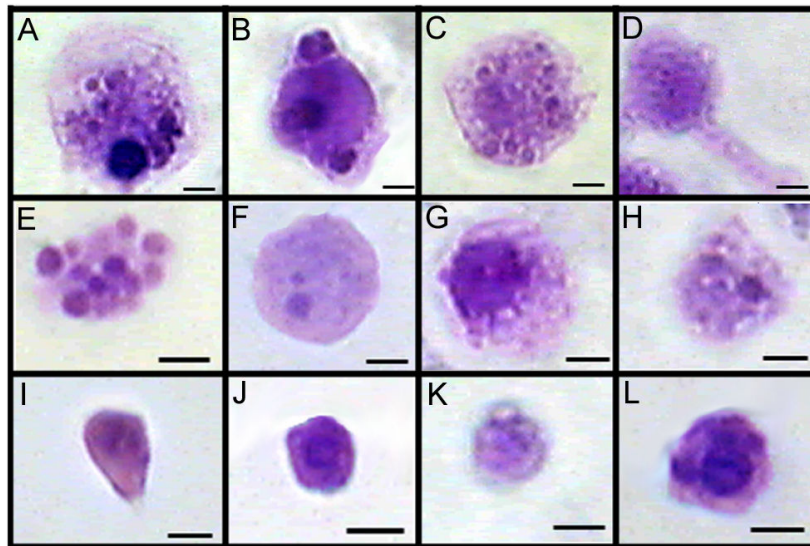


Figura 5. Células de *H. Heliophila* coradas com azul de toluidina. A dissociação celular foi feita com tecidos vivos (fragmentos de 2-3 mm³) incubados em água do mar artificial livre de cálcio e magnésio suplementada com EDTA (CMFSW+E). O sobrenadante contendo as células foi coletado e filtrado em filtro de nylon de 40µm. Após a filtragem as células foram centrifugadas (80 g, 10min). A concentração celular foi ajustada 5×10^5 células ml⁻¹ e fixadas em glutaraldeído 10%. Os citocentrifugados foram feitos utilizando 100 µl do estoque inicial de células, a 80 g por 5 min. As lâminas foram coradas com azul de toluidina 4%, pH 4,4 por 5 min. Todos os tipos celulares apresentaram intensa metacromasia na superfície celular. as células globulares - A, arqueócitos - C, esclerócitos - D, cistencitos - G e os tipos celulares não identificados E e H apresentaram grânulos intracelulares metacromaticos. Barra de escala = 1µm.

Para confirmar a presença de polissacarídeos sulfatados nestes grânulos intracelulares, as células dissociadas de *H. heliophila* foram submetidas à marcação metabólica com ³⁵S-sulfato e subsequente à tripsinização branda, para isolar os componentes pericelulares dos intracelulares. Após 8 hs de incubação com tripsina, as células não apresentaram metacromasia na superfície celular, indicando que os polissacarídeos sulfatados pericelulares foram removidos (dados não mostrados). Os polissacarídeos sulfatados pericelulares e intracelulares, marcados

com ^{35}S -sulfato, foram submetidos à cromatografia de troca iônica, em DEAE celulose (Fig. 6). Os ^{35}S -polissacarídeos dos dois compartimentos celulares foram eluídos com a mesma concentração de NaCl ($\sim 0,6\text{ M}$). O polissacarídeo sulfatado nativo de *H. heliophila* também foi eluído com esta concentração de NaCl ($\sim 0,6\text{M}$, Fig. 6). A integração dos picos indicou que a proporção entre os polissacarídeos sulfatados pericelulares e intracelulares foi de 66% e 34%, respectivamente. Portanto, aproximadamente um terço dos polissacarídeos sulfatados de células de *H. heliophila* encontram-se em compartimentos intracelulares.

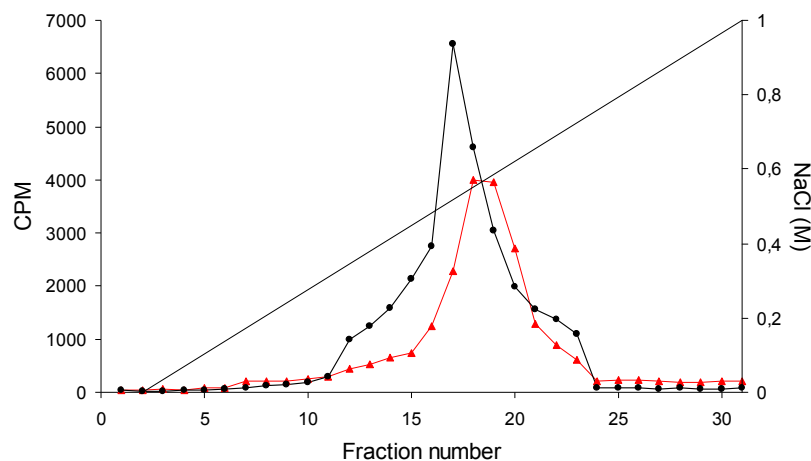


Figura 6. Cromatografia de troca iônica dos ^{35}S -polissacarídeos de células de *H. Heliophila*. Células dissociadas de *H. Heliophila* (8×10^{24} células ml^{-1}) foram incubadas por 24 hs em água do mar artificial suplementada com ^{35}S -sulfato ($100\ \mu\text{Ci}$, SFASW+ ^{35}S). Após a incubação, as células foram lavadas e submetidas à tripsinização branda por 12 hs. As células tripsinizadas foram centrifugadas (10 min, 250 G). O sobrenadante, contendo os ^{35}S -polissacarídeos associados à superfície celular (linhas pretas, ●), e o precipitado, contendo os ^{35}S -polissacarídeos intracelulares (linhas vermelhas, ▲), foram submetidos à digestão com papaína e aplicados a uma coluna de troca iônica (DEAE Celulose). As frações foram checadas através da presença de ^{35}S -polissacarídeos (CPM).

Para quantificar a síntese de polissacarídeos sulfatados durante a formação dos primorfos, as células foram submetidas à marcação metabólica, com ^{35}S -sulfato, durante diferentes etapas da reagregação celular que culminam com a formação do primorfo. As células dissociadas de *H. heliophila* levaram cinco dias para formar os primorfos (Fig. 7). No primeiro dia, as células totalmente dissociadas (Fig. 7A) formaram agregados celulares pequenos (0,1-0,3 mm) interconectados, e pouco

esessos (Fig. 7B). No segundo dia, os agregados apresentaram formas arredondadas e tamanhos heterogêneos (0,2-0,8 mm), sendo possível observar vários agregados interconectados (Fig. 7C). No terceiro dia, os agregados apresentavam tamanhos mais homogêneos e alguns agregados permaneciam interconectados (Fig. 7D). No quarto dia, os agregados ganharam volume e se isolaram uns dos outros (Fig. 7E). No quinto dia, os agregados já apresentavam características morfológicas externas de primorfos, como a superfície regular e lisa, a forma redonda e o tamanho em torno de 1mm (Fig. 7F).

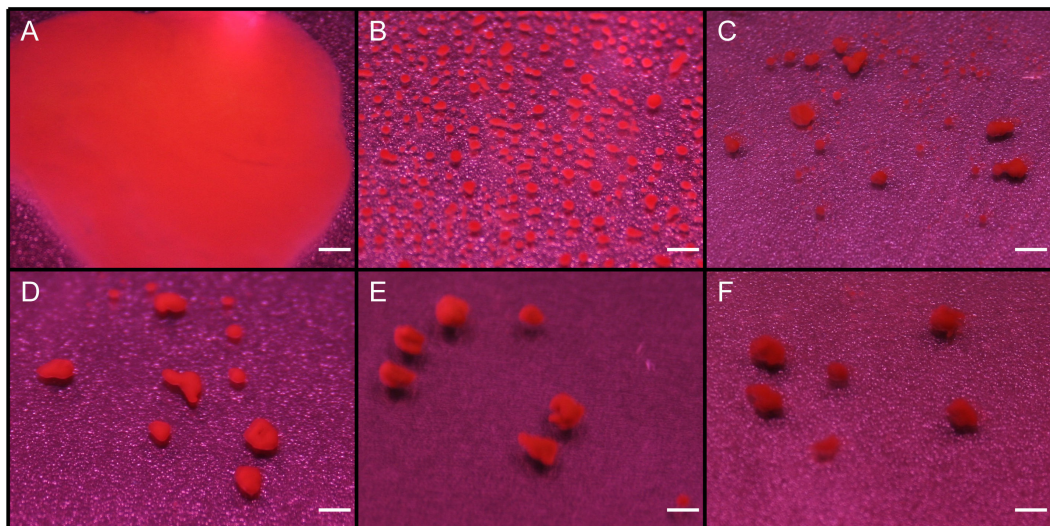


Figura 7. Dinâmica da formação de primorfos por células de *H. heliophila*. As células foram dissociadas utilizando CMFSW+E e filtradas em filtro de nylon (40 μ m). As células foram centrifugadas (80 g, 10 min) e ressuspensas em água do mar filtrada (0,22 μ m) suplementada com antibióticos (kanamicina 100 mg.l⁻¹ e tilosina 8 mg.l⁻¹; FSW). Os agregados foram ressuspensos diariamente e transferidos para novo meio de cultura. A formação dos primorfos levou 5 dias, as culturas foram fotografadas a cada 24 hs: A - 0 hora; B - 24 horas; C - 48 horas; D - 72 horas; E - 96 horas; F - 120 horas. Barra de escala = 1mm.

A síntese do polissacarídeo sulfatado de *H. heliophila* foi decrescente durante a formação dos primorfos (Fig. 8). Ao fim das primeiras 24 hs de cultura as células apresentaram uma alta quantidade do ³⁵S-polissacarídeo, indicando uma alta síntese do polissacarídeo sulfatado durante este período (Fig. 8). Nas 24 hs

seguintes (entre 24-48 hs de cultura), a quantidade de ^{35}S -polissacarídeo caiu praticamente pela metade, indicando que a síntese caiu pela metade no segundo dia de cultura (Fig. 8). No terceiro dia (entre 48-72 hs de cultura), a quantidade de ^{35}S -polissacarídeo sulfatado diminuiu praticamente oito vezes em relação à quantidade encontrada no primeiro dia de cultura, indicando uma queda drástica na síntese do polissacarídeo sulfatado a partir de 48 hs de cultura (Fig. 8). No quarto dia (entre 72-96 hs de cultura), a quantidade do ^{35}S -polissacarídeo sulfatado caiu para um nível muito baixo (Fig. 8). No quinto e sexto dias (entre 96-144 hs de cultura), quando os primorfos já estão formados, a quantidade do ^{35}S -polissacarídeo também foi muito reduzida (Fig. 8). Portanto, a partir de 72 hs de cultura, as células de *H. heliophila* param de sintetizar polissacarídeos sulfatados.

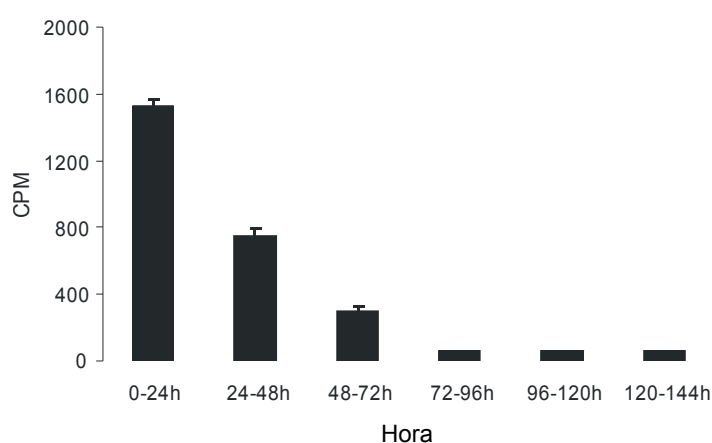


Figura 8. Incorporação de ^{35}S -sulfato durante a formação dos primorfos. Células de *H. heliophila* (10^7 células/ml) foram incubadas por 24 hs em SFASW- ^{35}S em diferentes períodos durante a formação dos primorfos (0-24 horas; 24-48 horas; 48-72 horas; 72-96 horas; 96-120 horas; 120-144 horas). Antes do período de incubação com SFASW+ ^{35}S , as células foram mantidas em FSW. Após a incubação as células (1 mg de cada cultura) e foram lavadas com CMFSW+E, submetidas à digestão com papaína e aplicadas a uma coluna de troca iônica (DEAE Celulose). As frações foram cheçadas através da presença de polissacarídeos ^{35}S sulfatados (CPM). As frações contendo polissacarídeos ^{35}S sulfatados foram integradas para comparação da síntese nos diferentes períodos.

Discussão

No primeiro capítulo dessa tese demonstramos, através de histoquímica e de marcação metabólica com ^{35}S -sulfato, que alguns tipos celulares da esponja *H. heliophila* possuem inclusões intracelulares contendo polissacarídeos sulfatados. Também demonstramos que a síntese de polissacarídeos sulfatados durante as culturas de células de esponjas que culminam com a formação dos primorfos, é decrescente, cessando a partir de 72 hs de cultivo.

A purificação dos polissacarídeos sulfatados presentes nos tecidos de *H. heliophila* resultou na presença de uma única população desses polímeros. Mourão & Zierer (2000) também encontraram uma única população de polissacarídeos sulfatados em *H. heliophila*. Os dois trabalhos mostram um polissacarídeo sulfatado com peso molecular e mobilidade eletroforética semelhantes (MOURÃO & ZIERER, 2000; presente tese). Portanto, a esponja *H. heliophila* possui apenas um tipo de polissacarídeo sulfatado em seus tecidos.

Os doze tipos celulares morfologicamente identificados de *H. heliophila* apresentaram polissacarídeos sulfatados na superfície celular. O reconhecimento e a adesão celular em esponjas é mediada pelos fatores de agregação – AF's (e.g. MISEVIC *ET AL.*, 2004; GUERARDEL *ET AL.*, 2004). Os AF's são moléculas semelhantes a proteoglicanos, compostas por um core protéico ligado à várias unidades de polissacarídeos sulfatados (e.g. FERNÁNDEZ-BUSQUETS & BURGER, 2003). As unidades efetivamente responsáveis pelo reconhecimento e adesão celulares são os polissacarídeos sulfatados, componentes dos AF's (SPILLMANN & BURGER, 1996; BUCIOR & BURGER, 2004). Portanto, a presença de polissacarídeos sulfatados na superfície de todos os tipos celulares de *H. heliophila* indica a presença dos AF's na superfície de todas as células dessa esponja.

Os tipos celulares identificados como células globulares, arqueócitos, esclerócitos, cistêncitos e os tipos celulares não identificados E e H apresentaram grânulos intracelulares, contendo polissacarídeos sulfatados. Células teste de ovos da ascídia *Styella plicata* também possuem granulações intracelulares contendo heparam sulfato (CAVALCANTI *ET AL.*, 1999). Em mamíferos, a heparina também é encontrada em compartimentos intracelulares de mastócitos (FORSBERG *ET AL.*, 1999). Tanto nas células teste de ascídias quanto nos mastócitos de mamíferos as funções fisiológicas desses polissacarídeos sulfatados intracelulares ainda não foram totalmente elucidadas. A única função dos polissacarídeos sulfatados de esponjas descrita na literatura é o reconhecimento e adesão celular (*e.g.* FERNÁNDEZ-BUSQUETS & BURGER, 2003). Os polissacarídeos sulfatados sintetizados por *H. heliophila*, localizados na superfície celular (aproximadamente dois terços), são presumidamente componentes dos AF's e participam do reconhecimento e adesão celular. No entanto, a função fisiológica dos polissacarídeos sulfatados acumulados em grânulos intracelulares de células de *H. heliophila*, assim como em ascídias e mamíferos, não foi definida.

Células de esponjas possuem uma alta atividade da telomerase. No entanto, quando as células são dissociadas, a atividade da telomerase decresce drasticamente (KOZIOL *ET AL.*, 1998). Quando as células em cultura reagregam, dando início à formação dos primorfos, a atividade da telomerase passa de negativa para positiva (CUSTÓDIO *ET AL.*, 1998). O mesmo ocorre com a incorporação de BrdU, que praticamente não ocorre nas células isoladas e, após o início da agregação, aumenta continuamente (ZHANG *ET AL.*, 2003; SUM *ET AL.*, 2007). Esses dados sugerem que é necessário o contato célula-célula para que ocorra a proliferação e diferenciação celular, que levam a formação dos primorfos. A síntese de polissacarídeos sulfatados pelas células de *H. heliophila* nas primeiras 24 hs da

reagregação celular foi alta, sugerindo que o contato célula-célula promove o aumento dessa síntese. No entanto, a síntese diminuiu continuamente nos dias seguintes, cessando completamente a partir do terceiro dia. Essa diminuição pode ser explicada através da dinâmica de formação dos primorfos. No primeiro dia as células estão completamente dissociadas, e necessitam de uma maior quantidade de polissacarídeos sulfatados *de novo* para realizarem o reagregação celular inicial. No segundo dia, os agregados de diferentes tamanhos se conectam ativamente para formarem agregados maiores. Portanto, essa etapa necessita de alguma quantidade de polissacarídeos sulfatados *de novo* para realizar a adesão entre os agregados. No terceiro dia, apenas alguns agregados se conectam para formarem agregados maiores. Nessa etapa, a síntese de polissacarídeos sulfatados *de novo* já é oito vezes menor do que no primeiro dia de cultura. A partir do terceiro dia os agregados encontram-se praticamente finalizados e ocorre a reorganização celular que irá originar os primorfos. A partir desse momento, a síntese de polissacarídeos sulfatados cessa. Esse resultado indica que a síntese de polissacarídeos sulfatados só é necessária durante os momentos de maior deslocamento e adesão entre as células e agregados. Diferente da proliferação e diferenciação celular, que aumenta continuamente durante a formação dos primorfos (CUSTÓDIO *ET AL.*, 1998; ZHANG *ET AL.*, 2003; SUM *ET AL.*, 2007), a síntese de polissacarídeos sulfatados decresce continuamente durante a formação dos primorfos.

Os primorfos são as experiências de cultura de células de esponjas com maior sucesso até agora. No entanto, esse método de cultura de células primárias não permite a produção de tecidos em larga escala e muito menos o desenvolvimento de linhagens celulares proliferantes. No presente trabalho foi realizada pela primeira vez a marcação metabólica com isótopo radioativo de polissacarídeos sulfatados de esponjas. Essa técnica é promissora, pois permite

acompanhar a síntese dessas moléculas durante diferentes fases da cultura de células de esponjas. Como os polissacarídeos sulfatados são as moléculas efetivamente responsáveis pelo reconhecimento e adesão celular em esponjas, o estudo da síntese desses polímeros é de extrema importância para o desenvolvimento de novas técnicas de cultivo de células de esponjas.

Capítulo 2

Efeitos da adição de polissacarídeos sulfatados exógenos na agregação celular da esponja marinha

Hymeniacidon heliophila

Introdução

O primeiro modelo de reconhecimento e adesão celular em animais foi realizado com células de esponjas (Porifera) no início do século XX (WILSON, 1907). Nesse modelo foi descrito que células de esponjas dissociadas mecanicamente se reagregam espécie-especificamente, formando pequenos agregados celulares. Posteriormente, observou-se que essa reagregação celular é mediada por moléculas associadas à membrana celular, denominadas como fatores de agregação (Af's) e que esta reagregação é dependente de cátions divalentes, como Ca^{2+} e Mg^{2+} (HUMPHREYS, 1963). Os primeiros trabalhos de isolamento e caracterização dos AF's concluíram que essas moléculas são compostas por proteínas e carboidratos em diferentes proporções (26% a 60% de carboidratos), de acordo com a espécie estudada (MARGOLIASH *ET AL.*, 1965; MULLER *ET AL.*, 1973; MULLER *ET AL.*, 1978; MISEVIC & BURGER, 1986).

Atualmente, sabe-se que os AF's são moléculas semelhantes a proteoglicanos e são responsáveis pela adesão e reconhecimento celular em

esponjas (e.g. FERNÁNDEZ-BUSQUETS & BURGER, 2003). A porção protéica dos AF's é composta por cores protéicos lineares ou circulares, dependendo da espécie estudada (JARCHOW *ET AL.*, 2000). Ligado ao core protéico são encontradas dois tipos de unidades polissacarídicas: o primeiro tipo é de baixo peso molecular, não sulfatado e liga o core protéico a receptores putativos da membrana celular; o segundo tipo é composto por polissacarídeos sulfatados de alto peso molecular que se ligam homofilicamente com polissacarídeos sulfatados das membranas de células adjacentes, promovendo a adesão celular (e.g. BLUMBACH *ET AL.*, 1998; FERNÁNDEZ-BUSQUETS & BURGER, 2003; BUCIOR & BURGER, 2004).

As unidades componentes dos AF's efetivamente responsáveis pelo reconhecimento e adesão celular em esponjas são os polissacarídeos sulfatados (SPILLMANN & BURGER, 1996; BUCIOR & BURGER, 2004). Experimentos utilizando microesferas, recobertas por polissacarídeos sulfatados purificados de esponjas, resultaram na agregação destas microesferas. Também ocorreu agregação entre células vivas de esponjas e microesferas recobertas com seus polissacarídeos sulfatados, confirmando que a agregação mediada pelos polissacarídeos sulfatados também ocorre fisiologicamente. A incubação com o anticorpo anti-polissacarídeo sulfatado da esponja *Microciona prolifera* com células vivas ou microesferas, recobertos de polissacarídeos sulfatados desta espécie, impediu a agregação de ambos, confirmando o papel central dos polissacarídeos sulfatados na agregação celular em esponjas (BUCIOR & BURGER, 2004). A força de ligação entre estes polissacarídeos sulfatados foi determinada através de microscopia de força atômica, variando entre 200 e 300, piconewtons de acordo com a espécie estudada (FERNÁNDEZ-BUSQUETS & BURGER, 2003; BUCIOR & BURGER, 2004).

Uma característica muito importante observada desde os primeiros experimentos de agregação celular em esponjas é a espécie-especificidade. Tanto em experimentos utilizando células vivas, quanto em experimentos utilizando microesferas recobertas com polissacarídeos sulfatados de esponjas, a agregação só ocorre de forma homóloga, ou seja, entre polissacarídeos sulfatados ou células de esponjas da mesma espécie (e.g. POPESCU & MISEVIC, 1997; MISEVIC *ET AL.*, 2004; BUCIOR & BURGER, 2004). Além disso, todas as espécies de esponjas que tiveram seus polissacarídeos sulfatados caracterizados apresentaram polímeros com diferentes estruturas, composição de açúcares e conteúdos de sulfato (e.g. ZIERER & MOURÃO, 2000; GUERERDEL *ET AL.*, 2004; BUCIOR & BURGER, 2004; VILANOVA *ET AL.*, 2007). Outra característica importante da interação entre os polissacarídeos sulfatados de esponjas é a dependência de cátions divalentes, principalmente de cálcio. Na ausência de cálcio ou em concentrações abaixo de 10 mM (concentração fisiológica de cálcio na água do mar) a agregação não ocorre ou diminui drasticamente (e.g. SPILLMANN & BURGER, 1996; BUCIOR & BURGER, 2004).

Na presente tese nós purificamos e caracterizamos parcialmente os polissacarídeos sulfatados das espécies de esponja *Hymeniacidon heliophila*, *Dysidea robusta* e *Aplysina fulva*. Os polissacarídeos sulfatados dessas espécies e a heparina foram utilizados em experimentos de agregação com células da esponja *H. heliophila*. Também foram realizados ensaios de afinidade entre esses polissacarídeos sulfatados e o polissacarídeo sulfatado de *H. heliophila* e a heparina, na presença e ausência de cálcio.

Objetivos

1. Isolar e caracterizar os polissacarídeos sulfatados de *H. heliophila*, *D. robusta* e *A. fulva*;
2. Determinar os efeitos da adição de polissacarídeos sulfatados exógenos e endógenos na agregação celular da esponja *H. heliophila*;
3. Determinar bioquimicamente a interação entre polissacarídeos sulfatados de esponjas, na presença e ausência de cálcio;
4. Determinar bioquimicamente a interação entre polissacarídeos sulfatados de esponjas e heparina, na presença e ausência de cálcio.

Materiais e Métodos

Amostras de esponjas

As esponjas *D. robusta* e *A. fulva* foram coletadas na Praia da Tartaruga, Búzios, Rio de Janeiro, através de mergulho em apnéia. As amostras da esponja *H. heliophila* foram coletadas na Praia Vermelha, Rio de Janeiro através de mergulho autônomo (SCUBA). As amostras coletadas com finalidade de extração de polissacarídeos sulfatados foram automaticamente fixadas em etanol 70%. As amostras de *H. heliophila* coletadas para cultura de células foram transportadas para o laboratório em água do mar e acondicionadas em aquário, a 18° C, para posterior utilização.

Extração dos polissacarídeos sulfatados

As amostras de *H. heliophila*, *D. robusta* e *A. fulva* foram cortadas em pequenos pedaços (1 mm³), lavados em etanol 70%, imersos três vezes em acetona e secos em estufa à 60° C. Os polissacarídeos sulfatados foram extraídos a partir dos tecidos secos (5 g), através de digestão proteolítica extensiva com papaína. Os extratos foram parcialmente purificados através de precipitações com cloreto de cetilpiridina e etanol. Foram obtidos aproximadamente 100 mg (peso seco) de extratos crus de polissacarídeos sulfatados.

Purificação dos polissacarídeos sulfatados

Os extratos crus de polissacarídeos sulfatados de *H. heliophila*, *D. robusta* e *A. fulva* foram submetidos à cromatografia de troca iônica em uma coluna de DEAE celulose (10 ml), equilibrada com 5 mM de acetato de sódio e 10 mM de EDTA, pH 5,0, acoplada a um sistema de FPLC. Os polissacarídeos sulfatados foram eluídos da coluna através de um gradiente linear de 0-3 M de NaCl, com um fluxo de 0,5 ml/min. Frações de 0,5 ml foram coletadas e analisadas através do ensaio de metacromasia, utilizando azul de 1,9-dimetilmetileno (FARNDAL ET AL., 1986), e através da condutividade. As frações contendo polissacarídeos sulfatados foram agrupadas, dializadas contra água destilada e liofilizadas.

Eletroforese em gel de agarose

Os polissacarídeos sulfatados de *H.heliophila*, *D. robusta* e *A. fulva* foram analisados através de eletroforese em gel de agarose. Os polissacarídeos sulfatados (10 µg de cada espécie) foram aplicados em um gel de agarose a 0,5% em tampão acetato de 1,3-diaminopropano 0,05 M (pH 9,0) e submetidos a 110 V por 1 h. Os polissacarídeos sulfatados no gel foram fixados com brometo de *N*-cetil-*N,N,N*-trimetilamonia 0,1%. Após 12h, o gel foi seco e corado com azul de toluidina 0,1% em solução 0,1:5:5 v/v ácido acético:etanol: água.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

A massa molecular dos polissacarídeos sulfatados de *H. heliophila*, *D. robusta* e *A. fulva* foi estimada através de eletroforese em gel de poliacrilamida. Os

polissacarídeos sulfatados (15 µg de cada espécie) foram aplicados em um gel de poliacrilamida a 6%, com 1 mm de espessura, em tampão sódio barbital 0,02 M (pH 8,6). Após a eletroforese (100 V por 30 min), o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% em solução de ácido acético 1% e depois lavado por 4h em solução de ácido acético 1%. Os marcadores de massa molecular utilizados foram o dextram sulfato de baixo peso molecular (8 kDa), condroitim 4-sulfato (40 kDa), condroitim 6-sulfato (60 kDa) e dextram sulfato de alto peso molecular (500 kDa).

Análises químicas

A composição química dos polissacarídeos sulfatados purificados de *H.heliophila*, *D. robusta* e *A. fulva* foi determinada através dos seguintes métodos: a hexose total foi estimada pela reação fenol-H₂SO₄ (DUBOIS *ET AL.*, 1956); o conteúdo de ácido urônico foi estimado pela reação de Ehrlich, utilizando carbazol (DISCHE, 1947); a dosagem de sulfato foi feita após a hidrólise ácida dos polissacarídeos (6,0 M de ácido trifluoracético por 5 h a 100°C), através do método de gelatina de BaCl₂ (SAITO *ET AL.*, 1958); a presença de diferentes açúcares neutros foi estimada através de cromatografia em papel em 3:2:1 v/v n-butanol:piridina:água (48 hs) dos polissacarídeos hidrolisados.

Dissociação celular

Os tecidos de *H.heliophila* foram cortados em pedaços de 2-3 mm³, lavados em água do mar natural e incubados em água do mar artificial livre de cálcio e magnésio suplementada com EDTA (CMFSW+E): 460 mM NaCl, 7 mM Na₂SO₄, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, 2,5 mM EDTA, pH 8,2. As amostras foram incubadas em

CMFSW+E por 30 min em placa agitadora em baixa velocidade. O sobrenadante foi descartado e os fragmentos ressuspensos em nova solução de CMFSW+E, por 45 min, em placa agitadora em baixa velocidade. Após a segunda incubação, o sobrenadante contendo as células foi coletado e filtrado em filtro de nylon de 40 µm. Após a filtração, as células foram centrifugadas (80 g, 10 min) e mantidas em CMFSW+E até a sua utilização.

Culturas de células em meios suplementados com polissacarídeos sulfatados exógenos

Para as culturas de células com meios suplementados com polissacarídeos sulfatados exógenos, as células em suspensão (1×10^5 células ml⁻¹) foram centrifugadas (80 g, 10 min) e ressuspensas em 100 µl de água do mar artificial filtrada (0,22 µm, FSW) suplementada com antibióticos (kanamicina 100 mg l⁻¹ e tilosina 8 mg l⁻¹) e vermelho de fenol (16 mg l⁻¹), e diferentes concentrações de diferentes polissacarídeos sulfatados. O meio de cultura (FSW) foi suplementado com heparina bovina (1,0 mg/ml, 5,0 mg/ml e 10,0 mg/ml), o polissacarídeo sulfatado de *H. heliophila* (0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2,0 mg/ml, 2,5 mg/ml e 3,0 mg/ml), o polissacarídeo sulfatado de *D. robusta* (3,0 mg/ml) e o polissacarídeo sulfatado de *A. fulva* (3,0 mg/ml). O controle negativo (células 100% desagregadas) foi feito com o meio de cultura CMFSW+E e o controle positivo (máxima agregação) foi estabelecido usando o meio de cultura FSW. Todas as culturas, controles e culturas suplementadas com diferentes polissacarídeos sulfatados em diferentes concentrações, foram feitas em triplicata, em placas de cultura de 96 poços. As culturas foram mantidas durante 6 hs a 18° C e depois fotografadas utilizando microscópio Leika DC300. As áreas dos agregados foram calculadas utilizando

software de análise de imagens Leica QWin. As áreas dos agregados foram comparadas através de análise de variância (ANOVA).

Cromatografias de afinidade ao polissacarídeo sulfatado de H. heliophila

A interação entre os polissacarídeos sulfatados das esponjas *H. heliophila*, *D. robusta* e *A. fulva* ou heparina pelo polissacarídeo sulfatado de *H. heliophila* foi determinada através de cromatografia de afinidade, utilizando resina Sepharose 4B. Quatrocentos ml de solução de HCl 1 mM foram adicionados a 2 g da resina Sepharose 4B ativada com CNBr. A mistura foi mantida sob agitação por 15 min. Após esse tempo, o material foi filtrado em funil de placa sinterizada e lavado sucessivamente com a mesma solução (~ 3 vezes o volume inicial). Depois dessa etapa, o gel foi mantido na placa e lavado com 10 ml de tampão de acoplamento (NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,3 com NaCl 0,5 M). O gel obtido após a lavagem foi posto em contato com 20 mg de polissacarídeo sulfatado de *H. heliophila*, diluído em 5 ml de tampão de acoplamento. A mistura foi agitada por 12 hs, e em seguida filtrada. Depois de filtrado, o gel foi misturado com o tampão bloqueador (glicina 0,2 M, pH 8,0) por 2 h, filtrado e lavado com tampão acetato 0,1 M, pH 4,0 com NaCl 0,5 M. O gel resultante foi aplicado a uma coluna de cromatografia e acoplada a um sistema de FPLC. As cromatografias foram realizadas utilizando dois tampões de equilíbrio diferentes: tampão acetato de sódio 5 mM, pH 5,0 com 0,25 M de NaCl, suplementado com 10 mM de EDTA, para determinar as interações na ausência de cálcio; e tampão acetato de sódio 5 mM, pH 5,0, com 0,25 M de NaCl, suplementado com 10 mM de CaCl₂, para determinar as interações na presença de cálcio. Os polissacarídeos sulfatados de *H. heliophila*, *D. robusta* e *A. fulva* e heparina (1 mg por cromatografia) foram aplicados à coluna, equilibrada com os

diferentes tampões, e eluídos através de um “step wise” de NaCl (0,25 M, 0,5 M, 1,0 M, 1,5 M e 2,0 M). Frações de 0,5 ml foram coletadas e analisadas através do ensaio de metacromasia, utilizando azul de 1,9-dimetilmetileno (Farndale *ET AL.*, 1986), e através da condutividade.

Cromatografias de afinidade com a heparina

As cromatografias de afinidade com a heparina foram realizadas usando uma coluna HITRAP-Heparin, acoplada a um sistema de FPLC. As cromatografias foram realizadas utilizando dois tampões de equilíbrio diferentes: tampão acetato de sódio 5 mM, pH 5,0 com 0,25 M de NaCl, suplementado com 10 mM de EDTA, para determinar as interações na ausência de cálcio; e tampão acetato de sódio 5 mM, pH 5,0, com 0,25 M de NaCl, suplementado com 10 mM de CaCl₂, para determinar as interações na presença de cálcio. Os polissacarídeos sulfatados de *H. heliophila*, *D. robusta* e *A. fulva* (1 mg por cromatografia) foram aplicados à coluna, equilibrada com os diferentes tampões, e eluídos através de um gradiente linear de NaCl (0-2 M). Frações de 0,5 ml foram coletadas e analisadas através do ensaio de metacromasia, utilizando azul de 1,9-dimetilmetileno (Farndale *ET AL.*, 1986), e através da condutividade.

Resultados

O fracionamento dos extratos crus dos polissacarídeos sulfatados das esponjas *H. heliophila*, *D. robusta* e *A. fulva* (Fig. 9) resultaram em frações únicas, eluídas com diferentes concentrações de NaCl (Fig. 10). O polissacarídeo sulfatado de *H. heliophila* foi eluído com uma concentração de aproximadamente 0,6 M de NaCl, o de *D. robusta* com uma concentração de aproximadamente 1,4 M de NaCl e o de *A. fulva* com uma concentração de aproximadamente 1,0 M de NaCl (Fig. 10). Esse resultado sugere que cada espécie apresenta uma população única de polissacarídeos sulfatados.

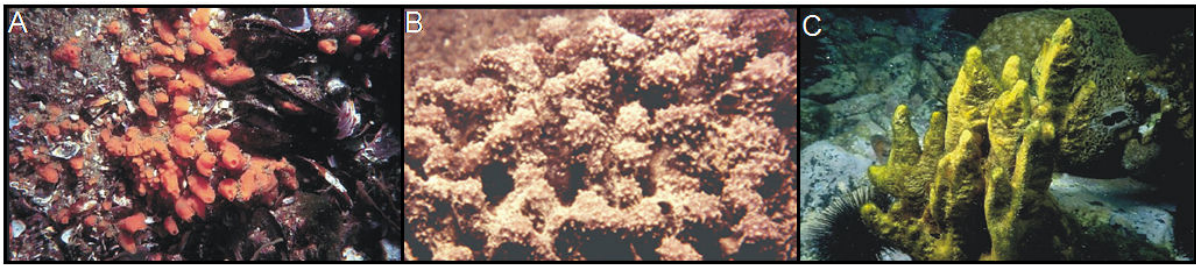


Figura 9. Espécies de esponjas marinhas utilizadas nos experimentos. A - *Hymeniacidon heliophila*, B - *Dysidea robusta* e C - *Aplysina fulva*.

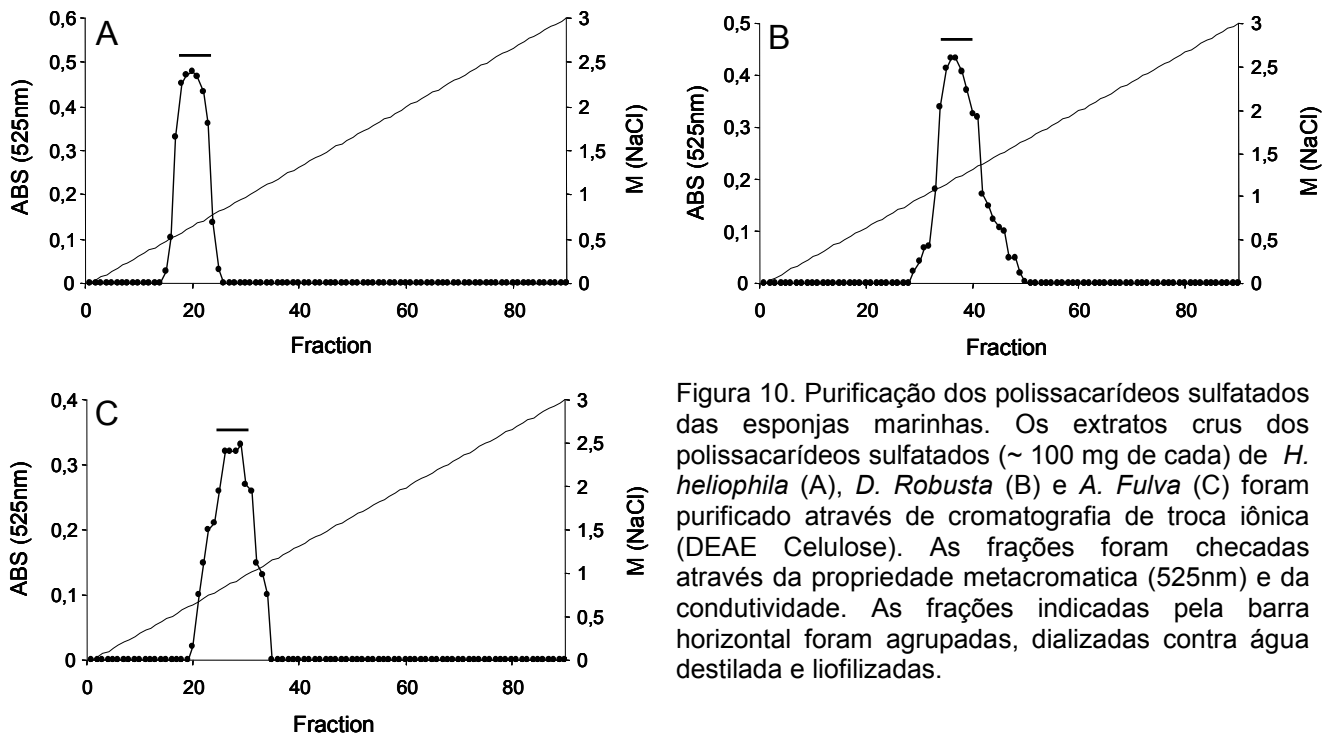


Figura 10. Purificação dos polissacarídeos sulfatados das esponjas marinhas. Os extratos crus dos polissacarídeos sulfatados (~ 100 mg de cada) de *H. heliophila* (A), *D. Robusta* (B) e *A. Fulva* (C) foram purificados através de cromatografia de troca iônica (DEAE Celulose). As frações foram checadas através da propriedade metacromática (525nm) e da condutividade. As frações indicadas pela barra horizontal foram agrupadas, dializadas contra água destilada e liofilizadas.

A análise dos polissacarídeos sulfatados isolados de *H. heliophila*, *D. robusta* e *A. fulva* foram realizadas através de eletroforese em gel de agarose (Fig. 11A). Os polissacarídeos sulfatados purificados das três espécies apresentaram bandas únicas, com diferentes mobilidades eletroforéticas (Fig. 11A). Isto confirmou a presença de populações únicas e puras de polissacarídeos sulfatados em cada uma das espécies. Confirmada a pureza, o polissacarídeo sulfatado de *H. heliophila* será denominado *SPHh*, o de *D. robusta* *SPDr* e o de *A. fulva* *SPAf*. As massas moleculares de *SPHh*, *SPDr* e *SPAf* foram estimadas através de eletroforese em gel de poliácridamida (Fig. 11B). *SPHh* apresentou massa molecular de aproximadamente 40 kDa, *SPDr* massa molecular de aproximadamente 50 kDa e *SPAf* massa molecular de aproximadamente 25 kDa (Fig. 11B).

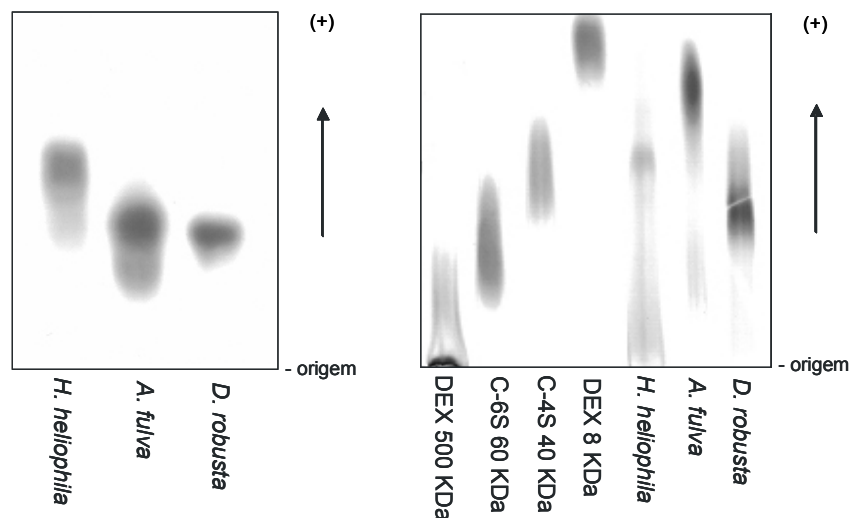


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose e poliácridamida dos polissacarídeos sulfatados de *H. heliophila*, *D. robusta* e *A. fulva*. A – Os polissacarídeos das esponjas (~10 µg) foram aplicados a um gel de agarose a 0,5% em tampão acetato de 1,3-diaminopropano. Os polissacarídeos no gel foram fixados, secos, e corado com azul de toluidina 0,1%. B – Os polissacarídeos das esponjas (~10 µg) foram aplicados em um gel de poliácridamida a 6% em tampão sódio barbital. Após a eletroforese, o gel foi corado com azul de toluidina 0,1%. Os marcadores de massa molecular utilizados foram o dextran sulfato de baixo peso molecular (8 kDa), condroitin 4-sulfato (40 kDa), condroitin 6-sulfato (60 kDa) e dextran sulfato de alto peso molecular (500 kDa).

As análises químicas de *SPHh*, *SPDr* e *SPAf* mostraram que a composição de açúcares, o conteúdo de ácido urônico e a sulfatação são diferentes entre os polissacarídeos sulfatados dessas três espécies (Tab. 1). *SPHh* é composto por galactose, fucose e ácido hexurônico, *SPDr* por arabinose, galactose, fucose e ácido hexurônico e *SPAf* por glicose e ácido hexurônico (Tab. 1). O conteúdo de ácido hexurônico e a sulfatação foram diferentes entre os polissacarídeos sulfatados das três espécies (Tab. 1). Portanto, a composição química dos polissacarídeos sulfatados dessas três espécies de esponjas é espécie-específica.

Tabela 1. Composição química dos polissacarídeos sulfatados de *H. heliophila*, *D. robusta* e *A. fulva*.

Espécie	Composição de açúcares ^a	Ácido hexurônico ^{b,c}	Sulfato/hexose total ^{b,c}
<i>H. heliophila</i>	Gal, Fuc e HexUA	0,18	1,20
<i>D. robusta</i>	Ara, Gal, Fuc e HexUA	0,25	2,04
<i>A. fulva</i>	Glc e HexUA	0,10	0,70

^a A composição de açúcares foi determinada por cromatografia em papel dos polissacarídeos sulfatados hidrolizados.

^b Razão molar.

^c Hexose total, sulfato total e ácido hexurônico foram dosados pelos métodos fenol-ácido sulfúrico, BaCl₂-gelatina e carbazole respectivamente.

As células de *H. heliophila*, incubadas com o polissacarídeo sulfatado homólogo (*SPHh*, 3 mg/ml) ou com a heparina (10 mg/ml), apresentaram baixa agregação celular (Fig. 12B e 12C, respectivamente). Os agregados incubados com esses polissacarídeos sulfatados foram esparsos, compostos por poucas células e geralmente não apresentaram muitas camadas de células sobrepostas. O oposto ocorreu com as células incubadas com os polissacarídeos sulfatados heterólogos *SPDr* (3 mg/ml) e *SPAf* (3 mg/ml). Nesse caso, os agregados foram compostos por

muitas células, muito concentrados e geralmete tridimensionais (Fig. 12E e 12F, respectivamente). Esses resultados indicam, que o polissacarídeo sulfatado homólogo e a heparina, mas não os polissacarídeos sulfatados heterólogos, são capazes de impedir a agregação celular.

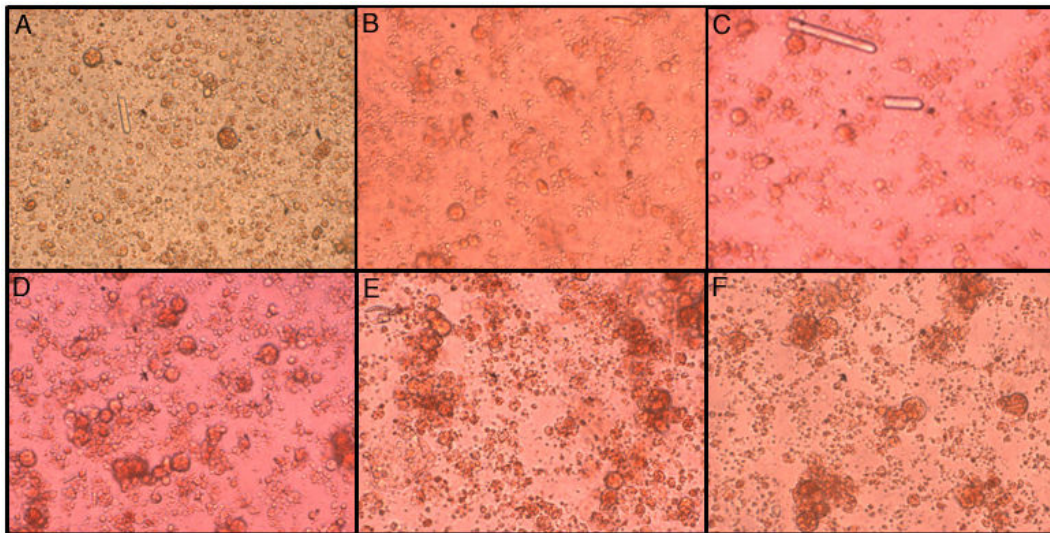


Figura 12. Culturas de células de *H. heliophila* em diferentes meios. As células foram dissociadas em CMFSW+E, filtradas em filtro de nylon de 40 μm e centrifugadas (80 g, 10 min). As células foram ressuspendidas e incubadas em diferentes meios de cultura por 6 hs: A – Células incubadas com CMFSW + E (controle negativo - NC); B - Células incubadas com água do mar filtrada (0,22 μm) com (kanamicina 100 mg l^{-1} e tilosina 8 mg l^{-1}) e vermelho de fenol (16 mg.l^{-1} , FSW) suplementada com 3 mg/ml de SPHh; C - Células incubadas com FSW suplementada com 10 mg/ml de heparina; D - Células incubadas com FSW (controle positivo - PC); E - Células incubadas com FSW suplementada com 3 mg/ml de PSDr; F - Células incubadas com FSW suplementada com 3 mg/ml de PSAf.

A área dos agregados foi calculada para permitir a comparação quantitativa entre a agregação de células incubadas com diferentes polissacarídeos sulfatados exógenos. As áreas dos agregados incubados com 3 mg/ml de SPHh foi significativamente menor do que as áreas dos agregados incubados com a mesma concentração de PSDr e PSAf (Fig. 13). Na verdade, As áreas dos agregados incubados com PSDr e PSAf não apresentaram diferenças significativas em relação

ao controle positivo (PC), onde ocorre a máxima agregação celular (Fig. 13). Este resultado confirma a ineficiência dos polissacarídeos sulfatados heterólogos em impedir a agregação celular, enquanto o polissacarídeo sulfatado homólogo é altamente eficiente.

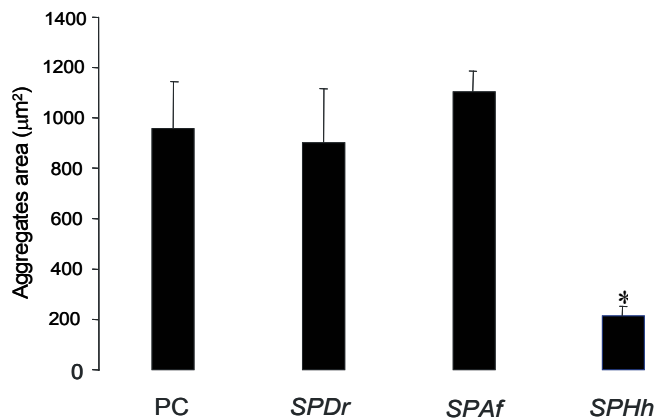


Figura 13. Agregação das células de *H. heliophila* incubadas com polissacarídeos heterólogos de esponjas. Células dissociadas de *H. heliophila* (1×10^5 células ml^{-1}) foram incubadas com FSW (controle positivo - PC) e com FSW suplementado com 3 mg/ml de SPDr, SPAf e SPHh. A cultura incubada com SPHh apresentou agregados com área significativamente menores ($p < 0,05$, *) do que o controle positivo (PC) e as culturas suplementadas com SPDr e SPAf. A área dos agregados nas culturas suplementadas com SPDr e SPAf não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) em relação ao controle positivo (PC). As áreas dos agregados foram comparadas através de ANOVA.

A área dos agregados também variou de acordo com as concentrações de SPHh e heparina adicionados aos meios de cultura de células de *H. heliophila* (Fig. 14). Em concentrações baixas (0,5 mg/ml), o SPHh já é capaz de diminuir a agregação das células de *H. heliophila*. Todas as concentrações de SPHh adicionadas ao meio de cultura (0,5 a 3,0 mg/ml) produziram agregados com áreas significativamente menores do que o controle positivo (Fig. 14A). O mesmo não ocorreu com as culturas incubadas com meio suplementado com heparina. A área dos agregados foi decrescente de acordo com a concentração de heparina adicionada ao meio de cultura (Fig. 14B). Para a heparina foram necessárias

concentrações mais elevadas para se obter a inibição da agregação. Somente as culturas com a concentração mais alta de heparina utilizada (10 mg/ml) produziram agregados com áreas significativamente menores. Esse resultado indica que tanto o polissacarídeo homólogo quanto a heparina são capazes de diminuir a agregação celular, no entanto, o polissacarídeo sulfatado homólogo é mais eficaz.

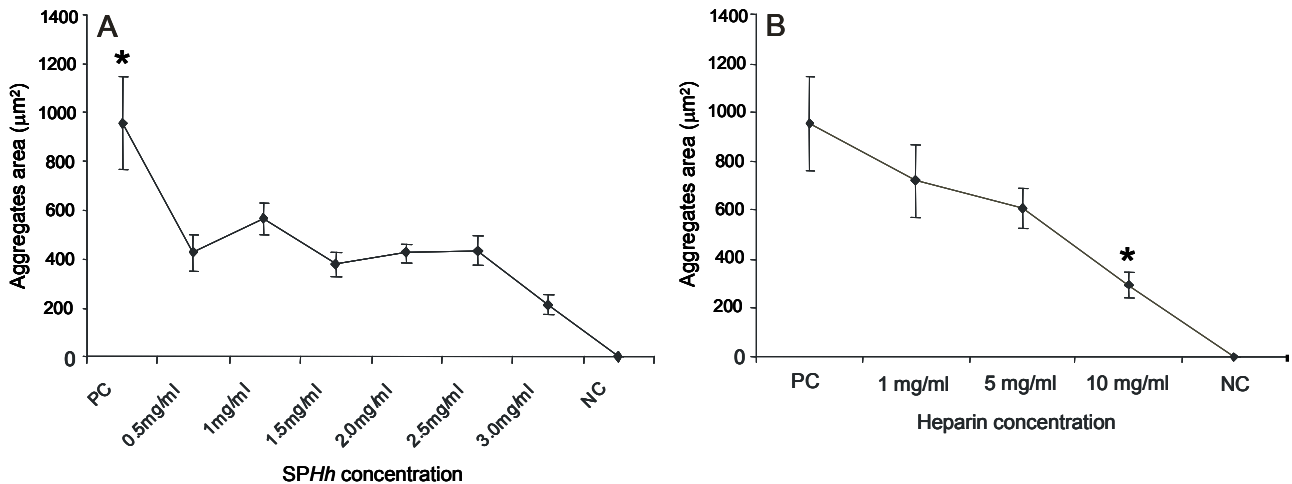


Figura 14. Agregação das células de *H. heliophila* incubadas com diferentes concentrações de SPHh e heparina. A - Células dissociadas de *H. heliophila* (1×10^5 células ml^{-1}) foram incubadas com FSW (controle positivo - PC), FSW suplementado com diferentes concentrações de SPHh e com CMFSW+E (controle negativo - NC). Os agregados incubados em todas as concentrações de SPHh apresentaram áreas significativamente menores ($p < 0,05$, *) do que o controle positivo (PC). B - Células dissociadas de *H. heliophila* (1×10^5 células ml^{-1}) foram incubadas com FSW (controle positivo - PC), FSW suplementado com diferentes concentrações de heparina e com CMFSW+E (controle negativo - NC). Somente os agregados incubados com a maior concentração de heparina apresentaram áreas significativamente menores ($p < 0,05$, *). As áreas dos agregados foram comparadas através de ANOVA.

A interação entre o SPHh e os polissacarídeos sulfatados das espécies de esponjas e heparina foi analisada através de cromatografia de afinidade (Sepharose CL4B acoplada com SPHh; Fig. 15). SPHh foi capaz de interagir com ele mesmo e com a heparina, na presença de cálcio (Fig. 15A e Fig. 15B). O mesmo não aconteceu com SPDr e SPAf, que não foram capazes de interagir com SPHh na

presença de cálcio (Fig. 15C e Fig. 15D). Nenhum desses polissacarídeos sulfatados foram capazes de interagir com *SPHh* na ausência de cálcio (Fig. 15). Esses resultados confirmam a espécie-especificidade e a cálcio dependência da afinidade entre os polissacarídeos sulfatados de esponjas, e também que a heparina possui afinidade por esse polissacarídeo sulfatado.

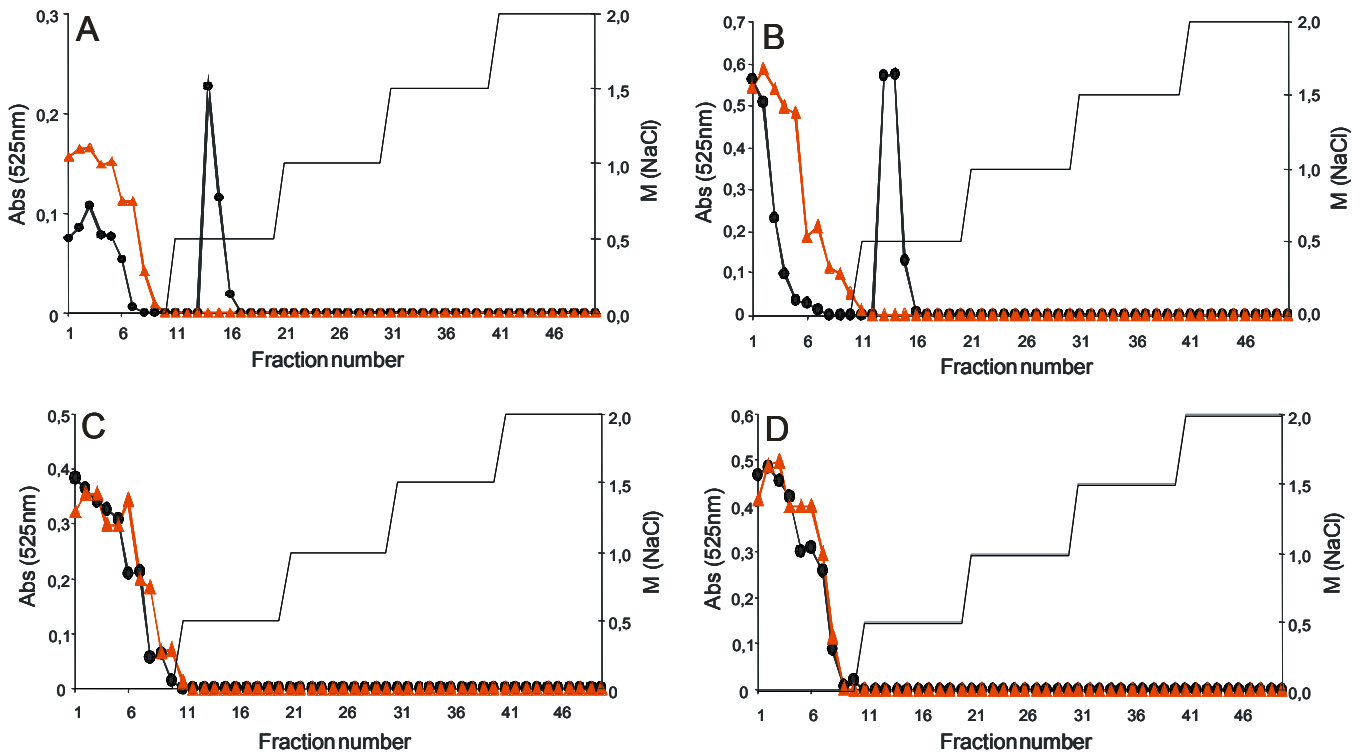


Figura 15. Afinidade de *SPHh* por diferentes polissacarídeos sulfatados. *SpHh* (A), heparina (B), *SPDr* (C) e *SPAf* (D), 1 mg de cada por cromatografia, foram aplicados a uma coluna de cromatografia de afinidade sepharose CL4B acoplada com *SPHh*. Os polissacarídeos sulfatados foram aplicados na coluna equilibrada em tampão acetato de sódio 5 mM, pH 5,0 com 0,25 M de NaCl suplementado com 10 mM de EDTA (linhas vermelhas, ▲) e em tampão acetato de sódio 5 mM, pH 5,0, com 0,25 M de NaCl suplementado com 10 mM de CaCl_2 (linhas pretas, ●). Os polissacarídeos sulfatados foram eluídos em ambos os tampões através de um “step wise” de NaCl (0 M, 0,5M, 1,0M, 1,5M e 2,0M).

A interação da heparina por polissacarídeos sulfatados de esponjas também foi analisada através de cromatografia de afinidade (Hitrap Heparin). *SPHh* (Fig. 16A), *SPDr* (Fig. 16B) e *SPAf* (Fig. 16C) apresentaram interação com heparina na presença de cálcio. Nenhum desses polissacarídeos sulfatados interagiu com heparina na ausência de cálcio. Esse resultado indica que a heparina apresenta uma

interação com os polissacarídeos sulfatados dessas espécies de esponjas, mas sem nenhuma evidência de espécie-especificidade, e essa interação é cálcio dependente.

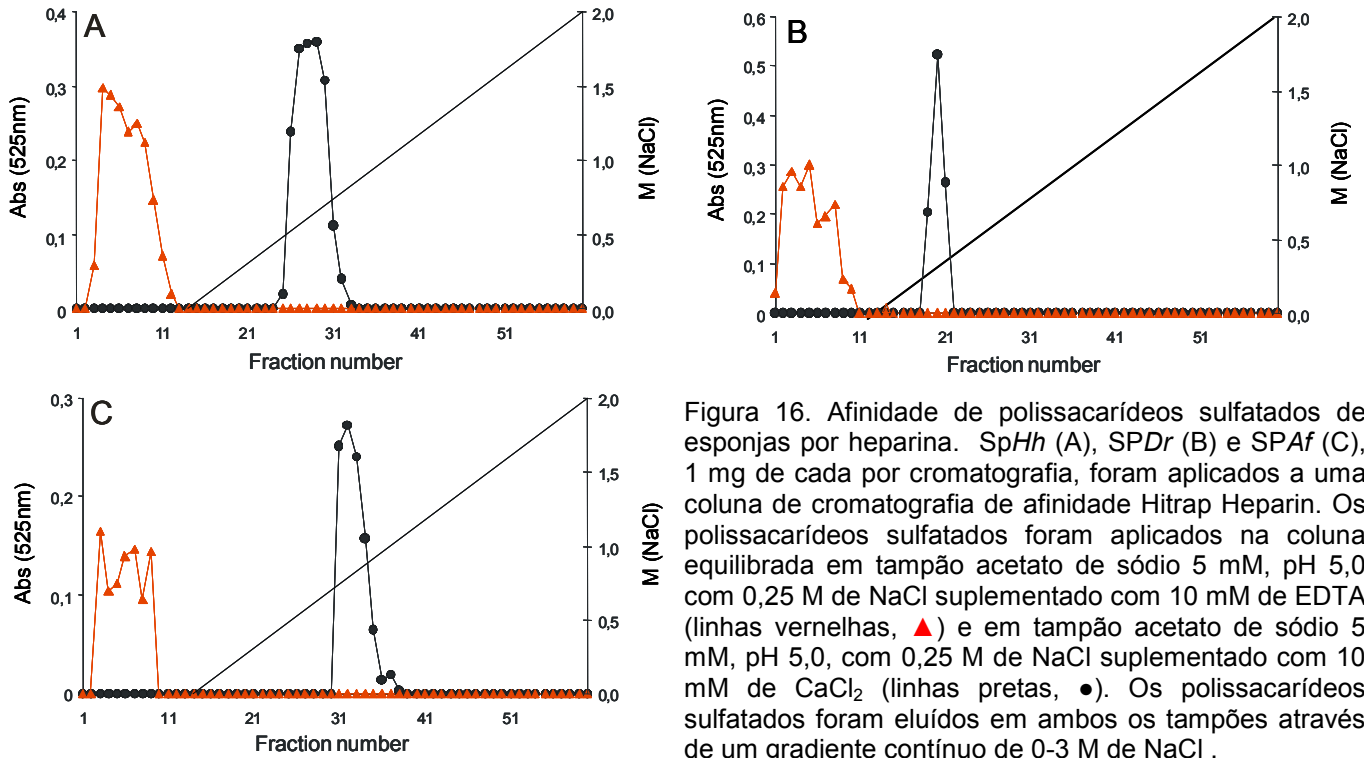


Figura 16. Afinidade de polissacarídeos sulfatados de esponjas por heparina. *SpHh* (A), *SPDr* (B) e *SPAf* (C), 1 mg de cada por cromatografia, foram aplicados a uma coluna de cromatografia de afinidade Hitrap Heparin. Os polissacarídeos sulfatados foram aplicados na coluna equilibrada em tampão acetato de sódio 5 mM, pH 5,0 com 0,25 M de NaCl suplementado com 10 mM de EDTA (linhas vermelhas, ▲) e em tampão acetato de sódio 5 mM, pH 5,0, com 0,25 M de NaCl suplementado com 10 mM de CaCl₂ (linhas pretas, ●). Os polissacarídeos sulfatados foram eluídos em ambos os tampões através de um gradiente contínuo de 0-3 M de NaCl .

Discussão

No segundo capítulo dessa tese foram estudados os polissacarídeos sulfatados, componentes do fator de agregação (AF's), das esponjas marinhas *H. heliophila*, *D. robusta* e *A. fulva*. Esses polissacarídeos sulfatados, juntamente com o glicosaminoglicano heparina, foram utilizados em ensaios de agregação celular com as células da esponja *H. heliophila*. Também foi analisada a interação, mediada por cálcio, entre esses polissacarídeos sulfatados.

As esponjas *H. heliophila*, *D. robusta* e *A. fulva* apresentam populações distintas de polissacarídeos sulfatados. Zierer & Mourão (2000) também isolaram os polissacarídeos sulfatados dessas espécies, e obtiveram resultados semelhantes. Todos os trabalhos de isolamento de polissacarídeos sulfatados realizados com esponjas resultaram em apenas uma população de polissacarídeos por espécie (e.g. PARRISH ET AL., 1991; ZIERER & MOURÃO, 2000; CIMINO ET AL., 2001; GUERERDEL ET AL., 2004; BUCIOR & BURGER, 2004; VILANOVA ET AL., 2007). A composição monossacarídica, a quantidade de ácido hexurônico e a sulfatação de SPHh, SPDr e SPAf foram similares às encontradas por Zierer & Mourão (2000) e diferem da composição química de todos os outros polissacarídeos sulfatados descritos para outras espécies de esponjas (VILANOVA ET AL., 2007).

Somente os polissacarídeos sulfatados homólogos de esponjas interagem entre si, ou seja, possuem a capacidade de se ligar homofilicamente (interação espécie-específica), tanto em sistemas *in vivo* quanto em sistemas biomiméticos (e.g. PARRISH ET AL., 1987; POPESCU & MISEVIC, 1997; MISEVIC ET AL., 2004; BUCIOR & BURGER, 2004). Essa espécie-especificidade da ligação entre os polissacarídeos sulfatados de esponjas deve-se às diferenças na polivalência, composição, arquitetura e arranjo tridimensional dos polímeros (BUCIOR &

BURGER, 2004). Células de *H. heliophila* incubadas com SPHh (polissacarídeo sulfatado homólogo), formam agregados celulares significativamente menores em comparação com o controle, mesmo em baixas concentrações, enquanto SPDr e o SPAf (polissacarídeos sulfatados heterólogos) não apresentam capacidade de impedir a agregação dessas células, mesmo em altas concentrações. O polissacarídeo sulfatado homólogo da esponjas *Ophlitaspongia tenius* também foi capaz de diminuir a agregação das células dessa espécie (PARRISH ET AL., 1987). A capacidade dos polissacarídeos sulfatados homólogos de esponjas, e a incapacidade dos polissacarídeos heterólogos de impedir a agregação celular é explicada pela espécie-especificidade da ligação homofílica entre esses polímeros. O polissacarídeo sulfatado homólogo, livre no meio de cultura, se liga ao polissacarídeo sulfatado componente dos AF's na superfície celular, diminuindo o número de sítios de ligação entre as células e dessa forma inibindo competitivamente a agregação celular. Em contraste, os polissacarídeos sulfatados heterólogos não se ligam ao polissacarídeo sulfatado componente dos AF's na superfície celular, permitindo assim sítios livres para que ocorra a adesão célula-célula.

A heparina também foi capaz de diminuir a agregação das células de *H. heliophila*. No entanto, a heparina só foi efetiva em altas concentrações. Já foi demonstrado que a heparina é capaz de se ligar a superfícies celulares, influenciando na adesão e agregação celular. Por exemplo, a heparina é capaz de se ligar a receptores na superfície celular de adenocarcinomas LM3, aumentando a adesão celular *in vitro* (BERTOLESI ET AL., 2005). Da mesma forma, a heparina é capaz de se ligar a receptores específicos na superfície de plaquetas e monócitos, aumentando a agregação entre essas células (HARDING ET AL., 2003). No entanto, no caso das células de esponjas, é provável que a heparina não se ligue a

receptores, e sim aos polissacarídeos sulfatados componentes dos AF's, inibindo competitivamente a agregação celular da mesma forma que os polissacarídeos sulfatados homólogos.

O *SPHh* apresentou interação com ele mesmo e com a heparina, apenas na presença de cálcio. Já a heparina, apresentou interação com os polissacarídeos sulfatados das três espécies de esponjas na presença de cálcio. A interação de *SPHh* com ele mesmo se deve à afinidade homofílica entre os polissacarídeos sulfatados componentes dos AF's de esponjas (e.g. POPESCU & MISEVIC, 1997; MISEVIC *ET AL.*, 2004; BUCIOR & BURGER, 2004). A heparina é o polissacarídeo sulfatado com maior carga negativa da natureza (NELSON & COX, 2004). É provável que a interação inespecífica da heparina por polissacarídeos sulfatados de esponjas ocorra devido ao seu caráter altamente aniônico. No entanto, mesmo sendo capaz de interagir com os polissacarídeos sulfatados de esponjas, foi necessário uma concentração de heparina três vezes maior do que a de *SPHh* para diminuir significativamente a agregação celular em *H. heliophila*. Essa menor eficiência da heparina provavelmente se deve às diferenças estruturais, visto que, a semelhança estrutural é a peça-chave para que ocorra a ligação homofílica entre os polissacarídeos sulfatados de esponjas (BUCIOR & BURGER, 2004).

Os polissacarídeos sulfatados das esponjas e a heparina não apresentam interação entre si na ausência de cálcio. O cálcio desempenha uma função essencial na ligação entre os polissacarídeos sulfatados de esponjas. A ligação entre esses polissacarídeos é provavelmente mediada pelos sítios aniônicos conferidos pelos ésteres de sulfato e pelos grupamentos carboxilas presentes nos ácidos hexurônicos. Essa ligação entre sítios aniônicos é mediada por cátions divalentes, principalmente o cálcio (SPILLMANN & BURGER, 1996; FERNANDEZ-BUSQUETS & BURGER, 2003). A ausência de interação entre os polissacarídeos sulfatados das

esponjas e a heparina na ausência de cálcio é mais uma evidência que a ligação química entre essas moléculas é semelhante à ligação homofílica entre polissacarídeos sulfatados homólogos de esponjas.

As esponjas são provavelmente um dos primeiros organismos metazoários. Devido a essa ancestralidade, a interação carboidrato-carboidrato mediada por cálcio é um dos primeiros eventos que permitiram a emergência dos organismos pluricelulares. No presente trabalho concluímos que as esponjas possuem populações únicas e espécie-específicas de polissacarídeos sulfatados. Polissacarídeos sulfatados homólogos e a heparina são capazes de impedir a agregação celular de esponjas através da inibição competitiva. A espécie-especificidade e a dependência de cálcio para a ligação homofílica entre polissacarídeos sulfatados de esponjas foi confirmada através de cromatografia de afinidade. A heparina possui interação inespecífica por polissacarídeos sulfatados de esponjas e essa interação também é cálcio dependente. Apesar desses resultados, outros estudos, especialmente visando esclarecer natureza química das ligações entre os polissacarídeos sulfatados de esponjas, devem ser realizados para aumentar a compreensão sobre esse mecanismo ancestral de ligação celular.

Capítulo 3

Determinação de espécies crípticas de esponjas marinhas (Porífera) através de seus polissacarídeos sulfatados

Introdução

A adesão e o reconhecimento celular em esponjas marinhas (Porífera) são mediados por moléculas semelhantes a proteoglicanos, denominadas fatores de agregação (AF's), spongicans ou gliconectinas (e.g. FERNÁNDEZ-BUSQUETS & BURGER, 2003; MISEVIC *ET AL.*, 2004; GUERARDEL *ET AL.*, 2004). Essas moléculas são compostas por um core protéico ligado a várias unidades de polissacarídeos sulfatados (HUMPHREYS *ET AL.*, 1977; JARCHOW *ET AL.*, 2000). Os polissacarídeos sulfatados, componentes dos AF's, são responsáveis pela adesão e reconhecimento célula-célula em esponjas (BUCIOR & BURGER, 2004). A interação entre os polissacarídeos sulfatados de células de esponjas adjacentes é cálcio dependente e altamente espécie-específica (SPILLMANN & BURGER, 1996; BUCIOR & BURGER, 2004; MISEVIC *ET AL.*, 2004).

A interação espécie-específica dos polissacarídeos sulfatados, componentes dos fatores de agregação de esponjas, foi demonstrada pela agregação seletiva e homofílica de microesferas recobertas com polissacarídeos sulfatados de diferentes espécies de esponjas (POPESCU & MISEVIC, 1997; MISEVIC *ET AL.*, 2004). Outra evidência da espécie-especificidade de polissacarídeos sulfatados entre as espécies

de esponjas é a diversidade química e estrutural dessas moléculas (ZIERER & MOURÃO, 2000; GUERARDEL *ET AL.*, 2004). Os polissacarídeos sulfatados de esponjas são altamente complexos, todas as espécies que já foram estudadas apresentaram polímeros com diferentes estruturas, composição de açúcares e conteúdos de sulfato (Tab. 2).

Tabela 2. Diferenças químicas entre os polissacarídeos sulfatados de esponjas marinhas.

Espécie	Polissacarídeos sulfatados	Referência
<i>Aplysina fulva</i>	HexUA, Glc, (sulfatado)	ZIERER & MOURÃO, 2000
<i>Chondrilla nucula</i>	HexUA, Ara, Gal, Fuc, (sulfatado)	ZIERER & MOURÃO, 2000
<i>Cliona celata</i>	Sulfatado HexNac, Ara, Fuc	GUERARDEL <i>ET AL.</i> , 2004
<i>Dysidea robusta</i>	HexUA, Ara, Gal, Fuc 4-O-sulfatado	ZIERER & MOURÃO, 2000
<i>Halicondria panicea</i>	Gal Py(4,6), Fuc, GlcNac N-sulfatado	GUERARDEL <i>ET AL.</i> , 2004
<i>Hymeniacidon heliophila</i>	HexUA, Gal, Fuc, (sulfatado)	ZIERER & MOURÃO, 2000
<i>Microciona prolifera</i>	Gal, Fuc, Gal Py (4,6), GlcNac N-sulfatado	GUERARDEL <i>ET AL.</i> , 2004
<i>Myxilla rosacea</i>	Glc 4,6-disulfatado, Fuc 2,4-dissulfatado	CIMINO <i>ET AL.</i> , 2001
<i>Ophlithaspongia tenius</i>	HexUA, Glc, GlcNac N-sulfatado	PARRISH <i>ET AL.</i> , 1991
<i>Suberites fuscus</i>	HexUA, GlcNac, Fuc, Man, Gal (sulfatado)	BUCIOR & BURGER, 2004

A taxonomia de esponjas é problemática devido ao pequeno número de caracteres morfológicos úteis para discriminar espécies (SOLÉ-CAVA *ET AL.*, 1991; SOLÉ-CAVA, 1994). Devido à ausência de caracteres morfológicos consistentes, muitas espécies de esponjas são consideradas cosmopolitas (SOLÉ-CAVA *ET AL.*, 1991). No entanto, estudos recentes utilizando marcadores moleculares, como seqüências de DNA e isoenzimas, demonstraram que muitas espécies consideradas cosmopolitas tratam-se, na verdade, de complexos de espécies crípticas (e.g. SOLÉ-CAVA & THORPE 1986; BOURY-ESNAULT *ET AL.*, 1992; KLAUTAU *ET AL.*, 1999; MURICY *ET AL.*, 1996; LAZOSKI *ET AL.*, 2001; LOUKACI *ET AL.*, 2004; USHER *ET AL.*, 2004). Espécies crípticas são aquelas impossíveis de se determinar apenas

utilizando caracteres morfológicos (SOLÉ-CAVA & THORPE, 1986). A análise de isoenzimas é um método que possui uma boa resolução para distinguir espécies crípticas de esponjas. No entanto, essa metodologia é prejudicada devido à necessidade de amostras frescas ou congeladas (WÖRHEIDE *ET AL.*, 2004). Além disso, a comparação entre os resultados obtidos com isoenzimas e outros marcadores moleculares atualmente disponíveis (seqüências de DNA) vem apresentando resultados conflituosos (ZILBERBERG *ET AL.*, 2006). Portanto, existe uma grande demanda pelo desenvolvimento de novos marcadores moleculares para a detecção de espécies crípticas de esponjas.

O gênero *Chondrilla* (Demospongiae: Chondrillidae) é um bom modelo para a detecção de espécies crípticas de esponjas, visto que, esse gênero apresenta um grande número de espécies crípticas nos oceanos Atlântico e Pacífico (KLAUTAU *ET AL.*, 1999; USHER *ET AL.*, 2004; ZILBERBERG *ET AL.*, 2006). Usher *ET AL.* (2004) encontrou, através da análise de seqüências de DNA, duas espécies crípticas de *Chondrilla australiensis* na costa oeste da Austrália. Ao longo do Oceano Atlântico existem de seis a oito espécies crípticas de *Chondrilla nucula*, detectadas através das análises por isoenzimas ou de seqüências de DNA (KLAUTAU *ET AL.*, 1999; ZILBERBERG *ET AL.*, 2006).

Baseado na espécie-especificidade dos polissacarídeos sulfatados de esponjas, propomos aqui um novo método bioquímico para distinguir espécies crípticas do gênero *Chondrilla*. Esta distinção foi feita através de eletroforese em gel de agarose dos polissacarídeos sulfatados dessas espécies. A composição química dos polissacarídeos sulfatados das espécies *C. nucula* e *C. australiensis* foi analisada para avaliar as diferenças entre polissacarídeos sulfatados de espécies co-genéricas. Também testamos a eficiência do método para distinguir espécies crípticas do gênero *Chondrilla* do Oceano Atlântico, detectadas através de

isoenzimas. Além disso, também testamos a eficiência do método em analisar espécimes fixados em diferentes meios, como, por exemplo, o formaldeído, um fixador que impossibilita as análises de DNA e isoenzimas.

Objetivos

1. Determinar as diferenças bioquímicas entre os polissacarídeos sulfatados das espécies *C. nucula* e *C. australiensis*;
2. Avaliar se a eletroforese em gel de agarose dos polissacarídeos sulfatados de quatro espécies crípticas do gênero *Chondrilla* apresenta resolução suficiente para distingui-las;
3. Testar a técnica utilizando espécimes de *Chondrilla* sp. fixados em formaldeído 4%, etanol 70%, secos e congelados.

Materiais e Métodos

Amostras de esponjas

Para a análise dos polissacarídeos sulfatados das espécies de *Chondrilla* foram usados dois espécimes de cada uma das cinco espécies testadas. Estas espécies foram: *C. australiensis* (Melbourne, Australia); *C. nucula* (Marseille, França); Duas espécies crípticas, encontradas em simpatria nas Bahamas (Lee Stocking Island), designadas como *Chondrilla* sp. E e *Chondrilla* sp. F (ZILBERBERG ET AL., 2006); e *Chondrilla* sp. B (KLAUTAU ET AL., 1999), um indivíduo de Ubatuba (São Paulo, Brasil) e outro de Búzios (Rio de Janeiro, Brasil). Todos esses espécimes foram fixados em etanol 70%. Para testar a eficiência do método, utilizando espécimes fixados de diferentes formas, quatro espécimes de *Chondrilla* sp. B de Arraial do Cabo (Rio de Janeiro, Brasil) foram coletados e fixados em etanol 70%, formaldeído 4%, seca em estufa, à 60° C, e congelada em freezer - 20° C.

Extração dos polissacarídeos sulfatados

Cada espécime analisado foi cortado em pequenos pedaços (1 mm³), lavado em etanol 70%, imerso três vezes em acetona e seco em estufa à 60° C. Os polissacarídeos sulfatados foram extraídos a partir dos tecidos secos (100 mg de *C. australiensis* e *C. nucula* e 30 mg dos demais espécimes) através de digestão proteolítica extensiva com papaína. Os extratos foram parcialmente purificados através de precipitações com cloreto de cetilpiridina e etanol. Aproximadamente 3

mg (peso seco) de extratos crus de polissacarídeos sulfatados foram obtidos de *C. australiensis* e *C.nucula* e 1 mg dos demais espécimes.

Purificação dos polissacarídeos sulfatados

Os extratos crus de polissacarídeos sulfatados de *C. australiensis* e *C. nucula* (3 mg de cada espécime) foram submetidos à cromatografia de troca iônica em uma coluna de DEAE celulose, equilibrada com 5 mM de acetato de sódio (pH 5,0) suplementado com 10 mM de EDTA, acoplada a um sistema de FPLC. Os polissacarídeos sulfatados foram eluídos da coluna através de um gradiente linear de 0-3 M de NaCl, à um fluxo de 0,5 ml/min. Frações de 0,5 ml foram coletadas e checadas através do ensaio de metacromasia utilizando azul de 1,9-dimetilmetileno (FARNDALE *ET AL.*, 1986), e através da condutividade. As frações contendo polissacarídeos sulfatados foram agrupadas, dializadas contra água destilada e liofilizadas.

Eletroforese em gel de agarose

Os extratos crus e os polissacarídeos sulfatados purificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose. Os polissacarídeos sulfatados (10 µg) foram aplicados a géis de agarose a 0,5% em tampão acetato de 1,3-diaminopropano 0,05 M (pH 9,0) e submetidas a 110 V por 1 h. Os polissacarídeos sulfatados nos géis foram fixados com brometo de *N*-cetil-*N,N,N*-trimetilamonia 0,1%. Após 12h, os géis foram secos e corados com azul de toluidina 0,1%, em solução 0,1:5:5 v/v ácido acético:etanol:água.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

As massas moleculares dos polissacarídeos sulfatados foram estimadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida. Os polissacarídeos sulfatados dos espécimes de *C. australiensis* e *C. nucula* (15 µg) foram aplicados a um gel de poliacrilamida a 6%, com 1 mm de espessura, em tampão sódio barbital 0,02 M (pH 8,6). Após a eletroforese (100 V por 30 min), o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% em solução de ácido acético 1% e depois lavado por 4h em solução de ácido acético 1%. Os marcadores de massa molecular utilizados foram o dextran sulfato de baixo peso molecular (8 kDa), condroitin 4-sulfato de cartilagem de tubarão (40 kDa) e dextran sulfato de alto peso molecular (500 kDa).

Análises químicas

As análises químicas dos polissacarídeos sulfatados de *C. nucula* e *C. australiensis* foram realizadas através dos seguintes métodos: a hexose total foi estimada pela reação fenol-H₂SO₄ (DUBOIS *ET AL.*, 1956); o conteúdo de ácido urônico foi estimado pela reação de Ehrlich utilizando carbazol (DISCHE, 1947); a dosagem de sulfato foi feita após a hidrólise ácida dos polissacarídeos (6,0 M de ácido trifluoracético por 5 h a 100° C), através do método de gelatina de BaCl₂ (SAITO *ET AL.*, 1958); a presença de diferentes açúcares neutros foi estimada através de cromatografia em papel em 3:2:1 v/v *n*-butanol:piridina:água (48 hs) dos polissacarídeos hidrolisados.

Resultados

O fracionamento do polissacarídeo sulfatado de *C. australiensis* resultou em uma fração única, eluída com 0,5 M de NaCl (Fig. 17A). *C. nucula* também apresentou uma única fração, contendo o polissacarídeo sulfatado, no entanto, esta foi eluída com uma concentração de 1 M NaCl (Fig. 17B). Esses resultados sugerem a presença de populações únicas e homogêneas de polissacarídeos sulfatados em ambas as espécies.

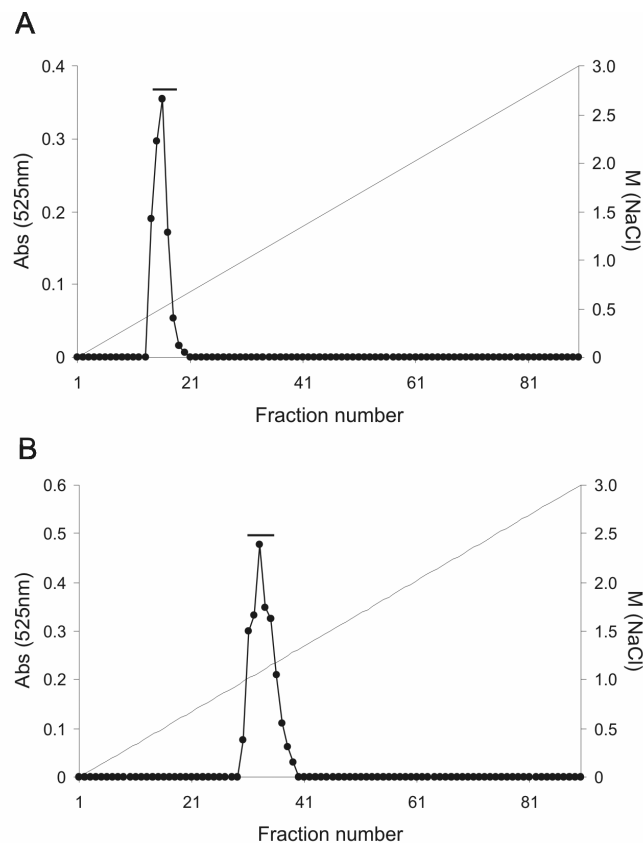


Figura 17. Purificação dos polissacarídeos sulfatados. Os extratos crus dos polissacarídeos sulfatados de *C. australiensis* (A) e *C. nucula* (B, ~3mg de cada) foram purificados através de cromatografia de troca iônica (DEAE Celulose). As frações foram cheçadas através da propriedade metacromática (525 nm) e da condutividade. As frações indicadas pela barra horizontal foram agrupadas, dializadas contra água destilada e liofilizadas.

A presença de uma única população de polissacarídeos sulfatados e a pureza dessas frações foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose. Os polissacarídeos sulfatados dos dois espécimes de *C. australiensis* apresentaram bandas estreitas, com a mesma mobilidade eletroforética. Os polissacarídeos sulfatados dos dois espécimes de *C. nucula* também apresentaram essas mesmas características na eletroforese em gel de agarose. No entanto, a mobilidade eletroforética entre os polissacarídeos sulfatados dessas duas espécies foi diferente (Fig. 18). Isto indica que tanto *C. australiensis* quanto *C. nucula* possuem populações únicas e homogêneas de polissacarídeos sulfatados, e que essas duas espécies possuem polissacarídeos sulfatados quimicamente distintos. A eletroforese em gel de poliacrilamida mostrou que os polissacarídeos sulfatados de *C. australiensis* e *C. nucula* apresentam alto peso molecular (aproximadamente 500 kDa; Fig. 19).

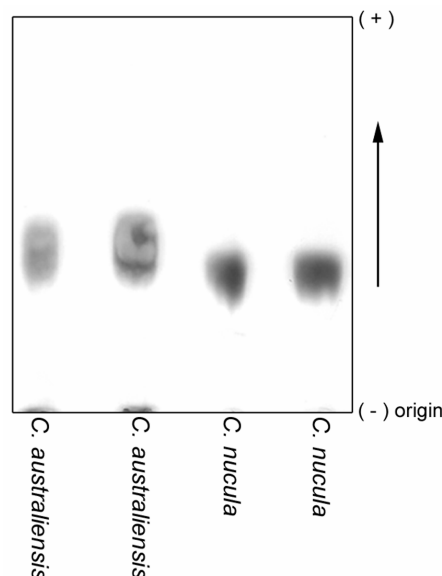


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose dos polissacarídeos sulfatados de *C. nucula* e *C. australiensis*. O polissacarídeo sulfatado purificado das esponjas (~10 µg) foram aplicados a um gel de agarose a 0,5% e correram por 1 h a 110 V em tampão acetato de 1,3-diaminopropano 0,05 M (pH 9,0). Os polissacarídeos sulfatados no gel foram fixados com brometo de *N*-cetil-*N,N,N*-trimetilamônia 0,1%. Após 12 h, o gel foi seco e corado com azul de toluidina 0,1%.

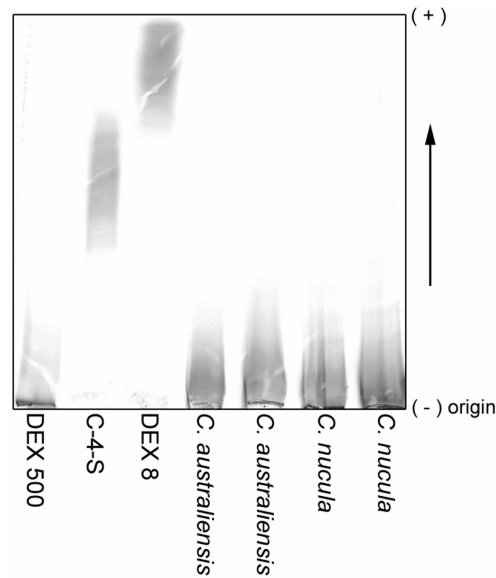


Figura 19. Eletroforese em gel de poliacrilamida dos polissacarídeos sulfatados de *C. nucula* e *C. australiensis*. Os polissacarídeos sulfatados purificados das esponjas (~10 µg) foram aplicado em um gel de poliacrilamida a 6% com 1 mm de espessura em tampão sódio barbital 0,02 M (pH 8,6). Após a eletroforese (100 V por 30 min), o gel foi corado com azul de toluidina 0,1%. Os marcadores de massa molecular utilizados foram o dextran sulfato de baixo peso molecular (8 kDa), condroitin 4-sulfato (40 kDa) e dextran sulfato de alto peso molecular (500 kDa).

As diferenças entre os polissacarídeos sulfatados de *C. australiensis* e *C. nucula* foram avaliadas através das suas composições de açúcares, conteúdo de ácido hexurônico e conteúdo de sulfato. Os polissacarídeos sulfatados de *C. australiensis* e *C. nucula* apresentaram a mesma composição de açúcares e conteúdo de ácido hexurônico (Tab. 3). Entretanto, o conteúdo de sulfato do polissacarídeo sulfatado de *C. nucula* foi cerca de 50% maior do que o de *C. australiensis* (Tab. 3). Portanto, a principal diferença química entre os polissacarídeos sulfatados de *C. australiensis* e *C. nucula* foram os seus conteúdos de sulfato.

Tabela 3. Composição química dos polissacarídeos sulfatados de *C. nucula* e *C. australiensis*.

Espécie	Composição de açúcares ^a	Hexose total ^{b,d}	Sulfato total ^{b,d}	Ácido hexurônico ^{c,d}	Sulfato/hexose total ^c
<i>C. australiensis</i>	Ara, Gal, Fuc e HexUA	2.19	2.16	0.12	0.99
<i>C. nucula</i>	Ara, Gal, Fuc e HexUA	2.44	3.73	0.10	1.53

^a A composição de açúcares foi determinada por cromatografia em papel dos polissacarídeos sulfatados hidrolizados.

^b nMoles/ml.

^c Razão molar.

^d Hexose total, sulfato total e ácido hexurônico foram dosados pelos métodos fenol-ácido sulfúrico, BaCl₂-gelatina e carbazole respectivamente.

Os extratos crus dos polissacarídeos sulfatados de dois espécimes de *C. nucula* da França, dois espécimes de *Chondrilla* sp. B da costa brasileira e dois espécimes de *Chondrilla* sp. E e dois de *Chondrilla* sp. F das Bahamas foram submetidos à eletroforese em gel de agarose. Os polissacarídeos sulfatados dos espécimes pertencentes à mesma espécie apresentaram o mesmo padrão de migração eletroforética (Fig. 20). No entanto, a mobilidade eletroforética dos polissacarídeos sulfatados das diferentes espécies crípticas de *Chondrilla* foi distinta (Fig. 20). Essas diferenças na mobilidade eletroforética demonstraram que a eletroforese em gel de agarose de extratos crus de polissacarídeos sulfatados possui uma boa resolução para distinguir espécies crípticas do gênero *Chondrilla*.

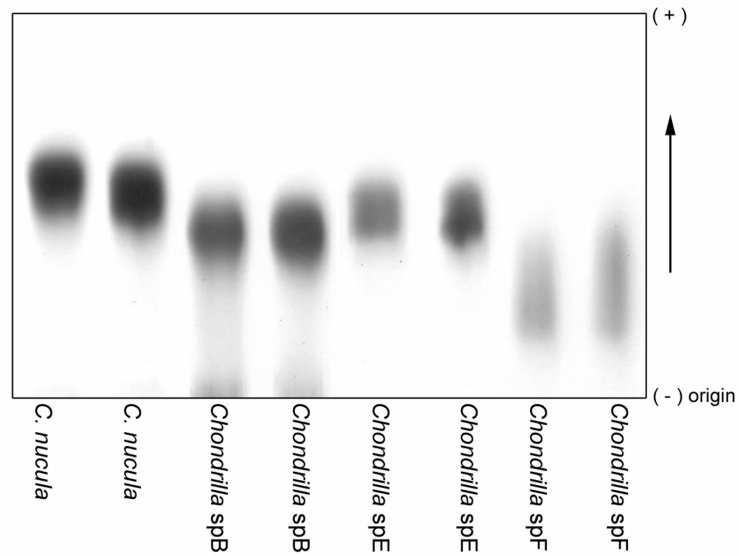


Figura 20. Eletroforese em gel de agarose dos extratos crus de polissacarídeos sulfatados (~15 μ g de cada) de *Chondrilla nucula*, *Chondrilla* sp. B, e duas espécies simpátricas das Bahamas *Chondrilla* sp. E e *Chondrilla* sp. F.

Para avaliar a efetividade do método, para amostras fixadas de diferentes formas, foram extraídos polissacarídeos sulfatados de espécimes de *Chondrilla* sp. B fixados em etanol 70%, formaldeído 4%, congelados a -20° C e secos a 60° C. A mobilidade eletroforética dos polissacarídeos sulfatados foi a mesma, independente do método utilizado para fixar a esponja (Fig. 21)

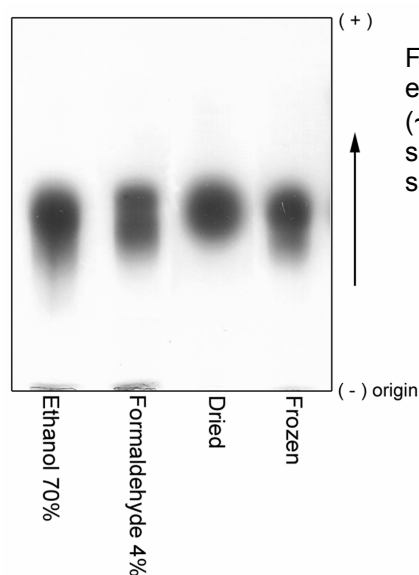


Figura 21. Eletroforese em gel de agarose dos extratos crus de polissacarídeos sulfatados (~15 μ g de cada) de espécimes de *Chondrilla* sp. B fixados em etanol 70%, formaldeído 4%, secas (60° C) e congeladas (-20° C).

Discussão

No terceiro capítulo dessa tese é apresentado um método novo, simples e eficiente para distinguir espécies crípticas do gênero *Chondrilla*. Também foi demonstrado que essa metodologia pode ser empregada com espécimes fixados em formaldeído, um fixador que impossibilita as análises através de isoenzimas e de seqüências de DNA.

Os polissacarídeos sulfatados de *C. australiensis* e *C. nucula* apresentam alto peso molecular (~500 kDa), a mesma composição de açúcares (ácido hexurônico, Ara, Fuc e Gal) e um conteúdo similar de ácido hexurônico (12% e 10% respectivamente). A única diferença química entre os polissacarídeos sulfatados dessas espécies é a razão molar sulfato:açúcar total (1:1 e 1,5:1 respectivamente). Zierer & Mourão (2000) descreveram a caracterização química de *C. nucula* de Arraial do Cabo, Brasil. Essa é uma das espécies crípticas de *C. nucula* do Oceano Atlântico, e foi nomeada temporariamente como *Chondrilla* sp. B. (KLAUTAU ET AL., 1999). O polissacarídeo sulfatado de *Chondrilla* sp. B contém ácido hexurônico, Ara, Fuc e Gal. O ácido hexurônico representa 25% do açúcar total e a razão molar sulfato:açúcar total é de 2,5:1 (ZIERER & MOURÃO, 2000). Portanto, as principais diferenças detectadas entre os polissacarídeos sulfatados de *C. australiensis*, *C. nucula* e *Chondrilla* sp. B estão relacionadas ao conteúdo de sulfato e de ácido hexurônico. Isso confirma a espécie-especificidade da composição de polissacarídeos sulfatados de esponjas, mesmo entre espécies do mesmo gênero.

Diferenças entre polissacarídeos sulfatados de espécies co-genéricas já foram observadas em fucanas sulfatadas, isoladas de ovos de quatro espécies de ouriços-do-mar, pertencentes ao gênero *Strongylocentrotus* (ALVES ET AL., 1998).

As diferenças entre essas fucanas estão somente no padrão de sulfatação e na posição da ligação glicosídica (ALVES *ET AL.*, 1998; VILLELA-SILVA *ET AL.*, 1999; 2001). Essas pequenas diferenças estruturais são suficientes para impedir a fertilização interespecífica entre essas espécies co-genéricas (BIERMANN *ET AL.*, 2004). Os polissacarídeos sulfatados das três espécies de *Chondrilla* também apresentam diferenças nos seus padrões de sulfatação. No entanto, é necessária uma caracterização estrutural mais detalhada desses polissacarídeos sulfatados, incluindo dados sobre a posição das ligações glicosídicas e sítios de sulfatação, para determinar as características desses polímeros nas diferentes espécies de *Chondrilla*.

A mobilidade eletroforética dos polissacarídeos sulfatados em gel de agarose é determinada principalmente pelas suas interações com o tampão 1,3-diaminopropano. Esta interação depende da estrutura e do padrão de sulfatação do polissacarídeo sulfatado (DIETRICH & DIETRICH, 1972; DIETRICH & DIETRICH, 1976). Esta metodologia possui resolução suficiente para separar polissacarídeos sulfatados com pequenas diferenças estruturais. Por exemplo, é possível separar os glicosaminoglicanos dermatam sulfato e condroitim 4-sulfato, que diferem exclusivamente no tipo de ácido hexurônico nas cadeias (ácido glicurônico no condroitim 4-sulfato e ácido idurônico no dermatam sulfato) (DIETRICH & DIETRICH, 1972; DIETRICH & DIETRICH, 1976). Portanto, a eletroforese em gel de agarose, em tampão 1,3-diaminopropano, pode ser utilizada para distinguir polissacarídeos sulfatados com pequenas diferenças estruturais.

Chondrilla nucula já foi considerada uma espécie cosmopolita (BOURY-ESNAULT, 2002). Entretanto, estudos utilizando eletroforese de isoenzimas demonstraram que *C. nucula* é na verdade, um complexo de espécies crípticas

(KLAUTAU *ET AL.*, 1999). Nessa tese, quatro espécies crípticas de *Chondrilla*, detectadas através de isoenzimas pela presença de ao menos um locus diagnóstico (ZILBERBERG *ET AL.*, 2006), foram analisadas através de seus polissacarídeos sulfatados. Essas quatro espécies foram separadas através de seus polissacarídeos sulfatados, incluindo duas espécies crípticas simpátricas (nomeadas *Chondrilla* sp. E e *Chondrilla* sp. F; ZILBERBERG *ET AL.*, 2006). Esse resultado demonstra uma boa resolução da técnica para separar espécies crípticas de *Chondrilla*. Além disso, a análise dos polissacarídeos sulfatados através de eletroforese em gel de agarose apresenta algumas vantagens em relação à análise de isoenzimas e de seqüências de DNA. A eletroforese de isoenzimas requer material fresco ou congelado (WÖRHEIDE *ET AL.*, 2004). Portanto, a análise de seqüências de DNA é vantajosa em relação às isoenzimas, devido à possibilidade de se trabalhar com amostras secas ou fixadas em etanol. No entanto, a análise de seqüências de DNA não é realizável com amostras fixadas em formaldeído. Muitos espécimes depositados em museus utilizam esse tipo de fixador. Outras vantagens da análise de polissacarídeos sulfatados sobre a análise de aloenzimas e de DNA é a velocidade (~5 dias), baixo custo (~2 US\$ por amostra) e a pequena quantidade de amostra necessária (< 30 mg). E, o mais importante, a técnica pode ser realizada utilizando amostras fixadas em formadeído.

A análise de polissacarídeos sulfatados por eletroforese em gel de agarose é uma técnica bioquímica promissora para a detecção de espécies crípticas de esponjas. No entanto, análises adicionais com um número maior de amostras e de espécies crípticas de *Chondrilla* (assim como de outros taxa de esponjas) devem ser realizados para estabelecer a robustez e efetividade geral da técnica.

Conclusões gerais

Nessa tese foram abordados diversos aspectos sobre os polissacarídeos sulfatados de esponjas marinhas. O primeiro capítulo focou a síntese de polissacarídeos sulfatados durante a formação de primorfos e a localização celular desses polissacarídeos. No segundo capítulo foram determinados os efeitos da adição de polissacarídeos exógenos na agregação celular de esponjas, assim como a interação entre estes polissacarídeos. No terceiro capítulo foi analisada a utilização de polissacarídeos sulfatados para distinguir espécies crípticas de esponjas. As principais conclusões relativas a estes aspectos foram:

Capítulo 1:

- A síntese de polissacarídeos sulfatados decresce continuamente durante a formação dos primorfos. Esse decréscimo pode estar relacionado à diminuição da migração e adesão celular durante a formação dos primorfos;
- Alguns tipos celulares da esponja *H. heliophila* acumulam polissacarídeos sulfatados intracelularmente em vacúolos.

Capítulo 2:

- *H. heliophila*, *D. robusta* e *A. fulva* apresentam populações únicas e distintas de polissacarídeos sulfatados;
- O polissacarídeo sulfatado homólogo e a heparina foram capazes de diminuir a agregação das células da esponja *H. heliophila*;
- Polissacarídeos sulfatados heterólogos foram incapazes de impedir a agregação das células da esponja *H. heliophila*;
- Polissacarídeos sulfatados de esponjas apresentam interação espécie-específica na presença de cálcio;
- A heparina apresenta interação inespecífica por polissacarídeos sulfatados de esponjas na presença de cálcio.

Capítulo 3:

- Os polissacarídeos sulfatados espécie-específicos de esponjas apresentam uma boa resolução para distinguir espécies co-genéricas de esponjas;
- Espécies crípticas do gênero *Chondrilla*, determinadas através de isoenzimas e DNA, foram também determinadas através da análise de seus polissacarídeos sulfatados;
- Amostras de esponjas fixadas em etanol 70%, formoldeído 4%, secas ou congeladas foram capazes de fornecer polissacarídeos sulfatados utilizáveis nas análises.

Referências Bibliográficas

- AHO S.; TURAKAINEN H.; ONNELA M.; BOEDTKER H. **Characterization of an intronless collagen gene family in the marine sponge *Microciona prolifera***. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7288-7292. 1993.
- AKIYAMA S. K.; JOHNSON M. D. **Fibronectin in evolution: presence in invertebrates and isolation from *Microciona prolifera***. Comp. Biochem. Physiol. 76: 687-694. 1983.
- ALVES A.P.; MULLOY B.; MOY G.W.; VACQUIER V.D.; MOURÃO P.A.S. **Females of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* differ in the structures of their egg jelly sulfated fucans**. Glycobiology 8: 939-394. 1998.
- AQUINO R.S.; LANDEIRA-FERNANDEZ A.M.; VALENTE A.P.; ANDRADE L.R.; MOURÃO P.A. **Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications**. Glycobiology. 15:11-20. 2005.
- BELARBI E.H.; GOMEZ A.C.; CHISTI Y.; CAMACHO G.F.; GRIMA E.M. **Producing drugs from marine sponges**. Biotechnol. Adv. 21: 585-598. 2003.
- BERTOLESI G.; EIJAN A.M.; CALVO J.C.; LAURIA DE CIDRE L. **Heparin increases the adhesion of murine mammary adenocarcinoma cells (LM3). Correlation with the presence of heparin receptors on cell surface**. J Biol Regul Homeost Agents. 19:33-40. 2005.
- BIERMANN C.H.; MARKS J.A.; VILELA-SILVA A.C.E.S.; CASTRO M.O.; MOURÃO P.A.S **Carbohydrate-based species recognition in sea urchin fertilization: another avenue for speciation?** Evol. Dev. 6: 353-361. 2004.
- BLUMBACH B.; PANCER Z.; DIEHL-SEIFERT B.; STEFFEN R.; MÜNKNER J.; MÜLLER I. **The putative sponge aggregation receptor: isolation and characterization of a molecule composed of scavenger receptor cysteine-rich domains and short consensus repeats**. J. Cell Sci. 111: 2635-2644. 1998.

- BOURY-ESNAULT N.; SOLE-CAVA A.M.; THORPE J.P. **Genetic and cytological divergence between colour morphs of the Mediterranean sponge *Oscarella lobularis* Schmidt (Porifera; Demospongiae; Oscarellidae).** J. Nat. Hist. 26:271-284. 1992.
- BOURY-ESNAULT N. **Order Chondrosida Boury-Esnault & Lopés 1985 Family Chondrillidae Gray 1872.** In: Hooper J.N.A.; van Soest R.W.M. (eds.) *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges.* Kluwer Academic/Plenum Publishers; New York. pp. 291-297. 2002.
- BRETTING H.; KABAT E.A. **Purification and characterization of the agglutinins from the sponge *Axinella polypoides* and a study of their combining sites.** Biochemistry 15: 3228-3236. 1976.
- BROWER D.L.; BROWER S.M.; HAYWARD D.C.; BALL E.E. **Molecular evolution of integrins: genes encoding integrin *b* subunits from a coral and a sponge.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 9182-9187. 1997.
- BUCIOR I.; BURGER M. **Carbohydrate-carbohydrate interaction as a major force initiating cell-cell recognition.** Glycoconjugate J. 21: 111-123. 2004.
- CAREY D.J. **Syndecans: multifunctional cell-surface coreceptors.** Biochem. J. 327: 1-16. 1997.
- CAVALCANTE M.C.M.; MOURÃO P.A.S.; PAVÃO M.S.G. **Isolation and characterization of a highly sulfated heparan sulfate from ascidian test cells.** Biochem. Biophys. Acta. 1428: 77-87. 1999.
- CARALT S.; URIZ M.J.; WIJFFELS R.H. **Cell culture from sponges: pluripotency and immortality.** Trends Biotechnol. 25: 467-471. 2007.
- CIMINO P.; BIFULCO G.; CASAPULLO A.; GÓMEZ-PALOMA L.; RICCIO R. **Isolation and NMR characterization of rosacelose; a novel sulfated polysaccharide from the sponge *Mixylla rosacea*.** Carbohydr. Res. 334: 39-47. 2001.

- CUSTODIO M.R.; PROKIC I.; STEFFEN R.; KOZIOL C.; BOROJEVIC R.; BRUMMER F.; NICKEL M.; MULLER W.E. **Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: A model system for studies of cell proliferation and cell death.** Mech Ageing Develop 105:45-59. 1998.
- CUSTÓDIO M.R.; HAJDU E.; MURICY G. **Cellular dynamics of in vitro reactions of *Hymeniacidon heliophila* (Demospongiae, Halicondrida).** Mar. Biol. 144: 999-1010. 2004.
- DIETRICH C.P.; DIETRICH S.M.C. **Simple micro method for identification of heparin and other acidic mucopolysaccharides from mammalian tissues.** Anal. Biochem. 46: 209-215.
- DIETRICH C.P.; DIETRICH S.M.C. **Electrophoretical behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers.** Anal. Biochem. 70: 645-657. 1976. 1972.
- DISCHE Z. **A new specific color reaction of hexuronic acids.** J. Biol. Chem. 167: 189-198. 1974.
- DUBOIS M.; GUILLES K.A.; HAMILTON J.K.; REBELS P.A.; SMITH F. **Colorimetric method for determination of sugars and substances.** Anal. Chem. 28: 350-356. 1956.
- EXPOSITO J.; GARRONE R. **Characterization of a fibrillar collagen gene in sponges reveals the early evolutionary appearance of two collagen gene families.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6669-6673. 1990.
- EXPOSITO J.; LE GUELLEC D.; LU Q.; GARRONE R. **Short chain collagens in sponges are encoded by a family of closely related genes.** J. Biol. Chem. 266: 21923-21928. 1991.
- FARNDALE R.W.; BUTTLE D.J.; BARRET A.J. **Improved quantification and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue.** Biochim. Biophys. Acta. 883:173-177. 1986.

- FERNANDEZ-BUSQUETS X.; BURGER M.M. **Circular proteoglycans from sponges: first members of spongican family.** Cell. Mol. Life Sci. 60: 88-112. 2003.
- FORSBERG E.; PEJLER G.; RINGVALL M.; LUNDERIUS C.; TOMASINI-JOHANSSON B.; KUSCHE-GULLBERG M.; ERIKSSON I.; LEDIN J.; HELLMAN L.; KJELLE L. **Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme.** Nature. 400: 773-776. 1999.
- GUERARDEL Y.; CZESZAK X.; SUMANOVSKI L.T.; KARAMANOS Y.; POPESCU O.; STRECKER G.; MISEVIC G.N. **Molecular fingerprinting of carbohydrate structure phenotypes of three porifera proteoglycan-like glyconectins.** J. Biol. Chem. 279: 15591-15603. 2004.
- HAEFNER B. **Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates.** Drug Discovery Today. 8: 536-544. 2003.
- HARDING S.A.; DIN J.N.; SARMA J.; JOSEPHS D.H.; FOX K.A.A.; NEWBY D.E. **Promotion of proinflammatory interactions between platelets and monocytes by unfractionated heparin.** Heart. 92:1635-1638. 2006.
- HASELL J. R.; KIMURA; J. H.; HASCALL V. C. **Proteoglycan core protein families.** Annu. Rev. Biochem. 55: 539-567. 1986.
- HAUSSER H.; KRESSE H. **Decorin endocytosis: structural features of heparin and heparan sulphate oligosaccharides interfering with receptor binding and endocytosis.** Biochem. J. 344: 827-835. 1999.
- HEINEGÅRD D.; SOMMARIN Y. **Proteoglycans: an overview.** Methods Enzymol. 144: 305-319. 1987.
- HENKART P.; HUMPHREYS S.; HUMPHREYS T. **Characterization of sponge aggregation factor: a unique proteoglycan complex.** Biochemistry 12: 3045-3050. 1973.
- HUMBERT-DAVID N.; GARRONE R. **A six-armed; tenascin-like protein extracted from the Porifera *Oscarella tuberculata* (Homosclerophorida).** Eur. J. Biochem. 216: 255-260. 1993.

- HUMPHREYS T. **Chemical dissolution and in vitro reconstruction of sponge cell adhesions. I. Isolation and functional demonstration of the components involved.** Dev. Biol. 8: 27-47. 1963.
- HUMPHREYS S.; HUMPHREYS T.; SANO J. **Organization and polysaccharides of sponge aggregation factor.** J. Supramol. Struct. 7: 339-351. 1977.
- IOZZO R. V. **Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function.** Annu. Rev. Biochem. 67: 609-652. 1998.
- IOZZO R. V.; SAN ANTONIO J. D. **Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena.** J. Clin. Invest. 108: 349-355. 2001.
- ISHIHARA M.; FEDARKO N.S.; CONRAD H.E. **Involvement of phosphatidylinositol and insulin in the coordinate regulation of proteoglycan sulfate metabolism and hepatocyte growth.** J. Biol. Chem. 262: 4708-4716. 1987.
- JARCHOW J.; FRITZ J.; ANSELMETTI D.; CALABRO A.; HASCALL V.C.; GEROSA D. **Supramolecular structure of a new family of circular proteoglycans mediating cell adhesion in sponges.** J. Struct. Biol. 132: 95-105. 2000.
- KAWAGISHI H.; YAMAWAKI M.; ISOBE S.; USUI T.; KIMURA A.; CHIBA S. **Two lectins from the marine sponge *Halichondria okadai*: an N-acetyl-sugar-specific lectin (HOL-I) and an N-acetyllactosamine-specific lectin (HOL-II).** J. Biol. Chem. 269: 1375-1379. 1994.
- KIRCHER H.W. **Gas-liquid chromatography of methylated sugars.** Anal. Chem. 32: 1103-1106. 1960.
- KJELLÉN L.; LINDAHL U. **Proteoglycans: structures and interactions.** Annu. Rev. Biochem. 60: 443-475. 1991.
- KLAUTAU M.; RUSSO C.A.; LAZOSKI C.; BOURY-ESNAULT N.; THORPE J.P.; SOLÉ-CAVA A.M. **Does cosmopolitanism result from overconservative systematics? A case study using the marine sponge *Chondrilla nucula*.** Evolution 53: 1414-1422. 1999.

KLOAREG B. E.; QUATRONO R. S. **Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polyssacharides.** Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 26: 259-315. 1988.

KOZIOL C.; BOROJEVIC R.; STEFFEN R.; MÜLLER W.E. **Sponges (Porifera) model systems to study the shift from immortal to senescent somatic cells: the telomerase activity in somatic cells.** Mech. Ageing Dev. 100: 107-120. 1998.

LABAT-ROBERT J.; ROBERT L.; AUGER C.; LETHIAS C.; GARRONE R. **Fibronectin-like protein in Porifera: its role in cell aggregation.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6261-6265. 1981.

LAZOSKI C.; SOLÉ-CAVA A.M.; BOURY-ESNAULT N.; KLAUTAU M.; RUSSO C.A.M. **Cryptic speciation in a high gene flow scenario in the oviparous marine sponge *Chondrosia reniformis*.** Mar. Biol. 139: 421-429. 2001.

LOUKACI A.; MURICY G.; BROUARD J.P.; GUYOT M.; VACELET J.; BOURY-ESNAULT N. **Chemical divergence between two sibling species of *Oscarella* (Porifera) from the Mediterranean Sea.** Biochem. System. Ecol. 32: 893-899. 2004.

MATHEWS M. B. **Polyanionic proteoglycans.** *in*: Conective tissue: Macromolecular structure and evolution. Kleinzeller, A.; Springer, G. F.; Witmann, H. G. (eds). Springer-Verlag, Berlin, 93-125. 1975.

MARGOLIASH E.; SCHENCK J. R.; HARGIE M. P.; BUROKAS S.; RICHTER; W. R.; BARLOW G. H. **Characterization of specific cell aggregating materials from sponge cells.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 20: 383-388. 1965.

MISEVIC G.N.; BURGER M.M. **Reconstitution of high cell binding affinity of a marine sponge aggregation factor by cross-linking of small low affinity fragments into a large polyvalent polymer.** J. Biol. Chem. 261: 2853-2859. 1986.

MISEVIC G.N.; GUERARDEL Y.; SUMANOVSKI L.T.; SLOMIANNY M.C.; DEMARTY M.; RIPOLL C.; KARAMANOS Y.; MÄES E.; POPESCU O.; STRECKER G. **Molecular recognition between glyconectins as an adhesion self-assembly pathway to multicellularity.** J. Biol. Chem. 279: 15579-15590. 2004.

- MÜLLER W.E.; ZAHN R.K. **Purification and characterization of a species-specific aggregation factor in sponges.** Exp. Cell Res. 80: 95-104. 1973.
- MÜLLER W. E.; MÜLLER I.; PONDELJAK V.; KURELEC B. ZAHN R. K. **Species-specific aggregation factor in sponges: isolation; purification and characterization of the aggregation factor from *Suberites domuncula*.** Differentiation 10: 45-53. 1978.
- MÜLLER W.E.; ZAHN R.K.; ARENDES J.; KURELEC B.; STEFFEN R. MÜLLER I. **Aggregation of sponge cells: Self-aggregation of the circular proteid particle.** Biochim. Biophys. Acta 551: 363-367. 1979.
- MÜLLER W.E.; WIENS M.; BATEL R.; STEFFEN R.; BOROJEVIC R.; CUSTODIO M.R. **Establishment of a primary cell culture from a sponge: Primmorphs from *Suberites domuncula*.** Marine Ecol. Progr. Ser. 178: 205-219. 1999.
- MOSCONA A.A. **Cell aggregation: properties of specific cell-ligands and their role in the formation of multicellular systems.** Dev. Biol. 18: 250-277. 1968.
- MURICY G.; SOLÉ-CAVA A.M.; THORPE J.P.; BOURY-ESNAULT N. **Genetic evidence for the extensive cryptic speciation in the subtidal sponge *Plakina trilopha* (Porifera: Demospongiae: Homoscleromorpha) from the Western Mediterranean.** Mar. Ecol. Progr. Ser. 138: 181-187. 1996.
- NELSON D.; COX. **Lehninger, principles of biochemistry.** W. H. Freeman; New York. 1100pp. 2004.
- OSINGA R.; TRAMPER J.; WIJFFELS R.H. **Cultivation of marine sponges.** Mar. Biotechnol. 1: 509-532. 1999.
- PANCER Z.; KRUSE M.; MÜLLER I.; MÜLLER W. E. **On the origin of Metazoan adhesion receptors: cloning of integrin a subunit from the sponge *Geodia cydonium*.** Mol. Biol. Evol. 14: 391-398. 1997.
- PARRISH C.R.; JAKOBSEN K.B.; COOMBE D.R.; BACIC A. **Isolation and characterization of cell adhesions molecules from the marine sponge *Ophlitaspongia tenius*.** Biochim. Biophys. Acta. 1073: 56-64. 1991.

POMPONI; S.A. **Biology of the Porifera: cell culture.** Can. J. Zool. 84; 167-174. 2006.

POPESCU O.; MISEVIC G.N. **Self-recognition by proteoglycans.** Nature 386: 231-232. 1997.

RASMONT R. **Une technique de culture des éponges d'eau douce en milieu contrôlé.** Ann. Soc. R. Zool. Belg. 91: 147-155. 1961.

RAUCH U.; FENG K.; ZHOU X.H. **Neurocan: a brain chondroitin sulfate proteoglycan.** Cell. Mol. Life Sci. 58: 1842-1856. 2001.

RUOSLAHTI E. **Structure and biology of proteoglycans.** Annu. Rev. Cell Biol. 4: 229-255. 1988.

SAITO H.; YAMAGATA T.; SUZUKI S. **Enzymatic methods for the determination of small quantities of isomeric chondroitin sulfate.** J. Biol. Chem. 243: 1542-1563. 1968.

SIPKEMA D.; VAN WIELINK R.; VAN LAMMEREN A.A.M.; TRAMPER J.; OSINGA R.; WIJFFELS R.H. **Primmorphs from seven marine sponges: Formation and structure.** J Biotechnol 100: 127-139. 2003.

SOLÉ-CAVA A.M. **Evolutionary genetics of marine sponges.** In: van Soest R.W.M.; van Kempen T.M.G.; Braekman J.C. (eds.). Sponges in time and space. Balkema; Rotterdam. pp. 55-63. 1994.

SOLÉ-CAVA A.M.; KLAUTAU M.; BOURY-ESNAULT N.; BOROJEVIC R.; THORPE J.P. **Genetic evidence for cryptic speciation in allopatric populations of two cosmopolitan species of the calcareous sponge genus *Clathrina*.** Mar. Biol. 111:381-186. 1991.

SOLÉ-CAVA A.M.; THORPE J.P. **Genetic differentiation between morphotypes of the marine sponge *Suberites ficus* (Demospongiae: Hadromerida).** Mar. Biol. 93: 247-253. 1986.

- SPILLMANN D.; BURGER M.M. **Carbohydrate-carbohydrate interactions in adhesion.** J. Cell. Biochem. 61: 562-568. 1996.
- STORMS S. D.; ANVEKAR V. M.; ADAMS L. D.; MURRAY B. A. **Heterophilic NCAM-mediated cell adhesion to proteoglycans from chick embryonic brain membranes.** Exp. Cell Res. 223: 385-394. 1996
- SUN L., SONG Y.; QU Y.; YU X.; ZHANG W. **Purification and in vitro cultivation of archaeocytes (stem cells) of the marine sponge *Hymeniacidon perleve* (Demospongiae).** Cell Tissue Res. 328: 223-237. 2007.
- USHER K.M.; SUTTON D.C.; TOZE S.; KUO J.; FROMONT J. **Biogeography and phylogeny of *Chondrilla* species (Demospongiae) in Australia.** Mar. Ecol. Prog. Ser. 270:117-127. 2004.
- VIEIRA R.P.; MULLOY B.; MOURÃO P.A.S. **Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber. Evidence for the presence of 3-O-sulfo-beta-D-glucuronosyl residues.** J. Biol. Chem. 266: 13530-13536. 1991.
- VAN DE VYVER G. **Mise en évidence d'un facteur d'agrégation chez l'éponge d'eau douce *Ephydatia fluviatilis*.** Ann. Embryol. Morphol. 4: 373-381. 1971.
- VILANOVA E.; ZILBERBERG C.; KOCHER M.; CUSTÓDIO M.R.; MOURÃO P.A.S. **A novel biochemical method to distinguish cryptic species of genus *Chondrilla* (Demospongiae: Chondrosida) based on its sulfated polysaccharides.** In: Custódio M.R.; Lôbo-Hajdu G.; Hajdu E.; Muricy G. (eds). Porifera research: biodiversity, innovation and sustainability. Série Livros 28. Museu Nacional, Rio de Janeiro. pp. 653-659. 2007.
- VILELA-SILVA A.C.E.S.; ALVES A.P.; VALENTE A.P.; VACQUIER V.D.; MOURÃO P.A.S. **Structure of the sulfated alpha-1-fucan from the egg jelly coat of the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*: patterns of preferential 2-O and 4-O-sulfation determine sperm cell recognition.** Glycobiology 9: 927-933. 1999.
- VILELA-SILVA A.C.E.S.; CASTRO M.O.; VALENTE A.P.; BIERMANN C.H.; MOURÃO P.A.S. **Sulfated fucans from the egg jellies of the closely related sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis* and *Strongylocentrotus pallidus* ensure species-specific fertilization.** J. Biol. Chem. 277: 379-387. 2002.

WILSON H. V. **On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges.** J. Exp. Zool. 5: 245-258. 1907.

WÖRHEIDE G.; FROMONT J.; SOLÉ-CAVA A.M. **Population genetics and phylogeography of sponges - a workshop synthesis.** Bolletino di Mus. Inst. Biol. Univ. Genova 68: 683-688. 2004.

YAMAGUCHI Y. **Heparan sulfate proteoglycans in the nervous system: their diverse roles in neurogenesis; axon guidance; and synaptogenesis.** Semin. Cell Dev. Biol. 12: 99-106. 2001.

ZHANG X.Y.; CAO X.P.; ZHANG W.; YU X.J.; JIN M.F. **Primmorphs from archaeocytes: dominant cell population of the sponge *Hymeniacidon perleve*: improved cell proliferation and spiculogenesis.** Biotechnol. Bioeng. 84: 583-590. 2003.

ZIERER M.S.; MOURÃO P.A.S. **A wide diversity of sulfated polysaccharides are synthesized by different species of marine sponges.** Carbohydr. Res. 328: 209-216. 2000.

ZILBERBERG C.; SOLÉ-CAVA A.M.; KLAUTAU M. **The extent of asexual reproduction in sponges of the genus *Chondrilla* (Demospongiae: Chondrosida) from the Caribbean and the Brazilian coasts.** J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 336: 221-220. 2006.

Anexo:**Curriculum Vitae**

Nome: Eduardo Prata Vilanova

Nascimento: 07/10/1975

Naturalidade: Rio de Janeiro

➤ **Formação Acadêmica**

- Graduação em Ciências Biológicas – Modalidade Biologia Marinha pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, março de 1997 a junho de 2001.
- Mestrado em Zoologia no Museu Nacional – Universidade Federal do Rio de Janeiro, julho de 2001 a julho de 2003.
- Doutorado em Química Biológica no Instituto de Bioquímica Médica – Universidade Federal do Rio de Janeiro, março de 2004 a julho de 2008.

➤ **Orientação de Estudantes**

1. Michele Cristine Leitão Kochem – Iniciação Científica de julho de 2005 a julho de 2007.

➤ **Comunicação em Congresso**

- 12 comunicações em congressos nacionais
- 4 comunicações em congressos internacionais

➤ **Publicações**

Vilanova, E., Coutinho C., maia g., Mourão P.A.S. (2010) Sulfated polysaccharides from marine sponges: conspicuous distribution among different cell types and involvement on formation of in vitro cell aggregates. *Cell Tissue Res.* 340: 523-531

Vilanova, E., Coutinho C., Mourão P.A.S. (2009) Sulfated polysaccharides from marine sponges (Porifera): An ancestor cell adhesion mechanism based on a carbohydrate-carbohydrate interaction. *Glycobiology* 19: 860-867

Vilanova, E., Zilberberg, C., Kochem, M., Custódio, M.R., Mourão P.A.S. (2008) A novel biochemical method to distinguish cryptic species of genus *Chondrilla* (Demospongiae: Chondrosida) based on its sulfated polysaccharides. *In: Custódio MR, Lôbo-Hajdu G, Hajdu E, Muricy G (eds). Porifera research: biodiversity,*

innovation and sustainability. Série Livros 28. Museu Nacional, Rio de Janeiro. pp. 653-659

Vilanova, E., Mayer, M., Curbelo, P., Silva S. (2004) The Impact of a nuclear power plant discharge on the sponge community of a tropical bay (SE Brazil). *Bollettino dei Musei e degli Istituti Biologici dell'Università di Genova* 68: 647-654

Moraes, F., **Vilanova, E.**, Muricy, G. (2003) Distribuição das esponjas marinhas (Porifera) na Reserva Biológica do Atol das Rocas, NE do Brasil. *Arquivos do Museu Nacional* 61: 13-22

Vilanova, E., Muricy, G. (2001) Taxonomy and distribution of the sponge genus *Dysidea* Johnston, 1842 (Demospongiae, Dendroceratida) in the extractive reserve of Arraial do Cabo, SE Brazil (SW Atlantic). *Boletim do Museu Nacional Serie Zoologia* 453: 1-16

A novel biochemical method to distinguish cryptic species of genus *Chondrilla* (Chondrosida, Demospongiae) based on its sulfated polysaccharides

Eduardo Vilanova⁽¹⁾, Carla Zilberberg⁽²⁾, Michele Kochem⁽³⁾, Marcio R. Custódio⁽³⁾, Paulo A.S. Mourão⁽³⁾

⁽¹⁾ Laboratório de Tecido Conjuntivo – Hospital Universitário Clementino Fraga Filho and Instituto de Bioquímica Médica/UFRJ. Av Brigadeiro Trompowsky s/n, sala 4a01, Rio de Janeiro (RJ), Brasil, CEP 21941-590. evilanova@hucff.ufrj.br

⁽²⁾ Dept. Biologia Celular e Genética – UERJ. Rua São Francisco Xavier 524, PHLC, sala 205, Rio de Janeiro (RJ), Brasil, CEP 20550-013. carlazilber@yahoo.com.br

⁽³⁾ Departamento de Fisiologia – Instituto de Biociências/USP. Rua do Matão n.321, Sala 300, São Paulo (SP), Brasil, CEP 05508-900. mcust@usp.br

Abstract: Sulfated polysaccharides from marine sponges are highly complex molecules with species specific composition. We now propose a novel biochemical method, build on the analysis of the sulfated polysaccharides content, to distinguish cryptic species of the genus *Chondrilla*. The major difference between the sulfated polysaccharides from *Chondrilla australiensis* and *Chondrilla nucula* is their sulfate content, which was enough to give different electrophoretic motilities on agarose gel. Additionally, the sulfated polysaccharides from the cryptic species *C. nucula*, *Chondrilla* sp. B, *Chondrilla* sp. E and *Chondrilla* sp. F also showed distinct electrophoretic motilities on agarose gel. This method allowed the distinction of two sympatric cryptic species of *Chondrilla* (sp. E and sp. F) found through allozymes by the presence of a diagnostic locus. Analysis of the sulfated polysaccharides has advantages over allozymes or DNA since it can be applied to specimens fixed either in ethanol, formaldehyde, frozen or dried.

Keywords: Porifera, marine sponges, molecular systematics, glyconectins

Introduction

The cellular adhesion and recognition of marine sponges (Porifera) is mediated by proteoglycan-like molecules, also called aggregation factors (AF's), spongicans or glyconectins (e.g. Fernández-Busquets and Burger 2003, Misevic *et al.* 2004, Guerardel *et al.* 2004). These proteoglycan-like molecules are composed of a protein core attached to several sulfated polysaccharide units (Humphreys *et al.* 1977, Jarchow *et al.* 2000). The sulfated polysaccharide units of glyconectins are responsible for the cell-cell recognition and adhesion in sponges (Bucior and Burger 2004). The interaction between the sulfated polysaccharides of adjacent sponge cells is calcium dependent and a highly species specific event (Spillmann and Burger 1996, Bucior and Burger 2004, Misevic *et al.* 2004).

The species specific interaction of the sulfated polysaccharides from glyconectins was demonstrated by the selective and homophilic aggregation of beads coated with sulfated polysaccharides from different sponges (Popescu and Misevic 1997, Misevic *et al.* 2004). Another evidence for the species specificity of sulfated polysaccharides from Porifera species is their chemical and structural diversity (Zierer and Mourão 2000, Guerardel *et al.* 2004). These

sulfated polysaccharides are highly complex and all the species previously studied showed polymers with different structures and/or sugar and sulfate content (Table 1).

The taxonomy of sponges is an unsolved problem due to the low numbers of usable morphological characters to discriminate species (Solé-Cava *et al.* 1991, Solé-Cava 1994). Due to the lack of consistent morphological traits, many species of sponges are considered cosmopolitan (Solé-Cava *et al.* 1991). However, recent studies using molecular markers, such as allozymes and DNA sequences, showed that many species considered cosmopolitan were actually complexes of cryptic species (e.g., Solé-Cava and Thorpe 1986, Boury-Esnault *et al.* 1992, Klautau *et al.* 1999, Muricy *et al.* 1996, Lazoski *et al.* 2001, Loukaci *et al.* 2004, Usher *et al.* 2004). Although analysis of allozymes seems to have enough resolution to distinguish cryptic species, the use of this methodology is impounded due to the need of fresh or frozen samples (Wörheide *et al.* 2004). In addition, comparisons among allozymes and other currently available molecular markers in detecting cryptic species of sponges have yield conflicting results (Zilberberg and Solé-Cava in prep). Therefore, there is a great need to find novel markers for the detection of cryptic species of sponges.

Table 1: Chemical differences among the sulfated polysaccharides from marine sponges.

Species	Sulfated polysaccharide	Reference
<i>Aplysina fulva</i>	HexUA, Glu, (sulfated)	Zierer and Mourão 2000
<i>Chondrilla nucula</i>	HexUA, Ara, Gal, Fuc, (sulfated)	Zierer and Mourão 2000
<i>Ciona celata</i>	Sulfated HexNac, Ara, Fuc	Guereñel <i>et al.</i> 2004
<i>Dysidea robusta</i>	HexUA, Ara, Gal, Fuc 4- <i>O</i> -sulfated	Zierer and Mourão 2000
<i>Halicondria panicea</i>	Gal Py(4,6), Fuc, GlcNac <i>N</i> -sulfated	Guereñel <i>et al.</i> 2004
<i>Hymeniacidon heliophila</i>	HexUA, Gal, Fuc, (sulfated)	Zierer and Mourão 2000
<i>Microciona prolifera</i>	Gal, Fuc, Gal Py (4,6), GlcNac <i>N</i> -sulfated	Guereñel <i>et al.</i> 2004
<i>Myxilla rosacea</i>	Glc 4,6-disulfated, Fuc 2,4-disulfated	Cimino <i>et al.</i> 2001
<i>Ophlithaspongia tenuis</i>	HexUA, Glc, GlcNac <i>N</i> -sulfated	Parrish <i>et al.</i> 1991
<i>Suberites fuscus</i>	HexUA, GlcNac, Fuc, Man, Gal (sulfated)	Bucior and Burger 2004

The sponge genus *Chondrilla* (Demospongiae: Chondrillidae) is a good model for the detection of cryptic species due to the large number of cryptic species that have been found along the Atlantic and Pacific Oceans (Klautau *et al.* 1999, Usher *et al.* 2004, Zilberberg *et al.* 2006, Zilberberg and Solé-Cava *in prep*). Usher *et al.* (2004) found, through DNA sequence analyses, two cryptic species of *Chondrilla australiensis* along the western coast of Australia. Similarly, along the Atlantic Ocean there are about six to eight cryptic species of *Chondrilla nucula*, which have been found through allozymes or DNA sequence analyses (Klautau *et al.* 1999, Zilberberg *et al.* 2006, Zilberberg and Solé-Cava *in prep*).

Based on the species specificity of the sulfated polysaccharides from sponges, we propose, here, a novel biochemical method to distinguish cryptic species within the genus *Chondrilla* through agarose gel electrophoresis of its sulfated polysaccharides. The chemical composition of the sulfated polysaccharides from the species *C. nucula* and *C. australiensis* were analyzed to evaluate the differences between sulfated polysaccharides from congeneric species. We also tested the efficiency of this methodology in detecting cryptic species of *Chondrilla* found through allozymes (Klautau *et al.* 1999, Zilberberg *et al.* 2006). Additionally, we tested the ability to analyze specimens fixed in different media, including formaldehyde, a preservative that makes the study of allozymes and DNA sequences unfeasible.

Material and methods

Sponge samples

To analyze the sulfated polysaccharides from cryptic species of *Chondrilla*, two specimens from each of five species were used. These species were: *Chondrilla australiensis* (Melbourne, Australia); *C. nucula* (Marseille, France); two cryptic species found in sympatry in the Bahamas (Lee Stocking Island), named *Chondrilla* sp. E and sp. F (Zilberberg *et al.* 2006); and *Chondrilla* sp. B (Klautau *et al.* 1999), one individual from Ubatuba (São Paulo, Brazil) and another from Búzios (Rio de Janeiro, Brazil). All these specimens were fixed in 70% ethanol. Additionally, to compare the efficiency of this methodology using different fixatives, four specimens of *Chondrilla* sp. B from Arraial do Cabo (Rio de Janeiro,

Brazil) were collected and one was fixed in 70% ethanol, one in 4% formaldehyde, one dried and one was frozen.

Extraction of the sulfated polysaccharides

Each specimen was cut into small pieces (1 mm³), washed with 70% ethanol, immersed three times in acetone and dried at a 60°C oven. Sulfated polysaccharides were extracted from the dried tissues (100 mg from *C. australiensis* and *C. nucula*, and 30 mg from all the other specimens) by extensive papain digestion, and the extracts were partially purified by cetylpyridinium and ethanol precipitations using the same methodology described for other invertebrate tissues (Vieira *et al.* 1991). Approximately 3 mg (dry weight) of crude extract was obtained from *C. australiensis* and *C. nucula* and 1 mg from the other species.

Purification of the sulfated polysaccharides

The crude extracts of sulfated polysaccharides (3 mg of each specimen) were applied to a DEAE cellulose column, equilibrated with 5 mM sodium acetate (pH 5.0) with 10 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid). The polysaccharides were eluted from the column using a linear gradient of 0-3 M NaCl, at a flow rate of 0.5 ml/min. Fractions of 0.5 ml were collected and checked by metachromatic assay using 1,9-dimethylmethylene blue (Farndale *et al.* 1986), and by measuring conductivity. The fractions containing sulfated polysaccharides were pooled, dialyzed against distilled water and lyophilized.

Agarose gel electrophoresis

The crude extracts and purified sulfated polysaccharides were analyzed by agarose gel electrophoresis. The sulfated polysaccharides (15 µg) were applied to a 0.5% agarose gel and run for 1 h at 110 V in a 0.05 M 1,3-diaminopropane-acetate buffer (pH 9.0). The sulfated polysaccharides in the gel were fixed with 0.1% *N*-cetyl-*N,N,N*-trimethylammonium bromide solution. After 12 h, the gel was dried and stained with 0.1% toluidine blue in 0.1:5: 5 acetic acid:ethanol: water.

Polyacrylamide gel electrophoresis

The molecular masses of the sulfated polysaccharides were estimated by polyacrylamide gel electrophoresis. Sulfated polysaccharides (15 µg) were applied to a 6% 1 mm thick polyacrylamide gel slab in 0.02 M sodium barbital (pH 8.6). After electrophoresis (100 V for 30 min), the gel was stained with 0.1% toluidine blue in 1% acetic acid and then washed for about 4 h in 1% acetic acid. The molecular mass markers were the low-molecular-mass dextran sulfate (8 kDa), chondroitin 4-sulfate from shark cartilage (40 kDa) and high-molecular-mass dextran sulfate (500 kDa).

Chemical analysis

Total hexose and uronic acid were estimated by the phenol-H₂SO₄ reaction (Dubois *et al.* 1956) and carbazole reaction (Dische 1947), respectively. After acid hydrolysis of the polysaccharides (6.0 M trifluoroacetic acid for 5 h at 100°C), sulfate was measured by the BaCl₂-gelatin method (Saito *et al.* 1958). The presence of different neutral sugars was estimated by paper chromatography in 3:2:1 *n*-butanol-pyridine-water for 48 h (Kircher 1954).

Results

Fractionation of the sulfated polysaccharides from *C. australiensis* resulted in a single and sharp peak, eluted with 0.5 M NaCl (Fig. 1A). *C. nucula* showed a single sulfated polysaccharide fraction too, but eluted with a higher NaCl concentration of 1M (Fig. 1B). These results indicate the presence of a single and homogeneous population of sulfated polysaccharides in the two species.

The presence of a single population of sulfated polysaccharides and the purity of the fractions were confirmed by agarose gel electrophoresis. The sulfated polysaccharides from two specimens of either *C. australiensis* or *C. nucula* showed narrow bands with similar electrophoretic motility (Fig. 2). However, the electrophoretic motility of the sulfated polysaccharides from *C. australiensis* and *C. nucula* differs significantly (Fig. 2), which indicates that *C. australiensis* and *C. nucula* have distinct sulfated polysaccharides. Polyacrylamide gel electrophoresis showed that sulfated polysaccharides from *C. australiensis* and *C. nucula* have high molecular weights (approximately 500 kDa; Fig. 3).

The differences between the sulfated polysaccharides from *C. australiensis* and *C. nucula* were evaluated by their sugar compositions, as well as, hexuronic acid and sulfate contents. The sulfated polysaccharides from *C. australiensis* and *C. nucula* showed the same sugar composition and similar hexuronic acid content (Table 2). However, the sulfate content of the sulfated polysaccharides from *C. nucula* was approximately 50% higher than that from *C. australiensis* (Table 2). Therefore, the major difference between the sulfated polysaccharides from *C. australiensis* and *C. nucula* is their sulfate content.

The crude extract of sulfated polysaccharides from two specimens of *C. nucula* from France, two specimens of *Chondrilla* sp. B from Brazilian coast and two specimens of *Chondrilla* sp. E and two of *Chondrilla* sp. F from Bahamas were applied to an agarose gel electrophoresis (Fig. 4).

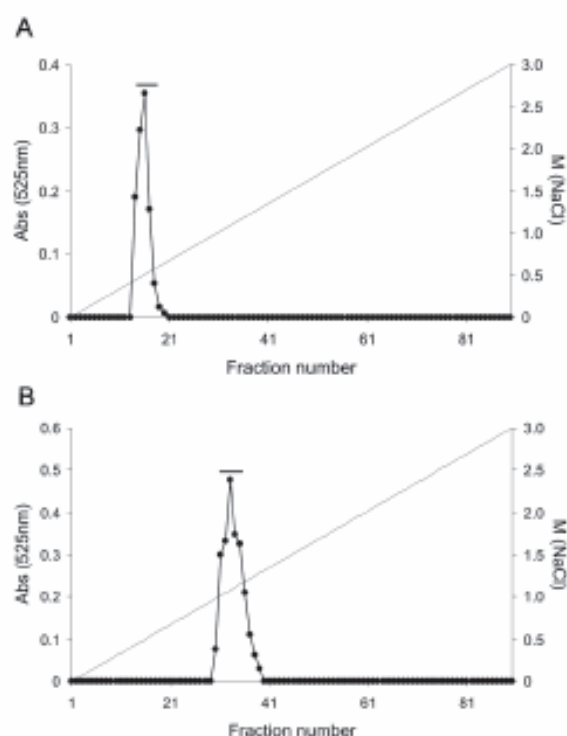


Fig. 1: Purification of the sulfated polysaccharides. The crude extracts of sulfated polysaccharides from *C. australiensis* (A) and *C. nucula* (B) (~3mg each) were purified by ion exchange chromatography (DEAEcellulose-FPLC). The samples were eluted by a linear gradient of 0–3 M NaCl. The fractions were checked by its meta-chromatic property (*) and NaCl concentration (—). The fractions indicated by the horizontal bar corresponding to the purified sponge sulfated polysaccharides.

The sulfated polysaccharides from these cryptic species of *Chondrilla* showed distinct electrophoretic motilities. These differences in the electrophoretic motility show that the agarose gel electrophoresis of crude extract of sulfated polysaccharides has a good resolution to distinguish cryptic species of the genus *Chondrilla*.

In order to evaluate the effectiveness of the method for samples of sponges fixed in different media, we extracted sulfated polysaccharides from specimens of *Chondrilla* sp. B fixed either in 70% ethanol, 4% formaldehyde, frozen at -20°C or dried at 60°C. The electrophoretic motility of the sulfated polysaccharide was the same, independent of the method used to fix the sponge (Fig. 5).

Discussion

In the present study we show a new, simple and efficient method to distinct cryptic species within the genus *Chondrilla*. We also demonstrate that this methodology can be performed with specimens fixed in formaldehyde, a preservative that

4

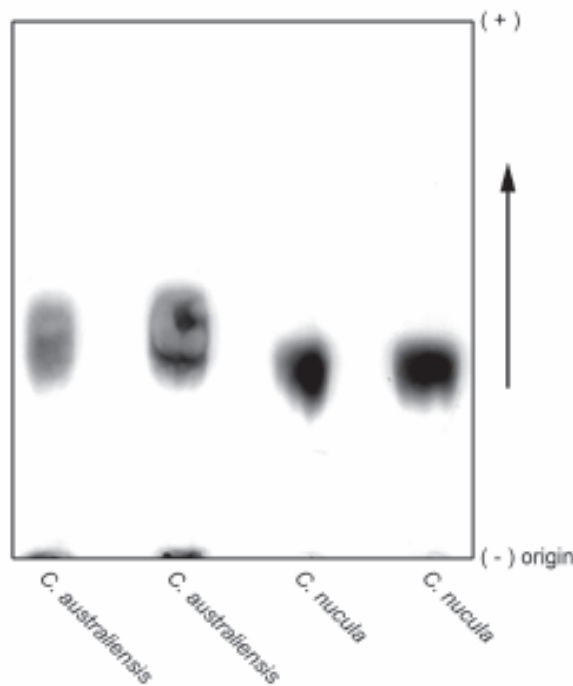


Fig. 2: Agarose gel electrophoresis of the purified sulfated polysaccharides from *C. australiensis* and *C. nucula* (~15 μ g of each).

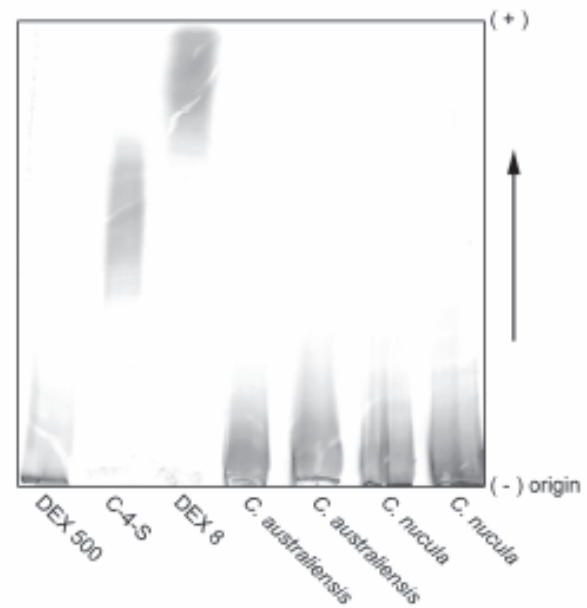


Fig. 3: Polyacrylamide gel electrophoresis of the purified sulfated polysaccharides from *C. australiensis* and *C. nucula* (~15 μ g of each). The molecular mass markers were high-molecular-mass dextran sulfate (DEX500, 500 kDa), chondroitin 4-sulfate from whale cartilage (C-4-S, 40 kDa), and low-molecular-mass dextran sulfate (DEX8, 8 kDa).

Table 2: Chemical composition of the sulfated polysaccharides from *C. nucula* and *C. australiensis*.

Species	Sugar composition*	Total hexose ^{b,d}	Total sulfate ^{b,d}	Hexuronic acid ^{c,d}	Sulfate/ total hexose ^e
<i>C. australiensis</i>	Ara, Gal, Fuc and HexUA	2.19	2.16	0.12	0.99
<i>C. nucula</i>	Ara, Gal, Fuc and HexUA	2.44	3.73	0.10	1.53

* The sugar composition was determined by paper chromatography of hydrolyzed sulfated polysaccharides. ^b μ Moles/ml. ^c Molar ratio. ^d Total hexose, total sulfate and hexuronic acid were measured by phenol-sulfuric acid, BaCl₂-gelatin and carbazole methods, respectively.

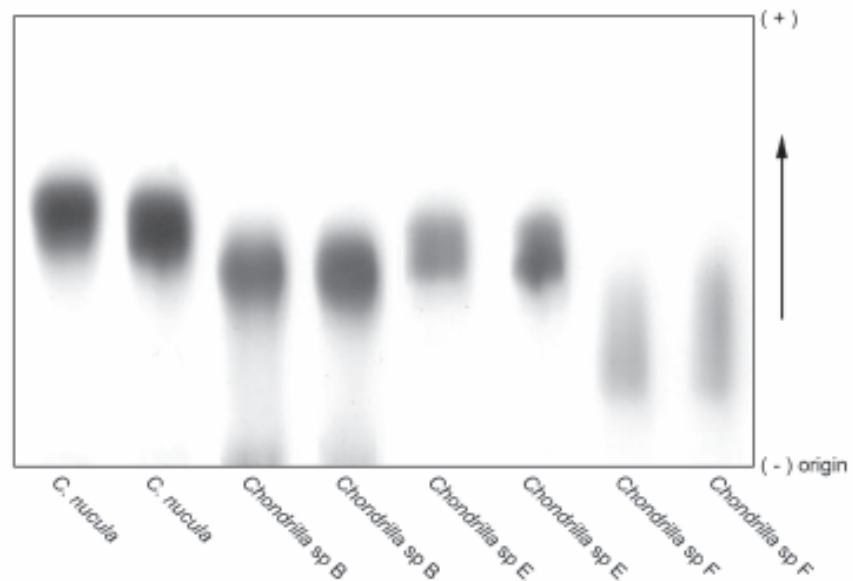
impounds the use of allozymes or even DNA sequencing analyses.

The sulfated polysaccharides from *C. australiensis* and *C. nucula* showed high molecular weight (~500 kDa), the same sugar composition (hexuronic acid, Ara, Fuc and Gal) and similar hexuronic acid content (12% and 10%, respectively). The only chemical difference between the sulfated polysaccharides from these species was the sulfate:total sugar molar ratio (1:1 and 1.5:1, respectively). Zierer and Mourão (2000) reported the chemical characterization of *C. nucula* from Arraial do Cabo, Brazil. This species is actually a cryptic species of *C. nucula* temporarily named *Chondrilla* sp. B (Klautau *et al.* 1999). The sulfated polysaccharide from *Chondrilla* sp. B contains hexuronic acid, Ara, Fuc and Gal, the hexuronic acid accounts for 25% of the total sugar and the sulfate:total sugar molar ratio is 2.5:1 (Zierer and

Mourão 2000). Therefore, the differences detected among the sulfated polysaccharides from *C. australiensis*, *C. nucula* and *Chondrilla* sp. B were mostly related to their sulfate and hexuronic acid content. This confirms the species specificity composition of the sulfated polysaccharides from sponges, even among species of the same genus.

Differences among sulfated polysaccharides from congeneric species have also been observed in the α -L-fucans isolated from the jelly coat of eggs of four sea urchin species within the genus *Strongylocentrotus* (Alves *et al.* 1998). The differences among these fucans are only in the sulfate pattern and the position of the glycosidic bonds (Alves *et al.* 1998, Villela-Silva *et al.* 1999 2001). These structural differences of sulfated polysaccharides are sufficient to avoid interspecific fertilization among these congeneric species (Biermann *et al.* 2004). The sulfated polysaccharides from the three species of

Fig. 4: Agarose gel electrophoresis of the crude extracts of sulfated polysaccharides from *Chondrilla nucula*, *Chondrilla* sp. B, and the two sympatric species *Chondrilla* sp. E and *Chondrilla* sp. F (15 μ g of each).



Chondrilla also showed differences in their sulfation pattern. However, we still need a structural characterization of these sulfated polysaccharides, such as the position of glycosidic bonds and sulfation sites to determine all their differences.

The electrophoretic motility of sulfated polysaccharides in agarose gel is mostly determined by their interaction with 1,3-diaminopropane, which depends on the structure and sulfation pattern of the sulfated polysaccharide (Dietrich and Dietrich 1972, Dietrich and Dietrich 1976). This methodology had enough resolution to separate sulfated polysaccharides with small structural differences. For instance, it can separate the glycosaminoglycans dermatan sulfate and chondroitin-4-sulfate, which differs exclusively on the type of hexuronic acid in the chains (glycuronic acid in chondroitin-4-sulfate and iduronic acid in dermatan sulfate) (Dietrich and Dietrich 1972, Dietrich and Dietrich 1976). Therefore, agarose gel electrophoresis in 1,3-diaminopropane buffer can be used to distinguish sulfated polysaccharides with small structural differences.

Chondrilla nucula was once considered a cosmopolitan species (Boury-Esnault 2002). However, a study using allozymes electrophoresis showed that *C. nucula* was in fact a complex of cryptic species (Klautau *et al.* 1999). In the present study, four cryptic species of *Chondrilla* detected through allozymes by the presence of at least one diagnostic locus (Zilberberg *et al.* 2006, Zilberberg and Solé-Cava in prep) were analyzed through their sulfated polysaccharides. The four species were separated by their sulfated polysaccharides, including the two sympatric Bahamian cryptic species (named sp. E and sp. F; Zilberberg *et al.* 2006). This result demonstrates the good resolution of the technique to separate cryptic species of *Chondrilla*. Additionally sulfated polysaccharides analyses by agarose gel electrophoresis showed some advantages in relation to allozymes or DNA analyses. Allozyme electrophoresis techniques require fresh or frozen samples (Wörheide *et al.* 2004). Therefore, DNA

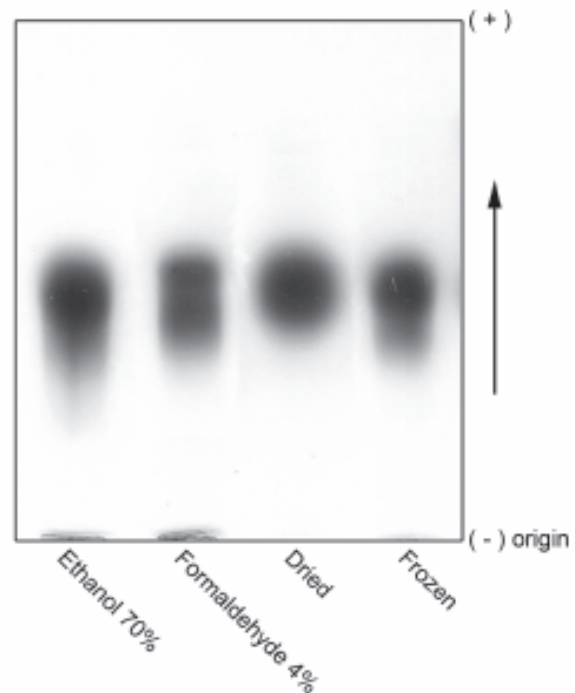


Fig. 5: Agarose gel electrophoresis of the crude extracts of sulfated polysaccharides from specimens of *Chondrilla* sp. B fixed in ethanol 70%, formaldehyde 4%, dried and frozen (~15 μ g of each).

sequencing analyses were advantageous over allozymes by the ability to work with dried or ethanol preserved specimens. However, DNA sequencing analyses are unfeasible with tissues preserved in formaldehyde, and most of the earlier

preserved museum specimens used this fixative. Thus, sulfated polysaccharides analyses have some advantages over allozymes and DNA, since it is a quick (~ 5 days) and very low cost technique (~ US\$ 2.00 / sample), it requires a very small sample (30mg of sponge tissue), and most importantly, it can be performed in formaldehyde preserved specimens.

We can conclude that the analysis of the sulfated polysaccharides by agarose gel electrophoresis is a promissory biochemical technique to distinguish cryptic species within Porifera. However, further analyses with a larger sample size, a higher number of cryptic species of *Chondrilla* and other sponge taxa must be performed to establish the general effectiveness and robustness of this technique.

Acknowledgements

We thank A.M. Solé-Cava and M. Maldonado for the collection of *Chondrilla* sp. E and *Chondrilla* sp. F from the Bahamas; K. Usher for the collection of *C. australiensis*. N. Boury-Esnault for the collection of *C. nucula* and F. Cavalcanti for the collection of *Chondrilla* sp. B. To Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: FNDCT, PADCT, and PRONEX), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) for financial support.

References

- Alves AP, Mulloy B, Moy GW, Vacquier VD, Mourão PAS (1998) Females of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* differ in the structures of their egg jelly sulfated fucans. *Glycobiology* 8: 939-994
- Biermann CH, Marks JA, Vilela-Silva ACES, Castro MO, Mourão (2004) Carbohydrate-based species recognition in sea urchin fertilization: another avenue for speciation? *Evol Dev* 6: 353-361
- Boury-Esnault N, Solé-Cava AM, Thorpe JP (1992) Genetic and cytological divergence between colour morphs of the Mediterranean sponge *Oscarella lobularis* Schmidt (Porifera, Demospongiae, Oscarellidae). *J Nat Hist* 26:271-284
- Boury-Esnault N (2002) Order Chondrosida Boury-Esnault & Lopés 1985 Family Chondrillidae Gray 1872. In: Hooper JNA, van Soest RWM (eds). *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. pp. 291-297
- Bucior I, Burger M (2004) Carbohydrate-carbohydrate interaction as a major force initiating cell-cell recognition. *Glycoconjugate J* 21: 111-123
- Cimino P, Bifulco G, Casapullo A, Gómez-Paloma L, Riccio R (2001) Isolation and NMR characterization of rosacelose, a novel sulfated polysaccharide from the sponge *Mixilla rosacea*. *Carbohydr Res* 334: 39-47
- Dietrich CP, Dietrich SMC (1972) Simple micro method for identification of heparin and other acidic mucopolysaccharides from mammalian tissues. *Anal Biochem* 46: 209-215
- Dietrich CP, Dietrich SMC (1976) Electrophoretical behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal Biochem* 70: 645-657
- Dische Z (1974) A new specific color reaction of hexuronic acids. *J Biol Chem* 167: 189-198
- Dubois M, Guilles KA, Hamilton JK, Rebels PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and substances. *Anal Chem* 28: 350-356
- Fardale RW, Buttle DJ, Barret AJ (1986) Improved quantification and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta* 883:173-177
- Fernandez-Busquets X, Burger MM (2003) Circular proteoglycans from sponges: first members of spongican family. *Cell Mol Life Sci* 60: 88-112
- Guerardel Y, Czeszak X, Sumanovski LT, Karamanos Y, Popescu O, Strecker G, Misevic GN (2004) Molecular fingerprinting of carbohydrate structure phenotypes of three porifera proteoglycan-like glycoconectins. *J Biol Chem* 279: 15591-15603
- Humphreys S, Humphreys T, Sano J (1977) Organization and polysaccharides of sponge aggregation factor. *J Supramol Struct* 7: 339-351
- Jarchow J, Fritz J, Anselmetti D, Calabro A, Hascall VC, Gerosa D (2000) Supramolecular structure of a new family of circular proteoglycans mediating cell adhesion in sponges. *J Struct Biol* 132: 95-105
- Kircher HW (1960) Gas-liquid chromatography of methylated sugars. *Anal Chem* 32: 1103-1106
- Klautau M, Russo CA, Lazoski C, Boury-Esnault N, Thorpe JP, Solé-Cava AM (1999) Does cosmopolitanism results from overconservative systematics? A case study using the marine sponge *Chondrilla nucula*. *Evolution* 53: 1414-1422
- Lazoski C, Solé-Cava AM, Boury-Esnault N, Klautau M, Russo CAM (2001) Cryptic speciation in a high gene flow scenario in the oviparous marine sponge *Chondrosia reniformis*. *Mar Biol* 139: 421-429
- Loukaci A, Muricy G, Brouard JP, Guyot M, Vacelet J, Boury-Esnault N (2004) Chemical divergence between two sibling species of *Oscarella* (Porifera) from the Mediterranean Sea. *Biochem System Ecol* 32: 893-899
- Misevic GN, Guerardel Y, Sumanovski LT, Slomianny MC, Demarty M, Ripoll C, Karamanos Y, Mães E, Popescu O, Strecker G. (2004) Molecular recognition between glycoconectins as an adhesion self-assembly pathway to multicellularity. *J Biol Chem* 279: 15579-15590
- Muricy G, Solé-Cava AM, Thorpe JP, Boury-Esnault N (1996) Genetic evidence for the extensive cryptic speciation in the subtidal sponge *Plakina trilopha* (Porifera: Demospongiae: Homoscleromorpha) from the Western Mediterranean. *Mar Ecol Prog Ser* 138: 181-187
- Parish CR, Jakobsen KB, Coombe DR, Bacic A (1991) Isolation and characterization of cell adhesions molecules from the marine sponge *Ophlitaspongia tenuis*. *Biochim Biophys Acta* 1073: 56-64
- Popescu O, Misevic GN (1997) Self-recognition by proteoglycans. *Nature* 386: 231-232
- Saito H, Yamagata T, Suzuki S (1968) Enzymatic methods for the determination of small quantities of isomeric chondroitin sulfate. *J Biol Chem* 243: 1542-1563
- Solé-Cava AM (1994) Evolutionary genetics of marine sponges. In: van Soest RWM, van Kempen TMG, Braekman JC (eds). *Sponges in time and space*. Balkema, Rotterdam. pp. 55-63
- Solé-Cava AM, Klautau M, Boury-Esnault N, Borojevic R, Thorpe JP (1991). Genetic evidence for cryptic speciation in allopatric populations of two cosmopolitan species of the calcareous sponge genus *Clathrina*. *Mar Biol* 111:381-186

- Solé-Cava AM, Thorpe JP (1986) Genetic differentiation between morphotypes of the marine sponge *Suberites ficus* (Demospongiae: Hadromerida). *Mar Biol* 93: 247-253
- Spillmann D, Burger MM (1996) Carbohydrate-carbohydrate interactions in adhesion. *J. Cell. Biochem* 61: 562-568
- Usher KM, Sutton DC, Toze S, Kuo J, Fromont J (2004) Biogeography and phylogeny of *Chondrilla* species (Demospongiae) in Australia. *Mar Ecol Prog Ser* 270:117-127
- Vieira RP, Mulloy B, Mourão PAS (1991) Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber. Evidence for the presence of 3-O-sulfo-beta-D-glucuronosyl residues. *J Biol Chem* 266: 13530-13536
- Vilela-Silva ACES, Alves AP, Valente AP, Vacquier VD, Mourão PAS (1999) Structure of the sulfated alpha-1-fucan from the egg jelly coat of the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*: patterns of preferential 2-O and 4-O-sulfation determine sperm cell recognition. *Glycobiology* 9: 927-933
- Vilela-Silva ACES, Castro MO, Valente AP, Biermann CH, Mourão PAS (2002) Sulfated fucans from the egg jellies of the closely related sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis* and *Strongylocentrotus pallidus* ensure species-specific fertilization. *J Biol Chem* 277: 379-387
- Wörheide G, Fromont J, Solé-Cava AM (2004). Population genetics and phylogeography of sponges - a workshop synthesis. *Boll Mus Inst Biol Univ Genova* 68: 683-688
- Zierer MS, Mourão PA (2000) A wide diversity of sulfated polysaccharides are synthesized by different species of marine sponges. *Carbohydr Res* 328: 209-216
- Zilberberg C, Solé-Cava AM, Klautau M. 2006. The extent of asexual reproduction in sponges of the genus *Chondrilla* (Demospongiae: Chondrosida) from the Caribbean and the Brazilian coasts. *J Exp Mar Biol Ecol* 336: 221-220

Sulfated polysaccharides from marine sponges (Porifera): an ancestor cell–cell adhesion event based on the carbohydrate–carbohydrate interaction

Eduardo Vilanova², Cristiano C Coutinho³, and Paulo A S Mourão^{1,2}

²Laboratório de Tecido Conjuntivo, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho and Instituto de Bioquímica Médica; and ³Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 21941-590, Brazil

Received on March 13, 2009; revised on April 15, 2009; accepted on April 16, 2009

Marine sponges (Porifera) are ancient and simple eumetazoans. They constitute key organisms in the evolution from unicellular to multicellular animals. We now demonstrated that pure sulfated polysaccharides from marine sponges are responsible for the species-specific cell–cell interaction in these invertebrates. This conclusion was based on the following observations: (1) each species of marine sponge has a single population of sulfated polysaccharide, which differ among the species in their sugar composition and sulfate content; (2) sulfated polysaccharides from sponge interact with each other in a species-specific way, as indicated by an affinity chromatography assay, and this interaction requires calcium; (3) homologous, but not heterologous, sulfated polysaccharide inhibits aggregation of dissociated sponge cells; (4) we also observed a parallel between synthesis of the sulfated polysaccharide and formation of large aggregates of sponge cells, known as primmorphs. Once aggregation reached a plateau, the demand for the *de novo* synthesis of sulfated polysaccharides ceased. Heparin can mimic the homologous sulfated polysaccharide on the *in vitro* interaction and also as an inhibitor of aggregation of the dissociated sponge cells. However, this observation is not relevant for the biology of the sponge since heparin is not found in the invertebrate. In conclusion, marine sponges display an ancestor event of cell–cell adhesion, based on the calcium-dependent carbohydrate–carbohydrate interaction.

Keywords: aggregation factor/cell aggregation/heparin/primmorphs/proteoglycans

Introduction

Sponges (phylum Porifera) are very ancient and probably the simplest animals among eumetazoans. These invertebrates have been extensively studied in recent years in order to establish the cellular and molecular aspects of evolution from the unicellular to multicellular animals (Custódio et al. 1998). The first model

of cellular recognition and adhesion in animals was achieved with cells from marine sponge in the beginning of the last century (Wilson 1907). This model was based on the observation that dissociated cells from marine sponge go through an aggregation process, in a species-specific way, forming small cellular aggregates. Later, it was observed that this cellular aggregation is mediated by membrane-associated molecules, named “aggregation factors.” This aggregation is dependent on divalent cations (Humphreys 1963). The first chemical characterization of the aggregation factors showed that these molecules contain different proportions of protein and carbohydrate. The proportions of carbohydrate vary from 26% to 60%, depending on the species (Margoliash et al. 1965; Müller and Zahn 1973; Müller et al. 1978; Misevic and Burger 1986).

Nowadays, it is clear that aggregation factors are proteoglycan-like molecules, responsible for the cellular adhesion and recognition in sponges (e.g., Fernández-Busquets and Burger 2003). These molecules are composed of circular or linear protein cores, attached to two types of polysaccharide units. One of them has a low molecular weight and binds to putative receptors in the cellular membrane. Another carbohydrate is composed of sulfated polysaccharides, with high molecular weight, and binds homophilically to the sulfated polysaccharides from the aggregation factor of adjacent cells, promoting cell adhesion (e.g., Blumbach et al. 1998; Jarchow et al. 2000; Fernández-Busquets and Burger 1997; Bucior and Burger 2004).

The component of the aggregation factor responsible for the cellular interaction is the sulfated polysaccharide (Spillmann and Burger 1996; Bucior and Burger 2004). Assays using cellulose beads coated with purified sulfated polysaccharides from marine sponges resulted in the aggregation of these beads. In the same way, beads coated with these sulfated polysaccharides aggregate with living cells of marine sponges, indicating that the aggregation mediated by sulfated polysaccharides also occurs physiologically. The incubation of living cells of the marine sponge *Microciona prolifera* with its sulfated polysaccharide antibody prevents cell aggregation, confirming the central role of the sulfated polysaccharides in the cell aggregation in sponges (Popescu and Misevic 1997; Bucior and Burger 2004). The binding strengths between the sulfated polysaccharides from the aggregation factor were determined by atomic force microscopy, varying between 200 and 300 piconewtons, depending on the species studied (Fernández-Busquets and Burger 2003; Bucior and Burger 2004). These interactions between sulfated polysaccharides from marine sponges are always calcium dependent (e.g., Spillmann and Burger 1996; Bucior and Burger 2004).

Certainly, the marked feature of cellular aggregation in marine sponges is its species specificity, which has been observed since the first experiments. The aggregation of sponge cells occurs only in a homologous way, as observed in experiments

¹To whom correspondence should be addressed: Tel/Fax: +55 (21) 2532-2090; e-mail: pmourao@hucff.ufrj.br

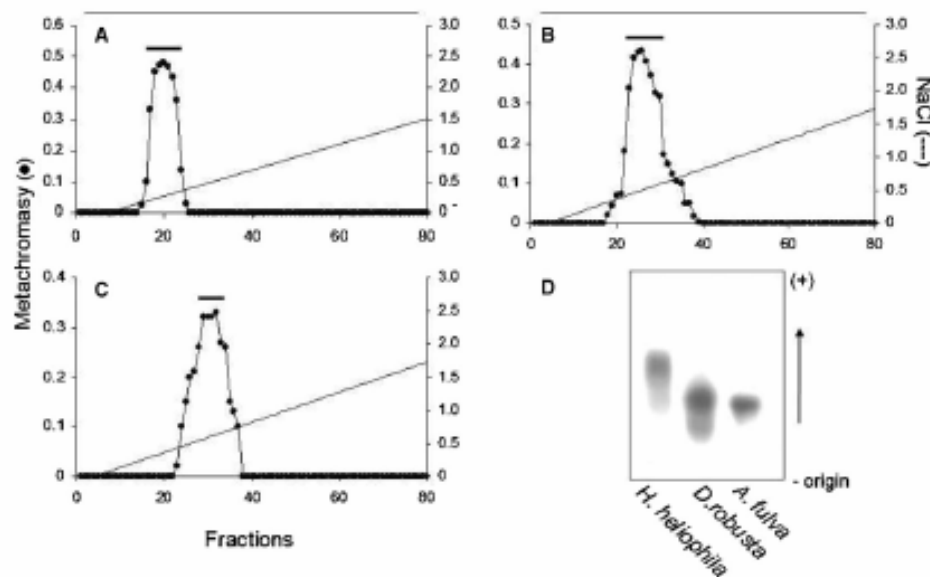


Fig. 1. Purification of sulfated polysaccharides from marine sponges. Total polysaccharides extracted from *H. heliophila* (A), *D. robusta* (B), and *A. fulva* (C) were purified by ion-exchange chromatography on DEAE cellulose. Fractions were checked for the presence of the sulfated polysaccharide by metachromasy (●) and for the NaCl concentration by conductivity (—). Fractions indicated by horizontal bars were pooled, dialyzed against distilled water, and lyophilized. (D) Purified sulfated polysaccharides (15 µg of each) were applied to an agarose gel and submitted to 110 V for 1 h in 1,3-diaminopropane acetate (pH 9.0). The sulfated polysaccharides were fixed in the gel with *N*-cetyl-*N,N,N*-trimethylammonium bromide solution for 12 h. The gel was dried and stained with 0.1% toluidine blue.

using either living cells or beads coated with sulfated polysaccharides (e.g., Popescu and Misevic 1997; Bucior and Burger 2004; Misevic et al. 2004). The sulfated polysaccharides from marine sponges are highly complex, with a variety of sugars and high sulfate content (Vilanova et al. 2007).

In the present study, we purified sulfated polysaccharides from three different species of marine sponges. Each species synthesizes a particular polysaccharide. All show a calcium-dependent and species-specific interaction in the binding assay. Only the homologous polysaccharide and heparin prevent aggregation of dissociated sponge cells. The synthesis of sulfated polysaccharides decreases as the sponge cells form large aggregates, known as primmorphs. Overall, our results indicate, in a further detail, that pure sulfated polysaccharides mediate cell-cell interactions which are essential for the aggregation of sponge cells. Possibly, the protein part of the aggregation factor is a glycan carrier, but it is not functionally involved in aggregation.

Results

Each species of marine sponge has a particular sulfated polysaccharide

We studied three species of marine sponge: *Hymeniacidon heliophila*, *Dysidea robusta*, and *Aplysina fulva*. Each species has a particular population of the sulfated polysaccharide, which was eluted from an anion-exchange chromatography with different NaCl concentrations (Figure 1A–C). On agarose gel electrophoresis, these sulfated polysaccharides have distinct mobility (Figure 1D). Finally, their monosaccharide composition

Table I. Chemical composition of the sulfated polysaccharides from three species of marine sponges

Species	Composition (molar ratios) ^a					Sulfate/total sugar ^b
	Glc	Gal	Fuc	Ara	HexUA	
<i>H. heliophila</i>	nd	0.59	0.23	nd	0.18	1.20
<i>D. robusta</i>	nd	0.22	0.34	0.19	0.25	2.04
<i>A. fulva</i>	0.90	nd	nd	nd	0.10	0.70

^aTotal hexose and hexuronic acid were quantified by the phenol-sulfuric acid and carbazole reactions, respectively. Sugars were identified, after acid hydrolysis, by gas-liquid chromatography of derived alditol acetates.

^bSulfate was measured by the BaCl₂-gelatin method.
nd, not detected.

and sulfate content also vary significantly among the species (Table I). Clearly, these results indicate that each species of marine sponge has a particular sulfated polysaccharide.

We attempted to determine the chemical structure of these sulfated polysaccharides based on NMR analysis. The ¹H NMR spectra at 600 MHz recorded at 60°C showed broader and poorly resolved signals (not shown), indicating a clearly heterogeneous chemical structure. It was not possible to assign the peaks even with the two-dimensional techniques. Thus, these sponge polysaccharides have a very complex nature and heterogeneous chemical structures, as several other sulfated polysaccharides from other species of marine sponges (e.g., Zierer and Mourão 2000; Guerardel et al. 2004). No evidence for the presence of protein was observed in these spectra, as indicated by the

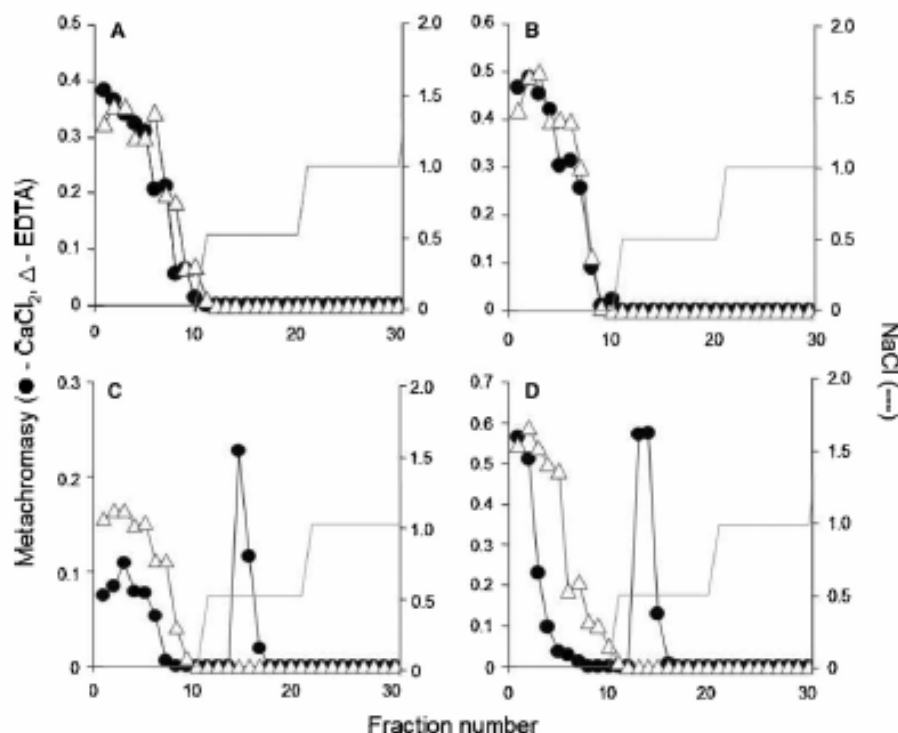


Fig. 2. Binding of homologous and heterologous sulfated polysaccharides to Sepharose 4B coupled with the sulfated polysaccharide from *H. heliophila*. The sulfated polysaccharide from *D. robusta* (A), *A. fulva* (B), *H. heliophila* (C), or heparin (D) (1 mg of each) was applied to the affinity column (3 mL) and eluted stepwise with NaCl solutions prepared in 5 mM sodium acetate + 10 mM CaCl₂ (●) or 5 mM sodium acetate + 10 mM EDTA (Δ), both at pH 5.0. Fractions of 0.5 mL were collected and checked for metachromasy and NaCl concentrations (---).

absence of down-field signals (6.5–7.0 ppm) or low-field signals, assigned to aromatic or aliphatic protons, respectively.

Species-specific interaction between sulfated polysaccharides from marine sponges

We investigated the interaction between sulfated polysaccharides from marine sponges using affinity chromatography. For these experiments, the purified sulfated polysaccharide from *H. heliophila* was coupled to Sepharose 4B. The interactions between homologous and heterologous polysaccharides were evaluated using affinity chromatography, eluted with increasing NaCl concentrations, in solutions containing either 10 mM CaCl₂ (closed circles in Figure 2) or 10 mM EDTA (open triangles). The homologous polysaccharide (Figure 2C), but not the heterologous ones (Figure 2A and B), was retained on the column. The interaction is clearly calcium dependent since it is abolished in the presence of EDTA (open triangles in Figure 2).

Curiously, heparin is retained on the affinity column in the presence of calcium (Figure 2D), similar to the homologous sulfated polysaccharide. Possibly, the high anionic nature of heparin appears to hinder nonspecific interactions with the sponge-sulfated polysaccharides. We further investigated this aspect using Hitrap-heparin column (Figure 3). The sulfated polysaccharides, purified from the three species of marine sponges, were retained in the heparin affinity column, although

they were eluted with different concentrations of NaCl. Again, the interaction between the sponge sulfated polysaccharides and heparin is calcium dependent.

Exogenous sulfated polysaccharide from homologous species prevents aggregation of sponge cells

We further investigated the effect of sulfated polysaccharides on aggregation of sponge cells using an *in vivo* assay (Figure 4). When dissociated cells from the marine sponge *H. heliophila* were incubated for 6 h at 18°C, in the absence of calcium, we observe no cell aggregation, denoted by only small, sparse aggregates, composed of few cells (negative control; Figure 4A). In contrast, when the cells were incubated in the presence of calcium, they form large aggregates, composed of several cells and usually three dimensional (positive control; Figure 4F). Clearly, this is an appropriate assay to follow aggregation of dissociated cells from marine sponges.

Subsequently, we added exogenous sulfated polysaccharides from homologous and heterologous species to the dissociated sponge cells, always in the presence of calcium. In the presence of heterologous polysaccharides (from *A. fulva* and *D. robusta* in Figure 4D and E, respectively), we observe aggregation of the sponge cells, as seen in the positive control (Figure 4F). In contrast, no aggregation is observed when cells were incubated with the homologous sulfated polysaccharide (Figure 4B). Again, heparin reproduces the same effect obtained

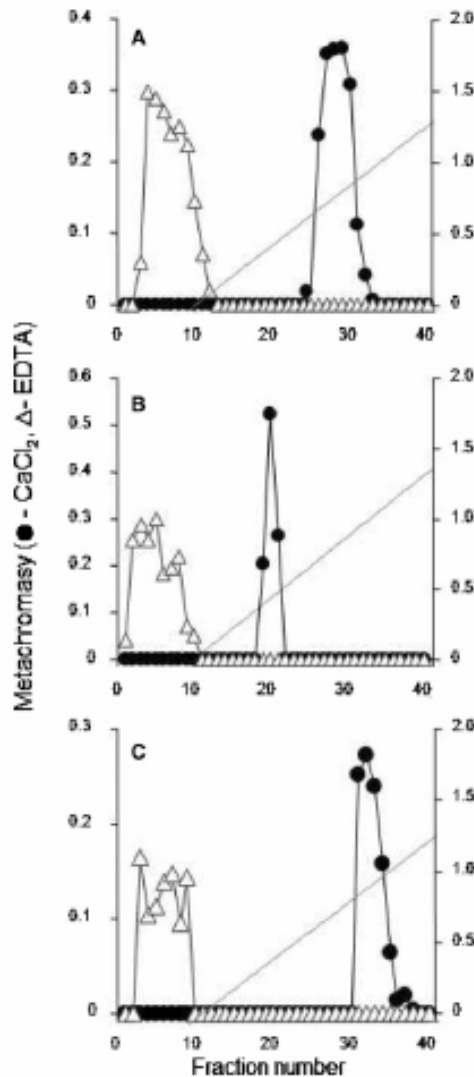


Fig. 3. Binding of sponge sulfated polysaccharides to a Hitrap-heparin column. The sulfated polysaccharide from *H. heliophila* (A), *D. robusta* (B) or *A. fulva* (C) (1 mg of each) was applied to a Hitrap-heparin column (1 mL) and eluted with a linear gradient of 0–2 M NaCl, prepared in 5 mM sodium acetate + 10 mM CaCl₂ (●) or 5 mM sodium acetate + 10 mM EDTA (Δ), both at pH 5.0. Fractions of 0.5 mL were collected and checked for metachromasy and NaCl concentrations (—).

with the homologous sulfated polysaccharide (Figure 4C), as already observed in the *in vitro* assays.

The efficiency of the exogenous sulfated polysaccharides to inhibit the aggregation of cells from *H. heliophila* was quantified based on the areas of the aggregates (Figure 5). At a fixed concentration of the exogenous sulfated polysaccharide (3 mg/mL), only the homologous compound inhibits aggregation of the sponge cells (Figure 5A). This effect is dose dependent (Figure 5B). Heparin has a similar action but requires

significantly higher concentrations to achieve the same effect as the homologous sulfated polysaccharide (Figure 5B).

Clearly, the purified sulfated polysaccharide inhibits aggregation of marine sponge cells in a species-specific way. Heparin can mimic this action but it is less efficient than the homologous sulfated polysaccharide.

Synthesis of the sulfated polysaccharide ceases as the aggregation of sponge cells is concluded

Subsequently, we looked for more direct evidence for correlation between aggregation of sponge cells and expression of sulfated polysaccharides. We follow in parallel the formation of large aggregates of sponge cells (denominated as primmorphs) and the synthesis of sulfated polysaccharides by the cells in culture. We estimated the synthesis of the sulfated polysaccharide by the cells based on the incorporation of ³⁵S-sulfate. On the first day, dissociated cells incorporated high amounts of ³⁵S-sulfate into the polysaccharide, but the synthesis decreased continuously throughout the second and third days, ceasing from the fourth day onward (Figure 6A). We followed the formation of primmorphs in the cultures by visual examination. On the first day, only small aggregates are observed (Figure 6B), but after the second and especially the third day, large aggregates that will become primmorphs preponderate in the cultures (Figure 6C and D).

Our interpretation for the results of Figure 6 is that the dissociated cells aggregate actively in the first days, demanding the *de novo* synthesis of sulfated polysaccharide to undergo cell–cell adhesion. After the third and especially the fourth day, the formation of the cell aggregates reaches a plateau. At this stage, the *de novo* synthesis of the sulfated polysaccharide is not necessary to promote further adhesion of the sponge cells.

Discussion

Sponges are one of the first metazoan organisms. The model of cellular recognition and adhesion in these animals has been studied since the beginning of the last century (Wilson 1907). It is clear now that a membrane-associated molecule, named as the aggregation factor, mediates cell aggregation in sponges (e.g., Fernández-Busquets and Burger 2003). The component of the aggregation factor responsible for the cellular interaction is the sulfated polysaccharide (Spillmann and Burger 1996; Bucior and Burger 2004). We now demonstrated that purified sulfated polysaccharides, extracted from the sponges by extensive protease digestion, mediate recognition and aggregation of sponge cells. Possibly, the protein part of the aggregation factor is a glycan carrier but it is not functionally involved in cell aggregation. Our conclusion is supported by several evidences.

First, each one of the marine sponges *H. heliophila*, *D. robusta*, and *A. fulva* has a single population of the sulfated polysaccharide, which differ among the species in sugar composition and sulfate content. Similar results were observed in previous studies (e.g., Zierer and Mourão 2000; Cimino et al. 2001; Bucior and Burger 2004; Guerardel et al. 2004; Vilanova et al. 2007).

Second, only the homologous sulfated polysaccharide interacts with itself in the presence of calcium, as indicated by *in vitro* assays using affinity chromatography. No interaction is observed between heterologous sulfated polysaccharides. Heparin

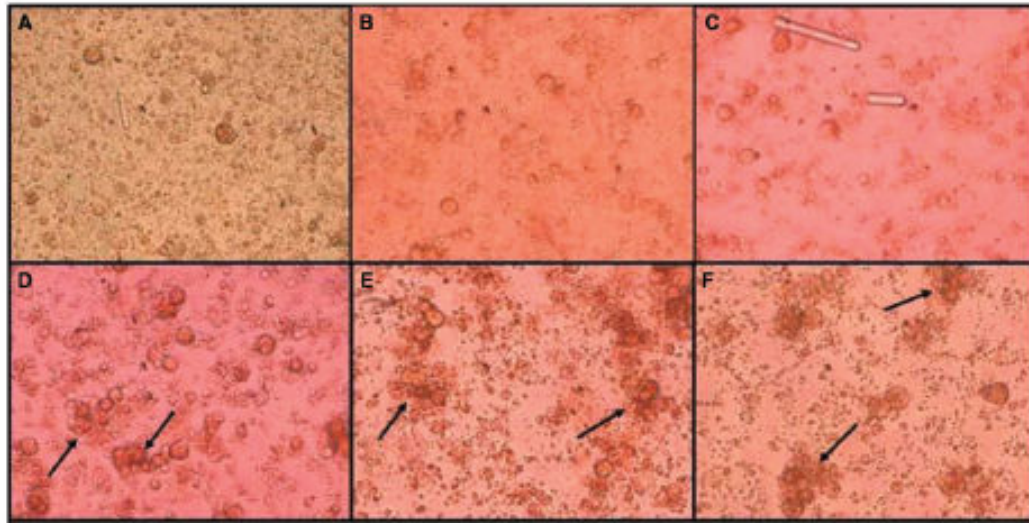


Fig. 4. Aggregation of dissociated cells from the sponge *H. heliophila* induced by exogenous sulfated polysaccharides. Dissociated sponge cells ($\sim 10^4$ cells) were incubated for 6 h at 18°C with $100\ \mu\text{L}$ of the following medium: CMFSW (A), filtered seawater, supplemented with antibiotics, in the absence (F) or in the presence of $3\ \text{mg/mL}$ of sulfated polysaccharide from *H. heliophila* (B), *A. fulva* (D), *D. robusta* (E), or heparin (C). The cell cultures were photographed using a Leika DC300 microscope. Typical aggregates of sponge cells are indicated by the arrows in panels D, E, and F.

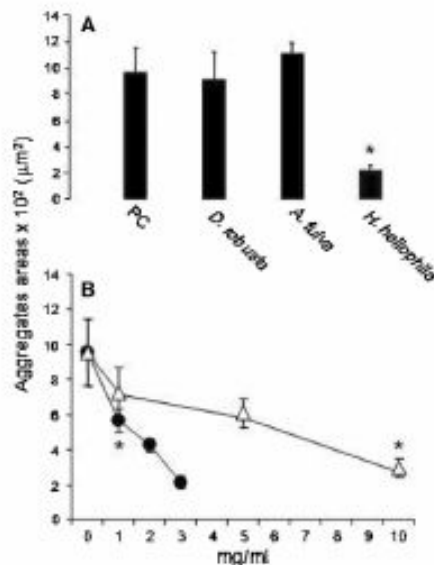


Fig. 5. Efficacy of exogenous sulfated polysaccharides to inhibit aggregation of cells from *H. heliophila*. Dissociated cells from *H. heliophila* were incubated for 6 h, at 18°C , with filtered seawater or a fixed concentration ($3\ \text{mg/mL}$) of sulfated polysaccharides from the three species of marine sponges (panel A) or in the presence of increasing concentrations of the sulfated polysaccharide from *H. heliophila* (panel B, ●) or heparin (panel B, △). The assays were performed as described in the legend of Figure 4 and the areas of cell aggregates (mean \pm SD, $n = 3$) were calculated using imagery analysis software Leika QWin. * = significantly different than positive control ($P < 0.05$).

can mimic the interaction promoted by the homologous sulfated polysaccharide. Possibly its high anionic nature appears to hinder the nonspecific interaction with the sponge sulfated polysaccharides. However, this observation is not relevant for the biology of the sponge since heparin is not found in these invertebrates.

Third, the species-specific interaction of sulfated polysaccharides from marine sponge was also observed with in vivo assays. We followed aggregation of sponge cells after the addition of exogenous sulfated polysaccharides to dissociated cells. The homologous, but not the heterologous, polysaccharides inhibit cell aggregation. Our interpretation for this result is that the homologous sulfated polysaccharide, soluble in the culture medium, binds to sulfated polysaccharides, component of the aggregation factor, expressed on the cell surface. As a consequence, it decreases the number of sites available for the cell-cell interaction, diminishing the binding mediated by sulfated polysaccharides. A previous study using the marine sponge *Ophlitaspongia tenuis* also suggested that the homologous sulfated polysaccharide can inhibit cell recognition (Parrish et al. 1991). Again, heparin can mimic the effect of the homologous sulfated polysaccharide but requires significantly higher concentrations to achieve the same effect.

Finally, we observed a parallel between the synthesis of the sulfated polysaccharide and the dynamic of primmorph formation, as observed in primary cultures of cells from the sponge *H. heliophila*. As the formation of cell aggregates that will become primmorphs reaches a plateau, the synthesis of sulfated polysaccharides ceases. Our interpretation for these results is that dissociated cells demand the de novo synthesis of the sulfated polysaccharide in order to achieve cell-cell adhesion. As aggregation stops, indicated by the preponderance of large aggregates in the cultures, the synthesis of the sulfated polysaccharide stops.

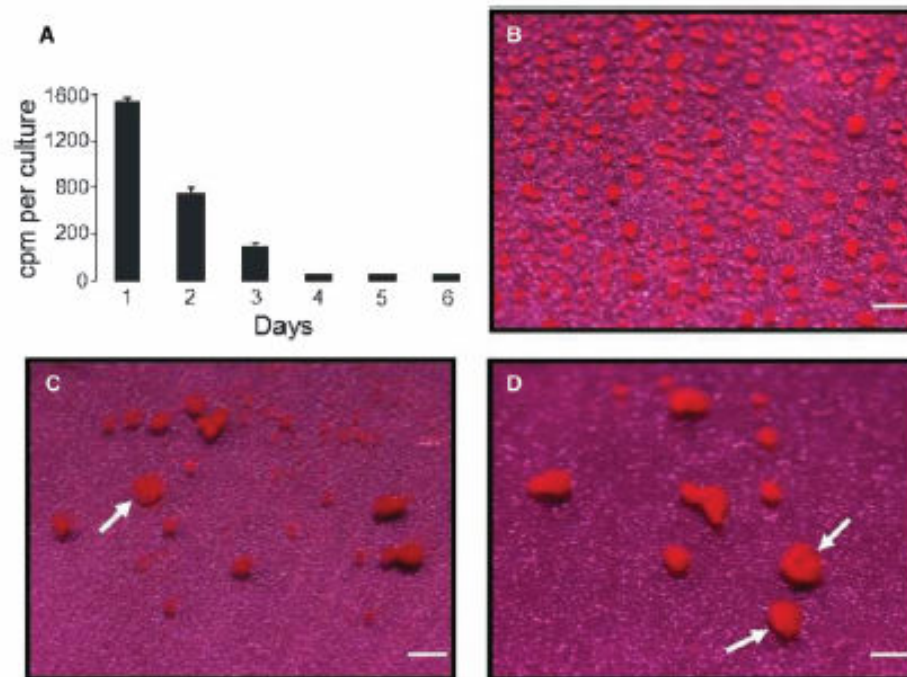


Fig. 6. Parallel between synthesis of the sulfated polysaccharide and formation of primmorphs by cells from *H. heliophila*. (A) Dissociated cells from *H. heliophila* were maintained in culture for up to six days in filtered seawater. Each 24 h period $\sim 10^9$ cells were transferred from the medium with filtered seawater to a medium with sulfate-free artificial seawater, supplemented with ^{35}S -sulfate (100 μCi), in order to measure the synthesis of sulfated polysaccharides. The ^{35}S -sulfated polysaccharides were purified by an ion-exchange chromatography on DEAE cellulose. Fractions were checked by the amount of radioactivity in a POP/toluene solution using a scintillation counter. The results are mean \pm SD, $n = 3$, at each 24 h period of cell culture. (B–D) Aggregation of sponge cells was followed by visual examination of the cultures at the first (B), second (C), and third (D) days. Arrows in the panel show typical cell aggregates. White bar = 1 mm.

The mechanisms involved in the cell–cell interaction in highly evolved animals have been extensively studied. A variety of complex molecules, including specific carbohydrate and protein structures, participate in this event. In contrast, marine sponges present more simple mechanisms of cell adhesion, based on a calcium-mediated carbohydrate–carbohydrate interaction (e.g., Spillmann and Burger 1996; Popescu and Misevic 1997; Bucior and Burger 2004). The ancestry of marine sponge suggests that this is one of the first evolutionary events that allowed the emerging of multicellular organisms (Misevic et al. 2004).

Further understanding of this ancestor mechanism of the cell–cell interaction requires determination of the molecular basis of the calcium-mediated carbohydrate–carbohydrate interaction. A limitation for this study is the complex structure and high molecular size of the sulfated polysaccharides from marine sponges (e.g., Guerardel et al. 2004). A possible alternative is to prepare low-molecular-size derivatives from these polysaccharides. But, again, this is a difficult task due to the absence of enzymes or specific chemical methods to cleave these polysaccharides.

Carbohydrate–carbohydrate interactions have been studied by several authors. Self-aggregation of various plant polysaccharides based on the carbohydrate–carbohydrate interaction was studied over 40 years ago (Arnott et al. 1974). The interaction of chondroitin sulfate and hyaluronic acid was claimed

subsequently (Turley and Roth 1980). In these early studies of the polysaccharide interaction, the biological significance was unclear. More recently, carbohydrate–carbohydrate interactions have been implicated in mammalian cell adhesion. Several combinations of glycosphingolipids at the surface of interfacing cells are implicated in adhesion and recognition (Hakomori 2004a, 2004b). However, these interactions occur between oligosaccharides with chemical structures totally distinct from the polysaccharides found in marine sponges.

In conclusion, our results indicate that in addition to their known function in coagulation, cell proliferation, inflammation, angiogenesis, viral infection and invertebrate fertilization, sulfated polysaccharides also mediate an ancestor cell–cell interaction event in marine sponges.

Material and methods

Sponge sample

The marine sponges *D. robusta* and *A. fulva* were collected at Tartaruga beach, Buzios, Rio de Janeiro, Brazil. The species *H. heliophila* was collected at Vermelha beach, Rio de Janeiro, Brazil. The sponge samples collected for the extraction of sulfated polysaccharides were immediately fixed in 70% ethanol. The samples of *H. heliophila* collected for cell cultures were transported to the laboratory immersed in seawater

and maintained in an aquarium, at 18°C, until further utilization.

Extraction of the sulfated polysaccharides

Samples of the marine sponges were cut into small pieces (1 mm³), washed with 70% ethanol, immersed three times in acetone, and dried at 60°C. Sulfated polysaccharides were extracted from the dried tissues (5 g) by extensive papain digestion, and the extracts were partially purified by cetylpyridinium and ethanol precipitations, as described for other invertebrate tissues (Vieira et al. 1991). Approximately, 50 mg (dry weight) of crude extract was obtained from each species.

Purification of the sulfated polysaccharides

Crude extracts of sulfated polysaccharides from the marine sponges (50 mg from each species) were applied to a DEAE-cellulose column, equilibrated with 5 mM sodium acetate (pH 5.0) + 10 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), linked to a FPLC system. The polysaccharides were eluted from the column using a linear gradient of 0–3 M NaCl, at a flow rate of 0.5 mL/min. Fractions of 0.5 mL were collected and checked by a metachromatic assay using 1,9-dimethylmethylene blue (Farndale et al. 1986) and by measuring conductivity to estimate the NaCl concentration. The fractions containing sulfated polysaccharides were pooled, dialyzed against distilled water, and lyophilized.

Agarose gel electrophoresis

Purified sulfated polysaccharides were analyzed by agarose gel electrophoresis. These polysaccharides (15 µg of each) were applied to a 0.5% agarose gel and the electrophoresis run for 1 h at 110 V in 0.05 M 1,3-diaminopropane acetate (pH 9.0). The sulfated polysaccharides in the gel were fixed with the 0.1% *N*-cetyl-*N,N,N*-trimethylammonium bromide solution. After 12 h, the gel was dried and stained with 0.1% toluidine blue in 0.1:5:5 (v/v/v) acetic acid:ethanol:water.

Chemical analysis

Total hexose and hexuronic acid were estimated by the phenol-H₂SO₄ reaction (Dubois et al. 1956) and carbazole reaction (Dische 1947), respectively. After acid hydrolysis of the polysaccharides (6.0 M trifluoroacetic acid for 5 h at 100°C), sulfate was measured by the BaCl₂-gelatin method (Saito et al. 1968). The percentages of different monosaccharides were estimated by paper chromatography in 3:2:1 (v/v/v) *n*-butanol-pyridine-water for 48 h and by gas-liquid chromatography (GLC) of derivative alditol acetates (Kircher 1960).

Sulfated polysaccharide affinity chromatography

Interactions between homologous or heterologous sulfated polysaccharides from the marine sponges or heparin were analyzed by affinity chromatographies. For these experiments, the purified sulfated polysaccharide from the sponge *H. heliophila* was coupled to Sepharose-4B, using a standard coupling procedure. Briefly, 20 mg of the polysaccharide in 5 mL of coupling solution (50 mM NaCl, 100 mM NaHCO₃, pH 8.2) was mixed with 3 mL cyanogen bromide-activated Sepharose 4B, and coupling was carried out as described by the manufacturer (Sigma, St. Louis, MO). The affinity chromatographies were performed using two different solutions: 5 mM sodium acetate + 10 mM

CaCl₂, pH 5.0, or 5 mM sodium acetate + 10 mM EDTA, pH 5.0. The homologous or heterologous sponge polysaccharide or heparin (1 mg of each) was applied to the affinity column (3 mL), linked to a FPLC system, and eluted by a step-wise gradient of NaCl (0.25 M, 0.5 M, 1.0 M, 1.5 M, and 2.0 M). In different experiments, the interaction between the sponge polysaccharide and heparin was determined using a Hitrap-heparin column (Sigma), as described above for Sepharose-4B, coupled with the sponge polysaccharide, except that a linear gradient of 0–3 M NaCl, instead of the step-wise gradient, was used to remove the sulfated polysaccharides from the affinity column. Fractions of 0.5 mL were collected from the affinity column and checked for metachromasy using 1,9-dimethylmethylene blue (Farndale et al. 1986), and by measuring conductivity to estimate NaCl concentrations.

Dissociation of the sponge cells

Tissues from *H. heliophila* were cut into small pieces (2–3 mm³), washed in natural seawater, and incubated with calcium- and magnesium-free artificial seawater, supplemented with EDTA (460 mM NaCl, 7 mM Na₂SO₄, 10 mM KCl, 10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid), 2.5 mM EDTA, pH 8.2) (CMFSW), as previously described (Custódio et al. 1998). After incubation the cells were filtered through 40 µm mesh nylon net and harvested by centrifugation (80 × g, 10 min). The dissociated cells were maintained in the calcium- and magnesium-free artificial seawater until further utilization.

Effect of exogenous sulfated polysaccharides on aggregation of sponge cells

Dissociated cells from *H. heliophila* (10⁴ cells) were incubated for 6 h at 18°C in 100 µL of filtered seawater (positive control, maximum aggregation) or CMFSW (negative control, no aggregation) or filtered seawater supplemented with different concentrations of the exogenous sulfated polysaccharide. The cells were then examined for the presence of aggregates and photographed using a Leika DC300 microscope. The areas of cellular aggregates were calculated using imagery analysis software Leika QWin. All the cell cultures were made in triplicates and the areas of aggregates compared by analysis of variance (ANOVA).

Cultures of sponge cells and formation of primmorphs

Cultures of cells from *H. heliophila* (10⁹ cells each) were maintained for up to six days in 5 mL of filtered (0.22 µm mesh) seawater, supplemented with 16 mg/L phenol red, 0.01 mg/mL kanamycin, and 0.01 mg/mL tylosin (Custódio et al. 1998). We followed the formation of primmorphs by visual examination and the cell cultures were photographed daily using a digital camera Canon D20.

³⁵S labeling of the sulfated polysaccharides from primary cultures of sponge cells

In order to determine the synthesis of the sulfated polysaccharide, the cell culture media were changed from filtered seawater to sulfate-free artificial seawater, supplemented with ³⁵S-sulfate (460 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, 2 mM NaHCO₃, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, and 100 µCi of H₂³⁵SO₄, pH 8.2). After incubation for 24 h at 18°C, the media were removed and the cells exhaustively washed with CMFSW to

remove free ^{35}S -sulfate. The cells were harvested by centrifugation ($80 \times g$, 10 min). ^{35}S -Sulfated polysaccharides were extracted from the cell cultures using papain, as described above for the extraction of sulfated polysaccharides from sponge. The ^{35}S -sulfated polysaccharides were purified by ion-exchange chromatography, as described above. The fractions were checked by the amount of radioactivity using 5 mL of 0.5% POP/toluene solution in a Beckman model LS 6000SC scintillation counter (Silva et al. 1989).

Funding

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Acknowledgement

We would like to thank Adriana A. Piquet for technical assistance.

Conflict of interest statement

None declared.

References

- Arnott S, Fulmer A, Scott WE, Des ICM, Moorhouse R, Rees DA. 1974. The agarose double helix and its function in agarose gel structure. *J Mol Biol.* 90:268–284.
- Blumbach B, Pancer Z, Diehl-Seifert B, Steffen R, Mönkner J, Müller I. 1998. The putative sponge aggregation receptor: Isolation and characterization of a molecule composed of scavenger receptor cysteine-rich domains and short consensus repeats. *J Cell Sci.* 111:2635–2644.
- Bucior I, Burger M. 2004. Carbohydrate–carbohydrate interaction as a major force initiating cell–cell recognition. *Glycoconj J.* 21:111–123.
- Cimino P, Bifulco G, Casapullo A, Gómez-Paloma L, Riccio R. 2001. Isolation and NMR characterization of rosacelose, a novel sulfated polysaccharide from the sponge *Mixyilla rosacea*. *Carbohydr Res.* 334:39–47.
- Custódio MR, Prokic I, Steffen R, Koziol C, Borojevic R, Brummer F, Nickel M, Müller WE. 1998. Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: A model system for studies of cell proliferation and cell death. *Mech Ageing Dev.* 105:45–59.
- Dische Z. 1947. A new specific color reaction of hexuronic acids. *J Biol Chem.* 167:189–198.
- Dobois M, Guilles KA, Hamilton JK, Rebels PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and substances. *Anal Chem.* 28:350–356.
- Fardale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. 1986. Improved quantification and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta.* 883:173–177.
- Fernández-Busquets X, Burger MM. 1997. The main protein of the aggregation factor responsible for species-specific cell adhesion in the marine sponge *Micoclona prolifera* is highly polymorphic. *J Biol Chem.* 272:27839–27847.
- Fernández-Busquets X, Burger MM. 2003. Circular proteoglycans from sponges: First members of spongican family. *Cell Mol Life Sci.* 60:88–112.
- Guerardel Y, Czeszak X, Sumanovski LT, Karamanos Y, Popescu O, Strecker G, Misevic GN. 2004. Molecular fingerprinting of carbohydrate structure phenotypes of three porifera proteoglycan-like glycoconectins. *J Biol Chem.* 279:15591–15603.
- Hakomori S. 2004a. Carbohydrate-to-carbohydrate interaction, through glycosinapse, as a basis of cell recognition and membrane organization. *Glycoconj J.* 21:125–137.
- Hakomori S. 2004b. Carbohydrate-to-carbohydrate interaction in basic cell biology: A brief overview. *Arch Biochem Biophys.* 426:173–181.
- Humphreys T. 1963. Chemical dissolution and in vitro reconstruction of sponge cell adhesions: I. Isolation and functional demonstration of the components involved. *Dev Biol.* 8:27–47.
- Jardow J, Fritz J, Anselmetti D, Calabro A, Hascall VC, Gerosa D. 2000. Supramolecular structure of a new family of circular proteoglycans mediating cell adhesion in sponges. *J Struct Biol.* 132:95–105.
- Kircher HW. 1960. Gas-liquid chromatography of methylated sugars. *Anal Chem.* 32:1103–1106.
- Margolish E, Schenck JR, Hargie MP, Burokas S, Richter WR, Barlow GH. 1965. Characterization of specific cell aggregating materials from sponge cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 20:383–388.
- Misevic GN, Burger MM. 1986. Reconstitution of high cell binding affinity of a marine sponge aggregation factor by cross-linking of small low affinity fragments into a large polyvalent polymer. *J Biol Chem.* 261:2853–2859.
- Misevic GN, Guerdel Y, Sumanovski LT, Slomianny MC, Demarty M, Ripoll C, Karamanos Y, Mites E, Popescu O, Strecker G. 2004. Molecular recognition between glycoconectins as an adhesion self-assembly pathway to multicellularity. *J Biol Chem.* 279:15579–15590.
- Müller WE, Müller I, Pondeljak V, Kurelec B, Zahn R K. 1978. Species-specific aggregation factor in sponges: Isolation, purification and characterization of the aggregation factor from *Suberites domuncula*. *Differentiation.* 10:45–53.
- Müller WE, Zahn R K. 1973. Purification and characterization of a species-specific aggregation factor in sponges. *Exp Cell Res.* 80:95–104.
- Parrish CR, Jakobsen KB, Coombe DR, Bacic A. 1991. Isolation and characterization of cell adhesion molecules from the marine sponge *Ophitasporgia tenuis*. *Biochim Biophys Acta.* 1073:56–64.
- Popescu O, Misevic GN. 1997. Self-recognition by proteoglycans. *Nature* 386:231–232.
- Saito H, Yamagata T, Suzuki S. 1968. Enzymatic methods for the determination of small quantities of isomeric chondroitin sulfate. *J Biol Chem.* 243:1542–1563.
- Silva LC, Mourão PA, Borojevic R. 1989. Patterns of sulfated glycosaminoglycan synthesis and accumulation in hepatic granulomas induced by schistosomal infection. *Exp Mol Pathol.* 50(3):411–20.
- Spillmann D, Burger MM. 1996. Carbohydrate–carbohydrate interactions in adhesion. *J Cell Biochem.* 61:562–568.
- Turley EA, Roth S. 1980. Interactions between the carbohydrate chains of hyaluronate and chondroitin sulfate. *Nature.* 283:268–271.
- Vieira RP, Mulloy B, Mourão PAS. 1991. Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber. Evidence for the presence of 3-O-sulfo-beta-D-glucuronosyl residues. *J Biol Chem.* 266:13530–13536.
- Vilanova E, Zilberberg C, Kochem M, Custódio MR, Mourão PAS. 2007. A novel biochemical method to distinguish cryptic species of genus *Chondrilla* (Demospongiae: Chondroidea) based on its sulfated polysaccharides. In: Custódio MR, Lôbo-Hajdu G, Hajdu E, Muricy G, editors. *Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability*. Rio de Janeiro (BR): Museu Nacional, Série Livros 28, p. 653–659.
- Wilson HV. 1907. On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. *J Exp Zool.* 5:245–258.
- Zieler MS, Mourão PAS. 2000. A wide diversity of sulfated polysaccharides are synthesized by different species of marine sponges. *Carbohydr Res.* 328:209–216.

Sulfated polysaccharides from marine sponges: conspicuous distribution among different cell types and involvement on formation of in vitro cell aggregates

Eduardo Vilanova · Cristiano Coutinho ·
Guilherme Maia · Paulo A. S. Mourão

Received: 14 January 2010 / Accepted: 5 March 2010 / Published online: 8 April 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Marine sponges (Porifera) display an ancestral type of cell-cell adhesion, based on carbohydrate-carbohydrate interaction. The aim of the present work was to investigate further details of this adhesion by using, as a model, the in vitro aggregation of dissociated sponge cells. Our results showed the participation of sulfated polysaccharides in this cell-cell interaction, as based on the following observations: (1) a variety of sponge cells contained similar sulfated polysaccharides as surface-associated molecules and as intracellular inclusions; (2) ^{35}S -sulfate metabolic labeling of dissociated sponge cells revealed that the majority (two thirds) of the total sulfated polysaccharide occurred as a cell-surface-associated molecule; (3) the aggregation process of dissociated sponge cells demanded the active *de novo* synthesis of sulfated polysaccharides, which ceased as cell aggregation reached a plateau; (4) the

typical well-organized aggregates of sponge cells, known as primmorphs, contained three cell types showing sulfated polysaccharides on their cell surface; (5) collagen fibrils were also produced by the primmorphs in order to fill the extracellular spaces of their inner portion and the external layer surrounding their entire surface. Our data have thus clarified the relevance of sulfated polysaccharides in this system of in vitro sponge cell aggregation. The molecular basis of this system has practical relevance, since the culture of sponge cells is necessary for the production of molecules with biotechnological applications.

Keywords Primmorphs · Cell culture · Aggregation factor · Proteoglycans · Collagen · Sponge, *Hymenacidon heliophila* (Porifera)

Introduction

Sponges (phylum Porifera) are an ancient group and probably the simplest animals among the metazoans. These invertebrates have been extensively studied in recent years in order to establish the cellular and molecular aspects of evolution from unicellular to multicellular animals (Custódio et al. 1998). The first model of cellular recognition and adhesion in animals was achieved with cells from marine sponges in the beginning of the last century (Wilson 1907). This model was based on the observation that dissociated cells from marine sponges go through an aggregation process, in a species-specific way, forming small cellular aggregates.

Cell-cell adhesion and recognition in sponges are mediated by proteoglycan-like molecules, named aggregation factors (Guerardel et al. 2004; Misevic et al. 2004). These molecules are composed of a protein core attached

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). We are also grateful to Dr. Radovan Borojevic for financial support.

E. Vilanova · P. A. S. Mourão (✉)
Laboratório de Tecido Conjuntivo, Hospital Universitário
Clementino Fraga Filho and Instituto de Bioquímica Médica,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil
e-mail: pmourao@bucoff.ufrj.br

E. Vilanova · C. Coutinho · G. Maia
Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular,
Instituto de Ciências Biomédicas,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

to several units of sulfated polysaccharides (Jarchow et al. 2000; Fernández-Busquets and Burger 2003). Both cell adhesion and recognition are effectively accomplished by the sulfated polysaccharide units of the aggregation factors (Jarchow et al. 2000; Vilanova et al. 2009). The homophilic interaction among these sulfated polysaccharides is calcium-dependent and highly species-specific (Zierer and Mourão 2000; Bucior and Burger 2004; Vilanova et al. 2007, 2009).

During the last few years, studies on sponges have had a distinct focus. A large number of natural products have been isolated from this invertebrate phylum, several of these products being presently in clinical or pre-clinical trials (Haefner 2003). However, the sponge biomass obtained directly from the ocean is not enough to supply the large scale demands of pharmaceutical researches (Osinga et al. 1999). Therefore, the "supply problem" is the major barrier for the development of drugs from bioactive sponge compounds (Belarbi et al. 2003). A promising method for producing bioactive compounds from sponges is cell culture, since this system is free of contaminants such as bacteria, yeasts, and protozoans and allows gene manipulations to optimize the production of bioactive metabolites (de Carak et al. 2007; Sun et al. 2007).

Nowadays, sponge cell cultures are performed with cells in suspension (Pomponi 2006) or multicellular aggregates, named primmorphs (Custódio et al. 1998; Müller et al. 1999). These structures are formed by dissociated sponge cells that naturally aggregate when incubated in sea-water (Custódio et al. 1998). Primmorphs are spherical cell aggregates composed of an external layer covered by a continuous pinacoderm. They contain a central zone filled with spherulous cells and archeocytes (Custódio et al. 1998). A smooth thin layer, probably composed by collagen fibers, surrounds the external pinacoderm (Sipkema et al. 2003). Primmorphs can be maintained in culture for several months (Sipkema et al. 2003).

Dissociated sponge cells lose their telomerase activity and, as a consequence, their ability to proliferate (Custódio et al. 1998; Kozioł et al. 1998). However, when these cells are assembled in primmorphs, they restore their telomerase activity and synthesize DNA, regaining their ability to grow and proliferate (Custódio et al. 1998). This shift from the non-proliferative to the proliferative state is related to the requirement of cell-cell contact for the sponge cells to restore their physiological environment (Custódio et al. 1998). Therefore, primmorphs represent an important step for the development of the cultivation of sponge cells (Zhang et al. 2003). In addition, the cultivation of primmorphs is feasible with several species of sponges, indicating the robustness of the technique (Sipkema et al. 2003; Zhang et al. 2003).

In the present study, we show that a variety of cell types from the sponge *H. heliophila* contain sulfated polysaccharides as surface-associated molecules and as intracellular inclusions. Most of our results are based on ^{35}S -sulfate metabolic incorporation and on histochemical examination. We also describe the dynamics of sulfated polysaccharide and collagen synthesis during the formation of primmorphs from dissociated cells of *H. heliophila*. These results are important for determining the role of sulfated polysaccharides on cell-cell adhesion and recognition during the diverse steps of in vitro cell aggregation of marine sponges. Our data may help to establish appropriate ways for the cultivation of sponge cells for future biotechnological applications.

Materials and methods

Sponge samples

The marine sponge *H. heliophila* was collected at Vermelha Beach, Rio de Janeiro, Brazil. Samples for extraction of sulfated polysaccharides were immediately fixed in 70% ethanol, whereas samples for cell culture were transported in sea water to the laboratory and maintained in an aquarium at 18°C until further use.

Extraction of sulfated polysaccharides

Samples of *H. heliophila* were cut into small pieces (1 mm³), washed with 70% ethanol, immersed three times in acetone, and dried at 60°C. Sulfated polysaccharides were extracted from the dried tissues (5 g) by extensive papain digestion, and the extracts were partially purified by cetylpyridinium and ethanol precipitations, as described for other invertebrate tissues (Vieira et al. 1991). Approximately 50 mg (dry weight) of crude extract was obtained.

Purification of sulfated polysaccharides

The crude extract of sulfated polysaccharides from *H. heliophila* (50 mg) was applied to a DEAE-cellulose column, equilibrated with 5 mM sodium acetate (pH 5.0) plus 10 mM EDTA (ethylenediamine tetra-acetic acid), linked to a fast performance liquid chromatography system. The polysaccharides were eluted from the column by using a linear gradient of 0–3 M NaCl, at a flow rate of 0.5 ml/min. Fractions of 0.5 ml were collected and checked by metachromatic assay with 1,9-dimethylmethylene blue (Famdale et al. 1986) and by measuring conductivity to estimate NaCl concentration. The fractions containing sulfated polysaccharides were pooled, dialyzed against distilled water, and lyophilized.

Agarose gel electrophoresis

Purified sulfated polysaccharides from *H. heliophila* were analyzed by agarose gel electrophoresis. The polysaccharides from the sponge (15 µg) and a mixture of standard glycosaminoglycans (dermatan sulfate, heparan sulfate, and chondroitin sulfate, 5 µg of each) were applied to a 0.5% agarose gel, and the electrophoresis was run for 1 h at 110 V in 0.05 M 1,3-diaminopropane-acetate (pH 9.0). The sulfated polysaccharides in the gel were fixed with 0.1% N-cetyl-N,N,N-trimethylammonium bromide solution. After 12 h, the gel was dried and stained with 0.1% toluidine blue in 0.1:5: 5 (v/v) acetic acid: ethanol:water.

Dissociation of sponge cells and formation of primmorphs

Tissues from *H. heliophila* were cut into small pieces (2–3 mm³), washed in natural sea water, and incubated with calcium-free and magnesium-free artificial sea water, supplemented with EDTA [CMFSW+E: 460 mM NaCl, 7 mM Na₂SO₄, 10 mM KCl, 10 mM HEPES (4-(2-hydroethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid), 2.5 mM EDTA, pH 8.2], as previously described (Custódio et al. 1998). After incubation, the cells were filtered through 40-µm mesh nylon net and harvested by centrifugation (80g, 10 min). The dissociated cells were maintained in CMFSW until further utilization. For the formation of primmorphs approximately 10⁹ cells from *H. heliophila* were maintained for up to 6 days in 5 ml filtered (0.22 µm mesh) seawater supplemented with 16 mg/l phenol red, 0.01 mg/ml kanamycin, and 0.01 mg/ml tylosin, as previously described (Custódio et al. 1998). We followed the formation of primmorphs by visual examination, and the cell cultures were photographed daily with a digital camera (Canon D20).

Histochemical examination of dissociated sponge cells and primmorphs

Dissociated cells from the sponge (5×10⁵ cells) and from the primmorphs (6×10⁴ cells) were fixed with 10% glutaraldehyde for 24 h at 4°C. The slides were prepared by using a cytocentrifuge (100 µl, 80g, 5 min). The cells were stained with 4% toluidine blue, pH 4.4, for 5 min and photographed via a microscope (Zeiss Axioscop 2). The cell aggregates were also analyzed by histochemical techniques. They were fixed with 10% glutaraldehyde for 24 h at 18°C, embedded in paraffin, and cut on a microtome (10 µm). In order to detect the presence of sulfated polysaccharides, the cell aggregates were stained with 4% toluidine blue, pH 4.4, for 5 min and photographed with a microscope (Zeiss Axioscop 2), the metachromasy observed

with the toluidine blue staining being specific for sulfated polysaccharide (Famdale et al. 1986; Aquino et al. 2005). To detect collagen, the cell aggregates were stained with picrosyrius red, for 90 min (Dolber and Spach 1993) and photographed with a fluorescence microscope (Zeiss Axioplan).

³⁵S-sulfate labeling and isolation of intracellular and membrane-associated-sulfated polysaccharides

Dissociated cells from *H. heliophila* (8×10²⁴ cells) were incubated for 24 h at 18°C in sulfate-free artificial seawater, supplemented with ³⁵S-sulfate (SFSW+³⁵S: 460 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, 2 mM NaHCO₃, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, and 100 µCi H₂³⁵SO₄, pH 8.2). After incubation, the medium was removed, and the cells were washed several times in CMFSW+E to remove free ³⁵S-sulfate. In order to isolate membrane-associated and intracellular sulfated polysaccharides, sponge cells were submitted to a mild trypsination for 12h, at 18°C, in a solution of CMFSW+E supplemented with 0.05% trypsin. Following this treatment, cells were harvested by centrifugation (250g, 10 min). The supernatant, containing membrane-associated sulfated polysaccharides, was collected, dialyzed against distilled water, and lyophilized. The cell pellet, containing intracellular sulfated polysaccharides, was washed in CMFSW+E, immersed in acetone, and dried at 60°C. Both the supernatant and the cell pellet were submitted to extensive papain digestion, and the extracts were partially purified by ethanol precipitation. The membrane-associated and intracellular ³⁵S-sulfated polysaccharides were purified by using anion-exchange chromatography, as described above. The fractions were checked for ³⁵S-radioactivity by using 5 ml 0.5% POP/toluene solution in a Beckman model LS 6000SC scintillation counter (Silva et al. 1989).

³⁵S-sulfate labeling of sulfated polysaccharides during formation of primmorphs

In order to determine the synthesis of sulfated polysaccharides during the formation of primmorphs, the media of three cell cultures were changed from filtered seawater to SFSW+³⁵S on each one of the 5 days of culture. After incubation for 24 h at 18°C, the media were removed, and the cell aggregates exhaustively washed with CMFSW+E to remove free ³⁵S-sulfate. The cell aggregates were harvested by centrifugation (80g, 10 min) and immersed in acetone. ³⁵S-sulfated polysaccharides were extracted from the cells by using papain, as described above. The ³⁵S-sulfated polysaccharides were purified by anion-exchange chromatography, and the fractions were checked for the amount of ³⁵S-radioactivity.

Results and discussion

Marine sponge *H. heliophila* has a single population of sulfated polysaccharides

Sulfated polysaccharide from *H. heliophila* was eluted with approximately 0.6 M NaCl by anion-exchange chromatography (Fig. 1a). Agarose gel electrophoresis confirmed the purity of this sulfated polysaccharide, since a single band was observed, with a mobility distinct from standard vertebrate glycosaminoglycans (Fig. 1b). The purified sulfated polysaccharide from *H. heliophila* contained galactose, fucose, hexuronic acid, and a low sulfate content (not shown, see also Zierer and Mourão 2000; Vilanova et al. 2009). Zierer and Mourão (2000) observed two bands following agarose gel electrophoresis of purified polysaccharides from *H. heliophila*. This discrepancy might be a consequence of the partial degradation of the purified polysaccharide. Sulfated fucose residues, as found in sponge polysaccharide, form glycosidic linkages that are highly susceptible to hydrolysis (Vieira et al. 1991), and thus special care is required during the storage of the sulfated polysaccharide solution.

Cells from *H. heliophila* have membrane-associated and intracellular sulfated polysaccharides

We found 12 morphologically distinct cell types among the dissociated cells from tissues of the sponge *H. heliophila*. Eight cell types were identified as globoferous cells,

archoocytes, scleroocytes, collencytes, choanocytes, lophocytes, pinacocytes, and polyblasts, based on a comparison with the literature (Custódio et al. 2004). Typical staining of these cells with toluidine blue is shown in Fig. 2a, c, d, g, i–l, respectively. Four other cell types were not identified, and their staining with toluidine blue is shown in Fig. 2b, e, f, h. A definitive identification of these cell types requires more refined morphological analysis. However, in spite of the variable morphological aspects of the sponge cells, they always showed intense metachromasy at the cell surface, denoting the presence of sulfated polysaccharides. In addition, some cell types contained intracellular inclusions, with intense metachromasy, indicating the accumulation of sulfated polysaccharides as intracellular granules. This was clearly observed in cells similar to globoferous cells (Fig. 2a) and archoocytes (Fig. 2c) and in the unknown cell type shown in Fig. 2e (see arrows).

In order to confirm the presence of sulfated polysaccharides as intracellular inclusions, we submitted the dissociated cells to metabolic labeling with ^{35}S -sulfate, followed by mild trypsinization. This procedure separates membrane-associated and intracellular ^{35}S -sulfated polysaccharides. The experiment was carried out with a mixture of cell types, as shown in Fig. 2, since their separation was not feasible. After mild trypsinization, the cells lost their metachromasy at the cell surface (data not shown). The membrane-associated and intracellular ^{35}S -sulfated polysaccharides were eluted from the DEAE-cellulose column with the same NaCl concentration (Fig. 3), similar to that observed for the elution of the sulfated polysaccharide

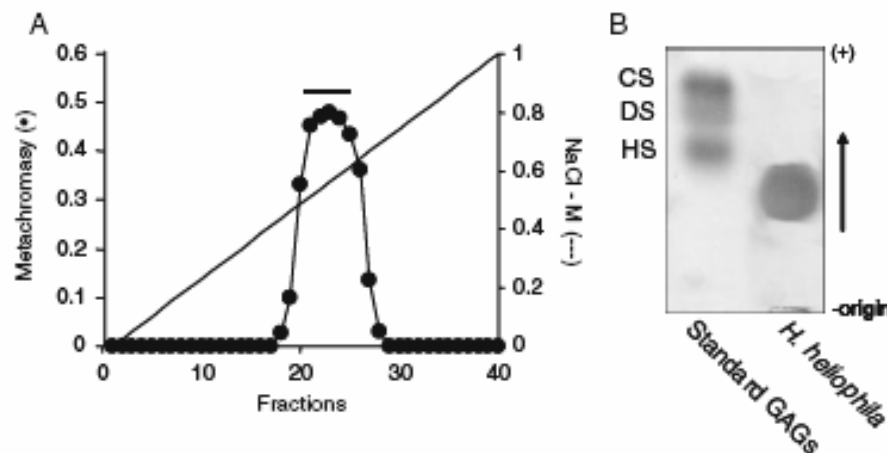


Fig. 1 Purification of the sulfated polysaccharide from *H. heliophila*. **a** Total polysaccharide extracted from *H. heliophila* tissues was purified by ion exchange chromatography on DEAE-cellulose. Fractions were checked for the presence of sulfated polysaccharide by metachromasy (filled circles) and for NaCl concentration by conductivity (solid line). Fractions indicated by a horizontal bar were pooled, dialyzed against distilled water, and lyophilized. **b** Purified

sulfated polysaccharide from *H. heliophila* (15 μg) and a mixture of the glycosaminoglycans (GAGs), heparan sulfate (HS), dermatan sulfate (DS), and chondroitin sulfate (CS) were applied (5 μg of each) to an agarose gel and submitted to 110 V for 1 h in 1,3-diaminopropane-acetate (pH 9.0). The sulfated polysaccharides were fixed in the gel with *N*-cetyl-*N,N,N*-trimethylammonium bromide solution for 12 h. The gel was dried and stained with 0.1% toluidine blue

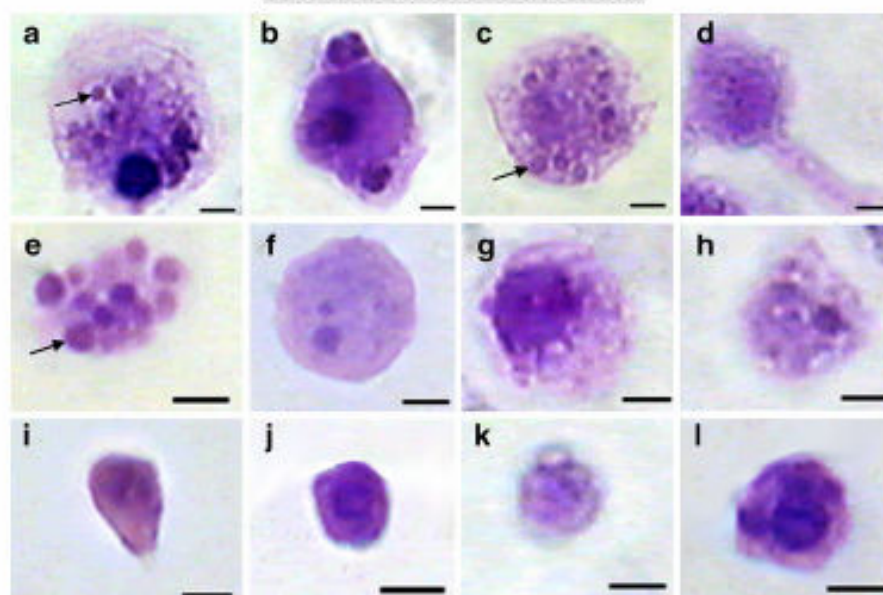


Fig. 2 Typical staining of twelve cell types from *H. heliophila* with toluidine blue. Dissociated cells ($\sim 5 \times 10^7$ cells) from the sponge were fixed with 10% glutaraldehyde for 24 h at 4°C. The slides were prepared by using a cytocentrifuge (100 μ l, 80g, 5 min). The cells were stained with 4% toluidine blue, pH 4.4, for 5 min. Eight cell types were tentatively identified as globoferous cells (a), archeocytes

(c), sclerocytes (d), collencytes (g), choanocytes (i), lophocytes (j), pinacocytes (k), and polyblasts (l). The four cell types shown in h, e, f, h could not be identified based on comparisons with data in the literature. A more definitive identification of these cells requires a more detailed morphological analysis (arrows in a, c, e intracellular inclusions stained with the same dye). Bars 5 μ m

extracted from whole sponge (Fig. 1). These results suggested a similarity between membrane-associated and intracellular sulfated polysaccharides. The integration of the chromatography peaks showed that the membrane-associated

and intracellular ^{35}S -sulfated polysaccharides were 66% and 34% of the total incorporated ^{35}S -radioactivity, respectively. Therefore, approximately one third of the sulfated polysaccharides of *H. heliophila* was possibly found as intracellular inclusions and another two thirds as surface-associated molecules.

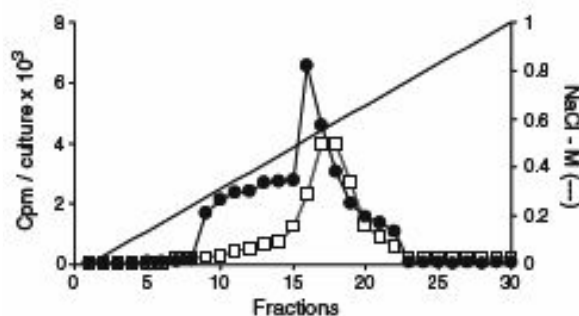


Fig. 3 Anion-exchange chromatography of ^{35}S -sulfated polysaccharides from cells of *H. heliophila*. Dissociated sponge cells ($\sim 8 \times 10^6$ cells) were incubated for 24 h at 18°C in sulfate-free artificial seawater supplemented with ^{35}S -sulfate (SFSW+ ^{35}S , 100 μ Ci). After incubation, the cells were washed and submitted to a mild trypsinization (0.05% trypsin) for 12 h, at 18°C. The supernatant, containing membrane-associated sulfated polysaccharides (filled circles), and the cell pellet, containing intracellular sulfated polysaccharides (open squares) were submitted to extensive papain digestion and purified by anion-exchange chromatography (DEAE-cellulose). The fractions were examined for the amount of ^{35}S -radioactivity (cpm) in the POP/bohene solution by using a scintillation counter

Membrane-associated sulfated polysaccharides in sponge cells are probably linked to the aggregation factor (Jarchow et al. 2000; Fernández-Busquets and Burger 2003). However, the function of intracellular sulfated polysaccharides is not clear (Cavalcante et al. 1999; Kolset and Tveit 2008). A possible explanation for the presence of intracellular sulfated polysaccharides in archeocytes and globoferous cells is that these cells actively phagocytose other apoptotic cells from the sponge (Krieger and Herz 1994; Custódio et al. 1998). In this case, the intracellular inclusions contain sulfated polysaccharides accumulated in phagosomes from phagocytosed cells of the sponge itself.

Synthesis of ^{35}S -sulfated polysaccharides decreases during primmorph formation

We investigated the synthesis of sulfated polysaccharides during the *in vitro* aggregation of sponge cells (Fig. 4). On the first day, dissociated sponge cells aggregated actively, forming small irregular aggregates (Vilanova et al. 2009).

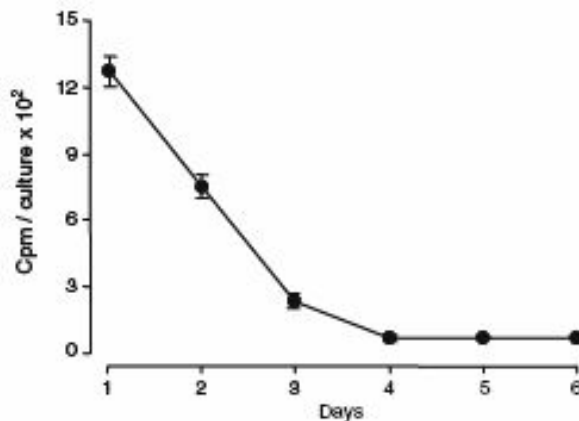


Fig. 4 Parallel between synthesis of sulfated polysaccharides and formation of primmorphs by cells from *H. heliophila*. Dissociated cells were maintained in culture for up to 6 days in filtered sea water. Within each 24-h period, a set of cell cultures were transferred from the medium with filtered sea water to a medium with sulfate-free artificial sea water supplemented with ³⁵S-sulfate (100 μ Ci), in order to measure the synthesis of sulfated polysaccharides. The ³⁵S-sulfated polysaccharides were purified by ion exchange chromatography on DEAE-cellulose. Fractions were examined for the amount of radioactivity in a POP/toluene solution by using a scintillation counter. Results are mean \pm SD, $n=3$ at each 24 h-period of cell culture

This step of active cell aggregation demands *de novo* synthesis of sulfated polysaccharides, as indicated by the high incorporation of ³⁵S-sulfate into these molecules (Fig. 4). On the second and third days, small cell aggregates connected with each other to form larger aggregates (Vilanova et al. 2009). During this step, cells still synthesized *de novo* sulfated polysaccharides, but at a decreased rate (Fig. 4). On the fourth and fifth days, the cell aggregates stopped interconnecting and increasing in size and exhibited the round shape and smooth surface characterizing typical primmorphs. At this final step of

primmorph formation, the synthesis of sulfated polysaccharides decreased dramatically to <1000 cpm/culture (Fig. 4). Despite the decrease in *de novo* synthesis of sulfated polysaccharides, the aggregates at all stages of primmorph formation had intense metachromasy (Fig. 5), denoting the constant presence of sulfated polysaccharides.

Our interpretation of these results is that aggregation of the dissociated cells demands active *de novo* synthesis of sulfated polysaccharides, as occurs in the first two days of primmorph formation. After the third day, the formation of cell aggregates reaches a plateau. At this stage, the *de novo* synthesis of sulfated polysaccharides is not necessary to promote further adhesion of the sponge cells. These results are in agreement with the key role of sulfated polysaccharides in cell-cell adhesion and recognition in marine sponges (Jarchow et al. 2000; Bucior and Burger 2004; Vilanova et al. 2009). These molecules have an essential role in the process of aggregation in primary cell cultures of these organisms.

Primmorphs of *H. heliophila* have three distinct cell types

We examined the primmorphs after 6 days of *in vitro* aggregation by using detailed histological examination after staining with toluidine blue and picrosirius red (Fig. 6a, b, respectively). During this initial analysis, we clearly observed the presence of lophocytes on the primmorphs (arrows in Fig. 6a–c). For a more refined identification of the types of cells found in the primmorphs, the cells were dissociated, and their morphologies were determined histologically (Fig. 6c). Three distinct cell types were preliminarily identified: archeocytes, lophocytes, and pinacocytes. The archeocytes were conspicuous cells found on the primmorphs (Fig. 6d) and were widely distributed in their inner portion. We identified archeocytes based on their characteristic morphology: large cells containing several

Fig. 5 Staining of cell aggregates from *H. heliophila* with toluidine blue. Cell aggregates at 0 (a), 24 h (b), 48 h (c), 72 h (d), 96 h (e), and 120 h (f) were fixed with 10% glutaraldehyde, embedded in paraffin, and cut on a microtome (10 μ m). The slides were stained with 4% toluidine blue, pH 4.4, for 5 min (arrow in f pinacoderm. Bars 100 μ m (a), 50 μ m (b–f))

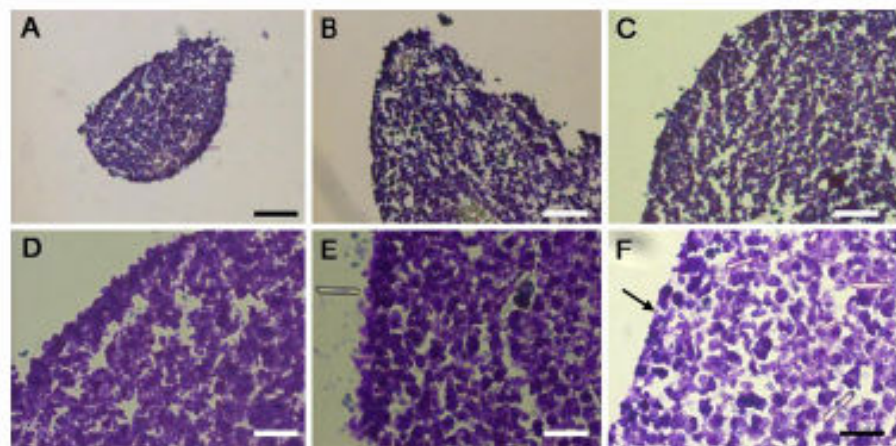
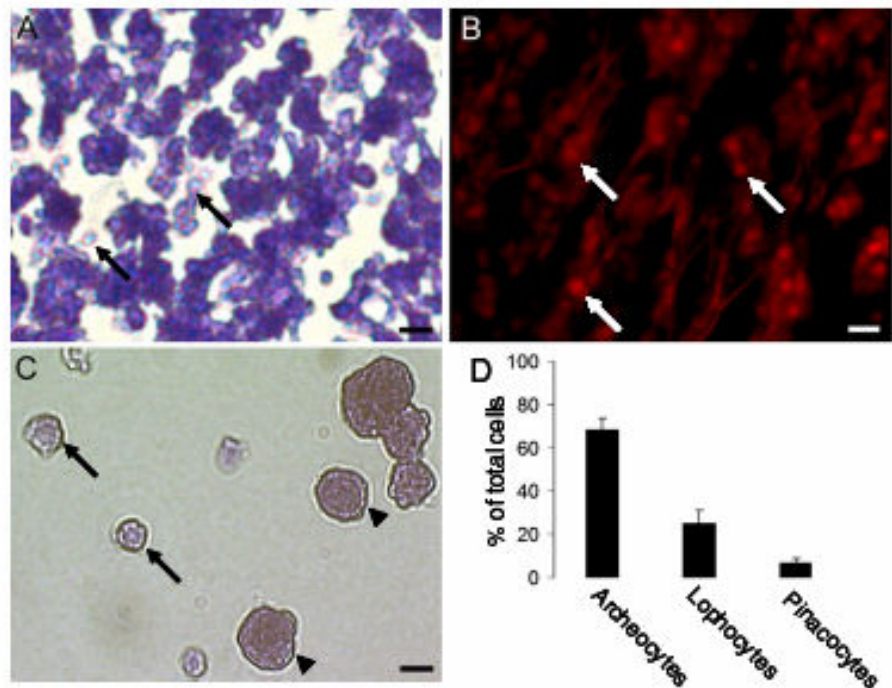


Fig. 6 Types of cells found in the primmorphs formed from *H. heliophila*. The primmorphs were fixed with 10% glutaraldehyde, embedded in paraffin, cut on a microtome, and stained with either toluidine blue (a) or picrosirius red (b). Note the presence of lophocytes (arrows in a, b). Cells ($\sim 6 \times 10^6$) from the primmorphs were dissociated in CMPSW + E, counted in a Neubauer chamber, fixed with glutaraldehyde, cytocentrifuged, and stained with 4% toluidine blue (c). Note the lophocytes (arrows) and archeocytes (arrowheads). The cell composition of the primmorphs (mean \pm SD) is shown in d. Bars 20 μ m (a, b), 10 μ m (c)



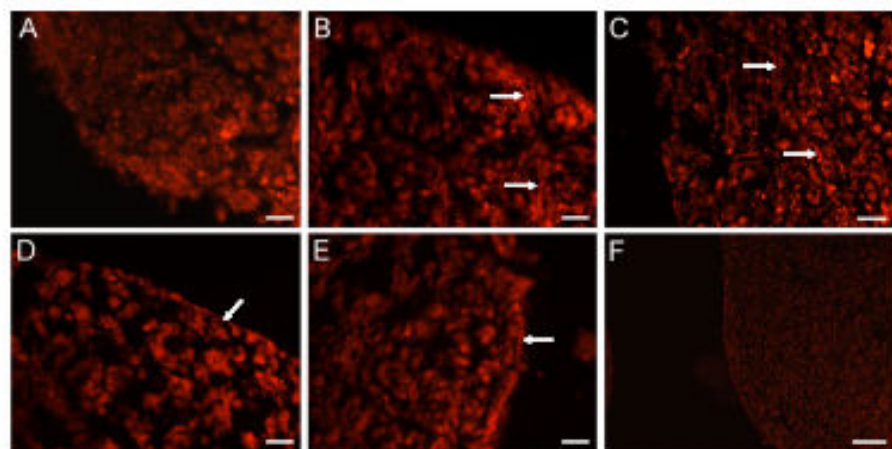
inclusions and a well-defined border (arrowheads in Fig. 6c), as reported previously (Custódio et al. 2004; Zhang et al. 2003; Sun et al. 2007). These archeocytes are possibly totipotent cells, as suggested in previous studies (Custódio et al. 1998; Sipkema et al. 2003; Zhang et al. 2003; Sun et al. 2007). A more definitive identification of these cells requires further morphological analyses.

The second most abundant cells found in the primmorphs were the lophocytes (Fig. 6d). These cells were also present in the inner portion of the primmorphs. They were small and spherical and had a regular shape (arrows in Fig. 6c), as reported previously (Custódio et al. 2004). The

main function of these cells seems to be to secrete collagen (Garrone 1978; Sun et al. 2007). Positive staining with picrosirius red (Fig. 6b) indicated that, indeed, these cells were associated with collagen secretion.

Pinacocytes account for only approximately 7% of the cells of primmorphs. The identification of these cells was difficult because they became irregular during centrifugation. However, histological examination of the non-dissociated primmorph clearly showed the presence of these cells (Fig. 5f), as in previous studies (Custódio et al. 1998; Sipkema et al. 2003; Zhang et al. 2003; Sun et al. 2007). These three types of cell exhibited intense metachromasy on their cell surfaces,

Fig. 7 Staining of cell aggregates from *H. heliophila* with picrosirius red. Cell aggregates forming after 24 h (a), 48 h (b), 72 h (c), 96 h (d), and 120 h (e, f) were fixed with 10% glutaraldehyde, embedded in paraffin, cut on a microtome (10 μ m), and stained with picrosirius red for 90 min (arrows in b, c collagen fibrils, arrows in e, f collagen external layer). Bars 50 μ m (a–e), 100 μ m (f)



indicating the presence of sulfated polysaccharides (Fig. 6c). Therefore, we can conclude that newly formed (6 days) primmorphs of the sponge *H. heliophila* have three distinct cell types, indicating they are complex structures.

Collagen de novo synthesis in primmorphs

Primmorphs stained with pycrosirius red at various stages of their formation showed *de novo* synthesis of collagen (Fig. 7). In the first 24 h, the collagen fibers were not organized within the cell aggregates, and only a diffuse staining was observed (Fig. 7a). Starting at 48 h, the sponge cell aggregates showed collagen fibrils distributed along their inner portion (arrows in Fig. 7b, c). Finally, after 96 hours, we could visualize an external collagen layer (arrows in Fig. 7d–f). Newly formed primmorphs therefore had collagen fibrils filling the extracellular spaces of their inner portions and a collagen external layer surrounding their entire surface.

Collagen performs several biological functions in sponges, e.g., it is a component of the skeleton, associated with the pinacoderm and structures in the extracellular matrix (Exposito et al. 1991; Aouacheria et al. 2006). Collagens from sponges are short-chain proteins, related to collagen IV (Aouacheria et al. 2006). The presence of collagen in primmorphs has previously been described (Krasco et al. 2000; Schröder et al. 2000; Sipkema et al. 2003; Zhang et al. 2003). Sipkema et al. (2003) have speculated that the thin layer surrounding the external pinacoderm of primmorphs is composed of collagen. We confirm here the collagenous nature of this layer. The function of this external collagen layer is probably related to mechanical protection of the pinacoderm of the primmorph. The type or family of collagen synthesized by primmorphs is unknown and requires further investigation.

The presence of collagen fibrils in the inner portion of the primmorph of the sponge *Hymeniacidon perleve* has only been detected after 10 days of cultivation (Zhang et al. 2003). Here, we have detected the early synthesis of collagen fibrils in the initial steps of primmorph formation. These collagen fibrils fill the extracellular spaces of the primmorphs and are probably associated with the structural integrity of the primmorphs.

Major conclusions

Several types of sponge cells contain sulfated polysaccharides as surface-associated molecules and as intracellular inclusions. When these cells are dissociated and cultivated in vitro, they actively aggregate forming primmorphs. These typical well-organized aggregates contain three cell types: archeocytes, lophocytes, and pinacocytes. Aggregation of the dissociated cells demands active *de novo* synthesis of

sulfated polysaccharides, which ceases when cell aggregation reaches a plateau. Collagen fibrils are also formed by the primmorphs to fill the extracellular spaces of their inner portion and the external layer surrounding their entire surface.

We have investigated in detail the participation of sulfated polysaccharides in an ancestral type of cell-cell interaction, as observed in a marine sponge, by using the in vitro aggregation of dissociated cells to form primmorphs as a model. Our data might help to establish appropriate ways for the cultivation of sponge cells, with future biotechnological applications.

Acknowledgment We thank Adriana Piquet for technical assistance, Dr. Maria Christina de Mello for help with the revision of the manuscript, Dr. Marcio Custódio for help with the cell cultures, and Dr. Radovan Borojevic for intellectual support.

References

- Aouacheria A, Geourjon C, Aghajari N, Navrátil V, Delaé G, Lethias C, Exposito J (2006) Insights into early extracellular matrix evolution: spongin short chain collagen-related proteins are homologous to basement membrane type IV collagens and form a novel family widely distributed in invertebrates. *Mol Biol Evol* 23:2288–2302
- Aquino RS, Landeira-Fernandez AM, Valente AP, Andrade LR, Mourão PAS (2005) Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms. Evolutionary implications. *Glycobiology* 15:11–20
- Belarbi EH, Gomez AC, Chisti Y, Camacho GF, Grima EM (2003) Producing drugs from marine sponges. *Biotechnol Adv* 21:585–598
- Bucior I, Burger M (2004) Carbohydrate-carbohydrate interaction as a major force initiating cell-cell recognition. *Glycoconjugate J* 21:111–123
- Carat S de, Uriz MI, Wijffels RH (2007) Cell culture from sponges: pluripotency and immortality. *Trends Biotechnol* 25:467–471
- Cavalcante MCM, Mourão PAS, Pavão MSG (1999) Isolation and characterization of a highly sulfated heparan sulfate from ascidian test cells. *Biochem Biophys Acta* 1428:77–87
- Custódio MR, Prokic I, Steffen R, Koziol C, Borojevic R, Brummer F, Nickel M, Müller WE (1998) Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and cell death. *Mech Ageing Dev* 105:45–59
- Custódio MR, Hajdu E, Muricy G (2004) Cellular dynamics of in vitro reactions of *Hymeniacidon heliophila* (Demospongiae, Halicondrida). *Mar Biol* 144:999–1010
- Dolber PC, Spach MS (1993) Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart. *J Histochem Cytochem* 41:465–479
- Exposito JY, Le Guellec D, Lu Q, Garrone R (1991) Short chain collagens in sponges are encoded by a family of closely related genes. *J Biol Chem* 266:21923–21928
- Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ (1986) Improved quantification and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta* 883:173–177
- Fernández-Busquets X, Burger MM (2003) Circular proteoglycans from sponges: first members of spongican family. *Cell Mol Life Sci* 60:88–112
- Garrone R (1978) *Phylogeneses of connective tissue*. Karger, Basel
- Guerardel Y, Czeszak X, Sumanovski LT, Karamanos Y, Popescu O, Strecker G, Misevic GN (2004) Molecular fingerprinting of

- carbohydrate structure phenotypes of three porifera proteoglycan-like glycoconectins. *J Biol Chem* 279:15591–15603
- Haefner B (2003) Drugs from the deep: marine natural products as drugs candidates. *Drug Discovery Today* 8:536–544
- Jarchow J, Fritz J, Anselmetti D, Calabro A, Hascall VC, Gerosa D (2000) Supramolecular structure of a new family of circular proteoglycans mediating cell adhesion in sponges. *J Struct Biol* 132:95–105
- Kolset SO, Tveit H (2008) Serglycin—structure and biology. *Cell Mol Life Sci* 78:1073–1085
- Kozioł C, Borojevic R, Steffen R, Müller WE (1998) Sponges (Porifera) model systems to study the shift from immortal to senescent somatic cells: the telomerase activity in somatic cells. *Mech Ageing Dev* 100:107–120
- Krasiko A, Lorenz B, Batel R, Schröder HC, Müller IM, Müller WE (2000) Expression of silicatein and collagen genes in the marine sponge *Suberites domuncula* is controlled by silicate and myotrophin. *Eur J Biochem* 267:4878–4887
- Krieger M, Herz J (1994) Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* 63:601–637
- Misevic GN, Guenardel Y, Sumanovski LT, Slomianny MC, Demary M, Ripoll C, Karananos Y, Mäes E, Popescu O, Streckler G (2004) Molecular recognition between glycoconectins as an adhesion self-assembly pathway to multicellularity. *J Biol Chem* 279:15579–15590
- Müller WE, Wiens M, Batel R, Steffen R, Borojevic R, Custódio MR (1999) Establishment of a primary cell culture from a sponge: primmorphs from *Suberites domuncula*. *Marine Ecol Prog Ser* 178:205–219
- Osinga R, Tramper J, Wijffels RH (1999) Cultivation of marine sponges. *Mar Biotechnol* 1:509–532
- Pomponi SA (2006) Biology of the Porifera: cell culture. *Can J Zool* 84:167–174
- Silva LC, Mourão PA, Borojevic R (1989) Patterns of sulfated glycosaminoglycan synthesis and accumulation in hepatic granulomas induced by schistosomal infection. *Exp Mol Pathol* 50:411–420
- Sipkema D, Wielink R van, Lammeren AAM van, Tramper J, Osinga R, Wijffels RH (2003) Primmorphs from seven marine sponges: formation and structure. *J Biotechnol* 100:127–139
- Schröder HC, Krasiko A, Batel R, Skorokhod A, Pähler S, Kruse M, Müller IM, Müller WE (2000) Stimulation of protein (collagen) synthesis in sponge cells by a cardiac myotrophin related molecule from *Suberites domuncula*. *FASEB J* 14:2022–2031
- Sun L, Song Y, Qu Y, Yu X, Zhang W (2007) Purification and in vitro cultivation of archaeocytes (stem cells) of the marine sponge *Hymeniacidon perleve* (Demospongiae). *Cell Tissue Res* 328:223–237
- Vieira RP, Mulloy B, Mourão PAS (1991) Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber. Evidence for the presence of 3-O-sulfo-beta-D glucuronosyl residues. *J Biol Chem* 266:13530–13536
- Vilanova E, Zilberberg C, Kochem M, Custódio MR, Mourão PAS (2007) A novel biochemical method to distinguish cryptic species of genus *Chondrilla* (Demospongiae: Chondrosida) based on its sulfated polysaccharides. In: Custódio MR, Lôbo-Hajdu G, Hajdu E, Muricy G (eds) Porifera research: biodiversity, innovation and sustainability. Museu Nacional, Série Livros 28, Rio de Janeiro, pp 653–659
- Vilanova E, Coutinho CC, Mourão PAS (2009) Sulfated polysaccharides from marine sponges (Porifera): an ancestor cell-cell adhesion event based on carbohydrate-carbohydrate interaction. *Glycobiology* 19:860–867
- Wilson HV (1907) On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. *J Exp Zool* 5:245–258
- Zhang XY, Cao XP, Zhang W, Yu X, Jin M (2003) Primmorphs from archaeocytes: dominant cell population of the sponge *Hymeniacidon perleve*: improved cell proliferation and spiculogenesis. *Biotechnol Bioeng* 84:583–590
- Zierer MS, Mourão PAS (2000) A wide diversity of sulfated polysaccharides are synthesized by different species of marine sponges. *Carbohydrate Res* 328:209–216

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](#)