



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LECTINA ENCONTRADA  
NA ASCÍDIA *Didemnum ligulum*.

RAMON FEITOSA RODRIGUES

---

MONOGRAFIA APRESENTADA AO DEPARTAMENTO DE  
ENGENHARIA DE PESCA DO CENTRO DE CIÊNCIAS  
AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, COMO  
PARTE DAS EXIGÊNCIAS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
ENGENHEIRO DE PESCA.

---

FORTALEZA - CEARÁ - BRASIL  
FEVEREIRO/2006



**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof. Alexandre Holanda Sampaio, Ph.D.**  
**Orientador/Presidente**

---

**Prof. Benildo Souza Cavada, Ph.D**  
**Membro**

---

**Prof. Alexandre Havt Bindá**

**VISTO:**

---

**Prof. Moisés Almeida de Oliveira, D.Sc.**  
**Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca**

---

**Profª Artamízia Maria Nogueira Montezuma, M.Sc.**  
**Coordenador do Curso de Engenharia de Pesca**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

R616p Rodrigues, Ramon Feitosa.  
Purificação e caracterização parcial da lectina encontrada na ascídia *Didemnum ligulum* /  
Ramon Feitosa Rodrigues. – 2006.  
40 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro  
de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2006.  
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.

1. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

---

*A todos aqueles com quem  
aprendi algo de bom.  
Especialmente aos meus pais,  
Angelo e Judith.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e irmãos, que mesmo com todas as brigas, me ensinaram a nunca desistir e a ter coragem frente a todas as dificuldades. E que apesar de todas as confusões, sei que me amam e querem o melhor para mim.

Aos professores do Curso de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, que fazem o possível e o impossível para que os alunos tenham o melhor aprendizado. Em especial, a professora Silvana Saker Sampaio, uma professora incansável e dedicada. Ao professor Alexandre Holanda Sampaio, por ter me orientado e me dado a oportunidade de trabalhar onde trabalho. Ao professor Wladimir Ronald Lobo Farias, que em sua seriedade e compromisso acolhe o maior número de alunos em suas pesquisas. Ao professor Tito Monteiro da Cruz Lotufo, cujo o qual, sem a ajuda, não teria condições nem de começar o trabalho.

Ao professor Benildo Sousa Cavada, por ter permitido e apoiado meu ingresso no mundo da Bioquímica, por ter tido paciência em meu lento e contínuo processo de aprendizagem, tanto como pessoa quanto como aluno.

Sou agradecido também, a doutoranda Kyria Santiago do Nascimento, que por meio de sua experiência e boa vontade, me ensinou tudo que fui capaz de aprender.

Ao doutorando Celso Shiniti Nagano, que através de suas qualidades de perseverança e irreverência, me mostrou a força para seguir meu caminho.

A todos com quem tive contato no Biomol-Lab e no curso de Engenharia de Pesca, que sempre compartilharam de seus ganhos no conhecimento, dos bons e maus momentos: Átila, Carla, Eudismar, Lia, Gustavo, Júlia, Taianá, Jozi, Georg, Raquel, Vítor, Lia, Tales, Luciana, Jônatas, Cecília, Felipe, Eduardo, Rafhael, Taiane, Carlos, Emanuel Marinho, Lara, Emanuel Prata e Nathalie.

## SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
SUMÁRIO	v
RESUMO	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. História da lectina	1
1.2. Classificação de lectinas	3
1.3. Lectinas de animais	4
1.4. Importância e aplicações biomédicas das lectinas	8
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>10</b>
2.1. Material	10
2.1.1. Ascídia marinha <i>Didemnum ligulum</i>	10
2.1.2. Eritrócitos	11
2.1.3. Reagentes	11
2.2. Métodos	12
2.2.1. Extração de Proteínas	12
2.2.2. Atividade hemaglutinante	12
2.2.3. Tratamento de eritrócitos	12
2.2.4. Inibição da atividade hemaglutinante	13
2.2.5. Determinação de Proteína	13
2.3.6. Fracionamento por Sulfato de Amônio	13
2.3.7. Cromatografias	14
2.3.8. Eletroforese	15
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>16</b>
3.1. Atividade Hemaglutinante frente a diferentes condições	16

3.2. Atividade hemaglutinante	16
3.3. Estudos de inibição	17
3.4. Fracionamento com sulfato de amônio	17
3.4. Cromatografias	19
3.6. Eletroforese	21
<b>4. DISCUSSÃO</b>	<b>22</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>26</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>27</b>

## RESUMO

Uma das definições mais recentes das lectinas é a de que são proteínas de origem não imune, contendo pelo menos um domínio não catalítico capaz de se ligar de forma reversível a mono ou oligossacarídeos específicos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). As lectinas são moléculas amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em vários seres vivos desde plantas a animais (vertebrados e invertebrados) incluindo microorganismos e vírus (LIERNER *et al.*, 1986). Elas são instrumentos poderosos para a decodificação dos glicocódigos utilizados na troca de informações entre as células (CALVETE *et al.*, 2003).

O seguinte trabalho teve como objetivo o isolamento e caracterização parcial, de uma lectina encontrada no Tunicado da Classe Ascidiacea, Ordem Aplousobranchia, *Didemnum ligulum*. O animal foi coletado na praia da Taiba localizada no município de São Gonçalo do Amarante do Estado do Ceará. Depois de acondicionada em saco plástico, a colônia foi livrada de epibiôntes e materiais incrustantes, lavada com água destilada, congelada, liofilizada e finalmente macerada. Realizada a extração protéica, a parte solúvel foi submetida a fracionamento por sulfato de amônio (F 0-40% de Saturação), Cromatografia de troca iônica no gel DEAE-Sephacel. A visualização do grau de pureza foi feito através da obtenção da Atividade específica e Eletroforese em gel SDS-PAGE com ausência e presença do agente redutor  $\beta$ -mercaptaetanol. Durante o processo de purificação observou-se o aumento da Atividade específica, a Eletroforese do material obtido da cromatografia de troca iônica mostrou-se parcialmente pura, o que foi concluído quando submetido a Cromatografia em HPLC. A inibição por açúcares resultou em uma diversidade de substratos específicos. Através da malha de 17,5% de gel de poliacrilamida utilizada na eletroforese, podemos inferir um baixo peso molecular para essa proteína.

**LISTA DE FIGURAS**

	Página
Figura 1 Desenho esquemático ilustrando os quatro tipos de lectinas propostas por Peumans e Van Damme (1995).	4
Figura 2 Foto da ascídia <i>Didemnum ligulum</i> com alguns epibiontes	10
Figura 3 Cromatografia de afinidade em gel de quitina do extrato total da ascídia <i>Didemnum ligulum</i> .	19
Figura 4 Cromatografia da F 0-40 em Gel DEAE-Sephacel	20
Figura 5 Eletroforese em PAGE-SDS (gel de poliacrilamida com 17,5%), com e sem a utilização de $\beta$ -mercaptaetanol.	21

**LISTA DE TABELAS**

	Página
Tabela 1 Screening inicial dos vários extratos totais contra eritrócitos de coelho com e sem tratamento enzimático	16
Tabela 2 Diferentes resultados de Atividade hemaglutinate para diferentes eritrócitos em contato com extrato total.	17
Tabela 3 Tabela com dados de concentração mínima inibitória	18
Tabela 4 Atividade Específica das Diversas Frações da obtidas pela subsequente precipitação por Sulfato de Amônio	18

# PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LECTINA PRESENTE NA ASCÍDIA MARINHA *Didemnum ligulum*.

RAMON FEITOSA RODRIGUES

## 1. INTRODUÇÃO

As proteínas são as moléculas mais abundantes nas células vivas. Elas ocorrem em todas as células e em todas as partes das mesmas, apresentando também grande variedade e diversidade de funções biológicas. Entre essas funções, encontramos: atividade catalítica, transporte de íons ou moléculas específicas, função nutricional e/ou armazenamento, contrátil ou motora, estrutural, defesa, regulação na atividade celular ou fisiológica e outras numerosas funções exóticas (LEHNINGER et al., 1995). Dentre essas moléculas, encontramos uma classe de proteínas muito estudada nas últimas décadas, as lectinas. Elas foram descobertas há pouco mais que um século. Essas moléculas apresentam a importante propriedade de ligar-se de forma reversível a carboidratos e glicoconjugados, sendo instrumentos poderosos para a decodificação dos glicocódigos utilizados na troca de informações entre as células (CALVETE et al., 2003).

### 1.1. Histórico

O médico S. Weir Mitchell (1829–1914) é considerado o primeiro a ter observado a atividade hemaglutinante quando em 1860, por meio de extensivo estudo do veneno da cobra *Crotalus durissus*, identificou aglutinação de eritrócitos após contato com o veneno de cobra (SHARON; LIS, 2003).

Em 1888, em sua tese de doutorado, Stillmark (1860–1923) citou pela primeira vez, a atividade das fitohemaglutininas (como as lectinas eram chamadas na época) em plantas superiores. Através de seus estudos da

toxicidade da mamona (*Ricinus communis*), observou que, quando o extrato da mamona e sangue eram postos em contato, ocorria aglutinação de eritrócitos (STILLMARK, 1888).

Landsteiner (1868–1943), descobridor dos tipos sanguíneos A, B e O, demonstrou em 1908, que a atividade hemaglutinante de extratos de diferentes sementes apresentavam resultados relativos, quando testadas com eritrócitos de diferentes animais. Estes fatos corroboram com as indicações relatadas por Stillmark sobre a seletividade das lectinas em relação a diferentes glóbulos vermelhos (SHARON; LIS, 2003).

A descoberta da especificidade das lectinas por açúcares foi realizada, pelo prêmio Nobel, James B. Sumner, quando observou que a lectina de *Canavalia ensiformis*, a Concavalina A, foi inibida por sacarose (SHARON; LIS, 2003).

O termo lectina é oriundo do latim, *Legere*, que significa: selecionar, escolher. Foi primeiramente citado por Boyd e Shapleigh, pela característica dessas moléculas de aglutinarem diferentes eritrócitos (BOYD; SHAPLEIGH, 1954). Sharon e Lis incluíram à definição dessas proteínas, a capacidade de se ligarem a açúcares diversos e aglutinarem células, a obrigatoriedade de serem de origem não imune, e a amplitude de poderem ser provenientes de animais, plantas ou microorganismos (SHARON; LIS, 1972).

Posteriormente, a definição de Goldstein et al realizada em 1980 foi aceita consensualmente pela comunidade científica, e dizia que as lectinas eram proteínas de origem não imune que se ligam a açúcares, aglutinam células e precipitam polissacarídeos ou glicoproteínas (GOLDSTEIN et al., 1980). A descoberta de lectinas com apenas um sítio de ligação a carboidratos não se encaixava na definição acima, permitindo o desenvolvimento de novas definições.

Recentemente foram descobertas lectinas que apresentam sítio catalítico, além do sítio de ligação a carboidrato (NITTA et al., 1993), (ROBERTS et al., 1999), denominadas "leczymes" (NITTA, 2001). O achado dessas moléculas não criou conflito com a definição de que as lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos de forma reversível, e não apresentam a capacidade de modificar os sacarídeos aos quais se ligam (KOCOUREK; HOREJSI, 1981), visto que o sítio enzimático não age sobre os carboidratos

específicos no sítio lectínico. Mesmo sendo essa última definição correta, ela não perdurou, por ser muito abrangente.

Uma das definições mais recentes afirma que, as lectinas são proteínas de origem não imune, contendo pelo menos um domínio não catalítico capaz de se ligar de forma reversível a mono ou oligossacarídeos específicos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Para Kilpatrick (2000), a definição dessas proteínas ainda é polêmica, pois as lectinas são em grande parte componentes do sistema imune nos animais, funcionando diretamente frente à primeira linha de defesa, ou indiretamente promovendo apropriados mecanismos de proteção, via gerenciamento do tráfego de leucócitos, ou por transmissão de sinais entre células envolvidas na resposta imune. Quanto a discussão sobre a possível exclusão das lectinas como enzimas, Kilpatrick faz uma analogia entre a toxina Ricina que apresenta atividade enzimática em sobre RNA, considerada uma lectina de planta, e a RNAase do sapo, que mesmo apresentando a habilidade de se ligar a carboidrato, não é considerada como tal.

## **1.2. Classificação de lectinas**

Peumans e Van Damme (1995) com base em seus estudos sobre lectinas propuseram quatro tipos fundamentais de lectinas em relação as suas estruturas globais (Figura 1): As merolectinas que possuem apenas um sítio de ligação a carboidrato, as hololectinas que apresentam dois ou mais sítios de ligação a carboidrato, idênticos ou com elevada homologia, as superlectinas apresentando dois ou mais sítios de ligação a carboidratos estruturalmente diferentes e não relacionados, e as quimerolectinas que além de apresentarem o sítio de ligação a carboidrato apresentam também um outro sítio com atividade biológica distinta (catalítica, inativadora de ribossomos etc.).

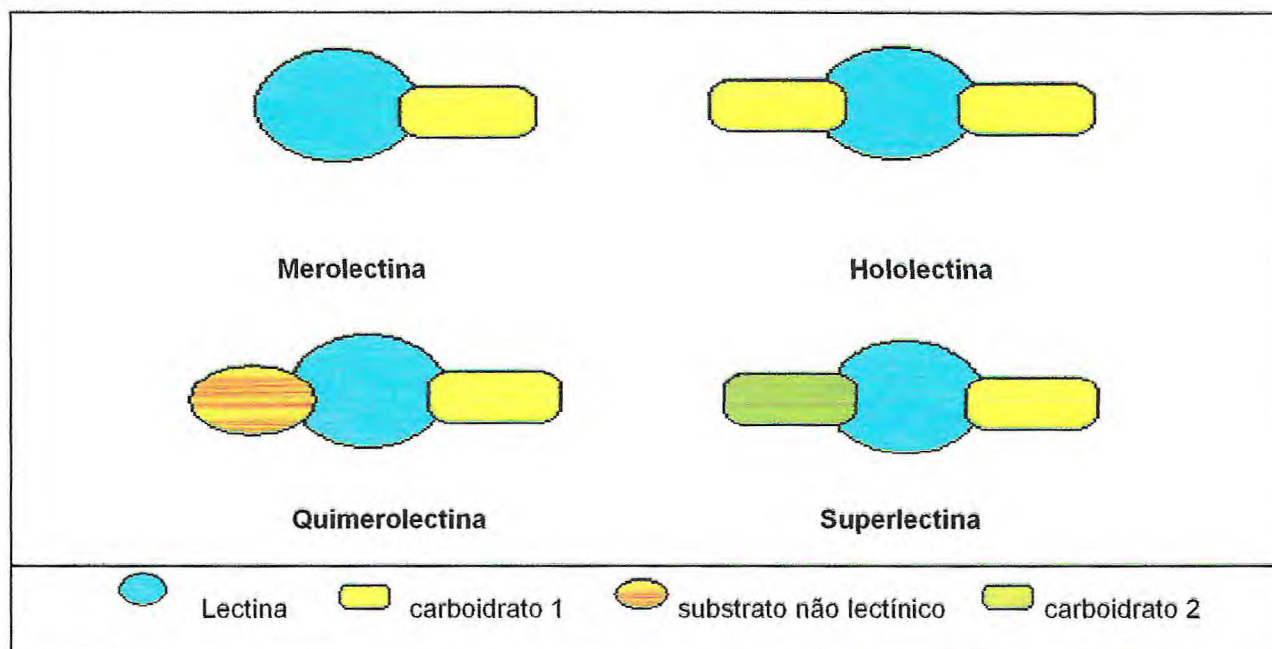


Figura 1. Desenho esquemático ilustrando os quatro tipos de lectinas propostas por Peumans e Van Damme (1995).

### 1.3. Lectinas Animais

O avanço da tecnologia em sequenciamento de proteínas, cristalização e modelagem em três dimensões de suas estruturas, aumentaram em muito a disponibilidade de informações sobre as lectinas. A diversidade das características entre as lectinas tornaram possível, sua classificação em diferentes famílias, fornecendo base para um melhor entendimento dessas moléculas, e sua evolução nos organismos.

#### A) Galectinas (Tipo-S)

As galectinas também conhecidas como lectinas Tipo-S (dependentes de sulfidríla) são consideradas a segunda maior família dessas moléculas (DRICKAMER, 1988). Elas são proteínas solúveis, específicas para  $\beta$ -galactosídios, e apresentam estrutura relativamente simples (KASAI;

HIRABAYASHI, 1996; LEFFLER, 2001). São proteínas pequenas ou de tamanho médio, variando entre 14 e 35 kDa e compartilham um domínio altamente homólogo, conhecido como Domínio de Reconhecimento a S-carboidratos (S-CRD) que consiste de 135 aminoácidos.

Acredita-se que as galectinas agem como moduladores das interações entre substratos e células e são essenciais para diferenciação normal e crescimento de todos os animais multicelulares (PERILLO et al., 1998). Algumas galectinas possuem a capacidade de induzir a proliferação de células e/ou apoptose, estando também relacionada com a morfogênese de órgãos, metástase de células tumorais, resposta imune e inflamação (SHARON; LIS, 2003).

A galectina-1 além de seu papel na apoptose, tem um potente efeito imunoregulatório in vivo, suprimindo várias doenças em animais, tais como artrite reumatóide (RABINOVICH et al, 2002) e hepatite (SANTUCCI et al., 2000).



## B) Lectinas Tipo-C

A super família das lectinas tipo-C incluem por volta de 50 membros, agrupados em quatro famílias: lectinas endocíticas, colectinas, selectinas e a menor, *lecticans*. A maioria dessas lectinas está ligada a membrana e conservam seu domínio de reconhecimento a carboidrato extracelularmente. Esse domínio varia entre 115 e 150 aminoácidos, e requerem o íon cálcio para ligarem-se ao carboidrato específico (SHARON; LIS, 2003).

As lectinas endocíticas são constituídas de subunidades de glicoproteína de membrana tipo II. Essas lectinas apresentam quase sempre especificidade por N-acetilglicosamina e galactose.

As colectinas são um grande grupo de proteínas solúveis oligoméricas, que tem a massa variando entre 200 e 650 kDa, possuindo 9 a 27 subunidades. Apresentam além do domínio colágeno um domínio de ligação a carboidrato um (EPSEN et al., 1996; HAKANSSON; REID, 2000).

A família das selectinas consiste de três membros: as selectinas E, que apresentam massa média de 115 kDa, as selectinas P, com massa média de

140 kDa e as selectinas L com massa variando entre 90 e 110 kDa, todas tipo proteínas de membranas com multidomínios tipo I, com C-CRD na região N-terminal (MCEVER, 1998; WEIS, et al., 1998).

### **C) Lectinas Tipo-P**

Além dos domínios das galectinas e das lectinas tipo-C, um terceiro tipo designado com P-CRD, foi achado em duas lectinas receptoras de manose-6-fosfato, ambas glicoproteínas transmembranares tipo I (DAHMS; HACOOCK, 2002).

### **D) Pentraxinas**

Família de proteínas plasmáticas oligoméricas com a capacidade cálcio dependente de ligação. É dessa forma nomeada em virtude do arranjo de suas subunidades, que formam um ciclo pentamérico simétrico (SRINIVASAN et al., 1994).

### **E) Ficolinas**

As ficolinas compõem um pequeno grupo de lectinas multiméricas componentes do soro e dependentes do íon cálcio, apresentando especificidade por N-acetilglicosamina (SHARON; LIS, 2003). Em sua estrutura apresentam um domínio tipo colágeno combinado com um domínio tipo fibrinogênio (LU; LE, 1998), se assemelhando em muito com as colectinas.

#### **1.3.1. Lectinas em invertebrados**

Camus (1899) publicou o que pode ser considerado o primeiro relato da detecção de lectina no invertebrado *Helix pomatia*. Alguns anos depois,

Noguchi (1902), relatou a presença de aglutininas humorais nas hemolinhas dos crustáceos *Limulus polyphemus* e *Homarus americanus*. Hoje sabemos que o repertório de lectinas em invertebrados é amplo e complexo, com representantes nas famílias das lectinas tipo C, galectinas e pentraxinas (VASTA et al., 2004). Muitas lectinas, tanto celulares como humorais, têm sido encontradas em invertebrados, com diferentes especificidades, tamanhos e características físico-químicas (OLAFSEN, 1986). No entanto, seu papel biológico só foi elucidado em poucos casos (HARDY; FLETCHER; OLAFSEN, 1977), (RENWRANTZ; STAHLER, 1983), (RENWRANTZ; STAHLER, 1981). Dentre esses papéis biológicos são sugeridos para maioria deles o envolvimento no processo de defesa imune, encapsulação, coagulação da hemolinha e citotoxicidade (VASTA, 1991).

O fato de os tunicados serem os invertebrados mais próximos filogeneticamente dos vertebrados estimulou a detecção e caracterização de lectinas desses seres ao longo dos últimos 50 anos (HUFF, 1940), (TYLER, 1946), (BROWN et al., 1968), (UHLENBRUK et al., 1972), (BRETTEING; RENWRANTZ, 1973), (PARRINELLO; PATRICOLO, 1975), (COOMBE et al., 1981), (NATALIA et al., 1997), (VALENTINA et al., 2004). Porém, somente a partir do início da década de 80 foram obtidas as primeiras lectinas purificadas de Urocordatos, de ascídias, como: a específica por galactose de *Ascidia malaca* (PARRINELLO; CANICATTI, 1982); a específica por ácido siálico de *Halocynthia pyriformis* (VASTA; MARCHALONIS, 1983); a específica por  $\alpha$ -galactose de *Didemnum candidum* (VASTA; MARCHALONIS, 1983) e a específica por  $\alpha$ -lactose de *Phallusia mamillata* (PARRINELLO; CANICATTI, 1982).

Lectinas homólogas à aquelas encontradas em mamíferos têm sido identificadas e caracterizadas a partir de protocordatos, incluindo as lectinas tipo C proximamente relacionadas as colectinas e selectinas (VASTA, et al., 1999; RAFTOS et al., 2001), ficolinas (KENJO et al., 2001) e Galectinas (O'LESRY et al., não publicado), mas somente a estrutura da lectina tipo C, encontrada na ascídia *Polyandrocarpa misakiensis* foi resolvida em complexo com galactose (POGET et al., 1999).

#### 1.4. Importância e aplicações biomédicas das lectinas

Desde a descoberta das lectinas, seu estudo tem fornecido importantes informações e funções, relativas principalmente às áreas da biologia e medicina. Tais estudos contribuíram inicialmente para constatação da especificidade dessas moléculas para diferentes tipos sanguíneos, o que permitiu em parte a classificação do sistema ABO, tendo papel crucial no desenvolvimento da tecnologia de transfusões de sangue (SHARON; LIS, 2003).

O uso de lectinas mitogênicas em pesquisas biológicas teve como resultado, a descoberta do fator de crescimento dos linfócitos, hoje conhecido como interleucina-2 (MIER; GALLO, 1982; MORGAN et al., 1976). De acordo com Sharon e Lis (2003) essas proteínas mitogênicas poderiam também ser usadas em estudos de combate ao câncer, visto que algumas células malignas apresentam modificação em seus carboidratos de superfície. A atividade da galectina-3, que age na formação de novos vasos sanguíneos, pode contribuir para o surgimento de tumores e metástase (NANGIA-MAKKER et al., 2000).

Estudos recentes têm mostrado que as lectinas apresentam efeitos biológicos de atividade antiinflamatória (ALENCAR et al, 2005), (ASSREUY et al., 1997), (ASSREUY et al., 1999), potencialização da defesa imune do hospedeiro, apoptose (BARBOSA et al., 2001), atividade hipoglicemiante (KAVALALI et al., 2002), adesão celular (KHURRUM et al., 2004). Todas essas atividades se deve ao fato das lectinas serem instrumentos poderosos para a decodificação dos glicocódigos utilizados na troca de informações entre as células (CALVETE et al., 2003).

As lectinas têm aplicação em diversas áreas de pesquisa, principalmente para a detecção, isolamento e estudo estrutural de glicoproteínas, investigação de carboidratos da membrana celular e de organelas, identificação e separação de células, entre outras (SHARON; LIS, 2003).

Em tunicados foi constatada a presença de lectina com atividade antiinflamatória (PETER et al., 2002 enquanto que outras lectinas apresentaram atividade opsonizante (PEARCE et al., 2001; BALLARIN et al., 1999) e atividade mitogênica (VASTA et al., 1986).

A pesquisa de lectinas em organismos primitivos, principalmente aqueles de origem marinha, apresenta um grande interesse devido a possibilidade de se encontrar moléculas com aplicações biológicas não encontradas em outros organismos.

O presente trabalho tem como objetivo o isolamento e caracterização parcial da lectina de presente na ascídia marinha *Didemnum ligulum*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

#### 2.1.1. Ascídia Marinha *Didemnum ligulum*

O animal utilizado para pesquisa pertence ao Filo Chordata, Subfilo Urochordata, Classe Ascidiacea, Ordem Aplousobranchia, espécie *Didemnum ligulum*.

Esses animais formam colônias incrustantes, delgadas (1 a 2 mm), alcançando 10 a 15 cm de diâmetro (Figura 2). Apresentam coloração laranja, mais ou menos avermelhada, com as regiões cloacais mais escuras. Cloaca e sifões inalantes circundados por muitas espículas que lhe conferem uma aparência estrelada. Essa espécie é distribuída no Atlântico tropical americano e Pacífico tropical ocidental (RODRIGUES et al., 1998).



Figura 2. Aspecto geral de uma colônia da ascídia marinha *Didemnum ligulum* com alguns epibiontes, coletada na praia da Taíba, Ceará.

A ascídia colonial *Didemnum ligulum* foi coletada mensalmente, durante o período de maré baixa, na praia de Taíba, município de São Gonçalo do

Amarante, Ceará. As ascídias foram removidas do substrato com a ajuda de uma espátula, tendo o cuidado de retirá-las o mais integralmente possível. O material coletado foi levado ao laboratório, separado manualmente de contaminantes, e, em seguida lavado com água destilada, acondicionado em sacos plásticos e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, o material foi liofilizado, e macerado até a obtenção de um pó fino com o auxílio de um almofariz.

### 2.1.2. Eritrócitos

Eritrócitos humanos do tipo A, B e O de pacientes sadios foram fornecidos pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

Os eritrócitos de coelho foram obtidos de animais sadios do Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC.

### 2.1.3 Reagentes

Ácido clorídrico, ácido fosfórico, ácido tricloroacético, acrilamida, bis-acrilamida,  $\beta$ -mercaptoetanol, cloreto de sódio, Coomassie brilliant blue G, dodecil sulfato de sódio (SDS), etanol, glicina, heparina, hidróxido de sódio, papaína, tripsina, Tris, sulfato de amônio, temed, persulfato de amônio, azul de bromofenol, glicerol, e demais reagentes utilizados no decorrer do trabalho foram de grau analítico, sendo obtidos comercialmente

DEAE-Sephacel foi adquirida da Amersham Bioscience.

Ácido galactoneuramínico, carragenana, D-arabinose, D-fucose, D-galactosamina, fucoidano, D-galactose, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glicosamina, D-glicose, lactulose, L-fucose, manose, metil-D-galactose, metil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo, metil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo, mucina de estomago de porco,  $\alpha$ -lactose,  $\beta$ -lactose e quitina foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis USA.

Polissacarídeo sulfatado da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* foi gentilmente cedido pelo Professor Wladimir Ronald Lobo Farias.

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Extração de Proteínas

A extração protéica foi feita sob agitação constante durante 1 hora, na proporção de 1/5 (p:v), utilizando as seguintes soluções tampões: Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6; glicina 0,1M, pH 2,6; glicina 0,1M, pH 9,0, todos contendo NaCl 0,15M. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 9000 x g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido, denominado de extrato total, foi utilizado para as etapas posteriores.

### 2.2.2. Atividade hemaglutinante

Os ensaios de atividade hemaglutinante nas diversas frações de *Didemnum ligulum* foram realizados através de diluições seriadas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, etc) em tubos de ensaio, com tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,6 com NaCl 0,15M. Para cada 100 µL de cada diluição foi adicionado igual volume de uma suspensão de eritrócitos a 2%, levemente agitados e incubados a 37°C por 30 minutos. A mistura foi deixada em repouso por mais 30 minutos à temperatura ambiente e a aglutinação observada macroscopicamente. O valor título expresso em unidade de hemaglutinação (UH/mL), é obtido através do inverso da maior diluição até onde a amostra apresentou nítida aglutinação.

### 2.2.3. Eritrócitos

Os eritrócitos dos diferentes tipos de sangue testados foram preparados segundo metodologia padrão (AINOUZ; SAMPAIO, 1991). Alíquotas de cerca de 3 mL foram lavadas 6x com NaCl 0,15M através de centrifugação, obtendo-se desta forma, eritrócitos nativos.

O tratamento enzimático dos eritrócitos foi realizado através do uso das enzimas proteolíticas tripsina e a papaína, na concentração de 0,01mg/mL de uma solução de eritrócitos a 2%. Após o contato da enzima com o sangue por



1 hora em geladeira, os eritrócitos foram lavados com NaCl 0,15M novamente por 6x, diluídos para obtenção de uma solução de eritrócitos tratados enzimaticamente a 2% em NaCl 0,15M e então utilizados para a determinação da atividade hemaglutinante.

#### **2.2.4. Estudos de inibição da atividade hemaglutinante**

A inibição da atividade hemaglutinante foi determinada a partir da fração protéica contendo 4 Unidades de Hemaglutinação (U.H.). Este método consiste no preparo de diluições seriadas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 etc) com NaCl 0,15 M dos açúcares e glicoproteínas em tubos de ensaio. Para cada 200  $\mu$ L de diluição foi adicionado igual volume de uma solução da lectina contendo 4 U.H. A mistura foi deixada em repouso por 1 h e posteriormente foram adicionados 200  $\mu$ L de uma suspensão de eritrócitos de coelho a 2% tratados com tripsina. Os tubos foram deixados em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos e levados a uma estufa a 37°C por mais 30 minutos. O título de inibição da atividade hemaglutinante foi determinado como a maior diluição do açúcar ou glicoproteína capaz de inibir uma solução da lectina contendo 4 U.H.

#### **2.2.5. Determinação de Proteína**

Os teores de proteínas solúveis das frações foram realizados segundo o método de Bradford (1976), utilizando como padrão a albumina sérica bovina (BSA). A absorbância a 595nm foi utilizada para determinação de proteínas nos eluatos das cromatografias utilizadas no processo de purificação da lectina.

#### **2.2.6. Fracionamento com sulfato de amônio**

O extrato total foi submetido ao fracionamento com sulfato de amônio nas frações 0-20, 20-40, 40-60, 60-80 e 80-100% de saturação a temperatura

ambiente por 30 minutos. O precipitado obtido em cada fração após centrifugação a  $9.000 \times g$  por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  foi suspenso em pequenos volumes de Tris-HCl 0,1M, pH 7,6 com NaCl 0,15M dialisado exaustivamente contra água destilada, seguido de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,6 com NaCl 0,15M. As frações protéicas obtidas foram utilizadas para determinação de proteínas e atividade hemaglutinante.

### **2.2.7. Cromatografias**

#### **A) Cromatografia de afinidade em coluna de quitina**

O extrato total foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de quitina. A coluna medindo  $12 \times 1,5$  cm foi montada por gravidade, e em seguida, equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,6 com NaCl 0,15M. Posteriormente, o extrato total foi aplicado na coluna e eluído com o tampão de equilíbrio por gravidade e coletadas frações de 2,0 mL. Após a completa eluição do pico não retido pela resina (PI), a coluna foi eluída pela adição de tampão glicina 0,1M, pH 2,6 com NaCl 0,15, seguido de glicina 0,1M pH 7,6 com NaCl 0,15M. As absorbâncias foram monitoradas a 280 nm (espectrofotômetro Genesys) e determinada a atividade hemaglutinante. As frações ativas foram dialisadas contra água destilada, concentradas por liofilização e estocadas para posterior utilização.

#### **B) Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel**

A cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel foi realizada em uma coluna medindo  $5 \times 1,5$  cm montada por gravidade e equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,6. Posteriormente, a fração foi aplicada na coluna e eluída com o tampão de equilíbrio com um fluxo constante de  $30 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$  e coletadas frações de 2 mL. Após a eluição completa do pico não retido pela resina (PI), um segundo pico (PII) foi eluído pela adição de um gradiente de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,6, com gradiente de NaCl (0-

2M). As absorvâncias foram monitoradas a 280nm (espectrofotômetro Genesys) e determinada a atividade hemaglutinante. As frações ativas foram dialisadas contra água destilada, concentradas por liofilização e estocadas para posterior utilização.

#### **2.2.8. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS e $\beta$ -mercaptoetanol**

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e  $\beta$ -mercaptoetanol (SDS-PAGE), segundo o método descrito por LAEMMLI (1970), adaptado para o uso de placas de vidro verticais. Para a montagem do gel foi usada uma concentração de 3,5% de poliacrilamida em tampão tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e para o gel de separação uma concentração de 12% de poliacrilamida em tampão tris-HCl 1,5 M pH 8,8. A amostra liofilizada foi dissolvida em tampão tris-HCl 0,08M, pH 6,8, contendo glicerol 5%, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5% e 0,05% de azul de bromofenol. Em seguida a amostra foi incubada a 100°C por 10 min. Alíquotas de 20  $\mu$ L foram aplicadas em poços previamente feitos no gel de aplicação. A corrida eletroforética foi realizada em corrente constante de 20 mA, durante 3 horas. O coramento das proteínas foi realizado com uma solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 a 1% em metanol:ácido acético:água (40:10:60), por um período de 12 horas. O descoramento foi realizado por uma solução de metanol:ácido acético:água (40:20:40).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Atividade Hemaglutinante frente a diferentes condições

Os resultados obtidos com o estudo de extração da fração protéica aglutinante utilizando diferentes tampões e diferentes pHs estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Atividade hemaglutinante para três diferentes extratos totais da ascídia marinha *Didemnum ligulum*.

Tampão	Normal UH/mL*	Papaína UH/mL*	Tripsina UH/mL*
Glicina 0,1 M, pH 2,6, c/NaCl 0.15M	-	8	4
Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6, c/NaCl 0.15M	4	8	8
Glicina 0,1 M, pH 9,0, c/NaCl 0.15M	4	8	8

UH = unidades de hemaglutinação; \*= eritrócitos de coelho a 2%

#### 3.2. Atividade hemaglutinante

O extrato protéico da obtido em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6, c/NaCl 0.15M da ascídia marinha *D. ligulum* apresentou atividade hemaglutinante preferencial contra eritrócitos de coelho nativos e tratados com enzimas proteolíticas (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade hemaglutinante (UH/mL) do extrato total de *Didemnum ligulum* contra diferentes eritrócitos nativos e tratados com enzimas proteolíticas.

Eritrócitos	Nativos	Tratamento enzimático	
		Tripsina	Papaína
Coelho	4	8	8
Humano A	-	-	-
Humano B	-	-	-
Humano O	-	-	-

### 3.3. Estudos de Inibição da Atividade Hemaglutinante

A Tabela 3 apresenta os resultados dos estudos de inibição da atividade hemaglutinante presentes no extrato total de *Didemnum ligulum*. A substância que apresentou o maior poder de inibição da atividade hemaglutinante foi a D-fucose na concentração mínima inibitória de 3,12 mM seguido por L-fucose, N-acetil-glicosamina na concentração mínima de 6,25 mM. Não foi observada a inibição pela glicoproteína mucina de porco até a concentração máxima de 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>.

### 3.4. Fracionamento por Sulfato de Amônio

O estudo de fracionamento das frações protéicas do extrato total de *Didemnum ligulum* utilizando-se sulfato de amônio, observou-se que apenas as frações de (0 – 20%) e (20 – 40%) foram capazes de causar hemaglutinação. (Tabela 4)

Tabela 3. Inibição da atividade hemaglutinante da lectina de *Didemnum ligulum*.

Substância	Concentração Mínima Inibitória* mM
D-fucose	3,12
L-fucose	6,25
N-acetil-glicosamina	6,25
D-galactosamina	12,5
D-galactose	12,5
Metil- $\alpha$ -D-galactose	25
$\alpha$ -lactose	25
$\beta$ -lactose	25
N-acetil-galactosamina	50
Lactulose	50

\*Concentração mínima capaz de inibir 4 unidades de hemaglutinação (U.H.) da lectina. Eritrócitos de coelho tratados com tripsina foram utilizados para determinação da atividade hemaglutinante. Arabinose, glicose, manose e metil- $\alpha$ -glicosídeo não inibiram até a concentração de 50 mM. Polisacarídeo sulfatado de *Botryocladia occidentalis* e a mucina de porco não inibiram na concentração máxima de 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>.

Tabela 4. Estudos de fracionamento com sulfato de amônio da atividade hemaglutinante presente no extrato total de *Didemnum ligulum*.

Frações (%)	UH/mL*	UH/mgP
0-20	32	138,7
20-40	64	100,0
40-60	-	ND
60-80	-	ND
80-100	-	ND

\* Eritrócitos de coelho tratados com tripsina. ND=não determinado.

### 3.5. Cromatografias

#### A) Cromatografia de afinidade em Coluna de Quitina

A Figura 3 apresenta o resultado da cromatografia por afinidade em coluna de quitina do extrato total da ascídia marinha *Didemnum ligulum*. A atividade hemaglutinante estava presente no pico I, não retido pela coluna. Conseqüentemente esta etapa não pôde ser usada para a purificação da lectina.

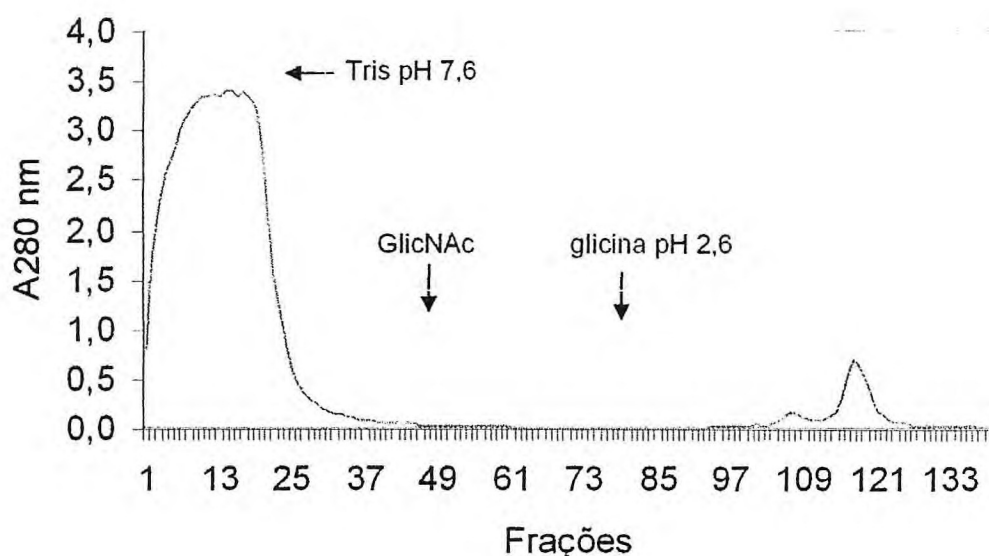


Figura 3. Cromatografia de afinidade em gel de quitina do extrato total da ascídia *Didemnum ligulum*. A coluna (12x1,5cm) foi equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,6 com NaCl 0,15M. A fração retida na coluna foi eluída pela adição de tampão glicina 0,1M, pH 2,6 com NaCl 0,15, seguido de glicina 0,1M pH 7,6 com NaCl 0,15M. Foram coletadas frações de 2,0 mL e submetidas a atividade hemaglutinante, utilizando eritrócitos tripsinizados de coelho.

## B) Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Sephacel

Os resultados da cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel da fração 0/40 do extrato total da ascídia marinha *Didemnum ligulum* estão apresentados na Figura 4.

Um pico não retido (PI) foi eluído com tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,6 não apresentando atividade hemaglutinante. O pico retido (PII) foi eluído com Tris-HCl 0,1M, pH 7,6 em gradiente de sal de 0 a 2M, contendo atividade hemaglutinante.

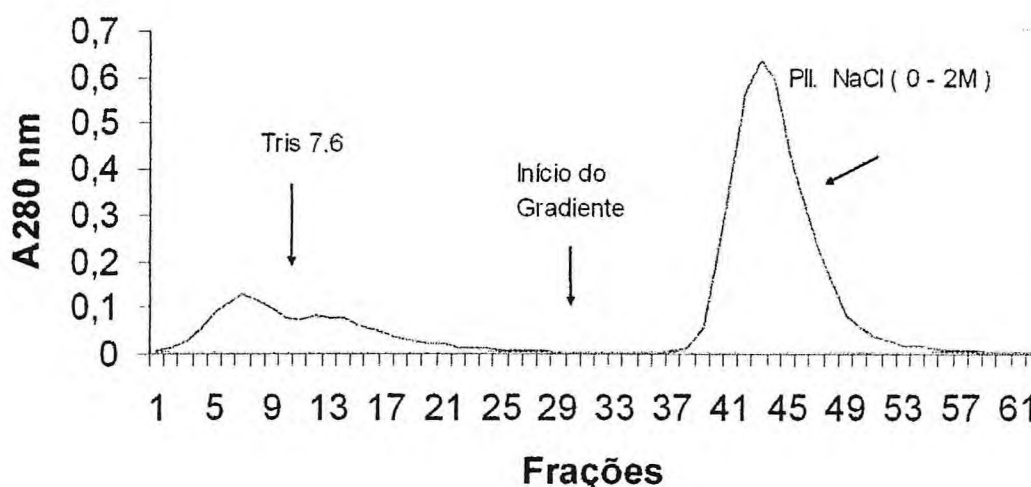


Figura 4. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel da fração obtida por precipitação com sulfato de amônio (F0/40) de *Didemnum ligulum*. A fração foi dialisada em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,6 e em seguida aplicada na coluna (5x1,5cm). A coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio com um fluxo constante de 30 mL.h<sup>-1</sup> e eluída com gradiente de NaCl 2M no mesmo tampão. Foram coletadas frações de 2 mL e submetidas a atividade hemaglutinante, utilizando eritrócitos tripsinizados de coelho.

### 3.6. Eletroforese

A Figura 5 apresenta a determinação da massa molecular aparente da lectina *Didemnum ligulum* realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), utilizando a fração 0-40% de saturação com sulfato de amônio.



Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença e ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol da lectina presente na ascídia marinha *Didemnum ligulum*. Linha 1: fração 0-40%; Linha 2: PII-DEAE-Sephacel sem  $\beta$ -mercaptoetanol; Linha 3: PII-DEAE-Sephacel com  $\beta$ -mercaptoetano

#### 4. DISCUSSÃO

A coleta das ascídias para a realização da presente monografia teve de ser realizada com bastante cuidado, visto que durante o procedimento da retirada das colônias do substrato rochoso poderia haver excesso de dano ao animal, e conseqüente perda da hemolinfa, o que poderia acarretar em diminuição da atividade hemaglutinante. A razão desta medida se deve ao fato de que as lectinas estão comumente presentes nos fluídos corporais desses invertebrados marinhos (UHLENBRUCK et al., 1972; VASTA et al., 1982).

Os resultados de atividade hemaglutinante presente no extrato total da ascídia marinha *Didemnum ligulum*, frente a eritrócitos de coelho e humanos A, B e O, nativos e tratados com enzimas proteolíticas, evidenciaram atividade lectínica apenas nos eritrócitos de coelho, sendo que a atividade foi incrementada pelo tratamento com tripsina e papaína.

O uso de enzimas proteolíticas possibilita uma mais forte aglutinação devido provavelmente uma combinação de: remoção de sialoglicoproteínas e suas cargas negativas da superfície dos eritrócitos; redução no impedimento estérico causado por polipeptídeos dos eritrócitos e, proporcionando o aparecimento de carboidratos e glicoproteínas anteriormente não acessíveis na superfície dos eritrócitos (LIS; SHARON, 1986).

Vários são os trabalhos de detecção da atividade hemaglutinante em organismos marinhos que evidenciam a eficiência de eritrócitos de coelho tratados com enzimas proteolíticas, sendo estes mais susceptíveis a aglutinação positiva das lectinas presentes nesses organismos. Por exemplo, eritrócitos de coelho tratados com proteases foram também os mais eficientes para a detecção de lectinas presentes em algas marinhas (HORI et al., 1981, CHILES; BIRD 1989; AINOZ; SAMPAIO, 1991, AINOZ et. al., 1992; NAGANO et al., 2002). A preferência por eritrócitos de coelho tratados com tripsina foi observada também para a ascídia marinha colonial *Botryllus schlosseri* (BALLARIN et al., 1999).

O extrato total da ascídia marinha *Didemnum ligulum* não foi capaz de aglutinar eritrócitos humanos do sistema ABO, mesmo quando tratados com enzimas proteolíticas. Resultado semelhante foi observado para a ascídia marinha *Symplegma* sp (NUNES, 2006, comunicação pessoal). Diferentemente, extratos protéicos de *D. ternatanum* (BELOGORTSEVA, et al., 1997) e *Botryllus schlosseri* (BALLARIN, et al., 1999) foram capazes de aglutinar hemácias humanas A, B e O, nativas e tratadas com tripsina.

A eficiência do tampão e do pH na extração da lectina presente na ascídia marinha *D. ligulum*, dentre os tampões testados, foi observada quando utilizado o tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 com NaCl 0,15 M, que apresentou a maior atividade específica (6,78 UH/mgP). Quando o pH da solução tampão foi elevado para 9,0, embora o valor da atividade hemaglutinante tenha permanecido o mesmo, o teor de proteína foi elevado, diminuindo portanto a atividade hemaglutinante específica (3,7 UH/mgP). No extrato aquoso, preparado com glicina 0,1M pH 9,0 com NaCl 0,15M, houve uma diminuição da potencia de aglutinação o que resultou também na diminuição da atividade específica (3,7 UH/mgP). Diferentemente, Belogortseva et al. (1997) evidenciaram que a atividade hemaglutinante em extratos protéicos da ascídia marinha *D. ternatanum* apresentava incremento da atividade hemaglutinante na faixa de pH de 3,0 a 6,0.

O fracionamento com sulfato de amônio é uma etapa padrão nos processos de purificação de proteínas e, particularmente de lectinas, embora não tenha sido usado em trabalhos de isolamento de lectinas de ascídias. A etapa de fracionamento por sulfato de amônio traz uma série de vantagens: permiti a separação do material em diferentes frações; possibilita a concentração da amostra e exclusão de polissacarídeos entre outros constituintes e a concentração da amostra (SHARON; LIS, 2003) como glicoproteínas, que poderiam estar inibindo a lectina em estudo. Estudos de fracionamento do extrato total da ascídia *D. ligulum* com sulfato de amônio revelaram que a atividade hemaglutinante estava presente nas frações 0-20 e 20-40% de saturação, possibilitando uma melhor recuperação da atividade hemaglutinante total presente no extrato.

Os resultados disponíveis na literatura relativos a inibição da atividade hemaglutinante em lectinas de ascídias têm revelado uma maior especificidade por galactose e seus derivados. Por exemplo, D-galactose, 2-deoxi-D-galactose, metil- $\alpha$ -D-galactosídeo, D-lactulose foram potentes substâncias inibitórias da atividade hemaglutinante presente na ascídia *Botryllus schlosseri* (BALLARIN et al., 1999). A inibição da atividade hemaglutinante por D-galactose e seus derivados foi também observada nas ascídias *Syela clava* (KELLY et al., 1992), *Didemnum candidum* e *Halocynthia pyriformis* (VASTA et al., 1982) e *D. ternatanum* (MOLCHANOVA et al., 2005). Interessantemente, a lectina de *D. ligulum* foi inibida por N-acetil-glucosamina, na concentração de 6,25 mM. Resultados semelhantes foram observados com a ascídia *D. ternatanum* (MOLCHANOVA et al., 2005), que foi inibida por D-glicose e seus derivados, tais como N-acetil-glicosamina. Inibição da atividade hemaglutinante por D-galactose, D-glicose e alguns de seus derivados foi também observada por Sampaio et al. (2002) com a lectina da alga marinha vermelha *Ptilota plumosa*.

Os resultados encontrados nos estudos de inibição da atividade hemaglutinante revelam que a lectina presente no extrato total de *D. ligulum* apresenta especificidade por D-fucose e L-fucose, que inibiram a atividade na concentração mínima inibitória de 3,12 e 6,25 mM, respectivamente. D-galactose e alguns de seus derivados também foram capazes de inibir a atividade hemaglutinante.

Na tentativa de se isolar a lectina presente no extrato total de *D. ligulum* utilizando processos cromatográficos, e de posse do resultado dos estudos de inibição da atividade hemaglutinante, que mostraram a capacidade de açúcar simples N-acetil-glucosamina inibir a lectina, foi realizado a cromatografia de afinidade em coluna de quitina, um polímero formado por unidades de N-acetil-glucosamina. Entretanto, a cromatografia mostrou que a quitina não foi um suporte eficaz na ligação da lectina, em virtude de que toda a atividade hemaglutinante presente no extrato aplicado na coluna estava presente no pico I, o pico não retido pela resina cromatográfica. Desta forma, foi necessário a procura de um outro processo cromatográfico para o isolamento da lectina.

A cromatografia de troca iônica tem sido utilizada como uma excelente ferramenta para a purificação de várias lectinas. De fato, cromatografia de troca iônica para a purificação de aglutininas de macroalgas marinhas tem sido utilizada por nosso grupo com eficiência, para o isolamento de várias lectinas de algas (AINOUZ et al., 1995; NAGANO et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2006).

A cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel foi uma etapa efetiva para o isolamento parcial da lectina de *D. ligulum*, possibilitando a separação de algumas proteínas contaminantes que não ficaram retidas na coluna, enquanto que toda a atividade hemaglutinante presente na fração 0-40% permaneceu ligada a matriz de DEAE, sendo eluída da coluna apenas com a adição de um gradiente de NaCl 2,0 M em tampão.

Os resultados obtidos pela eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, com e sem o agente redutor,  $\beta$ -mercaptoetanol, revelam a presença de oligomerizações devido a presenças de duas bandas de subunidades heterogêneas. Resultados semelhantes foram observados com outras lectinas de ascídias (BALLARIN et al., 1999; PEARCE et al., 2001).

Os resultados obtidos no presente trabalho são parciais, necessitando que estudos posteriores de purificação e caracterização devam ser realizados para classificar esta lectina em relação aos diversos grupos de lectinas isoladas e caracterizadas de organismos marinhos. A importância do presente trabalho está relacionada com a detecção da presença de lectinas em uma espécie de ascídia marinha presente do litoral cearense e é um dos dois primeiros trabalhos no Brasil, que relatam a presença de lectinas em ascídias marinhas.

Os estudos posteriores que serão realizados em função dos dados obtidos até a realização dessa monografia proporcionarão a aplicação dessa importante ferramenta biotecnológica em diversos ensaios biológicos, já que está bem estabelecido que os organismos marinhos produzem compostos de baixo peso molecular, com características e atividades biológicas bastante peculiares, quase sempre expressando uma determinada atividade biológica em concentrações inferiores do que lectinas oriundas de outras fontes.

## 5. CONCLUSÃO

A ascídia marinha *Didemnum ligulum* coletada no litoral do estado do Ceará possui um componente lectínico com especificidade por fucose e galactose que foi isolado parcialmente por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel. A importância do presente trabalho está relacionada com a detecção da presença de lectinas em uma espécie de ascídia marinha presente do litoral cearense e é um dos dois primeiros trabalhos no Brasil que relatam a presença de lectinas em ascídias marinhas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINOUZ, I.L.; SAMPAIO, A.H. Screening of Brazilian marine algae for hemagglutinins. **Botanica Marina**, Berlin, v.34, p.211-214, 1991.

AINOUZ, I.L.; SAMPAIO, A.H.; FREITAS, A.L.P.; BENEVIDES, N.M.B.; MAPURUNGA, S. Comparative study on hemagglutinin from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.7, n.1, p.15-19, 1995.

ALENCAR, N.M.N.; CAVALCANTE, C.F.; VASCONCELOS, M.P.; LEITE, K.B.; ARAGÃO, K.S.; ASSREUY, A.M.S.; NOGUEIRA, N.A.P.; CAVADA, B.S.; VALE, M.R. Anti-inflammatory and anti-microbial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental model of infectious peritonitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. London, v. 57, n. 7, pp. 919-922, Jul 2005.

ASSREUY, M.A.S.; SHIBUYA, M.D.; MARTINS, G.J.; SOUZA, M.L.P.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators Inflammation**. London, v. 6, pp. 201-210, Jun 1997.

ASSREUY, A.M.; MARTINS, G.J.; MOREIRA, E.E.F.; BRITO, G.A.C.; CAVADA, B.S.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **Journal of Urology**. Philadelphia, v.161, pp. 1988-1993, Jun 1999.

BALLARIN, L.; TONELLO, C.; GUIDOLIN, L.; SABBADIN, A. Purification and characterization of a humoral opsonin, with specificity for D-galactose, in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 123, pp. 115-123, May 1999.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; FREITAS, L.A.R.; BARRAL-NETTO, M. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 96, pp. 673-678, 2001.

BELOGORTSEVA, N.; MOLCHANOVA, V.; GLAZUNOV, V.; EVTUSHENKO, E.; LUK'YNOV, P. N-acetyl-glucosamine-specific lectin from ascidian *Didemnum ternatanum*. **Biochimica et Biophysica Acta**. Amsterdam, v. 1380, pp. 249-256, 1997.

BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**. New York, v.119, p.419, 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**, San Diego, v. 72, pp. 248-254, 1976.

BRETTING, H.; RENWRANTZ, L. Investigations of invertebrates of the Mediterranean Sea with regard to their contents haemagglutinins. **Zetschrift fur Immunitats Forshschung**. Jena, v. 145, pp. 242-249, 1973.

BROWN, R.; ALMODOVAR, L.R.; BHATIA, H.M.; BOYD, W.C. Blood group specific agglutinins in invertebrates. **Journal of immunological**. Rockville, v. 100, pp. 214-216, 1968.

CALVETE, J.J.; MORENO, M.M.P.; THEAKSTON, R.D.; KISIEL, D.G.; MARCINKIEWICZ, C. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. **Biochemical Journal**. London, v. 372, pp. 725-734, Jun 2003.

CAMUS, M.L. Recherches experimentales sur une agglutinine produite par la glande de l'albumen chez l'*Helix pomatia*. **C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.** v. 129, p.233, 1899.

CHILES, T.C.; BIRD, K.T. A comparative study of animal erythrocyte agglutinins from marine algae. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.94B, p.107-111. 1989.

COOBE, D.R.; Ey, P.L.; SCHLUTER, S.F.; JENKIN, C.R. An agglutinin in the haemolymph of an ascidian promoting adhesion of sheep erythrocytes to mouses macrophages. **Immunology**, v.42, pp. 661-669, 1981.

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

DEHAL, P.; SATOU, Y.; CAMPBELL, R. K.; CHAPMAN, J.; DEGNAN, B.; TOMASO, A.; DAVIDSON, B.; GREGORIO, A.; GELPKE, M; GOODSTEIN, D. M. The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. **Science**, New York, v. 298, pp. 2157-2167, Dec 2002.

DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 263, p. 9557-9560, 1988.

EPSTEIN, J.; EICHBAUM, Q.; SHERIFF, S.; EZEKOWITZ, R.A. The collectins in innate immunenity. **Current Biology**, London, v. 8, pp. 29-35, Feb 1996.

HAKANSSON, K.; REID, K.B.M. Collectin structure: a review. **Protein Science**, New York, v. 9, p. 1607-1617, Sep 2000.

HARDY S.W.; FLETCHER, T.C.; OLAFSEN, J.A. Aspects of cellular and humoral defense mechanisms in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. In: **Solomon JB, Horton JD, editors, Developmental Immunobiology**, pp. 59-66, 1977.

HORI, K.; MIYAZAWA, K.; ITO, K. Hemagglutinins in marine algae. **Bulletin Japanese Society of Science Fisheries**, v.47, p.793-798. 1981.

GOLDSTEIN, I.J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin. **Nature**, London, v. 285, p. 66, 1980.

KASAI, K.; HIRABAUASHI, J. Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 119, pp. 1-8, Jan 1996.

HUFF, C.G. Immunity in invertebrates. **Physiological Review**, v. 20, pp. 68-88, 1940.

KAVALALI, G.; TUNCEL,H.; GÖKSEL, S.; HATEMI,H. Hipoglicemic activity of *Urtica pilurifera* in streptozotocin-diabetic rats. **J Ethnopharm.**, 0:1-5, 2002.

KENJO, A.; TAKAHASHI, M.; MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; NAKADA, M.; MIZOUCHI, T.; FUJITA, T. Cloning and characterization of novel ficolins from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*, **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 276, pp. 19959-1965, Jun 2001.

KILPATRICK, D.C. Handbook of Animal Lectins. Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: WILEY., 2000, 2 p.

KOCOUREK, J.; HOREJSI, V. Defining a lectin. **Nature**, London v. 290, p. 188, 1981.

LEFFLER, H. Galectins structure and function – a synopsis. In Mammalian Carbohydrate Recognition Systems. Springer, Berlin. Crocker, P., ed., 2001, 57-83 p.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; MICHEL, M. C. Princípios de Bioquímica. São Paulo, SARVIER, 1995.

LIS, H.; SHARON, N. Biological properties of lectins In: **“The lectins-properties, functions, and applications in biology and medicine.”** Liener, I.E., Sharon, N. and Goldstein, I.J., Eds., New York: Academic Press; 1986.p. 265-291.

LU, J.; LE, Y. Ficolins and the fibrinogen-like domain. **Immunobiology**, Amsterdam, v. 199, pp. 190-199, Mar 1998.

MCEVER, R.P. Leukocyte adhesion through selectins under flow. **The immunologist**. v. 6, pp. 61-67, 1998.

MIERS, J.W.; GALLO, R.C. The purification and properties of human T cell growth factor. **Journal of Immunology**, Kirkland v. 128, pp. 1122-1127, Mar 1982.

MOLCHANOVA, V.; CHIKALOVETS, I.; LI, W.; KOBELEV, S.; KOZYREVSKAYA, S.; BOGDANOVICH, R.; HOWARD, E.; BELOGORTSEVA, N. New GlcNAc/GalNAc-specific lectin from the ascidian *Didemnum ternatanum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Vladvostok, vol. 1723, pp. 82-90, Dec 2004.

MORGAN, D.A.; RUSCETTI, F.W.; GALLO, R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. **Science**, New York, v. 193, pp. 1007-1008, 1976.

NAGANO, C.S, MORENO, F.B.M.B, BLOCH Jr, C., PRATES, M.V., CALVETE, J.J., SAKER-SAMPAIO, S., FARIAS, W.R.L., TAVARES, T.D., NASCIMENTO, K.S., GRANGEIRO, T.B., CAVADA, B.S., SAMPAIO, A.H. Purification and characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. **Protein and Peptide Letters**, Hilversum, v. 9, n. 2, p. 159-165, Apr 2002.

NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; NUNES, E.V.; RODRIGUES, R.F.; GOERSCH, G.V.; CAVADA, B.S.; CALVETE, J.J.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W.R.L.; SAMPAIO, A.H. Isolation and characterization of a new agglutinin from the red marine alga *Hypnea cervicornis*, J. Agardh. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v.84, n.1, 49-54, Feb 2006.

NITTA, K. Leczime. **Methods Enzymology**, San Diego, v. 341, pp. 368-374, 2001.

NOGUCHI, H. The interaction of the blood of cold-blooded animals, with reference to haemolysis, agglutination and precipitation. **Univ. Penn. Med. Bull.**, v. 15, pp. 295, 1902.

OLAFEN, J.A. Invertebrate lectins: biochemical heterogeneity as a possible key to their biological function. In: Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1986, pp.94-111.

PARRINELLO, N.; CANICATTI, C. Carbohydrate binding specificity and purification by biospecific affinity chromatography of *Ascidia malaca* traust hemagglutinins. **Developmental and Comparative Immunology**, Oxford, v. 6, pp. 53-64, 1982.

PARRINELLO, N.; CANICATTI, C.  $\alpha$ -Lactose binding hemagglutinins from the ascidian, *Phallusia mamillata*. **Biological Bulletin**, Woods Hole, v. 164, pp. 125-135, 1983.

PARRINELO, N.; PATRICOLO, E. Erythrocyte agglutinins in the blood of certain ascidians. **Experientia**, Basel, v.31, pp. 1092-1093, 1975.

PEARCE, S.; NEWTON, R.A.; NAIR, S.V.; RAFTOS, D. A. Humoral opsonins of the tunicate, *Pyura stolonifera*. **Developmental and Comparative Immunology**, Oxford, v. 25, pp. 377- 385, Jul 2001.

PERILLO, N.L.; MARCUS, M.E.; BAUM, L.G. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. **Journal of Molecular Medicine**, New York, v. 76, pp. 402-412, May 1998.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, pp. 347-352, 1995.

POGET, S.F.; LEGGE, G.B.; PROCTOR, M.R.; BUTLER, P.J; BYCROFT, M.; WILLIAMS, R.L. The structure of a tunicate C-type lectin from *polyandrocarpa misakiensis* complexed with D-galactose., **Journal of Molecular Biology**, London, v. 290, pp. 867-879, Jul 1999.

RENWRANTZ, L.; SCHÄNCKE, W.; HARM, H.; ERL, H.; LIEBSCH, H.; GERKEN, J. Discriminative ability and function of the immunobiological recognition system of the snail *Helix pomatia*. **Journal of Comparative Physiology**, New York, v. 141, pp. 477-488, 1981.

RENWRANTZ, L.; STAHLER, A. Opsonizing properties of an isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules at the surface of hemocytes from *Mytilus edulis*. **Journal of Comparative Physiology**, New York, v. 146, pp. 535-546, 1983.

RAFTOS, D.; GREEN, P. MAHAJAN, D.; NEWTON, R.; PEARCE, S.; PETERS, R.; ROBBINS, J.; NAIR, S. Collagenous lectins in tunicates and the proteolytic activation of complement, **Advances Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 484, pp. 229-236, 2001.

RODRIGUES, S.A.; ROCHA, R.M.; LOTUFO, T.M.C. Guia ilustrado para identificação das Ascídias do Estado de São Paulo, São Paulo, FAPESP; 1998, 66 PP.

SANTUCCI, L.; FIORUCCI, S.; CAMMILIERE, F.; SERVILLO, G.; FEDERICI, B.; MORELLI, A. Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concavalin A-induced hepatitis in mice. **Hepatology**, Philadelphia, v. 31, pp. 399-406, Feb 2000.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins cells-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, v. 177, pp. 949-959, 1972.

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins**, Dordrecht-Boston-London. Kluwer Academic Publishers: 2003.

STILLMARK, H. **Uben ricin, ein giftiges ferment aus samen von *Ricinus communis* L., und einigen anderen euphobiaceen.** 1888. PhD Thesis, University of Dorpat, Dorpat (Tartu).

UHLENBRUCK, G.; PARDOE, G.I.; PROKOP, O.; ISHIYAMA, I. The serological specificity of snail agglutinins (protectins). **Anim. Blood Groups Biochem. Genet.**, v. 3, pp. 125-139, 1972.

VASTA, G.R. The multiple biological roles of invertebrate lectins: their participation in non-self recognition mechanisms. In: Warr GW, Cihen N, editors. Phylogenesis of immune functions. Boca Raton: CRC Press, 1991, 73-101 pp.

VASTA, G.R.; HAFIZ, A.; ERIC, W.O. Structural and functional diversity of lectin repertoires in invertebrates, protochordates and ectothermic vertebrates., **Current Opinion in Structural Biology**, Baltimore, v. 14, pp. 617-630, Oct 2004.

VASTA, G.R.; MARCHALONIS, J.J.; DECKER, J.M. Binding and mitogenic properties of a galactosyl-specific lectin from tunicate *Didemnum candidum* for murine thymocytes and splenocytes. **Journal of Immunology**, Rockville, v. 137, pp. 3216-3233, 1986.

VASTA, G.R.; QUESENBERRY, M.; AHMED, H. O'LEARY, N. C-type lectins and Galectins mediate innate and adaptive immune functions: their role in the complement activation pathway. **Developmental Comparative Immunology**, Oxford, v. 23, pp. 401-420, Jul 1999.

VASTA, G.R.; WARR, G.W.; MARCHALONIS, J.J. TUNICATE LECTINS: DISTRIBUTION AND SPECIFICITY. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 73B, pp. 887-900, 1982.

WEIS, W.I.; TAYLOR, M.E.; DRICKAMER, K., The C-type lectin superfamily in the immune system. **Immunological Review**, v. 163, pp. 19-34, 1998.