



**SANDRO MASCENA GOMES FILHO**



**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE UMA  
LECTINA DA ESPONJA MARINHA *Aplysina fulva* (AFL).**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR**

**JOÃO PESSOA**

**2014**

**SANDRO MASCENA GOMES FILHO**

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE UMA  
LECTINA DA ESPONJA MARINHA *Aplysina fulva* (AFL).**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas da Natureza da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**.

**Orientador:**

Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha

**JOÃO PESSOA – PB  
2014**

G633p Gomes Filho, Sandro Mascena.

*Purificação, caracterização e atividades biológicas de uma lectina da esponja marinha Aplysina fulva (AFL) / Sandro Mascena Gomes Filho.-- João Pessoa, 2014.*

78f. : il.

Orientador: Carlos Alberto de Almeida Gadelha

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN

1. *Biologia celular e molecular.* 2. *Esponja marinha.*  
3. *Aplysina fulva.* 4. *Lectinas.* 5. *Atividades antibacteriana*

**Sandro Mascena Gomes Filho**

Dissertação de Mestrado avaliada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal da Paraíba

Orientador



Profa. Dra. Jozi Godoy Figueiredo

Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia

Examinadora Externa

---

Prof. Dr. Juscélio Donizete Cardoso

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal da Paraíba

Examinador Interno

---

Prof. Dr. Clayton Zambeli Oliveira

Departamento de Biologia Molecular

Universidade Federal da Paraíba

Suplente

## DEDICATÓRIA

A minha mãe Gírlândia Barbosa, por sempre ter me mostrado a vida de fato como ela é, ter me feito viver para aprender a seguir os melhores caminhos para a vida e principalmente pelo amor incondicional.

A minha irmã Katarine Mascena, pelo carinho e admiração.

Ao meu pai Sandro Mascena, que nos deixou cedo mas que sempre esteve nos nossos corações.

Amo todos vocês!

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, inteligência suprema e causa primária de todas as coisas pela oportunidade dada de crescer em todos os aspectos.

A CAPES pelo auxílio concedido durante a realização deste curso de pós-graduação. Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPB.

Agradeço a minha família por serem minha eterna fonte de busca de forças para sempre procurar o melhor para todos nós. Amo vocês!

Ao meu orientador, Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha, por ter me recebido muito bem em seu laboratório, pela amizade, companheirismo por ter me introduzido na química de proteínas, pela paciência, ensinamentos sobre a pesquisa, vida acadêmica um pouco além da bancada e por muitas vezes ser mais que um orientador. Serei eternamente grato.

A professora Dra. Tatiane Santi Gadelha, pela ajuda cedida e sempre disponível para discutirmos os resultados, tudo isso foi muito importante. Obrigado!

A minha amiga Katya Anaya, que durante muitos dias, noites e madrugadas no laboratório me apoiou, me ensinou o que podia, me corrigiu nos meus erros, pela paciência em muitos momentos e por estar comigo na tristeza, felicidade e aperreios. Muito obrigado por tudo Katya, você também contribui para minha formação.

A Edilza, pela amizade e por todos os momentos de felicidade, tristeza e aperreio de ajuda e conversas no laboratório. Muito obrigado.

A Thalles Lacerda, Rodrigo Lacerda e Juscélio Cardoso por sempre ter estado disponível para ajudar quando necessário.

Aos meus amigos e amigas do Laboratório de Farmacologia Funcional, Iara e Luiz.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Proteômica e Estrutural (LAPROTE) e Laboratório de Bioquímica Genética e Radiobiologia (BioGeR) pela ajuda e por todas as vivências.

A minha amiga Layanne Cabral por ter sempre me ouvido, apoiado, aconselhado e acompanhado tudo desde do início. Obrigado Layanne, você é uma das pessoas que quero levar comigo sempre!

Aos meus amigos da turma do mestrado, Derek, Layanne, Theresa Rachel, Maria Talita, Pamella Kelly e Isis por serem os melhores, sem vocês com certeza o mestrado não teria sido o mesmo, vocês foram e serão felicidade nas minhas lembranças!

A minha amiga e meia irmã Raquel Carvalho, que foi de suma importância para tudo isso, sem ela provavelmente este mestrado não teria iniciado. Muito obrigado também pela sinceridade e amizade!

Ao Geraldo Almeida por ser chave para que tudo isso acontecesse. Obrigado pela oportunidade!

A Vanessa Lacerda, por ser uma das minhas melhores amigas, por sempre me passar essa energia ótima que ela tem. Obrigado por me fazer feliz mesmo quando eu estava chorando, literalmente. Adoro-te!

A Cleiton Rodrigues, pela amizade, companheirismo e força em todos os momentos, obrigado por ter feito parte disso tudo.

Aos meus amigos: Diogo Marques, Felipe Almeida e Daniel Vasconcelos por serem sempre os melhores e compreenderem um pouco da minha ausência nestes momentos.

A Laís Danielle, pela amizade!

Aos meus amigos, Marcus Vinícius, Thuane Carvalho, Isabella Laurindo pela amizade e carinho!

A minha amiga, Morgana Laís uma das minhas amigas mais antigas que tenho carinho que desde quando surgiu em 2001 até hoje não mudou. Obrigado por fazer parte de muitos dos meus momentos.

Aos meus amigos, Otacílio Cipriano e Rayane Cipriano pela amizade.

A Rayanne Oliveira por ser essa linda que mesmo um pouco distante faz parte do meu coração.

A Tarciano Siqueira, meu amigão que me acompanhou na graduação e mesmo longe ainda tenho admiração.

Aos amigos, Nilberto Dias, Guilherme Araújo, Matias Neto, Radmácyo Gomes, Diógenes Ferreira, André Santana e Aianne Brito por fazerem parte das minhas melhores lembranças!

## RESUMO

Uma nova lectina foi purificada e caracterizada a partir da esponja marinha *Aplysina fulva* (AFL). O extrato bruto foi produzido a partir da solubilização de proteínas em solução tampão Tris HCl 0,1 M pH 7,4 NaCl 0,15 M, sendo este utilizado na realização dos ensaios de atividade hemaglutinante e dosagem de proteínas pelo método de Bradford. O primeiro passo de purificação de AFL foi por meio de cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose CL 4B. O pico não retido foi eluído com o mesmo tampão de extração e o pico retido foi eluído com tampão Glicina 0,1 M pH 2,6 NaCl 0,15 M. O mesmo foi dialisado, liofilizado e ressuspendido em Tris HCl 0,025 M pH 7,6 e submetido a cromatografia de troca iônica em DEAE Sephacel. A análise do pico retido da DEAE Sephacel por eletroforese nativa em gel de poliacrilamida (PAGE) mostrou a presença de uma única banda com aproximadamente 57 kDa, como também uma única banda com aproximadamente em 27,5 kDa em presença de SDS (PAGE-SDS). A nova lectina apresenta uma grande quantidade de aminoácidos hidrofóbicos, mostrando-se resistente a altas temperaturas e com melhor atividade hemaglutinante na faixa de pH neutro a alcalino. AFL foi capaz de inibir o crescimento de cepas de *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *C. tropicalis*. A nova lectina não apresentou efeitos tóxicos para células de câncer de mama, entretanto mostrou-se hábil em aglutinar formas promastigotas de *Leishmania brasiliensis* através do reconhecimento de galactose em sua superfície.

Palavras chaves: Esponja marinha, *Aplysina fulva*, Lectinas, Atividade antibacteriana, Atividade antifúngica, *Leishmania brasiliensis*.

## ABSTRACT

A new lectin was purified and characterized from marine sponge *Aplysina fulva* (AFL). The crude extract was obtained with Tris HCl 0.1 M pH 7.4 containing NaCl 0.15 M buffer. Haemagglutinating activity detection and soluble protein measurement were performed with the crude extract and after each purification step. Isolation of AFL was performed by affinity chromatography in Sepharose CL 4B column, and the retained peak was applied in a DEAE Sephacel ion exchange chromatography column. Analysis of DEAE Sephacel retained peak on polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) showed the presence of a single band with approximately 27.5 kDa. Under non-denaturing conditions it shows the presence of a single 57 kDa band. The novel lectin showed large amount of hydrophobic amino acids, high temperatures resistance and better hemagglutination activity in the range of neutral to alkaline pHs. AFL was able to inhibit the growth of strains of *P. aeruginosa*, *C. albicans* and *C. tropicalis*. The lectin did not show toxic effects on cells of breast cancer, but had agglutination effect on *Leishmania brasiliensis* promastigotes by recognizing galactose residues on its surface.

Key words: Marine sponges, *Aplysina fulva*, Lectins, antibacterial, antifungal and *Leishmania brasiliensis*

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
1.2 Prefácio.....	15
1.3 Contextos Históricos.....	16
1.4 Classificação das Lectinas.....	17
1.5 Distribuição nos Organismos.....	24
1.6 Esponjas Marinhas.....	24
1.7 Lectinas de Esponjas Marinhas.....	26
1.8 Aplicações.....	29
1.9 <i>Leishmania sp</i> e Carboidratos de Superfície.....	31
2 OBJETIVOS .....	33
2.1 Objetivos Gerais.....	33
2.2 Objetivos Específicos .....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 Coleta de Material Biológico.....	34
3.2 Preparo da Amostra e Extração de Proteínas Solúveis.....	34
3.3 Preparo das Hemácias.....	34
3.4 Dosagem de Proteínas Solúveis.....	35
3.5 Determinação da Atividade Hemaglutinante.....	35
3.6 Especificidade por Açúcar.....	35
3.7 Efeito da Temperatura Sobre a Atividade da Lectina.....	36
3.8 Efeito do pH sobre a Atividade da Lectina.....	36
3.9 Cromatografia de Afinidade.....	36
3.10 Cromatografia de Troca Iônica.....	37

3.11 Exclusão Molecular em BioGel P-60.....	38
3.12 Eletroforeses em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS e 2-mercaptoetanol.....	39
3.13 Composição de Aminoácidos.....	39
3.14 Atividade Antibacteriana e Antifúngica .....	40
3.15 Reconhecimento de Carboidratos na Superfície de <i>Leishmania brasiliensis</i> .....	42
3.16 Atividade Antitumoral .....	42
4 RESULTADOS.....	44
4.1 Extração, Dosagem de Proteínas e Atividade Hemaglutinante .....	44
4.2 Especificidade por Açúcares.....	46
4.3 Purificação de AFL .....	47
4.4 Cromatografia de Afinidade.....	47
4.5 Cromatografia de Troca Iônica.....	48
4.6 Exclusão Molecular em BioGel P-60.....	49
4.7 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	50
4.8 Efeito da Temperatura e do pH na Atividade Hemaglutinante.....	54
4.9 Quantificação de Aminoácidos.....	56
4.10 Atividade Antibacteriana e Antifúngica.....	56
4.11 Atividade Antitumoral.....	59
4.12 Detecção de Carboidratos na Superfície de <i>Leishmania brasiliensis</i> .....	60
5 DISCUSSÃO.....	61
6 CONCLUSÕES.....	66
7 REFERÊNCIAS.....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS

**°C:** Graus Celsius;

**µg:** Micrograma

**µL:** Microlitro;

**AZT:** Zidovudina;

**Ca<sup>2+</sup>:** Cálcio;

**CchG:** Galectina de *Cinachyrella sp*;

**CFM:** Concentração fungicida mínima;

**CIM:** Concentração inibitória mínima;

**DCR:** Domínio reconhecedor de carboidrato;

**DEAE:** Dietilaminoetil;

**FCS:** Soro bovino fetal inativado por calor;

**HCl:** Ácido clorídrico;

**HIV:** Virus da Imunodeficiência Adquirida;

**M:** Molar;

**MAPK:** Proteína cinase ativada por mitógenos;

**Mg<sup>2+</sup>:** Mangésio;

**mM:** Milimolar;

**Mn<sup>2+</sup>:** Manganês;

**N.D:** Não determinado;

**NaCl:** Cloreto de Sódio;

**nm:** Nanômetros;

**P38:** proteína 38

**PBS:** Tampão Fosfato Salino;

**pH:** Potencial hidrogeniônico;

**PI3K:** Fosfatidilinositol 3 cinase;

**RIPS:** Proteínas inativadoras de ribossomos;

**TCA:** Ácido tricloroacético;

**Tris:** Tris-hidroximetil aminometano;

**U.H:** Unidades hemaglutinantes;

**β-gal:** Beta galactose;

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação das lectinas com base em sua estrutura. Adaptado de Peumans & Van Damme (1998).....	18
Figura 2: <i>Aplysina fulva</i> . Esponja marinha com aspecto de pequenos ramos cilíndricos irregulares e com coloração amarelada. (I. Herrera Bravo de Laguna, Personal Photo).....	26
Figura 3: Arranjo tetrâmérico de CchG, primeira estrutura tridimensional de lectina oriunda de esponja marinha. (PDB Code 4AGV, FREYMAN, D.M et al., 2012).....	27
Figura 4: Coluna de afinidade Sepharose CL 4B.....	37
Figura 5: Coluna Biogel P-60 acoplada a um sistema de coleta automática.....	38
Figura 6: Perfil cromatográfico obtido por cromatografia de afinidade do extrato bruto da esponja marinha <i>Aplysina fulva</i> aplicado em coluna de Sepharose CL 4B. (*): Atividade hemaglutinante determinada com suspensão de hemácias de coelho nativa a 3%.....	48
Figura 7: Cromatograma de eluição do pico retido da coluna de troca iônica DEAE-Sephacel.....	49
Figura 8: Cromatograma da exclusão molecular em Biogel P-60.....	50
Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (PAGE-SDS). Perfil eletroforético de amostras oriundas da (A) cromatografia de afinidade (B e C) cromatografia de troca iônica.....	51
Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (PAGE-SDS). Amostra referente a lectina purificada através de cromatografia de troca iônica. A: Imagem após duas lavagens com solução descorante com 10% ácido acético e 20% de metanol. B: Imagem após sucessivas lavagens com solução descorante.(I e III) Marcadores molecular: 225 kDa, 150 kDa, 102 kDa, 76 kDa, 52 kDa, 38 kDa, 31 kDa, 24 kDa, 17 kDa e 12 kDa. (II e IV): Pico retido da cromatografia de troca iônica. C: Determinação da massa molecular de AFL por reta de regressão linear simples. Marcadores molecular: 52 kDa, 38 kDa, 31 kDa, 24 kDa, 17 kDa e 12 kDa .....	52

Figura 11: Padrão eletroforético do pico do cromatograma de troca iônica DEAE-Sephacel em gel de poliacrilamida não desnaturante. (A) Marcadores moleculares: 225 kDa, 150 kDa, 102 kDa, 76 kDa, 52 kDa, 38 kDa, 31 kDa, 24 kDa e 12 kDa (B) Pico retido da cromatografia de troca iônica.....	53
Figura 12: Padrão eletroforético da exclusão molecular em BioGel P-60. Observa-se a presença de 3 bandas proteicas, com aproximadamente 76, 52 e 27 kDa.....	54
Figura 13: Curva de Termo Estabilidade de AFL.....	55
Figura 14: Efeito do pH sobre AFL.....	55
Figura 15: Toxicidade contra células de câncer de mama da linhagem MDA-MB-23.....	59
Figura 16: Teste de aglutinação de formas promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> . (A): Controle negativo, promastigotas na presença de PBS; (B): promastigotas na presença de 125 µg/ml de AFL; (C) : promastigotas na presença de 125 µg/ml de AFL mais 100mM de galactose.....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação por especificidade ao carboidrato das lectinas. Peumans & Van Damme (1998).....	19
Tabela 2: Classificação das lectinas quanto à ocorrência. Peumans & Van Damme (1998).....	20
Tabela 3: Lectinas animais como possíveis alvos para terapêutica. Adaptado de Kilpatrick, 2002.....	23
Tabela 4: Teor de proteínas solúveis nos extratos e suas respectivas atividades específicas.....	44
Tabela 5: Ensaio de hemaglutinação do extrato bruto da esponja marinha <i>Aplysina fulva</i> . N.D: Não determinado.....	45
Tabela 6: Inibição da hemaglutinação. MIC: Concentração Inibitória Mínima; NI: Não Inibiu.....	46
Tabela 7: Purificação da lectina da esponja marinha <i>Aplysina fulva</i> (AFL).....	47
Tabela 8: Quantificação de aminoácidos.....	50
Tabela 9: Resultados da avaliação da Concentração inibitória mínima- CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de lectina sobre bactérias - Técnica de microdiluição. (-): Não houve crescimento do microrganismo. (+): crescimento do microrganismo.....	57
Tabela 10: Resultados da avaliação da Concentração inibitória mínima- CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) da lectina sobre leveduras- Técnica de microdiluição. (-): não houve crescimento do microrganismo (+): crescimento do microrganismo.....	58

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PREFÁCIO

Estruturas oligossacarídicas complexas apresentam-se na superfície das células incorporadas na matriz extracelular onde desempenham papéis estruturais, como marcadores que medeiam o contato célula-célula em eventos de reconhecimento. Além das funções estruturais e energéticas desempenhadas pelos carboidratos, existem outros papéis que se tornam evidentes a partir da interação com as lectinas. Lectinas muitas vezes são moléculas complexas, com vários domínios proteicos, mas sua capacidade de ligar-se a açúcares é atribuída a um domínio reconhecedor de carboidrato (DRC) (DODD; DRICKAMER, 2001).

No presente, lectinas tem alcançado especial destaque por serem um grupo de proteínas ou glicoproteínas com capacidade de se ligar reversivelmente a açúcares específicos presentes na superfície de diferentes células causando aglutinação. Esta reação ocorre devido a boa parte das lectinas serem moléculas bivalentes, ou seja, possuírem no mínimo dois sítios de ligação para carboidratos específicos da superfície celular (MARQUES; BARRACCO, 2000). Lectinas identificam geralmente os monossacarídeos para os quais tem afinidade em posições terminais na cadeia de carboidratos, porém aqueles presentes em posições subterminais, frequentemente influenciam nesta ligação (ARASON, 1996). Essa interação entre lectinas e carboidratos ocorre em várias reações imunológicas, como na adesão celular, na opsonização dos microorganismos invasores, na formação de nódulos hemocíticos (YOUNG LEE; SÖDERHÄLL, 2002), fazendo parte ainda de processos de encapsulamento e melanização de parasitas (LING; YU, 2006).

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

## 1.2 CONTEXTOS HISTÓRICOS

No final do século XIX alguns pesquisadores verificaram a existência de proteínas que quando eram expostas ao contato com sangue eram capazes de aglutinar suas células. Estas foram chamadas de hemaglutininas ou fitoaglutininas, por serem de origem vegetal (SHARON; LIS, 2001).

A primeira descrição de uma hemaglutinina, assim como era chamada, foi feita por Hermann Stillmark, em 1888 na Universidade de Dorpat, na Estônia, trabalhando com *Ricinus communis*. Stillmark descobriu a presença de um fator proteico tóxico presente nas sementes de mamona o qual, era capaz de aglutinar eritrócitos. A este fator tóxico, foi dado o nome de ricina (RÜDIGER, 1998). Logo após a descrição da ricina, foi demonstrada a presença de uma aglutinina tóxica em extratos de *Abrus precatorius*, que recebeu o nome de abrina. Com esses estudos, sugeriram que as lectinas possuíam uma propriedade tóxica intrínseca, entretanto Landsteiner e Rabitschek demonstraram em 1907, pela primeira vez, a existência de uma lectina que não apresentava toxicidade. Estes resultados incentivaram outras pesquisas que mostraram que nem toda lectina é tóxica e que esta propriedade ocorre apenas em algumas lectinas (VAN DAMME et al, 1998).

Em 1936 Sumner e Howell purificaram a primeira lectina a partir de sementes de *Canavalia ensiformes*. Analisando a aglutinação das lectinas presentes em extratos de sementes de *Canavalia ensiformes* (ConA), verificaram que esta lectina era capaz de aglutinar, além de hemácias, fungos e glicogênio em solução. Perceberam ainda, que a atividade hemaglutinante desta proteína era inibida por sacarose, mostrando assim sua especificidade a este açúcar. Sugeriram que o fenômeno ocorria graças a interação entre a lectina e os carboidratos presentes na membrana das hemácias, evidenciando a propriedade mais marcante das lectinas, a afinidade por carboidratos. Este fato norteou todas as outras pesquisas subsequentes (SUMNER & HOWELL, 1936).

Willian Boyd e Karl Renkonen em 1940 mostraram para comunidade científica que algumas hemaglutininas exibiam preferência por certos tipos específicos de hemácias pertencentes ao sistema ABO (VAN DAMME et al., 1998). Alguns anos depois, foi demonstrado que a hemaglutinação de hemácias do tipo A era fortemente inibida por  $\alpha$ -N-acetil-D-galactosamina, enquanto a hemaglutinação de hemácias do tipo O era inibida por  $\alpha$ -fucose. Reunindo todos esses dados, foi possível concluir que  $\alpha$ -N-acetil-D-galactosamina e  $\alpha$ -

L-fucose eram os açúcares que conferiam especificidade para os sangues tipo A e O respectivamente. Com estes estudos, foram mostradas as primeiras evidências da presença de carboidratos na superfície das células. (SHARON; LIS, 2001).

A capacidade deste conjunto de proteínas em distinguir hemácias de diferentes grupos sanguíneos, levou Boyd e Shapleigh a denominar tais aglutininas como lectinas, cujo significado deriva do Latim "legere" que significa escolher (BOYD; SHAPLEIGH, 1954).

O termo lectina é amplamente empregado com finalidade de nomear todas as proteínas que possuem ao menos um domínio não catalítico que é capaz de ligar-se de forma específica e reversível a mono ou oligossacarídeos (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Elas interagem com segmentos glicídicos a partir do DRC que se mostra altamente conservado em cada tipo de lectina (NI & TIZARD, 1996).

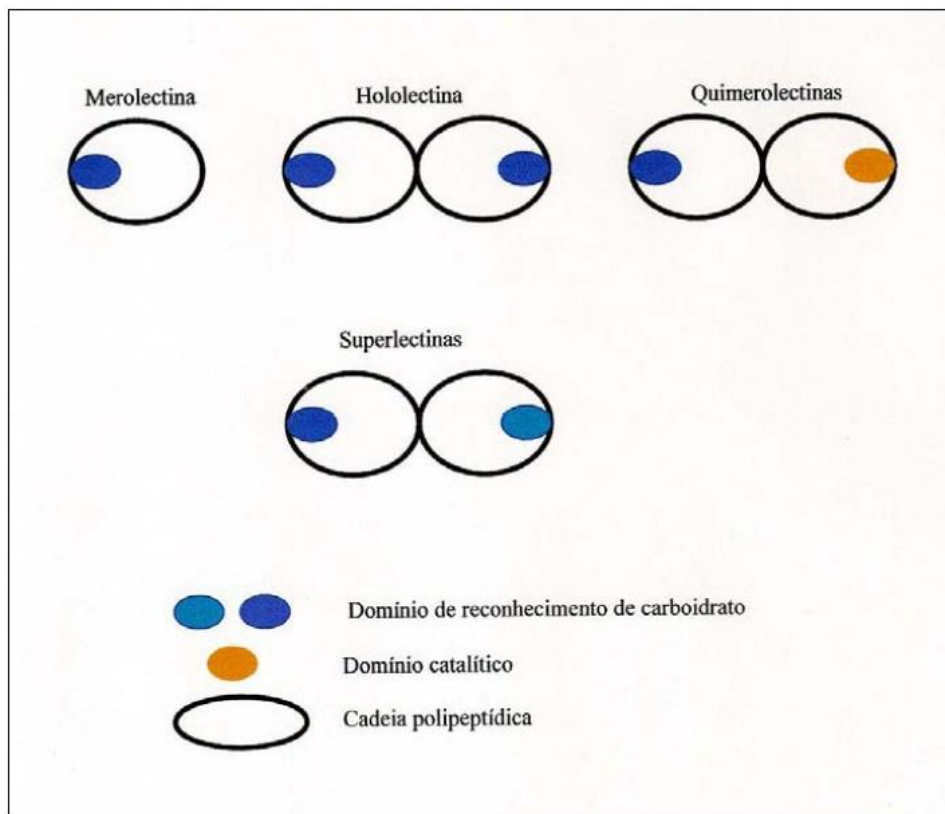
Devido ao DRC, as lectinas são capazes de interagir com glicoconjugados de superfície celular, formando ligações cruzadas entre as células adjacentes, dando origem ao processo denominado aglutinação (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; ALONSO et al., 2001).

### 1.3. CLASSIFICAÇÃO DAS LECTINAS

Atualmente, lectinas abrangem um vasto grupo de proteínas com subdivisões baseadas, particularmente, em seus aspectos estruturais. Peumans & Van Damme (1998) classificaram as lectinas em quatro grupos principais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas. A figura 1 representa esta classificação.

**Merolectinas** são lectinas que apresentam apenas um domínio de ligação para carboidratos. Por definição são monoméricas e estruturalmente simples, conseqüentemente, não apresentam atividade hemaglutinante ou capacidade de precipitar glicoconjugados. A lectina presente no látex de *Hevea brasiliensis* (seringueira), é um exemplo desta classe (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

Figura 1: Classificação das lectinas com base em sua estrutura. Adaptado de Peumans & Van Damme (1998).



**Hololectinas** são proteínas oligoméricas e, conseqüentemente, são capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. Ocorrem normalmente na forma de dímeros ou tetrâmeros. Diversas lectinas extraídas de plantas são classificadas como hololectinas, onde se pode citar como exemplo a Concanavalina A (ConA), *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Artocarpus integrifolia* (Jacalina) (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

**Quimerolectinas** são fusões de proteínas tendo um ou mais sítios de ligação para carboidratos, todavia, um destes sítios deve conter um açúcar com atividade biológica bem definida agindo de forma independente dos demais sítios. Tais proteínas geralmente apresentam dupla função, mas que se complementam, como por exemplo, proteínas envolvidas na invasividade celular, que utilizam o domínio de reconhecimento para açúcar como ponto de ancoragem e subsequentemente age com o outro domínio para efetivar a entrada na célula ou até mesmo demolição de membranas. Com relação direta ao número de sítios de ligação, quimerolectinas podem se comportar como merolectinas ou hololectinas, a exemplo das proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) do tipo 2, a qual apresentam mais de um domínio de ligação para açúcares e também são capazes de atuar como hololectinas (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

**Superlectinas** são proteínas formadas por dois ou mais sítios de ligação para carboidratos, entretanto, seu domínio catalítico pode reconhecer açúcares diferentes. São encontradas com menos frequência do que as hololectinas, porém novas estruturas para esse grupo lectinas vêm sendo elucidadas, como a lectina da banana que possui dois sítios distintos de reconhecimento a carboidratos (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

Em boa parte das lectinas estudadas até o momento, é clara a semelhança em aspectos estruturais, como a sequência primária, os sítios de ligação para carboidratos e a função biológica. Tais semelhanças, embora não sejam exatas, resultam em diferentes atividades biológicas (CAVADA et al., 2001).

Lectinas podem ainda ser classificadas com base em sua especificidade por carboidratos. A primeira classificação foi feita por Makela, em 1957, que considerou apenas a afinidade por carboidratos simples. Goldstein e Poretz, no ano de 1986, ampliaram esta classificação e em seguida Van Damme e colaboradores (1998) propuseram uma classificação mais abrangente com seis grupos de lectinas vegetais (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação por especificidade ao carboidrato das lectinas. Peumans & Van Damme (1998).

<b>Grupo</b>	<b>Especificidade ao carboidrato</b>
Fucose	L-Fucose
Galactose/ N-Acetil-Galactosamina	Galactose>Neu5Aca(2,6)Gal/GalNAc Galactose=Neu5Aca(2,6)Gal/GalNAc Galactose<Neu5Aca(2,6)Gal/GalNAc
N-Acetil-D-Glicosamina	N-Acetil-D-Glicosamina (GlcNAc) <sub>n</sub>
Manose	Manose Manose/Glicose Manose/Maltose
Ácido Siálico	Ácido Siálico Neu5Aca(2,6)Gal/GalNAc Neu5Aca(2,3)Gal/GalNAc
Glicanos Complexos	Complexos conhecidos Complexos desconhecidos

Ainda segundo o mesmo estudo, lectinas podem ser classificadas quanto à ocorrência. Esta classificação agrupa as lectinas das angiospermas em sete grupos (Tabela 2).

Tabela 2: Classificação das lectinas quanto à ocorrência. Peumans & Van Damme (1998).

<b>Grupo</b>	<b>Número de Lectinas Identificadas</b>
Lectina de Leguminosas	>100
Ligantes à Quitina	>100
Inativadoras de Ribossomos (RIPs)	>20
Relacionadas à Jacalina	<10
Monocotiledôneas ligantes de Manose	>50
Floema de Curcubitáceas	<10
Família das Amarantáceas	<10

**Lectinas de leguminosas:** As lectinas de leguminosas frequentemente são formadas por 2 a 4 subunidades de 25-30 kDa, onde cada uma apresenta um sítio de ligação para carboidrato. Estas lectinas são muito semelhantes em suas propriedades físico-químicas, mas diferem em suas especificidades a carboidratos e propriedades fisiológicas. Na literatura são relatadas pouco mais de 80 lectinas pertencentes a este grupo e as mais estudadas estão então entre as papilionóideas. Neste grupo de vegetais, as lectinas apresentam homologias na estrutura primária e na conformação tridimensional, configurando uma evolução a partir de um ancestral comum (CAVADA et al., 1998; REGO et al., 2002).

**Lectinas ligantes de quitina:** Estas lectinas estão presentes em papaveráceas, amarantáceas, urticáceas, solanáceas e poáceas, famílias que não estão relacionadas taxonomicamente. Todas as lectinas que apresentam capacidade de se ligarem à quitina estão classificadas neste grupo. Estas lectinas exibem um domínio de aproximadamente 40 resíduos de aminoácidos que exhibe uma sequência similar à lectina de *Hevea brasiliensis*, por tal fato ficou estabelecido que estas lectinas contêm um "domínio de heveína". Nas poáceas as lectinas, como a aglutinina do germe do trigo (WGA), apresentam sequências homologas de

aminoácidos e semelhanças relacionadas à especificidade para N-acetil-D-glicosamina, quitina e ácido N-acetilneuramínico (MARTÍNEZ-CRUZ et al., 2001).

**Lectinas inativadoras de ribossomos:** Este grupo de lectinas está distribuído em famílias botânicas não relacionadas taxonomicamente. São lectinas com uma cadeia A, cataliticamente ativa, ligada covalentemente por pontes bissulfeto a uma cadeia B. Esta segunda cadeia possui sítio (s) de ligação a carboidratos. A cadeia B complexa-se com glicoreceptores de superfície celular e a cadeia A penetra por endocitose nas células. A cadeia A, no citosol, remove enzimaticamente resíduos de adenina, específicos de uma região altamente conservada na maior subunidade do rRNA, causando mudança conformacional no mesmo, que bloqueia a ligação do cofator de alongação ao ribossomo. Em geral estas lectinas, como a aglutina de *Ricinus communis* (RCA), impedem a síntese protéica, promovendo a morte celular pela remoção de múltiplos resíduos de adenina de vários polinucleotídeos como os de polimerases (AGAPOV et al., 1999)

**Lectinas relacionadas à jacalina:** Tais lectinas estão estruturalmente e evolutivamente relacionadas à família das moráceas ou convolvuláceas, formando dois subgrupos. As lectinas relacionadas com moráceas apresentam especificidade para N-acetil-D-glicosamina, enquanto que as relacionadas a convolvuláceas são manose/maltose específicas, como também são as lectinas de asteráceas e musáceas (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

**Lectinas de monocotiledôneas ligantes de manose:** O grupo abrange aquelas com especificidade para manose, que são encontradas de forma exclusiva em monocotiledôneas. Estas lectinas foram descritas nas famílias das amarilidáceas, aliáceas, aráceas, liliáceas, bromeliáceas e orquidáceas, além de aloáceas. Nestas famílias, as lectinas mostram um alto grau de homologia em suas estruturas tridimensionais e na estrutura primária (PEUMANS & VAN DAMME, 1998)

**Lectinas do floema de cucurbitáceas:** Nas cucurbitáceas, geralmente as lectinas são glicosiladas e apresentam um domínio específico, especialmente para quitina. Elas possuem uma sequência de aminoácidos muito similar e uma massa molecular de aproximadamente 25 kDa. Estas lectinas formam um grupo particularizado, uma vez que apesar de apresentarem especificidade para quitina, não mostram o domínio heveína, característico para outras lectinas com especificidade para quitina (PEUMANS & VAN DAMME, 1998)

**Lectinas de amarantáceas:** As amarantáceas possuem uma sequência de aminoácidos similar entre si, massa molecular de aproximadamente 33 kDa e não apresentam glicosilação.

Estas lectinas são homodiméricas, apresentam especificidade para N-acetil-D-galactosamina e podem totalizar de 3 a 5% do peso de suas sementes (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

Entretanto, tais classificações elencadas acima não representam as lectinas presentes em animais. As lectinas presentes em animais, sejam de vertebrados ou invertebrados, são classificadas segundo a homologia entre suas estruturas primárias em diversos grupos e famílias. Frente a tais considerações já foram citadas pelo menos 10 famílias de lectinas pertencentes ao reino animal. As galectinas e as lectinas tipo C representam as maiores famílias de lectinas de animais. Além delas destacam-se ainda: Tipo-S, Tipo-I, Tipo-P, Tipo-L, Anexinas, Calreticulinas/Calnexinas, Discoidinas, Eglectinas, Eel aglutininas, Tipo fibrinogênio e Pantraxinas (KILPATRICK, 2002).

**Galectinas:** É uma família de lectinas que se ligam a galactose, também conhecidas como Tipo S independente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Galectinas são amplamente distribuídas em vários tipos de células de mamíferos. A literatura nos mostra que até hoje foram identificados 15 diferentes tipos dessas lectinas, sendo que seus DRCs provavelmente ligam-se a grupos N-acetilados devido ao reconhecimento da unidade de  $\beta$ -gal. De acordo com o número de arranjos dos DRCs as galectinas são classificadas em três tipos principais: protogalectinas, galectina tipo quimera e galectinas que tem repetições em tandem. As galectinas protótipo (protogalectinas) contém dois homodímeros ligados de forma não covalentes, onde seus DRCs podem recobrir superfícies de células e a matriz extracelular. Estão incluídas neste tipo as galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13 e 14. As galectinas tipo quimera forma outra classe que caracterizam-se por possuir uma estrutura mista. Nestas, há um DRC na porção carboxi terminal e um domínio amino terminal rico em resíduos de tirosina que ajudam a formar oligômeros de ordem superior. Até onde se sabe, apenas as galectinas tipo 3 foram incluídas nesse grupo. Por fim, a classe das galectinas que tem repetições em tandem têm dois DRCs distintos. Nesta classe estão incluídas as galectinas 4, 6, 8, 9 e 12. O DRCs que se ligam a  $\beta$ -galactosídeos são evolutivamente conservados. Cada galectina possui uma preferência para ligação a carboidrato no citoplasma e no núcleo, respectivamente. Nos últimos anos, diversos estudos vêm mostrando a correlação que essas galectinas possuem com a progressão tumoral. Estes resultados indicam que galectinas podem ser usadas como biomarcadores, assim como pode ser empregadas no diagnóstico e terapia do câncer (Tabela 3). As galectinas localizadas no citoplasma e no núcleo, podem ser secretadas e funcionar extracelularmente. Algumas ligam-se a carboidratos na superfície de antígenos e receptores celulares. Além disso, no espaço intracelular, galectinas também vem mostrando ter funções no citoplasma das células com atividades de ligação a

carboidratos. Como já mencionado, galectinas talvez regulem a transdução de sinal por ligantes intracelulares e participar de diversas cascatas de sinalização que levem a apoptose no câncer (LIU et al., 2012).

**Tipo C:** Compreende uma super família de lectinas, incluindo selectinas, DC-SIGN e receptor de neurocinina (NK) que vem sendo correlacionado com vários processos biológicos como resposta a modulação imunológica, adesão, proliferação e apoptose. A selectina é uma das que mais se destaca, incluindo, P-selectinas, L-selectinas e E-selectinas. A P-selectina é conhecida por promover proliferação do carcinoma do colon através da ativação das vias da p38 e PI3K, sugerindo que o complexo leva a ativação da PI3K e p38 podendo resultar na ativação dependente de integrinas. Integrinas vem mostrando uma relação próxima com o citoesqueleto, que provavelmente desempenhe um papel importante nos receptores de transdução de sinal, ativando diversas cascatas como a da MAPK e assim, regulando a ativação celular, proliferação e apoptose (LIU et al., 2012).

Tabela 3: Lectinas animais como possíveis alvos para terapêutica. Adaptado de Kilpatrick, 2002.

<b>Lectina</b>	<b>Tipo de Câncer</b>	<b>Mecanismo</b>
Galectina 1	Mama, cólon, gliomas, adenocarcinoma endometrial e próstata	Migração celular, adesão, angiogênese, indução de apoptose e escape do sistema imunológico.
Galectina 3	Tireoide, sistema nervoso central, pâncreas, pele, próstata e carcinoma renal	Transformação celular, indução da apoptose, invasão tumoral e metástase
Galectina 7	Tumores da tireoide e carcinoma do cólon uterino	Diferenciação de queratinócitos, estabilização da p53 e indução de apoptose
Galectina 8	Câncer do cólon do útero	Inibição da adesão celular e apoptose
P-Selectina	Câncer de mama e cólon do útero	Proliferação celular e indução de apoptose
Receptor NK	Carcinoma renal	Indução de apoptose via receptores TRAIL e Fas

## 1.4 DISTRIBUIÇÃO NOS ORGANISMOS

Amplamente distribuídas pela natureza, as lectinas são encontradas em quase todos os organismos, incluindo vegetais, vírus, bactérias, mamíferos e diversos grupos de invertebrados e vertebrados (GERLAN et al., 2005).

Nos microrganismos, como bactérias, protozoários e vírus, há indícios que elas podem desempenhar um papel auxiliar e/ou promoverem a adesão destes microrganismos às estruturas celulares de seus hospedeiros, o qual é um pré-requisito para que a infecção ocorra (LIS & SHARON, 1998). Em 1991, Glick e colaboradores estudando a infecção pelo vírus da influenza, constataram que o processo de adesão viral à célula alvo era mediado por uma lectina que se liga a resíduos de ácido siálico presente na face externa da superfície celular.

Peumans e Van Damme (1998) estudaram relatos de ocorrência de lectinas em plantas superiores e verificaram que estas proteínas já haviam sido detectadas em cerca de 500 espécies. Muitas das lectinas vegetais são encontradas nas sementes, embora sua presença já tenha sido observada em todos os tipos de tecidos vegetativos. As lectinas de sementes de leguminosas representam o grupo mais bem estudado destas proteínas (SHARON & LIS, 2001).

Nos animais vertebrados distinguem-se duas categorias de lectinas: as citoplasmáticas, que são extraídas com soluções aquosas e salinas e as lectinas de membrana que requerem o uso de detergentes para sua solubilização (LIENER, 1994).

## 1.5 ESPONJAS MARINHAS

Esponjas marinhas formam um grupo de organismos marinhos primitivos com registros fósseis de cerca de 600 milhões de anos atrás. Por dezenas de milhões de anos esses organismos foram os grandes responsáveis pela formação de recifes, desempenhando portanto, papel estrutural essencial, marcadamente associado ao incremento da biodiversidade. Em ambientes marinhos costeiros, as esponjas chamam atenção principalmente por suas cores e formas variadas. Seu tamanho pode variar de milímetros a metros, seja em altura ou diâmetro. São notoriamente assimétricas, entretanto existem exceções. Organizações anatômicas em disposição radial são relativamente comuns (HAJDU; PEIXINHO; FERNANDES, 2011).

O corpo de uma esponja marinha está organizado em três camadas: a pinacoderme, mesóflo e a coanoderme. As células superficiais, os pinacócitos, revestem tanto a superfície externa como a basal de uma esponja, assim como a superfície dos canais internos, presentes na maioria das esponjas e próximo dos quais se encontram os coanócitos. Estes estão organizados em uma monocamada contínua, seja em grandes sacos ou em pequenas câmeras. Entre a camada de pinacócitos e de coanócitos encontramos o mesóflo, composta fundamentalmente por fibrilas de colágeno, que geralmente são associados com outras estruturas esqueléticas, seja de natureza orgânica ou inorgânica, assim como alguns tipos celulares coletivamente chamados de “amebócitos”. Destes tipos celulares se destacam os arqueócitos, que desempenham funções na digestão, reprodução e regeneração. Essas células são indiferenciadas e apresentam um alto poder de totipotência, conhecidas como “as células tronco das esponjas” (HAJDU; PEIXINHO; FERNANDES, 2011).

O gênero *Aplysina* compreende 37 espécies no mundo sendo que 15 delas ocorrem no Brasil. A esponja marinha *Aplysina fulva*, apresenta forma extremamente variada. Frequentemente, são encontradas com forma de ramos cilíndricos de contorno irregular e suas ramificações são pouco frequentes. Os ramos cilíndricos são preponderantemente eretos. A seção dos ramos pode chegar a 2 m, mas comumente não ultrapassam 30 cm. O diâmetro dos ramos geralmente são de 2 a 3 cm. Podem apresentar-se com coloração amarelada, ocre e marrom (figura 2). No álcool, mais frequentemente tornam-se negra, roxa ou marrom-escura, mas em algumas exceções ficam rosadas (HAJDU; PEIXINHO; FERNANDES, 2011).

Estes metazoários primitivos são capazes de produzir uma grande quantidade de moléculas bioativas, por esse motivo são consideradas verdadeiras "fábricas químicas" (BACUS, G. J; GREEN, G., 1974). Algumas destas moléculas deram origem a drogas que são atualmente comercializadas e usadas no tratamento de enfermidades que atingem parte da população mundial. Dentre elas, o Aciclovir, utilizada no tratamento da Herpes tipo 2, Citarabina, usada para tratamento de leucemias e alguns linfomas e o AZT que compõe um dos primeiros coquetéis usado para o tratamento contra o vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) (HAJDU, E; PEIXINHO, S; FERNANDES, J. C. C, 2011).

Figura 2: *Aplysina fulva*. Esponja marinha com aspecto de pequenos ramos cilíndricos irregulares e com coloração amarelada. (I. Herrera Bravo de Laguna, Personal Photo).



## 1.6 LECTINAS DE ESPONJAS MARINHAS

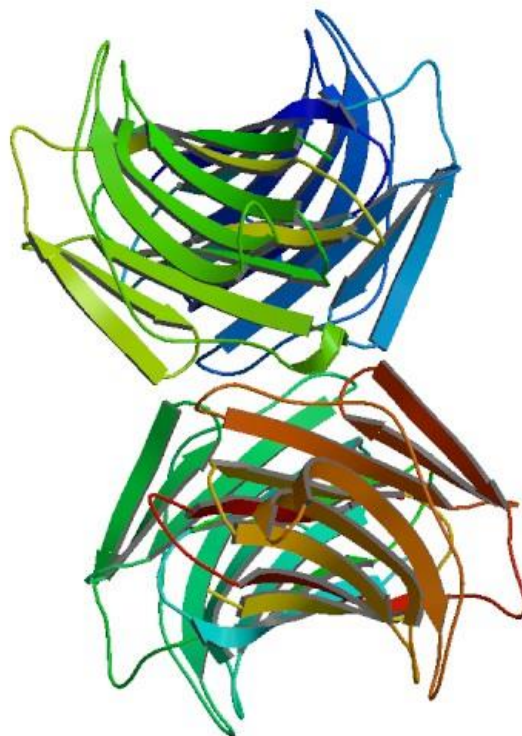
Esponjas marinhas são fontes promissoras de novos compostos bioativos com várias aplicações biomédicas (SIPKEMA et al., 2005). Seus produtos naturais vêm mostrando relevante potencial de aplicações biotecnológicas, tendo sido relatadas as mais diversas aplicações como antiviral, antitumoral, antimicrobiana e propriedades citotóxicas, produzindo novas substâncias que podem ser empregadas na produção de fármacos para terapêutica (THOMAS et al., 2010).

Organismos marinhos estão em evidência como novas fontes de lectinas e estudos sobre suas propriedades em sistemas vivos estão em destaque. Atualmente já existem mais de 300 espécies de organismos marinhos que produzem lectinas, entretanto poucas em esponjas marinhas foram de fato descritas e bem estudadas (CHERNIKOV et al., 2013).

As lectinas mais estudadas até o presente momento são as das esponjas do gênero *Cinachyrella*: *Cinachyrella alloclada*, *Cinachyrella apion* e *Cinachyrella spp* (MEDEIROS et al., 2010; UEDA et al., 2013) A galectina de *Cinachyrella spp* (CchG) é a mais bem pesquisada,

pois é a única que além de suas características físico-químicas descritas, tem sua estrutura tridimensional conhecida (figura 3). CchG apresenta-se como um dímero de 34 kDa, sendo composta por uma subunidade de 18 kDa e outra de 16 kDa. Assim, como as demais lectinas do gênero *Cinachyrella*, apresenta maior afinidade por lactose e é uma proteína bastante termo estável, pois resiste a temperatura de até 100 °C (UEDA *et al.*, 2013).

Figura 3: Arranjo tetramérico de CchG, primeira estrutura tridimensional de lectina oriunda de esponja marinha. (PDB Code 4AGV, FREYMANN, D.M et al., 2012)



O seu monômero é formado por duas sequências de cinco folhas  $\beta$  antiparalelas frente uma a outra através de um centro hidrofóbico. Essa estrutura em dímero é mantida por pontes dissulfeto. CchG apresenta um arranjo tetramérico no qual reflete um dímero canônico, já comum entre algumas lectinas, com a diferença que ambas as folhas  $\beta$  do protômero são contínuas através da interface do dímero (FREYMANN *et al.*, 2012).

**Lectina de *Axinella polypoides*:** Estudos realizados com a esponja *Axinella polypoides*, mostraram que a mesma possui duas lectinas, APL-I e APL-II. APL-I possui peso molecular de 21 kDa e apresenta-se na forma de dímero. Já APL-II apresenta peso molecular de 15 kDa e consiste de apenas uma subunidade. Ambas são glicosiladas e contém 0,5% de carboidrato. São

distintas em relação a sua composição de aminoácidos e são imunologicamente diferentes. APL-I e APL-II têm especificidades semelhantes e reagem com o grupo sanguíneo B, mas não com A e O, sendo ambas inibidas por D-galactose e D-fucose (BRETTEING & KABAT, 1976)..

**Lectina de *Axinella corrugata*:** Foram purificadas duas lectinas da esponja marinha *Axinella corrugata*. A primeira (ACL-I) apresenta peso molecular de 78,5 kDa e consiste em seis monômeros similares com massa relativa de 13,9 kDa cada. Alguns desses monômeros estão ligados entre si por pontes dissulfeto. O ponto isoelétrico de ACL-I é no pH 6,3. A mesma resiste a variações de pH na faixa de 3 a 11. A lectina apresenta melhor atividade hemaglutinante entre os pH 7 e 8. ACL-I é capaz de aglutinar hemácias em temperaturas distintas entre 0 e 65 °C e é não dependente de cátions. Entretanto, a temperaturas acima de 70 °C sua atividade cai drasticamente e em temperaturas entre 95 e 100 °C sua atividade é perdida completamente. ACL é capaz de aglutinar com maior intensidade sangue nativo de coelho, cão e cabra e fracamente hemácias humanas do sistema ABO. A lectina não é capaz de aglutinar sangues nativos de cavalo, frango e porco. O açúcar que a lectina é capaz de se ligar mais fortemente é o N, N', N''-triacetilquitotriose, o qual é 12 vezes mais forte do que N-acetil-D-glicosamina, N-acetil-D-manosamina, N-acetil-D-galactosamina e 32 vezes mais forte que N-acetil-D-lactosamina (DRESCH et al., 2008).

Estudos mostram ainda que, ACL-I está presente em vesículas de células esferuladas e podem também estar presente em menores quantidades na matriz extracelular da esponja marinha. A partir destas evidências, sugeriu-se que essa lectina desempenhe um papel de defesa contra patógenos (DRESCH et al., 2011).

A segunda lectina de *Axinella corrugata* (ACL-II), é uma proteína de aproximadamente 78 kDa. A atividade hemaglutinante de ACL-II é estável a partir de 0 até 65 °C. Sua atividade hemaglutinante cai consideravelmente em torno de 70 °C e próximo aos 100 °C perde completamente sua atividade. Em comparação a ACL-I, esta lectina é mais estável na faixa de pH entre 2,0 e 6,0. Assim como ACL-I, ACL-II não é dependente de cátions, como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  para exercer hemaglutinação. É capaz de aglutinar de forma mais eficaz sangue nativo de coelho e de forma fraca sangue humano. Não é capaz de aglutinar sangue de cavalo, galinha, ovelha, gado ou porco. O DRC dessa lectina, liga-se fortemente a N, N', N''-triacetilquitotriose (DRESCH et al., 2012).

**Lectina de *Craniella australiensis*:** A lectina de *Craniella australiensis* é uma glicoproteína com aproximadamente 27,6% de carboidrato e peso molecular total de 54 kDa.

Contém pontes dissulfeto interligando três subunidades idênticas de 18 kDa. A lectina não requer íons de cálcio, sendo estável nas suas atividades entre 20 e 70 °C e em pH na faixa de 5 a 8, entretanto a 100 °C sofre desnaturação irreversível. Em relação a sequência dos aminoácidos na porção N-terminal (TSSCQSIVVE), há uma elevada quantidade dos aminoácidos tirosina, glicina, valina e isoleucina; contudo não foi observado a presença de aminoácidos básicos como arginina. A lectina de *Craniella australiensis* não liga-se a açúcares na sua forma de mono ou oligossacarídeos, mas é capaz de ligar-se a glicoproteína asialo-PSM ou PSM tripsinizada (XIONG et al., 2006).

## 1.7 APLICAÇÕES

Todos os tipos celulares apresentam carboidratos, tanto na forma de oligossacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos nas suas superfícies, sejam eucariotos ou procariotos. Essas regiões atuam como potente sítio de ligação para lectinas de acordo com sua afinidade pelo açúcar presente. Essa ligação da lectina com algum açúcar de membrana das células podem causar diversas respostas celulares, muitas das quais seus mecanismos moleculares ainda não são conhecidos. Contudo, sem dúvida, a ligação da lectina ao açúcar é o ponto chave na definição das estratégias tanto para purificação como também na determinação de suas atividades biológicas (SHARON & LIS, 2001).

Lectinas têm sido ainda usadas na indução de apoptose em células de tumores humanos (KARASAKI et al., 2001) bem como na produção de medicamentos racionais, os quais ligam-se a células específicas do organismo diminuindo drasticamente os efeitos colaterais. Outra aplicação das lectinas é na vetorização de fármacos de difícil absorção a sítios específicos no organismo humano, apresentando grande potencial para o tratamento futuro de doenças (WOODLEY, 2001).

Além dos efeitos bactericidas, antifúngico e anti-inflamatório, atualmente, cientistas de todo o mundo estão investindo em pesquisas com aplicações biológicas que possam de alguma forma contribuir para produção de novos medicamentos para a terapêutica. Paralelamente, outros cientistas buscam poder detectar doenças e microrganismos, usando lectinas como ligantes para seus alvos. Estudos mostram que é possível utilizar lectinas como marcadores para diversas moléculas. Exemplo disto foi feito por Graham e colaboradores (2011), que usaram lectinas do tipo C para identificar grânulos dos neutrófilos a partir das suas glicoproteínas.

Outros estudos mostraram que uma lectina ligante de manose é uma forte ferramenta contra o vírus da influenza (CHANG et al., 2011; GRAHAM et al., 2011).

O HIV, outro vírus de grande importância para a saúde pública mundial, continua se alastrando em proporções assustadoras, sobretudo nas mulheres dos países em desenvolvimento, apesar das estratégias de prevenção. Uma vacina contra o vírus seria uma potente alternativa, entretanto essa opção continua inalcançada. Agentes microbicidas parecem ser uma alternativa plausível. A molécula chave para o contato com as células CD4 é a glicoproteína gp120, CCR5 e CXCR4 são co-receptores. Esse contato inicial seguido pela inserção do peptídeo de fusão gp41 causa fusão da membrana celular com a membrana do HIV, levando a contaminação. As glicoproteínas gp120 e gp41 são fortemente glicosiladas e encontram-se na superfície do vírus. Agentes que ligam-se a carboidratos são capazes de bloquear a entrada do vírus na célula. As lectinas presentes em cianobactérias são consideradas uma das moléculas mais potentes para bloquear essa entrada. As lectinas cianovirina-N (CV-N), microvirina (MVN) e algumas outras, exibem uma ampla atividade anti-HIV e são fortes candidatos para moléculas microbicidas usadas para prevenção da transmissão sexual do HIV. Todas essas lectinas possuem propriedades únicas que permitem esse potencial, como por exemplo uma grande variedade de sítios de reconhecimento de carboidratos (FÉRIR et al., 2014).

Além de propriedades farmacológicas, lectinas podem atuar como moléculas repórter para detecção de células. Novas pesquisas procuraram investigar a capacidade da lectina da esponja marinha *Axinella corrugada* (ACL-I) biotinizada em ligar-se a várias linhagens de células transformadas como células da mama (T-47D, MCF7), colón (HT-29), pulmão (H460), ovário (OVCAR-3) e da bexiga (T24). Como resultado, constatou-se que ACL-I liga-se em vários resíduos de N-acetil-D-galactosamina e N-acetil-D-glicosamina presente nas superfícies dessas células. Estes achados demonstraram que esta lectina pode ser usada como uma ferramenta para mapeamento de tecidos com suspeitas de neoplasias (DRESCH et al., 2013).

Estudos que buscaram por moléculas neuroativas, mostraram que a galectina da esponja marinha *Cinachyrella spp* (CchG) é capaz de modular o receptor de glutamato. A mesma é capaz de causar convulsões no modelo animal em estudo. O extrato bruto foi capaz de dessensibilizar lentamente o receptor ionotrópico do glutamato (iGluR) mostrando-se ineficiente em ativar diretamente os receptores AMPA ou cianato na ausência do glutamato, parecendo atuar como modulador alostérico positivo da função do receptor. Observa-se também que a corrente de equilíbrio do iGluR é irreversível. Dessa forma, sugere-se que ao ligar ao

iGluR, CchG desempenha papel semelhante a um neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central (SNC). Contudo, não descartam a possibilidade que ainda exista a capacidade de modulação indireta dos receptores AMPA e cianeto (UEDA et al., 2013).

### 1.8 *Leishmania sp* E CARBOIDRATOS DE SUPERFÍCIE

No Brasil e em outros países da América do Sul a *Leishmania. brasiliensis* é identificada como principal agente etiológico da leishmaniose tegumentar, associada a diferentes manifestações clínicas: leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose cutânea diminuta e leishmaniose muco-cutânea (BRITO et al., 2011). Os parasitos do gênero *Leishmania sp* são organismos unicelulares que apresentam um ciclo heteroxênico, caracterizado por duas principais formas morfológicas: as formas promastigotas, encontradas no interior do inseto vetor e as formas amastigotas, encontradas no interior dos macrófagos. As formas promastigotas estão presentes no intestino do inseto vetor, apresentando um formato alongado e flagelo livre. Já as formas amastigotas apresentam-se ovaladas e possuem o flagelo incluso não exposto (VANNIER-SANTOS et al., 2002).

Para que haja infecção, este protozoário precisa contornar o sistema imunológico desde do início de sua inoculação. No início da infecção, as células dendríticas normalmente internalizam os parasitos e atuam como células hospedeiras. A interação de *Leishmania sp* com suas células hospedeiras, ainda não estão totalmente esclarecida. (BENNETT et al., 2001).

Apesar dos parasitos *Leishmania sp* poderem subconverter diferencialmente funções efetoras das células dendríticas, as moléculas receptoras envolvidas na internalização de *Leishmania sp* com suas células hospedeiras continuam pouco conhecidas e pode ser considerada um ponto chave para este processo. Diversos receptores de macrófagos vêm sendo identificados como mediadores da ligação com o parasita e subsequente internalização das formas promastigotas das *Leishmanias*. Dentre as moléculas que estão presentes na superfície do parasita, dois glicoconjugados são proeminentes: protease gp63 e lipofosfoglicano (LPG). A gp63 é uma protease de peso molecular 58-65 kDa. O LPG na superfície das *Leishmanias*, é um glicoconjugado que auxilia várias funções, incluindo adesão às lectinas no intestino do inseto vetor (JECNA et al, 2013). O lipofosfoglicano (LPG) e a metaloproteinase gp63 ligam-se ao receptor do complemento tipo 3 (CR3), manose-fucose e fibronectina nos macrófagos.

Entretanto, esses receptores implicam na internalização pelas células dendríticas (CAPARRÓS et al., 2005).

Macrófagos e células dendríticas expressam uma ampla variedade de receptores que associam-se a patógenos, incluindo lectinas do tipo C e receptores lectin-like (ENGERING et al., 2002; FIGOR et al., 2002; MCGREAL et al., 2004). *Leishmania spp* apresentam em sua superfície glicoconjugados ricos em manose que são críticos para a virulência parasitária e uma hipótese é que a interação lectina - oligossacarídeo está envolvida no reconhecimento do parasita por fagócitos mononucleares (CAPARRÓS et al., 2005).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo geral purificar uma lectina presente na esponja marinha *Aplysina fulva*, realizar sua caracterização físico-química e atividades biológicas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar uma lectina presente na esponja marinha *Aplysina fulva* (AFL);
- Determinar seu peso molecular;
- Avaliar o efeito do pH e temperatura sobre sua atividade hemaglutinante;
- Analisar a composição de aminoácidos da nova lectina;
- Determinar a especificidade por açúcar da nova lectina;
- Avaliar as atividades antibacteriana, antifúngica e antitumoral da nova lectina;
- Detectar carboidratos na superfície de *Leishmania brasiliensis*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

A esponja *Aplysina fulva* foi coletada na Praia de Jacarapé, em João Pessoa, PB, conforme a licença ambiental do SISBIO (nº 38658-1). Os exemplares foram recolhidos a uma profundidade de 0-2 m através de mergulho livre e conservados congelados em freezer (-20°C) até o seu processamento.

#### 3.2 PREPARO DA AMOSTRA E EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS

Inicialmente foi feito um levantamento da melhor condição de extração de proteínas utilizando-se diferentes soluções tamponadas. Dessa forma, amostras da esponja marinha *Aplysina fulva* foram submetidas à limpeza com intuito de remoção de pequenas partículas. Em seguida foram fragmentadas e trituradas em um liquidificador com cada uma das seguintes soluções tampão: Glicina 0,1 M pH 2,6 NaCl 0,15 M, Tris HCl 0,1 M pH 7,4 NaCl 0,15 M e Glicina 0,1 M pH 9,0 NaCl 0,15 M na proporção 1:10 (p/v), à temperatura ambiente. O material insolúvel foi desprezado e a porção líquida submetida à agitação contínua durante três horas. Após tal período, a amostra foi centrifugada a 5000 RPM por 30 min a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante (extrato bruto) foi submetido a dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976) e determinação de atividade hemaglutinante visando obter a melhor condição de extração da lectina.

#### 3.3 PREPARO DAS HEMÁCIAS

Para a preparação da suspensão de hemácias a ser utilizada nos ensaios de hemaglutinação, alíquotas de 3 mL de sangue foram lavadas com 7 mL de solução de NaCl 0,15 M e centrifugadas a 924 x g até a obtenção de uma massa de hemácias íntegros, livres de soro e material hemolisado. Para o tratamento do sangue com as enzimas proteolíticas bromelaína, papaína e tripsina, uma solução de cada uma das enzimas foi adicionada a uma suspensão de hemácias a 3%, na proporção de 1:1 (v/v). O material foi incubado por 30 min a

37°C. Em seguida, centrifugado a 924 x g por 5 min e o precipitado resultante, lavado 5 vezes com uma solução de NaCl 0,15 M.

### 3.4 DOSAGEM DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS

Para determinar o teor de proteínas solúveis presentes nos extratos e nas frações obtidas de esponjas marinhas, a cada 100 µL do extrato bruto foram adicionados 2,5 mL de reagente de Bradford. Após a agitação e repouso por 10 min foi realizada a leitura a 595 nm em espectrofotômetro (BRADFORD, 1976).

### 3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

A atividade hemaglutinante do extrato bruto foi determinada por meio de diluições dupla-seriadas com NaCl 0,15M e a cada 100 µL de cada diluição, foram adicionados igual volume de uma suspensão de hemácias de coelhos a 3% em NaCl 0,15 M. Os tubos foram incubados em estufa a 37 °C durante 30 min e em seguida deixados em repouso à temperatura de 25 °C por 30 min. A presença da atividade hemaglutinante foi determinada macroscopicamente (MOREIRA & OLIVEIRA, 1983).

### 3.6 ESPECIFICIDADE POR AÇUCAR

A especificidade por açúcares da lectina presente no extrato bruto foi determinada segundo descrito por Moreira & Perrone (1977). A cada 100 µL de uma solução de NaCl 0,15 M, foram adicionados igual volume da solução de carboidratos e desta solução foram feitas diluições sequenciadas. Às diluições dos carboidratos foram adicionados 100 µL de extrato bruto e a mistura incubada em estufa a 37 °C por 30 min, seguidos de outros 30 minutos a temperatura de 25 °C. A seguir foram adicionados 100 µL de uma suspensão de hemácias a 3%, e a mistura deixada em estufa a 37 °C por 30 min, seguidos de outros 30 minutos a temperatura de 25 °C.

### 3.7 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE DA LECTINA

O efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante foi analisado usando alíquotas de uma solução de lectina em Tris-HCl 0,1 M pH 7,4 NaCl 0,15 M, as quais foram incubadas em banho seco às temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C por 10 min. Sendo após esse período verificada a sua atividade hemaglutinante pelo ensaio de hemaglutinação à temperatura ambiente.

### 3.8 EFEITO DO pH SOBRE A TIVIDADE DA LECTINA

A estabilidade da lectina frente a diferentes valores de pH foi determinada a partir de seu efeito sobre a atividade hemaglutinante. As amostras foram dissolvidas em soluções tampão com valores de pH que variaram de 1 a 12. Foram realizadas diluições seriadas no mesmo tampão em que se encontravam. Em seguida, o material foi colocado em estufa a 37 °C por 30 min e adicionado uma suspensão de hemácias a 3% para se analisar macroscopicamente a atividade hemaglutinante.

### 3.9 CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Uma coluna de Sepharose CL 4B com aproximadamente 60 cm (Figura 4) foi equilibrada com 5 volumes de coluna da solução tampão Tris HCl 0,1 M M pH 7,4 NaCl 0,15. Posteriormente, 200 mL extrato foi submetido a recirculação “overnight”. O pico não retido foi eluído com o mesmo tampão de equilíbrio e o pico retido foi eluído com o tampão Glicina 0,1 M pH 2,6 NaCl 0,15 M. A cromatografia seguiu em fluxo constante de 1,5 ml por minuto. Os eluatos foram monitorados em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 280 nm. O pico retido foi, dialisado, liofilizado e separado para análises posteriores.

Figura 4: Coluna de afinidade Sepharose CL 4B.



### 3.10 CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

A coluna de troca iônica Dietilaminoetil – Sephacel (DEAE – Sephacel) foi equilibrada com o tampão Tris (HCl) 0,025 M pH 7,6. O pico retido oriundo da cromatografia de afinidade foi resuspendido na solução tampão de equilíbrio Tris-HCl 0,025 M pH 7,6. O pico não retido foi eluído com a solução tampão Tris- HCl 0,025 M pH 7,6 e o pico retido foi eluído com um gradiente de NaCl que variou de 0,1 a 1 M. A cromatografia foi mantida sobre fluxo constante de 1,5 mL por minuto e monitorado em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 280 nm.

### 3.11 EXCLUSÃO MOLECULAR EM BIOGEL P-60

Com o intuito de melhor separação de proteínas o pico retido de Sepharose CL 4B foi submetido à filtração em BioGel P-30 em uma coluna de 70 cm de altura por 1 cm de diâmetro. A coluna foi equilibrada com o tampão Tris - HCl 0,1 M pH 7,4 NaCl 0,15 M. A mesma foi acoplada a um sistema de coleta automática. A filtração ocorreu no fluxo de 1:2, sendo coletado 1 mL em cada um dos 95 tubos dispostos (figura 5). O mesmo foi monitorado com espectrofotômetro em um comprimento de onda de 280 nm.

Figura 5: Coluna cromatográfica de Biogel P-60 acoplada a um sistema de coleta automática.



### 3.12 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS E $\beta$ -MERCAPTOETANOL

O grau de purificação após os ensaios cromatográficos foi determinado por meio do acompanhamento dos perfis eletroforéticos das amostras. Estes experimentos serão realizados utilizando-se a técnica descrita por Laemli (1970). Para tanto, o gel de concentração foi preparado na concentração de 3,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 e SDS a 1%, enquanto que o gel de separação foi montado formando um gradiente de 7,5 a 17,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 3M, pH 8,8 e SDS a 1%. As amostras oriundas dos extratos protéicos e dos picos cromatográficos, dissolvidos em tampão Tris-HCl 0,625M, pH 6,7, contendo SDS a 2%, glicerol a 10% e  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, foram aquecidas em estufa a 100 °C durante 10 minutos, centrifugadas por 5 minutos a 2500 g, e em seguida adicionado 10  $\mu$ L de azul de bromofenol 0,02%. A corrida ocorreu sob amperagem constante (25mA) e ao final da corrida, o gel foi retirado da placa e fixado em TCA 12,5% por uma hora, sendo então corado com Coomassie brilliant blue R-250 a 0,005%. A remoção do excesso de corante foi realizada com o auxílio de uma solução descorante de metanol, ácido acético e água (1:3,5:8, v/v/v).

### 3.13 COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS

Em parceria com a profa. Dr. Marta Madruga do Centro de Tecnologia (CT), Universidade Federal da Paraíba, foi feita a composição de aminoácidos de AFL. Realizado de acordo com o método descrito por White, Hart e Fry (1986), no qual os aminoácidos foram determinados em amostra previamente hidrolisada em ácido clorídrico bidestilado 6N, seguida de derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC). A separação dos derivativos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) foi realizada em cromatografo líquido de alta resolução (VARIAN, Waters 2690, California, USA) acoplado com coluna de fase reversa C18 (PICO-TAG, 3,9 x 150 mm). As fases móveis empregadas consistiram de um tampão acetato de concentração 0,0011 g/mL e pH 6,4 e, uma solução de acetonitrila a 60%. A injeção de 20 $\mu$ L da amostra foi efetuada manualmente e a detecção ocorreu a 254 nm. A separação cromatográfica foi realizada a um fluxo constante de 1ml/min, à temperatura de 35 °C. O tempo de corrida cromatográfica foi de 21 minutos.

A curva de calibração foi construída com sete pontos, traçando-se um gráfico das alturas dos picos obtidos pela injeção de 20  $\mu$ L da solução de aminoácido preparada numa faixa de

0,1875 µmol/mL a 0,25 µmol/mL. Em cada curva de calibração, o primeiro ponto correspondeu ao limite de quantificação nas condições empregadas, ou seja, a menor quantidade detectável pelo método.

### 3.14 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA

Estes experimentos foram realizados em parceria com a profa. Dr. Edeltrudes Lima, do Laboratório de Micologia Clínica, Universidade Federal da Paraíba, onde para o controle de atividade antimicrobiana foi usado cloranfenicol (100 µg/mL) para bactérias e nistatina (100 UI /mL) para leveduras. Os produtos foram adquiridos comercialmente da SIGMA-ALDRICH®.

Nos ensaios para avaliação da atividade biológica da lectina de *Aplysina fulva* (AFL), foram incluídas cepas:

**Bactérias:** *Staphylococcus aureus* ATCC- 25923, *S. aureus* LM-177. *S. aureus* LM-197 e *S. epidermidis* ATCC- 12228; e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-9027, *P. aeruginosa* ATCC-25853 e *P. aeruginosa* LM-16606.

**Leveduras:** *Candida albicans* ATCC- 76645, *C. albicans* LM-111, *C. albicans* LM-62, *Candida tropicalis* ATCC- 13803, *C. tropicalis* LM-23; *C. tropicalis* LM- 36.

As cepas foram adquiridas no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, Laboratório de Micologia e de Microbiologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba. As mesmas foram mantidas em meios de cultura apropriados, Agar Nutriente- AN para bactérias e Agar Sabouraud Dextrose- ASD para leveduras (DIFCO LABORATORIES/France/USA) e conservadas a 4 °C e a 35 °C.

A suspensão dos microrganismos foi preparada conforme o tubo 0.5 da Escala McFarland, ajustada através de leitura espectrofotométrica (Leitz-Photometer 340-800), para 90% T (530 nm), correspondendo, aproximadamente, a 10<sup>6</sup> UFC/mL (NCCLS 2000; HADACECK; GREEGER, 2000; NCCLS, 2000; CLEELAND; SQUIRES, 1991).

**Meios de cultura:** Os ensaios de atividade antifúngica e antibacteriana foram realizados em meio líquido Caldo Nutriente- CN para bactérias (DIFCO LABORATORIES/France/USA) e Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) para leveduras (ACUMEDIA/India). Os meios de cultura foram preparados e usados conforme as instruções de cada fabricante.

**Determinação das concentrações inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM):** A determinação da CIM de AFL foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas de microdiluição contendo 96 cavidades com fundo em forma de “U” e em duplicata. Em cada orifício da placa, foi adicionado 100 µL do CN (bactérias) e meio líquido RPMI (leveduras) duplamente concentrado. Posteriormente, 100 µL da lectina solubilizada, também duplamente concentrado, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 8 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa se encontrará a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foram adicionados 10 µL do inóculo dos microrganismos nas cavidades, onde cada coluna da placa referiu-se, especificamente, a uma cepa.

Foi feito controle de crescimento do microrganismo no meio de cultura; e com cloranfenicol (100 µg/mL) para bactérias, e nistatina (100 µg/mL) para leveduras. As placas foram seladas e incubadas a 35°C /72 h para os ensaios com bactérias e leveduras. No ensaio biológico com as bactérias, após 24 h de incubação, foi adicionado 20 µL de solução do corante resazurina a 0,01 % (INLAB), reconhecido como um indicador colorimétrico de óxido-redução (MANN; MARKAN, 1998). Após a mudança de coloração do corante (azul para vermelho), considerou-se como indicador de crescimento microbiano; e se a cor permanece azul, significa a ausência de crescimento microbiano. E foi considerada como CIM, a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento das cepas bacterianas usadas nos ensaios, verificado por uma não mudança da coloração do corante indicador. A CIM da lectina sobre as cepas fúngicas, foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano verificado nas cavidades, quando comparado com o crescimento controle.

Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média geométrica dos valores de CIM obtidas nos dois ensaios (CLEELAND; SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998; SOUZA et al., 2007).

A atividade antimicrobiana foi interpretada e considerada ativa ou não, conforme os seguintes critérios: 50-500 µg/mL = forte/ótima atividade; 600-500 µg/mL = moderada atividade; 600-1500 µg/mL = moderada atividade; > 1500 µg/mL = fraca atividade ou produto inativo (SARTORATTO ET AL., 2004; HOUGHTON ET AL.; 20007).

### 3.15 RECONHECIMENTO DE CARBOIDRATOS NA SUPERFÍCIE DE *Leishmania braziliensis*

Este experimento foi realizado em parceria com a profa. Dr. Márcia Rosa de Oliveira, do laboratório de *Leishmania*, Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba. Formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/2011/AF) foram cultivadas *in vitro* em meio de cultura ágar-sangue "Novy-MacNeal & Nicolle" (NNN) e meio Schneider (Sigma-Aldrich™, St. Louis, USA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), streptomomicina (100 µg/ml) e penicilina (100 U.I./mL) (Cultilab, São Paulo, Brasil), a uma temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  (AMORIM et al., 2013).

Para o ensaio de aglutinação, formas promastigotas em fase logarítmica de crescimento foram lavadas três vezes em tampão fosfato salina gelado [PBS (NaCl 145mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1mM, pH 7,4)], e quantificadas em câmara de Neubauer. Em microplacas de 96 poços foi adicionado 1mg/mL de AFL diluída em PBS, e realizado o procedimento de diluição seriada também em PBS. Em seguida, foram adicionadas as formas promastigotas dos parasitos ( $3 \times 10^7$  células/poço), incubadas por 10 min a 25 °C e analisadas em microscópio óptico comum e fotografados. As amostras foram analisadas comparando a dois controles: (1) formas promastigotas em PBS (ausência da lectina) e (2) formas promastigotas na presença da lectina mais solução de D-galactose (100mM).

### 2.15 ATIVIDADE ANTI TUMORAL

Este estudo foi feito em parceria com a profa. Dr. Deborah Schectman, do Instituto de Química (IQ) da Universidade de São Paulo (USP). As células de câncer de mama da linhagem MDA-MB-231 foram cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro bovino fetal inativado por calor (FCS). As células foram semeadas ( $8 \times 10^3$ ) em microplacas de microcultivo de 96 poços e incubadas por 24 horas com concentrações de AFL que variaram de 500 µM até 1 nM. Após as 24 horas 10 µL do reagente WST-1 foi adicionado e 30 minutos após sua adição as microplacas foram lidas em um leitor de microplacas para quantificação colorimétrica da citotoxicidade celular. No grupo controle não foi adicionada nenhuma concentração da lectina.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 EXTRAÇÃO, DOSAGEM DE PROTEÍNAS E ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

A tabela 4 apresenta a dosagem de proteínas e a atividade hemaglutinante específica nos diferentes extratos brutos obtidos a partir das soluções tampões utilizadas. Nesta verifica-se que a solução extratora que melhor solubilizou as lectinas presentes no extrato bruto da esponja marinha *Aplysina fulva* foi o tampão Tris HCl 0,1 M pH 7,4 NaCl 0,15 M, onde foi possível obter 688 µg / mL de proteínas solúveis no extrato. A solução tampão menos eficiente para extração de proteínas, foi a solução tampão Glicina 0,1 M pH 2,6 NaCl 0,15 M, que extraiu apenas 157 µg/ mL, ou seja 4,3 vezes menos proteínas do que o extrato preparado com Tris HCl 0,1 M pH 7,4 NaCl 0,15 M, no qual foi obtido 23,25 U.H.

Tabela 4: Teores de proteínas solúveis nos extratos e suas respectivas atividades específicas.

<b>Extrato</b>	<b>µg/ mL</b>	<b>Atividade específica (U.H)</b>
Glicina 0,1 M NaCl 0,15 M pH 2,6	157	50,95
Tris HCl 0,1 M NaCl 0,15 M pH 7,4	688	23, 25
Glicina 0,1 M NaCl 0,15 M pH 9,0	670	23, 88

Após a extração de proteínas da esponja marinha *Aplysina fulva* com diferentes soluções tampão, foi avaliada a atividade hemaglutinante, objetivando determinar em qual solução extratora estaria a melhor atividade hemaglutinante específica. Quanto ao título, no extrato preparado com solução de Glicina 0,1 M pH 2,6 NaCl 0,15 M, observamos inicialmente a presença de atividade hemaglutinante até a diluição 1:8 seguida de hemólise. Já nos extratos preparados com as soluções: Tris HCl 0,1 M pH 7,4 NaCl 0,15 M e Glicina 0,1 M pH 9,0 NaCl 0,15 M, também foi verificada a presença de atividade hemaglutinante, entretanto esta se deu até a diluição de 1:16 e sem hemólise posterior.

Por fim, devido a maior quantidade de proteínas solúveis e boa atividade específica encontrada, foi escolhido como solução extratora a solução tampão Tris HCl 0,1 M pH 7,4 NaCl 0,15 M. Embora a solução extratora escolhida tenha resultados semelhantes aqueles encontrados com a solução tampão Glicina 0,1 M pH 9,0 NaCl 0,15 M, optou-se pela solução

tampão Tris HCl 0,1 M pH 7,4 NaCl 0,15 M, por esta representar um valor de pH mais próximo a realidade encontrada no meio onde o organismo habita.

Escolhida a solução extratora, os ensaios de atividade hemaglutinante foram realizados utilizando-se hemácias de coelho normal e tratadas com as enzimas proteolíticas bromelaína, papaína e tripsina. Também foi analisada a atividade hemaglutinante sobre hemácias humanas do sistema ABO, contudo sem tratamento com enzimas proteolíticas. Como resultado, evidenciou-se que os extratos testados foram capazes de aglutinar hemácias de coelho independente de terem sido ou não tratadas com enzimas proteolíticas e que também foram capazes de aglutinar hemácias humanas normais (tabela 5).

Tabela 5: Ensaio de hemaglutinação do extrato bruto da esponja marinha *Aplysina fulva*. N.D: Não determinado.

Hemácias	Título de Hemaglutinação (U.H.)			
	Normal	Tratadas		
		Bromelaina	Papaína	Tripsina
<b>Coelho</b>	64	32	32	32
<b>Humanas A</b>	32	ND	ND	ND
<b>Humanas B</b>	64	ND	ND	ND
<b>Humanas O</b>	64	ND	ND	ND

Quando foi testada atividade hemaglutinante sobre hemácias de coelho, verificou-se um título de hemaglutinação de 64, que decresceu quando testado frente a hemácias de coelho tratadas com enzimas proteolíticas, apresentando valor de 32. Semelhantemente ao resultado encontrado para as hemácias de coelho tratadas com enzimas proteolíticas, a lectina presente no extrato proteico da esponja marinha *Aplysina fulva* também foi capaz de aglutinar hemácias humanas do tipo A com título de hemaglutinação de 32, entretanto aglutinou hemácias humanas do tipo B e O com título de hemaglutinação 64, mesmo valor encontrado para hemácias de coelho normais.

## 4.2 ESPECIFICIDADE POR AÇUCARES

Visando determinar qual o possível ligante glicídico da lectina presente no extrato da esponja marinha *Aplysina fulva* foi realizado um ensaio de inibição da atividade hemaglutinante com os seguintes carboidratos: glicose, lactose, frutose, manose, galactose, N-acetil-D-glicosamina, fucose, ribose, rafinose, xilose e arabinose. Dentre todos os carboidratos testados, a D-galactose foi o único carboidrato que inibiu a atividade hemaglutinante da lectina, muito embora sua inibição tenha sido fraca, uma vez que só aconteceu até a segunda diluição e numa concentração de 100 mM (Tabela 6). Estes resultados sugerem que a lectina presente liga-se de forma fraca ao açúcar galactose, pois apenas em concentrações acima de 100 mM foi observado efeito inibitória da atividade hemaglutinante, embora incompleto.

Tabela 6: Inibição da hemaglutinação. MIC: Concentração Inibitória Mínima; NI: Não Inibiu.

<b>Carboidrato</b>	<b>MIC (mM)</b>
D-Galactose	100
D-Glicose	NI
D-Frutose	NI
L-Fucose	NI
D-Ribose	NI
D-Arabinose	NI
D-Xilose	NI
D-Manose	NI
N-Acetil- D-glicosamina	NI

### 4.3 PURIFICAÇÃO DE AFL

As etapas de purificação de AFL são descritas na Tabela 6, onde podem ser constatados os teores de proteínas, atividade hemaglutinante, atividade específica e grau de purificação da nova lectina ao longo das etapas utilizadas.

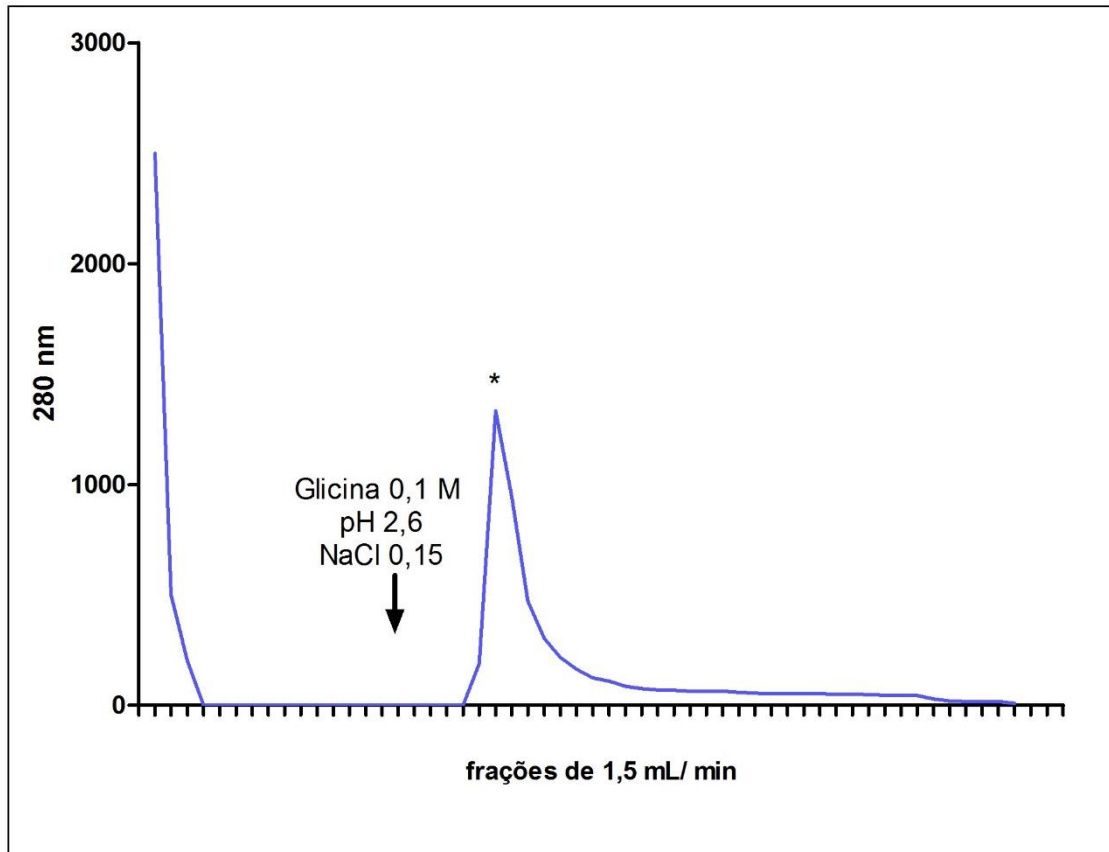
Tabela 7: Purificação da lectina da esponja marinha *Aplysina fulva* (AFL).

<b>Purificação</b>	<b>Total de Proteínas</b>	<b>Atividade Total (U.H/mg)</b>	<b>Atividade Específica (mg/ml)</b>	<b>Vezes de Purificação</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>Extrato</b>	0,575	16	27,82	1,0	100
<b>Sepharose CL 4B</b>	0,077	256	102,4	3,7	10,43
<b>DEAE Sephacel</b>	0,060	256	196,9	7,1	13,39

### 4.4 CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

A partir dos dados obtidos do ensaio de especificidade por açúcares, o extrato bruto foi aplicado em uma coluna de Sepharose CL 4B, uma matriz cromatográfica de afinidade que contém galactose em sua constituição. O pico não retido foi eluído com solução Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,4 NaCl 0,15 M até que a absorbância monitorada em comprimento de onda de 280 nm nas frações coletadas tenha sido zerada. Após obtenção do zero de leitura, o pico retido foi eluído da coluna com solução tampão Glicina 0,1 M pH 2,6 NaCl 0,15 M. Como resultado, obteve-se um pico único e uniforme, que ao ser submetido ao ensaio de atividade hemaglutinante, apresentou expressivo título com valor de 256. Como resultado deste título, a lectina foi purificada em 3,7 vezes (Tabela 6). O cromatograma obtido a partir da realização da cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose CL-4B encontra-se na Figura 6.

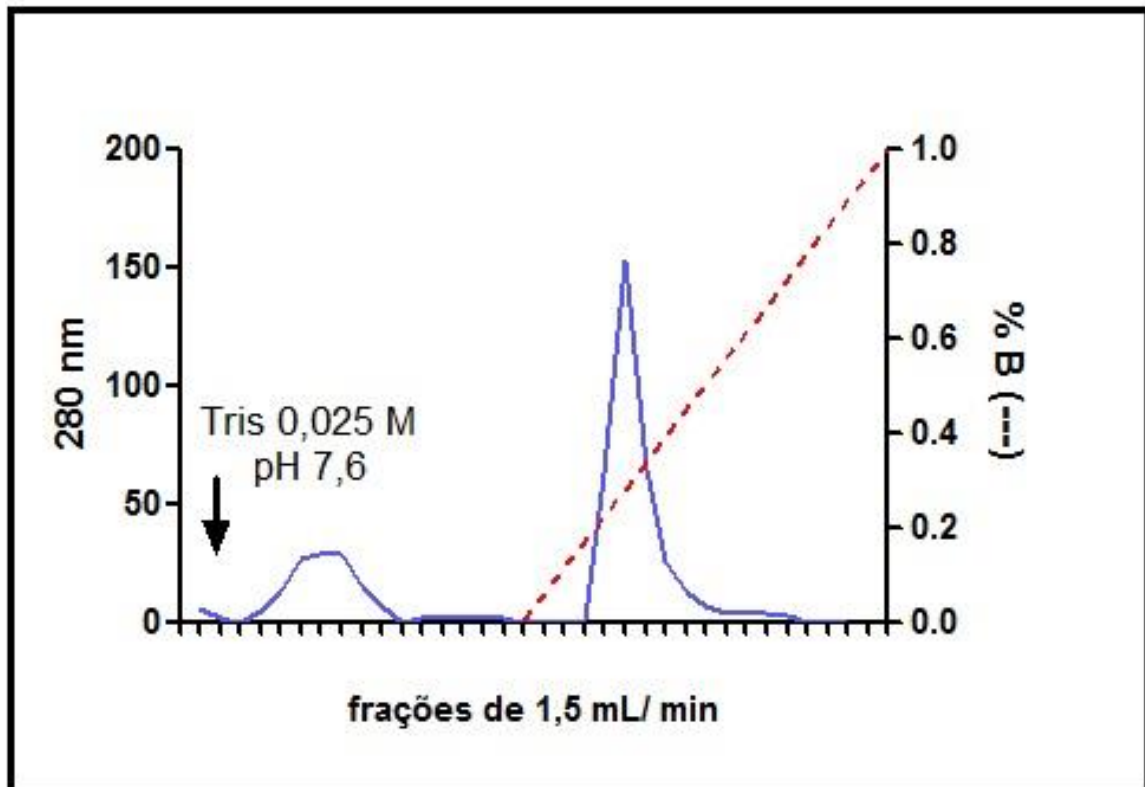
Figura 6: Perfil cromatográfico obtido por cromatografia de afinidade do extrato bruto da esponja marinha *Aplysina fulva* aplicado em coluna de Sepharose CL 4B. (\*): Atividade hemaglutinante determinada com suspensão de hemácias de coelho nativa a 3%.



#### 4.5 CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

O pico oriundo da cromatografia de afinidade foi dialisado, liofilizado e resuspenso em tampão Tris-HCl 0,025 M pH 7,6 e aplicado em uma coluna de troca iônica contendo matriz de Dietilaminoetil- Sephacel (DEAE-Sephacel). O pico não retido foi eluído com solução Tampão Tris-HCl 0,025 M pH 7,6 até que a absorbância monitorada em comprimento de onda de 280 nm nas frações coletadas tenha sido zerada. Após obtenção do zero de leitura, o pico retido foi eluído da coluna por meio de um gradiente de NaCl que variou de 0 a 1 M, gerando um pico único que encontra-se representado na Figura 7. Ao ser testada a atividade hemaglutinante do pico obtido, verificou-se um título de 256. Este valor estabelece que a lectina assim obtida foi purificada 7,1 vezes.

Figura 7 - Cromatograma de eluição do pico retido da coluna de troca iônica DEAE-Sephacel.

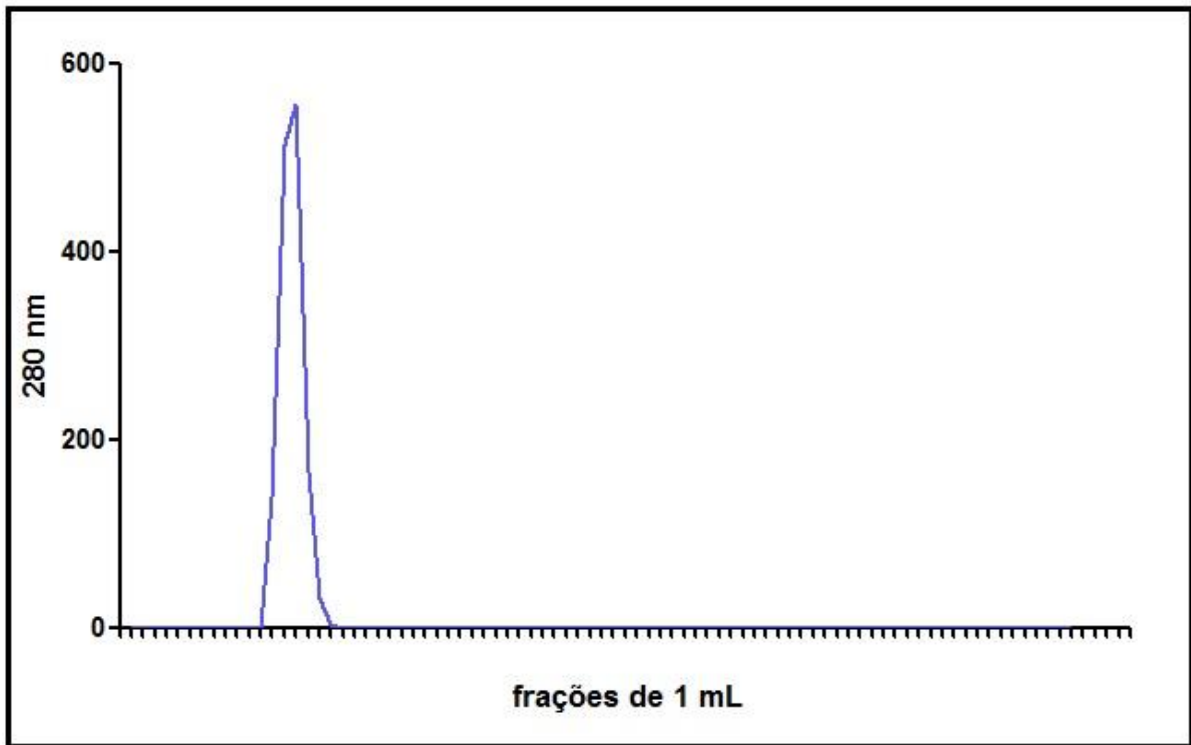


#### 4.6 EXCLUSÃO MOLECULAR EM BIOGEL P-60

Com o intuito de melhor separação de proteínas o pico retido de Sepharose CL 4B foi submetido à filtração em BioGel P-30 em uma coluna de 70 cm de altura por 1 cm de diâmetro. A coluna foi equilibrada com o tampão Tris - HCl 0,1 M pH 7,4 NaCl 0,15 M. A mesma foi acoplada a um sistema de coleta automático. A filtração ocorreu no fluxo de 1:2, sendo coletado 1 mL em cada um dos 95 tubos dispostos (figura 8). O mesmo foi monitorado com espectrofotômetro em um comprimento de onda de 280 nm.

O pico retido obtido por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose CL 4B foi dialisado, liofilizado e teve 3 mg ressuspendidas em 500  $\mu$ L de solução tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,4 NaCl 0,15 M para aplicação em coluna cromatográfica de exclusão molecular em matriz de BioGel P-60. Este procedimento teve como finalidade verificar se haveria mais de uma proteína no pico obtido a partir da cromatografia de afinidade, bem como de possíveis fragmentos do processamento da mesma proteína. A cromatografia de exclusão molecular durou 14 horas e ao final, foi obtido um pico com atividade hemaglutinante (Figura 8).

Figura 8: Cromatograma da exclusão molecular em Biogel P-60.



#### 4.7 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

O grau de purificação da lectina em todos os passos de purificação foi avaliado por meio de eletroforese de poliacrilamida na presença de SDS (PAGE-SDS) e na ausência de SDS (PAGE). Na PAGE-SDS do pico obtido por cromatografia de afinidade em Sepharose CL-4B foi constatada a presença de 3 bandas com pesos moleculares de 76, 51 e 27 kDa (Figura 9). No passo de purificação seguinte, cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel, em PAGE-SDS do referido pico retido foi encontrada apenas uma banda proteica com peso molecular de aproximadamente 27 kDa (Figura 9-10). Contudo, quando a mesma amostra é submetida a PAGE, constatou-se a presença de apenas uma banda proteica, com peso molecular de aproximadamente 52 kDa (Figura 11).

Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (PAGE-SDS). Perfil eletroforético de amostras oriundas da cromatografia de afinidade (A) e cromatografia de troca iônica (B e C).

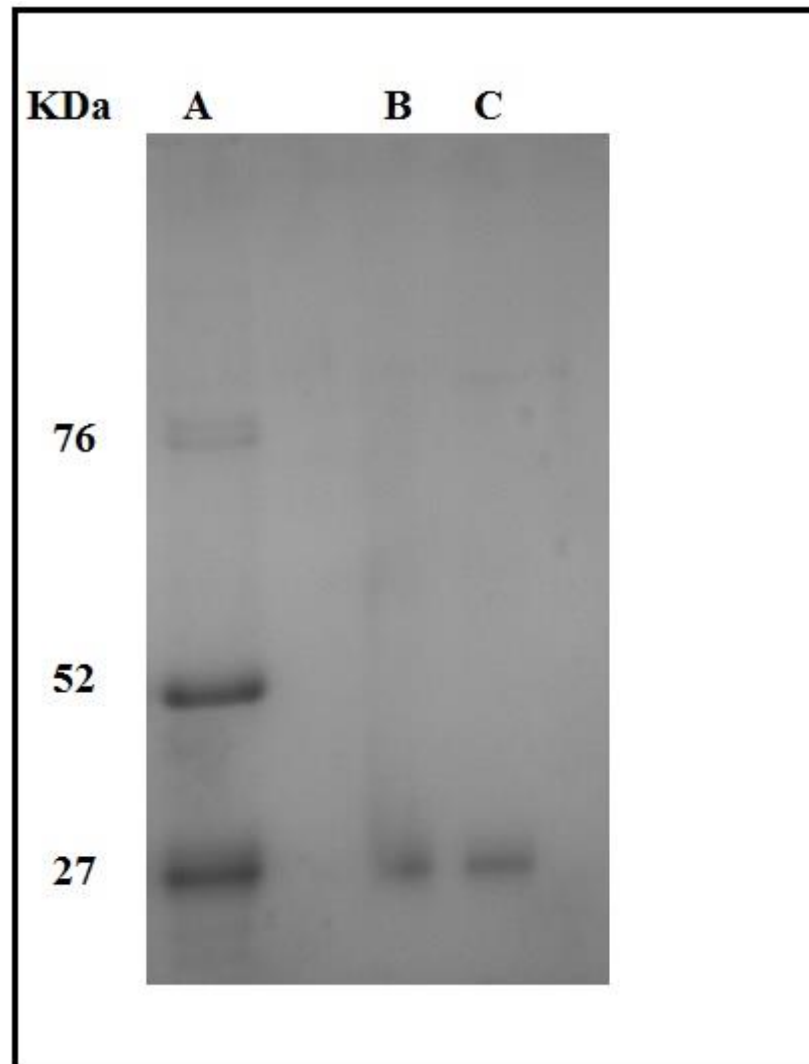


Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (PAGE-SDS). Amostra referente a lectina purificada através de cromatografia de troca iônica. A: Imagem após duas lavagens com solução descorante com 10% ácido acético e 20% de metanol. B: Imagem após sucessivas lavagens com solução descorante. (I e III) Marcadores molecular: 225 kDa, 150 kDa, 102 kDa, 76 kDa, 52 kDa, 38 kDa, 31 kDa, 24 kDa, 17 kDa e 12 kDa. (II e IV): Pico retido da cromatografia de troca iônica. C: Determinação da massa molecular de AFL por reta de regressão linear simples. Marcadores molecular: 52 kDa, 38 kDa, 31 kDa, 24 kDa, 17 kDa e 12 kDa .

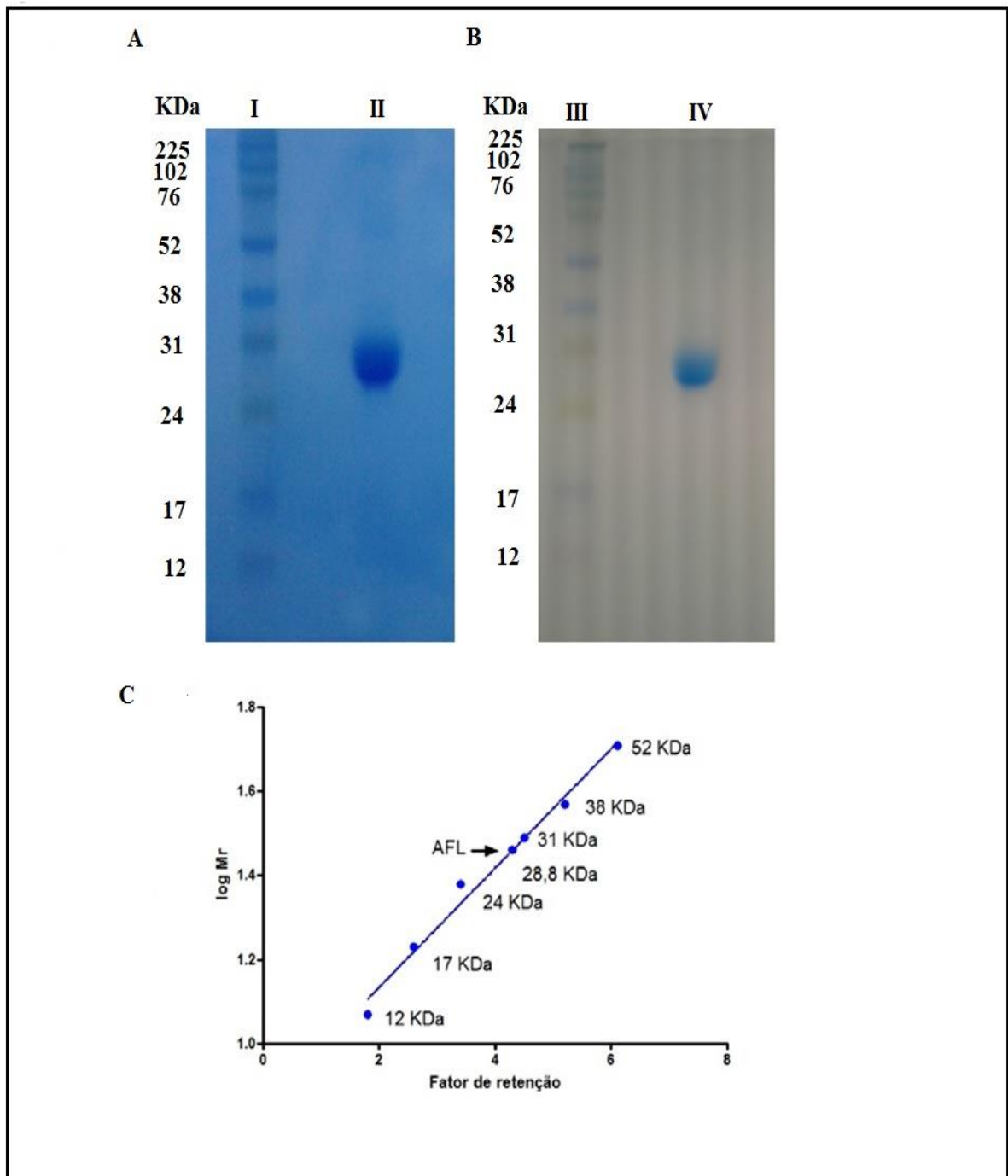
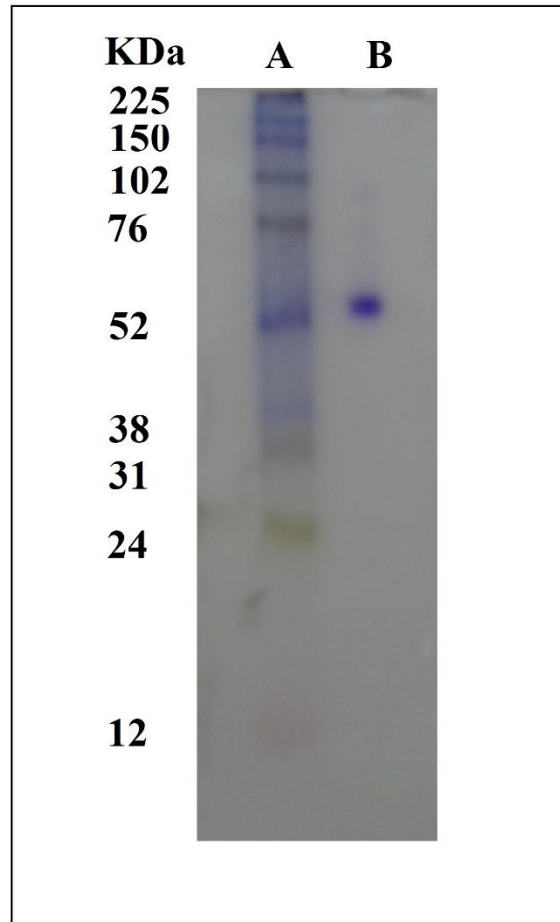


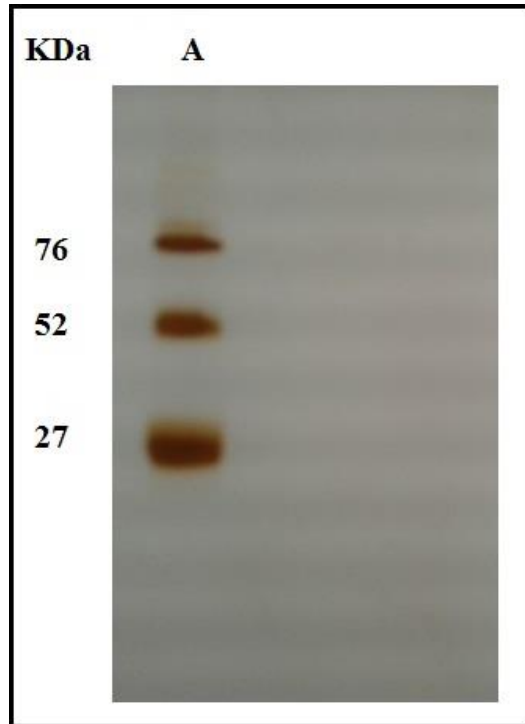
Figura 11: Padrão eletroforético do pico do cromatograma de troca iônica DEAE-Sephacel em gel de poliacrilamida não desnaturante. (A) Marcadores moleculares: 225 kDa, 150 kDa, 102 kDa, 76 kDa, 52 kDa, 38 kDa, 31 kDa, 24 kDa e 12 kDa (B) Pico retido da cromatografia de troca iônica.



Devido a presença de outras bandas superiores na corrida da amostra oriunda cromatografia de afinidade, como pode ser visualizado na PAGE-SDS (Figura 9), foi realizada uma filtração em gel com o intuito de melhor esclarecer a presença destas bandas. A eletroforese em gel de poliacrilamida do único pico eluído (Figura 12) da cromatografia de exclusão molecular em BioGel P-60 (Figura 8) evidenciou o mesmo padrão de bandas proteicas obtidas no passo de purificação anterior.

A disposição destas bandas observadas nas amostras obtidas a partir de DEAE-Sephacel, nos leva a concluir que AFL é um dímero que apresenta 57 kDa, composto por subunidades de 28,8 kDa.

Figura 12: Padrão eletroforético da exclusão molecular em BioGel P-60. Observa-se a presença de 3 bandas proteicas, com aproximadamente 76, 52 e 27 kDa.

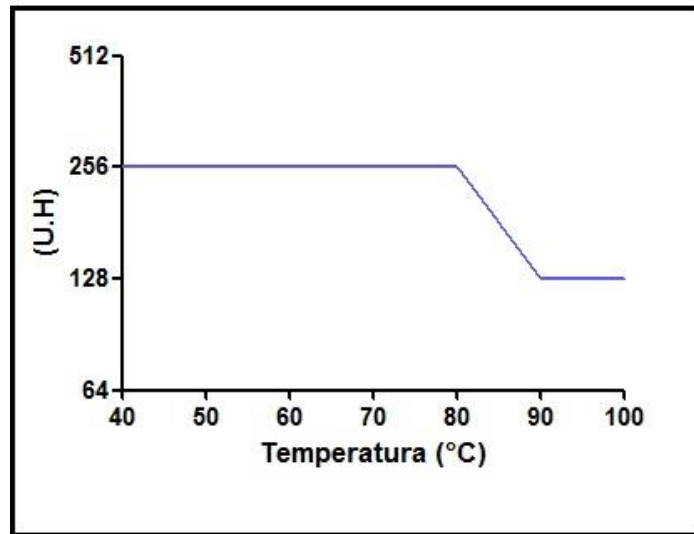


#### 4.8 EFEITO DA TEMPERATURA E DO pH NA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

Objetivando conhecer algumas propriedades de AFL, foram realizados testes que avaliaram sua atividade hemaglutinante frente a variações de temperatura. AFL mostrou-se resistente a elevadas temperaturas (Figura 13). Até a temperatura de 80 °C, AFL apresentou a mesma capacidade de exercer a hemaglutinação e apenas em temperaturas acima de 90 °C foi perdida 50% da sua atividade hemaglutinante.

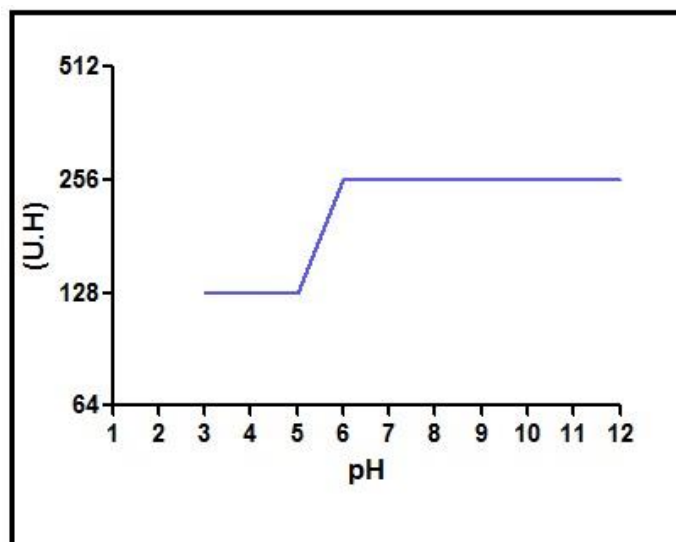
Esses resultados indicam que AFL é uma proteína termo resistente, pois nem mesmo a exposição a 100 °C levou à perda da sua função.

Figura 13: Curva de Termo Estabilidade de AFL.



Em relação ao efeito da variação do pH sobre a atividade hemaglutinante, nota-se que a lectina é relativamente sensível a pHs ácidos, pois em pH 1 e 2 não foi observada a presença de atividade hemaglutinante. Já na faixa de pH de 3 à 5 é notável a perda de 50% de atividade hemaglutinante, quando comparado com a atividade apresentada no pH de extração (7,4). Já em pHs alcalinos (faixa de 6 a 12) observou-se considerável potencialização da atividade hemaglutinante, que mostrou-se mais forte (figura 14). Desta forma, podemos concluir que AFL é uma lectina que tem melhor atividade em pHs básicos.

Figura 14: Efeito do pH sobre AFL.



#### 4.9 QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS

Após o passo de purificação da lectina, com intuito de melhor caracteriza-la, foi realizada a quantificação de aminoácidos pelo método descrito por White, Hart e Fry, (1986). Nossos resultados (Tabela 8) mostram que o aminoácido mais presente em AFL é a leucina, um aminoácido hidrofóbico que provavelmente deve fazer parte do grande centro hidrofóbico da proteína. O segundo aminoácido mais presente em AFL é justamente o isômero do aminoácido anterior, a isoleucina que também deve estar associado ao centro hidrofóbico da lectina. O aminoácido menos presente é a alanina, outro aminoácido hidrofóbico.

Tabela 8: Quantificação de aminoácidos.

<b>Aminoácido</b>	<b>mg do aminoácido/100mg AFL</b>
Leucina	11,2452
Isoleucina	9,7871
Fenilalanina	7,9505
Lisina	6,1872
Metionina	5,6489
Ácido Glutâmico	5,3195
Arginina	4,7818
Tirosina	4,4005
Treonina	3,8587
Histidina	3,4918
Serina	3,2876
Valina	2,9718
Ácido Aspártico	1,9298
Alanina	1,5834

#### 4.10 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIFUNGICA

No ensaio pela técnica de microdiluição para avaliação da atividade antibacteriana da lectina na concentração de 1024 a 4 µg/mL, foi observado que a mesma não produziu inibição sobre as cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* ATCC-12228 Mas, na concentração de 64 µg/mL, promoveu inibição sobre o crescimento das cepas de *P. aeruginosa* ATCC- 25853 e *P. aeruginosa* LM-606, sendo este valor considerado a sua CIM (Tabela 9).

Tabela 9: Resultados da avaliação da Concentração inibitória mínima- CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) de lectina sobre bactérias - Técnica de microdiluição. (-): Não houve crescimento do microrganismo. (+): crescimento do microrganismo.

AFL	Microrganismos							
	<i>S. aureus</i> ATCC-24923	<i>S. aureus</i> LM-17	<i>S. aureus</i> LM-197	<i>S. epidermidis</i> ATCC-12228	<i>P. aeruginosa</i> ATCC-9027	<i>P. aeruginosa</i> ATCC-25853	<i>P. aeruginosa</i> Lm-606	
<b>1024</b>	+	+	+	+	+	-	-	
<b>512</b>	+	+	+	+	+	-	-	
<b>256</b>	+	+	+	+	+	-	-	
<b>128</b>	+	+	+	+	+	-	-	
<b>64</b>	+	+	+	+	+	-	-	
<b>32</b>	+	+	+	+	+	+	+	
<b>16</b>	+	+	+	+	+	+	+	
<b>8</b>	+	+	+	+	+	+	+	
<b>4</b>	+	+	+	+	+	+	+	
<b>Cloranfenicol</b>	+	+	-	-	+	-	-	
<b>Cepa bacteriana</b>	+	+	+	+	+	+	+	

Os resultados dos ensaios da atividade antifúngica de AFL sobre as cepas fúngicas testadas estão notificados na tabela 10. As leveduras ensaiadas apresentaram maior sensibilidade à AFL do que as espécies bacterianas. A lectina na concentração até 128  $\mu\text{g/mL}$  inibiu o crescimento de quatro das cepas, *C. albicans* ATCC-76645, *C. albicans* LM-111, *C. tropicalis* LM-36 e *C. tropicalis* ATCC-13803. Já em concentrações de 512  $\mu\text{g/mL}$ , produziu inibição sobre o crescimento das seis (100 %) cepas do gênero *Candida* utilizadas nos ensaios biológicos. Desta forma, a CIM de 50 % ficou estabelecida na concentração de 128  $\mu\text{g/mL}$  e a de 100 % em 512  $\mu\text{g/mL}$ . Foi determinado que a CFM é na concentração de 512  $\mu\text{g/mL}$  para as cepas de *C. albicans* ATCC-76645, *C. albicans* LM-111 e *C. tropicalis* LM-36.

Os resultados obtidos dos ensaios de atividades biológicas da lectina sobre espécies bacterianas e de leveduras através da CIM, podem ser considerados de ótima atividade biológica, levando em consideração os parâmetros estabelecidos por Sartoratto et al., 2004; Houghton et al.; 2007.

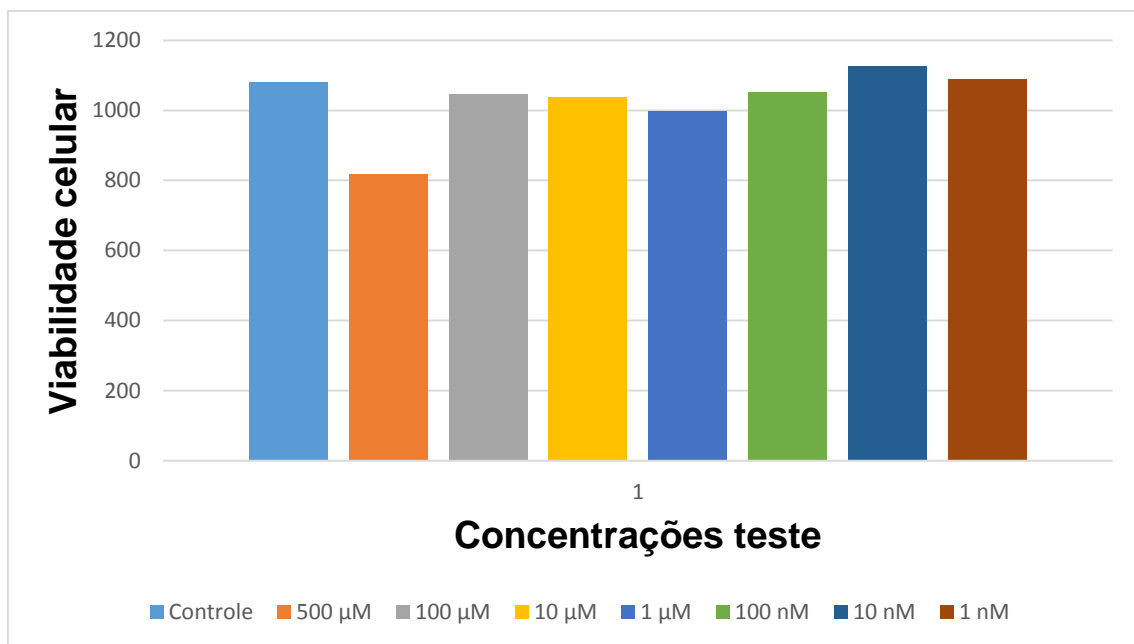
Tabela 10: Resultados da avaliação da Concentração inibitória mínima- CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) da lectina sobre leveduras- Técnica de microdiluição. (-): não houve crescimento do microrganismo (+): crescimento do microrganismo.

AFL	Microrganismos					
$\mu\text{g/mL}$	<i>C. albicans</i> ATCC- 76645	<i>C. albicans</i> LM- 111	<i>C. albicans</i> LM- 62	<i>C. tropicalis</i> ATCC- 13803	<i>C. tropicalis</i> LM- 23	<i>C. tropicalis</i> LM-36
<b>1024</b>	-	-	-	-	-	-
<b>512</b>	-	-	-	-	-	-
<b>256</b>	-	-	+	-	+	-
<b>128</b>	-	-	+	-	+	-
<b>64</b>	+	+	+	+	+	+
<b>32</b>	+	+	+	+	+	+
<b>16</b>	+	+	+	+	+	+
<b>8</b>	+	+	+	+	+	+
<b>4</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Nistatina</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Cepa fúngica</b>	+	+	+	+	+	+

#### 4. 11 ATIVIDADE ANTITUMORAL

Após a leitura no leitor de microplacas, as absorbâncias foram comparadas com o grupo controle (sem tratamento com AFL) e foi constatado que a concentração de 500  $\mu\text{M}$  foi a única que causou uma baixa toxicidade nas células MDA-MB-231 entretanto, esse dado não sugere que AFL possa causar morte em células tumorais, já que o número de células viáveis ainda permanece próximo ao controle (Figura 15). Outra observação interessante é que na concentração de 10 nM foi observado um aumento muito baixo da proliferação celular, entretanto esse dado também não pode ser considerado como indicativo de propriedade mitogênica, já que a quantidade de células nessa concentração não é tão diferente do grupo controle. Esses dados nos sugerem que a lectina presente em *Aplisina fulva* não é tóxica para células de câncer de mama da linhagem MDA-MB-231.

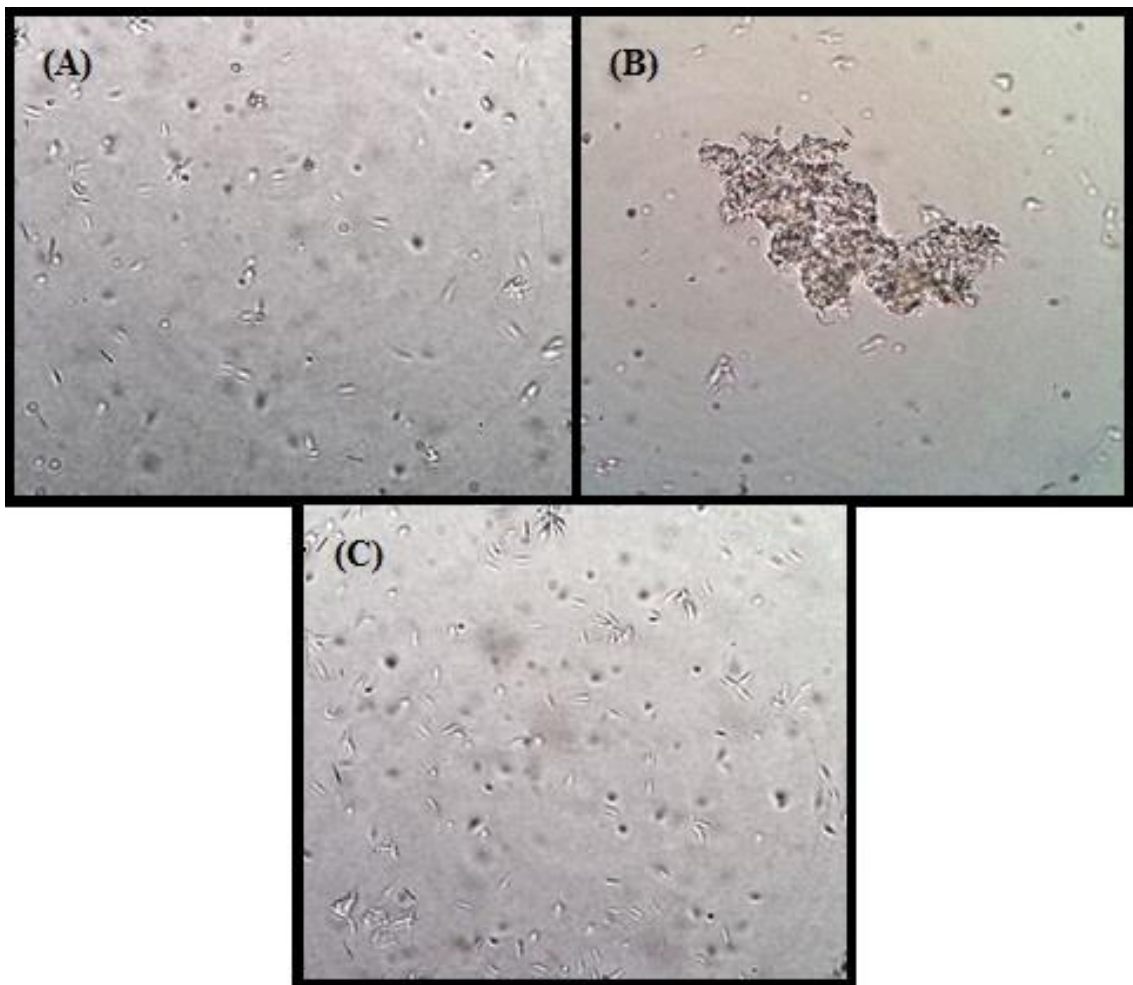
Figura 15: Toxicidade contra células de câncer de mama da linhagem MDA-MB-23.



#### 4. 12 DETECÇÃO DE CARBOIDRATOS NA SUPERFÍCIE DE *Leishmania braziliensis*

A análise sob microscopia óptica demonstrou que a partir de 125  $\mu\text{g/ml}$  AFL foi capaz de aglutinar as formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* em fase logarítmica de crescimento (Figura 16 B). A adição de 100 mM de galactose foi capaz de reverter essa aglutinação, confirmando a especificidade e capacidade dessa lectina para reconhecer e se ligar a D-galactose (Figura 16 C).

Figura 16: Teste de aglutinação de formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. (A): Controle negativo, promastigotas na presença de PBS; (B): promastigotas na presença de 125  $\mu\text{g/ml}$  de AFL; (C) : promastigotas na presença de 125  $\mu\text{g/ml}$  de AFL mais 100mM de galactose



## 5. DISCUSSÃO

A esponja marinha *Aplysina fulva* pode ser considerada uma nova fonte de lectinas de invertebrados, tendo em vista que no presente estudo foi purificada uma lectina dímica (AFL) da referida espécie com subunidades de massa molecular de aproximadamente 28,8 kDa, rica em leucina, específica para galactose e termo resistente. Na forma nativa, em gel de eletroforese, a lectina apresentou-se como dímero evidenciada pela presença de uma única banda proteica com 57 kDa. Por análise destes padrões eletroforéticos foi sugerido que a lectina em sua forma dímica é formada por duas subunidades mantidas provavelmente através de interações não covalentes do tipo iônicas, pontes de hidrogênio e hidrofóbicas.

Dentro do mesmo gênero (*Aplysina*), estruturas oligoméricas com peso molecular próximo ao encontrado para AFL foram relatadas para as lectinas das esponjas marinhas *Aplysina archeri* e *Aplysina lawnosa* (MIARONS; FRESNO, 2000). *Aplysina archeri*, assim como *Aplysina lawnosa*, é uma glicoproteína cuja estrutura se apresenta na forma de homotetrâmero de 64 kDa, onde cada subunidade tem aproximadamente 16 kDa. Ambas as lectinas são dependentes de cálcio e mangânes, mas diferem em sua composição de carboidratos (MIARONS; FRESNO, 2000). Comparando o peso molecular da lectina isolada da esponja marinha *Aplysina fulva* com aqueles encontrados para as lectinas de outras esponjas do mesmo gênero (*A. archeri* e *A. lawnosa*), constata-se que a lectina isolada em nossos estudos apresenta 7 kDa de diferença das demais isoladas.

Lectinas de esponjas marinhas com estruturas diméricas são bem conhecidas na literatura científica. Um exemplo clássico, é a lectina I de *Axinella polypoides* que apresenta-se na forma de dímero com 21 kDa (BREATTING, H; KABAT, E. A, 1976). Entretanto esta não é a única lectina de esponja marinha com estrutura em dímero relatada. A lectina de *Halichondria okadai*, também apresenta-se como um dímero com subunidades de 30 kDa unidas por pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas ou iônicas, evidenciadas por PAGE-SDS (KAWSAR et al., 2008). Da mesma forma, a lectina II da esponja marinha *Haliclona caeruela* (H-2) apresenta-se como um dímero de 30 kDa, também unido por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (CARNEIRO et al., 2012).

AFL é uma lectina termo estável a aquecimento até 80 °C, sendo este valor mais alto que aquele observado para as lectinas de *Cliona varians* (MOURA et al, 2006) e *Cinachyrella apion* (MEDEIROS et al., 2010), cujos limites de estabilidade térmica foram até 60 °C. Atingida

a temperatura de 80 °C, AFL permanece ainda com 50% de sua atividade hemaglutinante até o máximo de temperatura testada (100 °C). Este mesmo comportamento foi verificado para a galectina da esponja marinha *Cinachyrella spp*, que da mesma forma que AFL, é altamente termo estável, uma vez que o título de atividade hemaglutinante desta lectina diminui em 50% após exposição a temperaturas acima de 80° C, permanecendo mesmo após aquecimento à 100 °C, sendo necessário aquecimento por duas horas para que haja diminuição da mesma (UEDA et al., 2013). Além das lectinas das esponjas marinhas *Cliona varians* (MOURA et al, 2006) e *Cinachyrella apion* (MEDEIROS et al., 2010), outras lectinas, como aquelas das esponjas marinhas *Pellina semitubulosa* (ENGEL et al.,1992) e *Haliclona cratera* (PAJIC et al, 2002), também apresentam valores de termo estabilidade até 56 °C, estando estes bem abaixo daqueles encontrados para AFL. Contudo, semelhantemente a AFL, estas lectinas apresentam a capacidade de manter, por certo tempo, sua atividade hemaglutinante em valores de temperatura superiores ao seu limite de termo estabilidade. Não somente nas esponjas marinhas, mas também em outros invertebrados marinhos, como o bivalve *Pteria penguin*, constatou-se a presença de lectina com termo estabilidade. Neste organismo, a lectina mantém sua atividade hemaglutinante constante até a temperatura de 60 °C, reduzindo em 50% após atingir 70 °C, todavia, de maneira diferente as demais lectinas aqui discutidas, sua atividade hemaglutinante foi completamente abolida após exposição a 100 °C durante 1 hora (NAGANUMA et al., 2006).

Em invertebrados marinhos, assim como em outros organismos superiores, lectinas parecem apresentar melhores resultados de atividade hemaglutinante quando extraídas em pHs neutro a básico. AFL não foge esta regra, uma vez que apresentou melhores resultados de atividade hemaglutinante em pHs básicos. Resultados semelhantes foram descritos por Pajic e colaboradores (2002) e Carneiro e colaboradores (2012) para as lectinas das esponjas marinhas *Haliclona cratera* e *Haliclona caerulea*, respectivamente, que da mesma forma que AFL apresentaram baixa atividade hemaglutinante em pHs ácidos e crescente atividade hemaglutinante em pHs na faixa de neutro a alcalino. Contudo, quando comparado a AFL, algumas lectinas, como a da esponja marinha *Halichondria okadai* (KAWSAR et al., 2008), perdem completamente sua atividade hemaglutinante em pHs ácidos, embora mantenham o mesmo comportamento em pHs básicos.

Lectinas de esponjas marinhas apresentam uma especificidade peculiar por galactose e derivados oligossarídicos de galactose, tal característica também está presente nas lectinas de leguminosas, todavia estas apresentam especificidade por outros carboidratos, neste caso, por glicose e seus derivados. Da mesma que forma que outras lectinas de esponjas marinhas, AFL

conserva especificidade de ligação a galactose, embora não tenha demonstrado tanta afinidade por este carboidrato, uma vez que é necessária uma concentração de 100 mM de D-galactose para que se verifique uma diminuição de sua atividade hemaglutinante. Frequentemente na literatura científica são encontrados relatos da presença de lectinas de esponjas marinhas que se ligam a galactose com alta afinidade, exemplo disso é a lectina de *Cliona varians* (MOURA et al., 2006). A lectina monomérica com 29 kDa de *Haliclona cratera* (PAJIC et al., 2002) liga-se, além de galactose, a N-acetil-D-galactosamina e oligossacarídeos de  $\beta$ -D-galactose. Esta ligação a oligossacarídeos de  $\beta$ -D-galactose também já foi relatada para as lectinas de *Aplysina archeri* e *Aplysina lawnosa* (Miarons; Fresno, 2000). Já as lectinas I e II de *Axinella polypoides* (BREATTING; KABAT, 1976), além de ligar-se a galactose ligam-se também a fucose.

Durante a caracterização da composição de aminoácidos da lectina da esponja marinha *Aplysina fulva* constatou-se que os aminoácidos hidrofóbicos leucina e isoleucina são os que estão presentes em maiores teores percentuais, seguido da lisina, um aminoácido básico. Os mesmos resultados já foram descritos para a lectina da esponja marinha *Haliclona cratera* que se mostrou rica em aminoácidos hidrofóbicos e apresentando abundância de aminoácidos básicos (PAJIC et al., 2002). Já a lectina isolada a partir da esponja marinha *Craniella australiensis* apresentou altos teores de treonina, um aminoácido polar sem carga e glicina, um aminoácido hidrofóbico (XIONG et al., 2006).

Considerando que esponjas marinhas produzem uma gama de compostos bioativos que são capazes de protegê-las contra predadores e impedem infecções, testou-se AFL em modelos de estudo de toxicidade frente a microrganismos e algumas células. Dessa maneira foi verificada a capacidade de AFL inibir o crescimento de bactérias e fungos. Os resultados obtidos mostraram que AFL na concentração de 64  $\mu$ g/ mL apresentou toxicidade para cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (LM-606 e ATCC-25853). Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Fenton e colaboradores (2013) que estudando a lectina de *Sphaciospongia vesparia* demonstraram que a mesma exibe atividade antibacteriana contra as bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichea coli*, indicando que essas proteínas talvez estejam envolvidas em processos de defesa dessa esponja marinha. Anteriormente, alguns estudos já haviam sido feitos com lectinas do gênero *Aplysina*, demonstrando que estas são capazes de inibir o crescimento de *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Escherichea coli* e *Salmonella enteritidis* (MIARONS; FRESNO, 2000). Atividade antibacteriana frente a *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* foi relatada por Moura e colaboradores (2006), que demonstraram que a lectina de *Cliona varians* (CvL) na

concentração de 25 µg/mL foi capaz de inibir 75% do crescimento bacteriano. Em dose de 100 µg/mL alcançou-se uma capacidade inibitória de 90% do crescimento bacteriano.

Os resultados obtidos mostram que AFL na concentração de 128 µg/ mL foi capaz de inibir o crescimento das leveduras *Candida albicans* (ATCC- 76645), *C. albicans* (LM- 111), *C. tropicalis* (ATCC- 13803) e *C. tropicalis* (LM-36), entretanto *Candida albicans* (LM-62) e *C. tropicalis* (LM-23) só foram inibidas quando a concentração foi aumentada para 512 µg/mL. Atividade antifúngica moderada foi relatada para a lectina da esponja marinha *Halichondria okadai* (HOL-30) frente a cepas de *Botryodiplodia theobrome*, *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata*, *Macrophomia phaseolina* e *Colletotrichum corchori* (KAWSAR et al., 2008). Apesar destes relatos mais recentes, atividade antifúngica de lectinas de esponjas marinhas ainda é um assunto pouco estudado. Outros compostos oriundos de esponjas marinhas também apresentam atividade antifúngica, como por exemplo, o peptídeo jasplacinolida que é um ciclodepsipeptídeo isolado a partir da esponja marinha *Jaspis sp.* Este peptídeo é seletivo para *C. albicans* com MIC de 25 µg/ mL. A atividade tópica de uma solução a 2% de jasplacinolida em infecções vaginais de *C. albicans* é semelhante a de nitrato de miconazol (LAPORT; SANTOS; MURICY, 2009).

Ao buscar um possível efeito tóxico da lectina da esponja marinha *Aplysina fulva* frente a células de câncer de mama da linhagem (MDA-MB-231), não foram constatadas diferenças significativas na viabilidade das células testadas. Este resultado diverge de outros já publicados na literatura científica. A lectina de *Halichondria cratera* apresentou 50% da viabilidade de sobrevivência celular (IC50) em doses de 9 µg/mL e 11 µg/mL frente a células HeLa e FemX, respectivamente (PAJIC et al., 2002). A lectina de *Cinachyrella apion* (CaL) também apresenta toxicidade contra células de adenocarcinoma cervical das linhagens HeLa, PC3 e 3T. Neste ensaio, populações celulares tratadas com a lectina foram inibidas de forma dose-dependente. A linhagem celular mais sensível a CaL foi a de células HeLa, apresentando um IC50 de 10 µg/mL (RABELO et al., 2012). A lectina de *Cliona varians* (CvL) é capaz de inibir o crescimento de células leucêmicas humanas da linhagem K562, sendo o IC50 obtido com uma concentração em torno de 70 µg/mL. Na concentração de 20 µg/mL 80% das células não apresentam sinais de toxicidade, enquanto com tratamento na dose de 80 µg/mL esse valor cai em 25%. Ainda com relação a CvL, os mesmos pesquisadores perceberam que células T imaturas (linhagem celular JURKAT) também tem sua proliferação inibida, mas de forma menos sensível, apresentando um valor de IC50 de 100 µg/mL. Entretanto, CvL não apresenta toxicidade frente a linfócitos normais de sangue periférico (QUEIROZ et al., 2009).

As formas promastigotas de *Leishmania* sp. apresentam na sua superfície um glicolípido de alto peso molecular, o lipofosfoglicano (LPG), que está inserido na membrana desses parasitas por uma âncora hidrofóbica de glicosilfosfatidil-inositol. Essas macromoléculas são de grande importância na interação dos parasitos com o intestino do inseto vetor (SOARES et al., 2002) assim como, na internalização e sobrevivência dos parasitos no hospedeiro mamífero (TURCO & DESCOTEAUX, 1992). É conhecido que o LPG presente na superfície das formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* apresenta uma expressiva expressão e exposição de galactose (SOARES et al., 2005). Portanto a capacidade de AFL aglutinar formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* confirma a especificidade desta lectina para galactose além de revelar a potencialidade desta lectina como uma ferramenta molecular para o estudo de carboidratos de superfície em *Leishmania* sp. A utilização de lectinas para o estudo de carboidratos na superfície de *Leishmania* sp é documentado em outros trabalhos. Moura e colaboradores (2006) observaram que formas promastigotas de *L. chagasi* poderiam ser aglutinadas pela lectina da esponja marinha *Cliona varians*. Posteriormente, estudando as aplicações biológicas da lectina de *Cinachryrella apion* (CaL), Medeiros e colaboradores (2010) constataram que na concentração de 1 mg/ml esta lectina foi capaz de aglutinar formas promastigotas de *Leishmania chagasi*. Esta aglutinação não ocorre na presença do carboidrato lactose, fato que comprova a ligação específica de CaL a este glicídeo presente na superfície de *L. chagasi*.

## 6. CONCLUSÕES

- Uma nova lectina capaz de aglutinar hemácias de coelho e humanas foi purificada a partir da esponja marinha *Aplysina fulva* (AFL);
- AFL foi parcialmente inibida pelo carboidrato galactose sugerindo ser uma lectina ligante a oligossacarídeos derivados de galactose;
- Estruturalmente, através da análise do perfil eletroforético da proteína nativa, AFL apresenta-se como dímero de aproximadamente 57 kDa com subunidades de 28,8 kDa;
- AFL é uma lectina termoestável cuja melhor condição de pH para manter sua atividade é na faixa de neutro a alcalino;
- AFL apresenta em sua composição grande quantidade de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos de leucina e isoleucina;
- A lectina foi capaz de inibir o crescimento de cepas de *P. aeruginosa* (ATCC-25853) e *P. aeruginosa* (LM-606);
- A lectina foi capaz de inibir o crescimento de cepas de *C. albicans* (ATCC- 76645), *C. albicans* (LM- 111), *C. tropicalis* (ATCC- 13803) e *C. tropicalis* (LM-36) na concentração de 128 µg/mL e de *C. albicans* (LM- 62) e *C. tropicalis* (LM- 23) na concentração de 512 µg/mL;
- AFL não apresenta efeitos citotóxicos contra células de câncer de mama da linhagem MDA-MB-231;
- A lectina mostrou-se hábil em aglutinar formas promastigotas de *Leishmania brasiliensis* através do reconhecimento de galactose em sua superfície.

## 7. REFERÊNCIAS

AGAPOV, I. I; TONEVITSKY, A. G; MALUCHENKO, N. V; MOISENOVICH, M. M; BULAH, Y. S; KIRPICHNIKOV, M. P. Mistletoe lectin A-chain unfolds during the intracellular transport. **FEBS Lett**, v. 464, n. 1-2, p. 63-6, Dec 24 1999.

ALLIGIANAIS, N; KALPOTZAKIS, E; MITAKU, S; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, p.4168-4170, 2001.

ALONSO, R; RUBIO, L. A; MUZQUIZ, M; MARZO, F. The effect of extrusion cooking on mineral bioavailability in pea and kidney bean seed meals. **Animal Feed Science and Technology**, v. 94, n. 1, p. 1-13, 2001.

AMORIM, F. M; RODRIGUES, Y. K. S; BARBOSA, T. P; NÉRIS, P. L. N; CALDAS, J. P. A; SOUSA, S. C. O; LEITE, J. A; RODRIGUES-MASCARENHAS, S; VASCONCELLOS, M. L. A. A; OLIVEIRA, M. R. Morita-Baylis-Hillman adduct shows in vitro activity against *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with a reduction in IL-6 and IL-10 but independent of nitric oxide. **Parasitology**. v. 140, p. 29-38, 2013.

ARASON, G. J. Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 6, n. 4, p. 277-289, 1996

BACUS, G.J; GREEN, G. Toxicity in sponges and holothurians: a geographic pattern. **Science**, v. 13, p. 951–953, 1974

BENNETT, C; MISSLITZ, A; COLLEDGE, L; AEBISCHER, T; BLACKBURN. Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* amastigotes. **European Journal of Immunology**. v. 31, n. 3, 2001.

BOYD, W. C; SHAPLEIGH, F. Separation of individuals of any blood group into secretors and non-secretors by use of a plant agglutinin (lectin). **Blood**. v. 9, n. 12, p. 1194-4, 1954

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**. v.72, p. 248-254, 1976.

BRETTING, H.; KABAT, E. A. Purification and characterization of the agglutinins from the sponge *Axinella polypoides* and a study of their combining sites. **Biochemistry**, v. 15, n. 15, p. 3228-36, 1976.

BRITO, M. E. F; ANDRADE, M. S; MENDONÇA, M. G; SILVA, C. J; ALMEIDA, E. L; LIMA, B. S; FÉLIX, S. M; ABATH, F. G. C; DA GRAÇA, G. C; PORROZZI, R; ISHIKAWA, E. A; SHAW, J. J; CUPOLILLO, E; BRANDÃO-FILHO. Species diversity of *Leishmania* (*Viannia*) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **Tropical Medicine and International Health**. v. 14, p. 1278–1286, 2009

CAPARRÓS, E; SERRANO, D; PUIG, K; RIOL, L; LASALA, F; MARTINEZ, I; VIDAL-VANACLOCHA, F; DELGADO, R; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, J. L; RIVAS, L; CORBI, A. L; COLMENARES, M. Role of the C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN in *Leishmania* interaction with host phagocytes. **Immunobiology**. v. 210. p. 185-193. 2005.

CARNEIRO, R. F; MELO, A. A; NASCIMENTO, F. E. P; SIMPLICIO, C. A; NASCIMENTO, K. S; ROCHA, B. A. M; SAKER-SAMPAIO, S; MOURA, R. M; MOTA, S. S; CAVADA, B. S; NAGANO, C. S; SAMPAIO, A. H. Halilectin 1 (H-1) and Halilectin 2 (H-2): two new lectins isolated from the marine sponge *Haliclona caerulea*. **Molecular Recognition**. v. 26. p. 51-58. 2013.

CARNEIRO, R. F; MELO, A. A; NASCIMENTO, F. E; P; SIMPLICIO, C. A; NASCIMENTO, K. S; ROCHA, B. A. M; SAKER-SAMPAIO, S; MOURA, R. M; MOTA, S. S; CAVADA, B. S; NAGANO, C. S; SAMPAIO, A. H. Halilectin 1 (H-1) and Halilectin 2 (H-2): two new lectins isolated from the marine sponge *Haliclona caerulea*. **Journal of Molecular Recognition**. v. 26, p. 51-58, 2013.

CAVADA, B. S; SANROS, C. F; GRANGEIRO, T. B; NUNES, P. V; RAMOS, R. L; DE SOUSA, F. A; CRISOMOSTOMO, C. V; CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* duke. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 675-680, 1998.

CAVADA, B; BARBOSA, T; ARRUDA, S; GRANGEIRO, T. B; BARRAL-NETTO, M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Curr Protein Pept Sci**, v. 2, n. 2, p. 123-35, Jun 2001.

CHANG, W. C; HARTSHORN, K. L; WITHE, M. R; MOYO, P; MICHELOW, I. C; KOZIEL, H; KINANE, B. T; SCHMIDT, E. V; FUJITA, T; TAKAHASHI, K.. Recombinant chimeric lectins consisting of mannose-binding lectin and L-ficolin are potent inhibitors of influenza A virus compared with mannose-binding lectin. **Biochem Pharmacol**, v. 81, n. 3, p. 388-95, 2011.

CHERNIKOV, O. V; MOLCHANOVA, V. I; CHIKALOVETS, I. V; KONDRASHINA, A. S; LI, W; LUKYANOV, P. A. Lectins of marine hydrobionts. **Biochemistry**, v. 78, n. 7, p. 760-770, 2013.

CLELAND, R; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “in vitro” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. Antibiotics in Laboratory Medicine. **Willians & Wilkins**, p. 739-788, 1991.

DAHMS, N. M; HANCOCK, M. K. P-type lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1572, p. 317-340. 2002.

DODD, R. B.; DRICKAMER, K. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. **Glycobiology**, v. 11, n. 5, p. 71r-9r, May 2001.

DRESCH, R. R; LERNER, C. B; MOTHE, B; TRINDADE, V. M. T; HENRIQUES, A. T; VOZÁRI-HAMPE, M. Biological activities of ACL-I and physicochemical properties of ACL-II, lectins isolated from the marine sponge *Axinella corrugata*. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 161, n. 4, p. 365-70, Apr 2012.

DRESCH, R. R; ZANETTI, G. D; IRAZOQUI, F. J; SENDRA, V. G; ZLOCOWSKI, N; BERNADI, A; ROSA, R. M; BATTASTINI, A. M; HENRIQUES, A. T; VOZARI-HAMPE, M. M. Staining tumor cells with biotinylated ACL-I, a lectin isolated from the marine sponge, *Axinella corrugata*. **Biotech Histochem**, v. 88, n. 1, p. 1-9, Jan 2013.

DRESCH, R. R; ZANETTI, G. D; KANAN, J. H. C; MOTHE, B; LERNER, C. B; TRINDADE, V. M. T; HENRIQUES, A. T; HAMPE-VOZÁRI, M. M. Immunohistochemical localization of an N-acetyl amino-carbohydrate specific lectin (ACL-I) of the marine sponge *Axinella corrugata*. **Acta Histochem**, v. 113, n. 6, p. 671-4, 2011.

DRESCH, R. R; ZANETTI, G. D; LERNER, C. B; MOTHE, B; TRINDADE, V. M. T; HENRIQUES, A. T; VOZÁRI-HAMPE, M. M. ACL-I, a lectin from the marine sponge *Axinella corrugata*: isolation, characterization and chemotactic activity. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 148, n. 1, p. 23-30, Jul 2008.

- ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-713, 1978.
- ENGEL, M; BACHMANN, M; SCHRÖDER, H. C; RINKEVICH, B; KLAJAJIC, Z; UHLENBRUCK, G; MÜLLER, W. E. G.. A novel galactose- and arabinose- specific lectin from the sponge *Pellina semitubulosa*: isolation, characterization and immunobiological properties. **Biochim.** v.74, p. 527-537. 1992.
- ENGERING, A; GEIJTENBEEK, T. B; van KOOYK, Y; Immune escape through C-type lectins on dendritic cells. **Trends Immunol.** v. 23. p. 480-485. 2002.
- ERNST, M. E; KLEPSE M. E; WOLFE E. J; PFALLER, M. A. Antifungal dynamics of LY 303366, an investigational echinocandin B analog, against *Candida* ssp. **Diagnostic Microbiological Infectious Disease**, 26(3-4):125-131, 1996.
- ESPINEL-INGROFF, A; ESPINEL-INGROFF, A. Standardized disk diffusion method for yeasts. **Clinical Microbiology Newsletter**. v. 29, n. 13, p. 97-100, 2002.
- FENTON, B.; ARREQUÍN, E. R.; VÁZQUEZ, C. E.; ARREQUÍN, L. B.; SÁNCHEZ, S. N.; GARCÍA, H. E.; ZENTENO, G. E. Purification and characterization of structural and functional properties of two lectins from a marine sponge *Spherospongia vesparia*. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**. v. 50, n. 6, p. 562-9, 2013.
- FÉRIR, G; HUSKENS, D; NOPPEN, S; KOHARUDIN, L. M. I; GRONENBORN, A. M; SCHOLS, D. Broad anti-HIV activity of the *Oscillatoria agardhii* agglutinin homologue lectin family. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 69, n. 9, p. 1-13, 2014.
- FIGDOR, C. G; KOOYK, V. Y; ADEMA, G. J. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev.* **Immunology**. v. 2. p. 77-84. 2002.
- FRAYMANN, D. M; NAKAMURA, Y; FOCIA, P. J; SAKAI, R; SWANSON, G. T. Structure of a tetrameric galectin from *Cinachyrella* sp. (ball sponge). **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 68, n. 9, p. 1163-74, 2012.
- GEOFFRY FÉRIR; DONA HUSKENS; DAM NOPPEN; LEONARDUS KOHARUDIN; ANGELA GRONENBORN; DOMINIQUE SCHOLS. Broad anti-HIV activity of the *Oscillatoria agardhii* agglutinin homologue lectin family. **Journal of antimicrobial chemotherapy**. v. 69, n. 7. 2014.

GERLAN, D; SCHOLTT, B; ZÄHRINGER, U; SCHMIDT, K. H. N-acetyl-d-galactosamine/N-acetyl-d-glucosamine–recognizing lectin from the snail *Cepaea hortensis*: purification, chemical characterization, cloning and expression in *E. coli*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 223-232, 2005.

GLICK, G. D; TOOGOOD, P. L; WILEY, D. C; SKEHEL, J. J; KNOWLES, J. R. Ligand recognition by influenza virus. The binding of bivalent sialosides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 35, p. 23660-23669, 1991.

GRAHAM, S. A; ANTONOPOULOS, A; HITCHEN, S. M; DELL, A; DRICKAMER, K; TAYLOR, M. E. Identification of neutrophil granule glycoproteins as Lewis(x)-containing ligands cleared by the scavenger receptor C-type lectin. **J Biol Chem**, v. 286, n. 27, p. 24336-49, Jul 8 2011.

HADACEK, F; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HAJDU, E; PEIXINHO, S; FERNANDES, J. C. C. **Esponjas marinhas da Bahia. Guia de Campo e Laboratório**. Rio de Janeiro. Museu Nacional. 2011. 230 p. (série livros)

HOLETZ, F. B; HOWES, M. J; LEE, C. C; STEVENTON, G. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOUGHTON, P. J; HOWES, M. J; LEE, C. C; STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.391-400, 2007.

JECNA, L; DOSTALOVA, A; WILSON, R; SEBLOVA, V; CHANG, K. P; BATES, P. A; VOLFF, P. The role of surface glycoconjugates in *Leishmania* midgut attachment examined by competitive binding assays and experimental development in sand flies. **Parasitology**. v. 140. p. 1026-1036. 2013.

KARASAKI, Y; TSUKAMOTO, S; MIZUSAKI, K; SUGIURA, T; GOTOH, S. A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells. **Food research international**, v. 34, n. 1, p. 7-13, 2001.

KAWSAR, S. M. A; FUJII, Y; MATSUMOTO, R. ICHIKAWA, T; TATENO, H; HIRABAYASHI, J; YASUMITSU, H; DOGASAKI, C; HOSONO, M; NITTA, K; HAMAKO,

- J; MATSUI, T; OZEKI, Y. Isolation, purification, characterization and glycan-binding profile of a D-galactoside specific lectin from the marine sponge, *Halichondria okadai*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**. v. 150, p. 349-357, 2008.
- KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1572, p. 187-197, 2002.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970
- LAINSON, R; SHAW, J. J. A brief history of genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, 1992.
- LAPORT, M. S.; SANTOS, O. C. S.; MURICY, G. Marine sponges: potential sources of a new antimicrobial drugs. **Current pharmaceutical biotechnology**. v. 10, p. 86-105, 2009.
- LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 34, n. 1, p. 31-67, 1994.
- LING, E.; YU, X.-Q. Cellular encapsulation and melanization are enhanced by immulectins, pattern recognition receptors from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 30, n. 3, p. 289-299, 2006.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 2, p. 637-674, 1998.
- LIU, Z; ZHANG, Q; PENG, H; ZHANG, W-Z; Animal Lectins: Potential Antitumor Therapeutic Targets in Apoptosis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.168, n.3, p. 629-637, 2012.
- MANN, C. M; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.538-544, 1998.
- MARQUES, M. R. F.; BARRACCO, M. A. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. **Aquaculture**, v. 191, n. 1, p. 23-44, 2000.
- MARTÍNEZ-CRUZ, M.; ZENTENO, E.; CÓRDOBA, F. Purification and characterization of a galactose-specific lectin from corn (*Zea mays*) coleoptile. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1568, n. 1, p. 37-44, 2001.

MCGREAL, E. P; MARTINEZ-POMARES, L; GORDON, S. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. **Molecular Immunology**. v. 41. p. 1109-1121. 2004.

MCGREAL, E. P; MARTINEZ-POMARES, L; GORDON, S. Purification and characterization of a galactose-specific lectin from corn (*Zea mays*) coleoptile. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1568, n. 1, p. 1109-1121, 2004

MEDEIROS, D. S; MEDEIROS, T. L; RIBEIRO, J. K. C; MONTEIRO, N. K. V; MIGLIOLO, L; UCHOA, A. F; VASCONCELOS, I. M; OLIVEIRA, A. S; SALES, M. P; SANTOS, E. A. A lactose specific lectin from the sponge *Cinachyrella apion*: Purification, characterization, N-terminal sequences alignment and agglutinating activity on *Leishmania* promastigotes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 155, n. 3, p. 211-216, 2010.

MIARONS, P. B; FRESNO, M. Lectins from tropical sponges. Purification and characterization of lectins from genus *Aplysina*. **The Journal of Biological Chemistry**. v.275, n. 38, p. 29283-9, 2000.

MITSCHER, L. A; LEU, R. P; WU, N. W; BEAL, J. L; WHITW, R. Antimicrobial agents from higher plants I: Introduction, rationale and methodology. **Llodya**. v. 35, n. 2, p. 157-166, 1972

MOREIRA, R. A; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**. v. 59, 33p. 783-787, 1977.

MOREIRA, R. A; OLIVEIRA, J. T. A. Comparative studies of seed proteins of the genus *Artocarpus* with respect to lectins. **Biologia Plantarum**. v. 25, p. 336-342, 1983

MOURA, R. M; QUEIROZ, A. F. S; FOOK, J. M. S. L. L; DIAS, A. S. F; MONTEIRO, N. K. V; RIBEIRO, J. K. C; MOURA, G. E. D. D; MACEDO, L. L. P; SANTOS, E. A; SALES, M. P. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. v. 145, p. 517-523, 2006.

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

NAQVI, S. H; KILIAN, M. S. Y.; VOHORA, S. B. Anti-bacterial, antifungal and antihelminthic investigations on Indian medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 62, n. 3, p. 221-228, 1991.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS-NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 7 ed. Villanova. PA: NCCCLS, 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS-NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 7 ed. Villanova. PA: NCCLS, 2000.

NI, Y.; TIZARD, I. Lectin-carbohydrate interaction in the immune system. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 55, n. 1, p. 205-223, 1996.

PAJIC, I; KLAJAJIC, Z; DOGOVIC, N; SLADIC, D; JURANIC, Z; GASIC, M. J. A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**. v. 132. p. 213-221. 2002.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. Lectins as plant defense proteins. **Plant physiology**, v. 109, n. 2, p. 347, 1995.

PEUMANS, W. J; VAN DAMME, E. J. Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 33, n. 3, p. 209, 1998.

QUEIROZ, A. F. S; SILVA, R. A; MOURA, R. M; DREYFUSS, J. L; PAREDES-GAMERO, E. J; SOUZA, A. C. S; TERSARIOL, I. L. S; SANTOS, E. A; NADER, H. B; JUSTO, G. Z; SALES, M. P. Growth inhibitory activity of a novel lectin from *Cliona varians* against K562 human erythroleukemia cells. **Cancer Chemother Pharmacology**. v. 63, p. 1023-1033, 2009.

RABELO, L; MONTEIRO, N; SERQUIZ, R; SANTOS, P; OLIVEIRA, R; OLIVEIRA, A; ROCHA, H; MORAIS, A. H; UCHOA, A; SANTOS, E. A Lactose-Binding Lectin from the Marine Sponge *Cinachyrella Apion* (Cal) Induces Cell Death in Human Cervical Adenocarcinoma Cells. **Marine Drugs**. v. 10. p. 727-743. 2012.

RASO, P; GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Brasileiro Filho, G et al. **Bogliolo Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

REGO, E. J. et al. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). **Phytochemistry**, v. 60, n. 5, p. 441-446, 2002.

- RÜDIGER, H. Plant lectins—more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Cells Tissues Organs**, v. 161, n. 1-4, p. 130-152, 1998.
- RUITER, C. M.; VEER, C. V.; LEEFLANG, M. M. G.; DEBORGGRAEVE, S.; LUCAS, C.; ADAMS, E. R. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. **Journal of Clinical Microbiology**. 2014.
- SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.
- SHARON, N.; LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. In: (Ed.). *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates—2*: Springer, 2001. p.1-16. ISBN 1461354692.
- SIPKEMA, D; OSINGA, R; SCHATTON, W; MENDOLA, D; TRAMPER, J; WIJFFELS, R. Large-scale production of pharmaceuticals by marine sponges: Sea, cell, or synthesis? **Biotechnology and Bioengineering**. v. 90, n, 2, p. 201-222, 2005.
- SOARES, R. P. P; CARDOSO, T. L; BARRON, T; ARAÚJO, PIMENTA, P. F. P; TURCO, S. J. Leishmania braziliensis: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. **International Journal for Parasitology**. v. 35, p. 245–253, 2005
- SOARES, R. P. P; MACEDO, M. E; ROPERT, C; GONTIJO, N. F; ALMEIDA, I. C; GAZZINELLI, R .T; PIMENTA, P .F. P; TURCO, S. J. Leishmania chagasi: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sandfly vector Lutzomyia longipalpis. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 121, p. 213–224, 2002.
- SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of Origanum vulgare L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 409-413, 2007.
- SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. Identification of hemagglutinin of jack bean with concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, v. 32, n. 2, p. 227, 1936.
- THOMAS, T. R. A.; KAVLEKAR, D. P.; LOKABHARATHI, P. A. Marine drugs from sponge-microbe association—A review. **Marine Drugs**, v. 8, n. 4, p. 1417-1468, 2010.

TURCO, S. J; DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of Leishmania parasites. **Ann. Rev. Microbiol.** v. 46, p. 65-94, 1992.

UEDA, T; NAKAMURA, Y; SMITH, C. M; COPITS, B. A; INOUE, A; OJIMA, T; MATSUNAGA, S; SWANSON, G. T; KAKI, R. Isolation of novel prototype galectins from the marine ball sponge *Cinachyrella* sp. guided by their modulatory activity on mammalian glutamate-gated ion channels. **Glycobiology**, v. 23, n. 4, p. 412-25, Apr 2013.

UEDA, T; NAKAMURA, Y; SMITH, C. M; COPITS, B. A; INOUE, A; OJIMA, T; MATSUNAGA, S; SWANSON, G. T; SAKAI, R. Isolation of novel prototype galectins from the marine ball sponge *Cinachyrella* sp. guided by their modulatory activity on mammalian glutamate-gated ion channels. **Glycobiology**, v. 23, n. 4, p. 412-25, Apr 2013.

VAN DAMME, E. J. M; PEUMANS, W. J; BARRE, A; ROUGÉ, P. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical reviews in plant sciences.** v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998

VANNIER-SANTOS, M. A; MARTINY, A; SOUZA, W. Cell biology of Leishmania spp.: invading and evading. **Current Pharmaceutical Design.** v. 8, n. 4, p. 297-318, 2002.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986.

WOODLEY, J. Bioadhesion. **Clinical pharmacokinetics**, v. 40, n. 2, p. 77-84, 2001.

WOUNG-LEUNG, Y. L. Antimicrobial activities of some Hon-Kong plants used in Chinese medicine. **Fitoterapia**, v. 69, n.1, p. 11-16, 1988.

XIONG, G; LI, W; LIU, H; ZHANG, W; DOU, J; BAI, X; DU, Y. MA, X. A normal mucin-binding lectin from the sponge *Craniella australiensis*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 143, n. 1, p. 9-16, May 2006.

YOUNG, L. S; SÖDERHÄLL, K. Early events in crustacean innate immunity. **Fish & shellfish immunology.** v. 12, n. 5, p. 421-437, 2002.

ZHE LIU; QIAN ZHANG; HAO PENG; WEN-ZHI ZHANG. Animal lectins: potential antitumor therapeutic targets in apoptosis. **Applied Biochemistry and Biotechnology.** v. 168, n. 3, p. 629-37. 2012.