



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

ANDRESSA ROCHA DE OLIVEIRA SOUSA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA NOVA LECTINA DA
ESPONJA MARINHA *Chondrilla caribensis* RÜTZLER, DURAN & PIANTONI, 2007.**

FORTALEZA

2018

ANDRESSA ROCHA DE OLIVEIRA SOUSA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA NOVA LECTINA DA
ESPONJA MARINHA *Chondrilla caribensis* RÜTZLER, DURAN & PIANTONI, 2007.

Trabalho Supervisionado – Modalidade A –
Monografia – submetido ao Departamento de
Engenharia de Pesca do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para obtenção do Título de
Engenheiro de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Holanda
Sampaio.

Coorientador: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.

FORTALEZA

2018

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)

S696p Sousa, Andressa Rocha de Oliveira.
Purificação e caracterização bioquímica de uma nova lectina da esponja marinha *Chondrilla caribensis*
Rützler, Duran & Piantoni, 2007 / Andressa Rocha de Oliveira Sousa. – 2018.
43 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências
Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.
Coorientação: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.

1. Esponja. 2. Lectina. 3. Biotecnologia. I. Título.

CDD 639.2

ANDRESSA ROCHA DE OLIVEIRA SOUSA

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA NOVA LECTINA DA
ESPONJA MARINHA *Chondrilla caribensis* RÜTZLER, DURAN & PIANTONI, 2007.

Trabalho Supervisionado – Modalidade A –
Monografia – submetido ao Departamento de
Engenharia de Pesca do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para obtenção do Título de
Engenheiro de Pesca. Área de concentração:
Biotecnologia marinha.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pois sem Ele não conseguiria chegar até o fim dessa jornada. Ele que me deu forças e me ajudou a alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, Eugênia e Evandro, por desde criança me ensinar que só alcançaria meus sonhos através dos estudos. Eles que fazem tudo pela minha felicidade e sempre acreditam em mim. Amo vocês e sou imensamente grata.

Às minhas avós, Antonina e Laura, pelo amor, carinho e dedicação. Meu exemplo de mulheres fortes e guerreiras que não medem esforços para me auxiliar no que for preciso.

À minha irmã, Amanda, e minha família pela ajuda, paciência e apoio durante essa jornada.

Ao meu orientador, professor Dr. Alexandre Holanda Sampaio pelos ensinamentos e oportunidades, me acompanhando desde o início da graduação e me auxiliando sempre que foi preciso. Toda admiração do mundo pelo senhor, muito obrigada.

Ao professor Dr. Celso Shiniti Nagano, por estar sempre presente e disposto para nos auxiliar em qualquer situação. Pelos ensinamentos, pelo estágio, pelos conselhos, por me ajudar com o mestrado e pelos momentos de descontração. Obrigada, o senhor é único.

Ao meu coorientador, professor Dr. Rômulo Farias Carneiro, todas as palavras do mundo não seriam suficientes para expressar toda minha gratidão por você. Obrigada pela paciência, por todos os ensinamentos, pela ajuda, pela dedicação e por sempre estar presente como professor e como amigo. Você é um exemplo de pessoa e de profissional, obrigada por tudo.

À Renata pela ajuda e ensinamentos passados durante o estágio.

A todos os meus amigos que fiz ao longo do curso, principalmente aos meus companheiros de semestre: Ana Larissa, Danilo, Edson, Larissa e Philippe, vocês foram essenciais para eu conseguir chegar até aqui, sempre me ajudando e dividindo as angústias e desesperos.

Aos meus companheiros do BIOMAR, pela amizade e ajuda: André, Ana Kátia, Livia, Malu, Nicole, Pedro, Regi, Victória Régia, Victória e Vitória Alves. Principalmente vocês, Renato e Alexandra, que me auxiliaram bastante durante a realização deste trabalho.

E a você Philippe, pois estamos juntos desde o início e escolhemos trilhar o mesmo caminho, obrigada por ser simplesmente você, por me animar, por me motivar, por me ajudar, por dividir os medos e as felicidades. Muito obrigada.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

As esponjas pertencem ao filo Porifera e são animais sésseis e filtradores. Estão presentes nos mais variados ambientes e possuem diversas formas, cores e tamanhos. Atualmente existe um grande interesse nas biomoléculas produzidas por esses animais, sendo fonte de diversos estudos biotecnológicos. Dentre as moléculas com elevado potencial biotecnológico estão as lectinas, que são proteínas que ligam-se a carboidratos, porém não estão envolvidas necessariamente ao metabolismo dos mesmos e não pertencem a qualquer das principais classes de imunoglobulinas. O objetivo do presente trabalho foi purificar e caracterizar bioquimicamente uma nova lectina presente na esponja marinha *Chondrilla caribensis*. CCL II (*Chondrilla caribensis lectin II*) foi purificada a partir da combinação das cromatografias de afinidade, interação hidrofóbica, troca iônica e exclusão molecular. A lectina apresentou em SDS-PAGE duas bandas de 15 kDa e 14 kDa em condições não redutoras e 20 kDa e 18 kDa em condições redutoras, e foi capaz de aglutinar eritrócitos do tipo humano A, B e O, tratados e não tratados com enzimas proteolíticas. A atividade hemaglutinante de CCL II foi inibida apenas por fetuína, apresentou elevada estabilidade térmica e maior estabilidade em pH neutro.

Palavras-chave: Esponja. Lectina. Biotecnologia.

ABSTRACT

Sponges belong to the phylum Porifera, are sessile and filtering animals. They are present in the most varied environments and have different shapes, colors and sizes. Currently there is great interest in the biomolecules produced by these animals, being the source of several biotechnological studies. Among the molecules with high biotechnological potential are lectins, which are proteins that bind to carbohydrates, but are not necessarily involved in their metabolism and do not belong to any of the major classes of immunoglobulins. The objective of the present work was to purify and characterize biochemically a new lectin present in the marine sponge *Chondrilla caribensis*. CCL II (*Chondrilla caribensis lectin II*) was purified by the combination of affinity chromatography, hydrophobic interaction, ion exchange and molecular exclusion. The lectin showed in SDS-PAGE two bands of 15 kDa and 14 kDa under non-reducing conditions and 20 kDa and 18 kDa under reducing conditions, and was able to agglutinate human erythrocytes type A, B and O, treated and not treated with proteolytic enzymes. The hemagglutinating activity of CCL II was inhibited only by fetuin, presented thermal stability and maximum stability in neutral pH.

Keywords: Sponge. Lectin. Biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Chondrilla caribensis</i>	14
Figura 2 -	Arquitetura estrutural dos tipos de galectinas.....	18
Figura 3 -	Cromatografia de interação hidrofóbica em matriz de fenil-Sepharose.....	26
Figura 4 -	Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel.....	27
Figura 5 -	Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephacryl S-200 HR..	28
Figura 6 -	Efeito do pH na atividade hemaglutinante.....	29
Figura 7 -	Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante.....	30
Figura 8 -	SDS-PAGE da cromatografia de exclusão molecular.....	30
Figura 9 -	Estimativa da massa molecular nativa por cromatografia de exclusão molecular.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Atividade hemaglutinante da CCL II com eritrócitos nativos e tratados com enzimas proteolíticas (U.H./mL).....	28
------------	--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Esponjas.....	13
1.2	Lectinas.....	14
1.3	Lectinas de animais.....	16
1.4	Lectinas de esponja.....	17
1.5	Lectinas do gênero <i>Chondrilla</i>	20
2	METODOLOGIA.....	22
2.1	Coleta da esponja.....	22
2.2	Preparação do extrato proteico.....	22
2.3	Teste de hemaglutinação.....	22
2.4	Teste de inibição da atividade hemaglutinante.....	22
2.5	Isolamento da lectina.....	23
2.6	Avaliação da pureza da lectina.....	24
2.7	Estimativa de massa molecular.....	24
2.8	Caracterização da lectina.....	25
3	RESULTADOS.....	26
3.1	Purificação da lectina.....	26
3.2	Atividade hemaglutinante.....	28
3.3	Inibição da atividade hemaglutinante.....	29
3.4	Caracterização físico química.....	29
3.5	Estimativa da massa molecular em SDS-PAGE (dodecil-sulfato de sódio).....	30
3.6	Estimativa da massa molecular nativa.....	31
4	DISCUSSÃO.....	32
5	CONCLUSÃO.....	37
	REFERÊNCIAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

1.1 Esponjas

As esponjas pertencem ao filo Porifera, são animais sésseis, filtradores e possuem o corpo formado por um sistema de canais, onde células chamadas coanócitos, através de seus flagelos, promovem a circulação da água dentro desse sistema único. A fisiologia da esponja depende inteiramente da corrente de água que flui através do corpo, trazendo oxigênio e alimento e removendo detritos, além de estar diretamente relacionada com a reprodução desses animais. Esses seres vivos não possuem órgãos, são formados por tecidos conjuntivos que desempenham as funções vitais do organismo, devido à elevada independência de suas células (RUPPERT; BARNES, 2005).

As diversas espécies de esponjas ocupam os mais variados *habitats*, e possuem diferentes cores e tamanhos (BRUSCA; BRUSCA, 2007). As esponjas são agrupadas em quatro classes: Classe Calcarea, Classe Hexactinellida, Classe Homoscleromorpha e Classe Demospongiae (WoRMS, 2018).

Na classe Demospongiae estão incluídas 90% das esponjas e a maioria das formas conhecidas. Sua distribuição varia desde águas rasas até grandes profundidades, apresentando todos os tipos de padrões de crescimento. Podem ser encontradas em água salgada, salobra ou doce (BRUSCA; BRUSCA, 2007). O esqueleto dessa classe pode ser constituído de espículas silicosas, espículas de fibras de espongina ou mesmo de ambas (RUPPERT; BARNES, 2005).

O gênero *Chondrilla* pertence à família Chondrillidae (GRAY, 1872), se tornando o gênero desta família mais amplamente distribuído. Espécies de *Chondrilla* são caracterizadas pela presença de espículas siliciosas, abundante no córtex e em torno dos canais (IMMANUEL *et al.*, 2015).

Chondrilla caribensis (Figura 1) é uma esponja de superfície lisa e brilhante, com a cor variando do marrom escuro ao amarelo esverdeado, podendo ser globular ou levemente incrustante. Está presente no Atlântico tropical e subtropical, indo desde as Bermudas até o Brasil (RUTZLER; DURAN; PIANTONI, 2007).

Dois formas diferentes de *Chondrilla caribensis* foram identificadas, forma *caribensis* e forma *hermatypica*. A forma *caribensis* é espessa, incrustante e lobada, possuindo

consistência escorregadia, firme, mas elástica. Já a forma *hermatypica* é finamente incrustada e tem a consistência cartilaginosa e dura (RUTZLER; DURAN; PIANTONI, 2007).

Figura 1 - *Chondrilla caribensis*.



Fonte: Elaborada pela autora

Uma grande variedade de compostos bioativos importantes foi descoberta em esponjas, apresentando um elevado potencial farmacológico (BRUSCA; BRUSCA, 2007). Esses animais são uma rica fonte de produtos naturais potentes (SAGAR *et al.*, 2010), onde a maioria desses compostos são metabólitos secundários produzidos pelas próprias esponjas que atuam no seu sistema de defesa (SARMA; DAUM; MILLER, 1993). As esponjas marinhas são fontes de nucleosídeos, alcaloides, esteroides, terpenos, peptídeos, ácidos graxos e peróxidos, mostrando a enorme diversidade química (BLUNT *et al.*, 2005).

1.2 Lectinas

Lectinas são proteínas que ligam-se a carboidratos, porém não estão envolvidas necessariamente ao metabolismo do mesmo e não pertencem a qualquer das principais classes de imunoglobulinas (KILPATRICK, 2000).

A natureza de aglutinar eritrócitos dessas proteínas é conhecida desde a virada do século XIX, quando inicialmente receberam a denominação de hemaglutininas ou fitoaglutininas (SHARON; LIS, 2004), pois as lectinas vegetais eram conhecidas mesmo antes do termo

“lectina” ser empregado para incluir proteínas de ligação a carboidratos de origem animal (KILPATRICK, 2000).

A primeira hemaglutinação causada por lectinas foi observada em veneno de cobra. Tanto as lectinas de animais como as de plantas eram descobertas da mesma maneira, por meio da habilidade de aglutinar células sanguíneas, e até suas propriedades eram semelhantes (KILPATRICK, 2000).

Em 1906, outra lectina de origem animal foi descoberta, a conglutinina bovina. Apesar de não ser considerada lectina por muitos anos, foi a primeira associação de uma lectina animal com o sistema imune (KILPATRICK, 2000).

Em 1919, obteve-se pela primeira vez, de forma pura, uma hemaglutinina do feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), chamada de concanavalina A (SHARON; LIS, 2004). Esta lectina foi capaz de aglutinar não apenas eritrócitos, mas também leveduras, além de precipitar glicogênio em solução. Fora também observado o efeito inibitório da sacarose sobre a concanavalina A, sendo demonstrado pela primeira vez a especificidade das lectinas por açúcares (SUMNER; HOWEL, 1936).

Nos anos 1940, foi descoberta a especificidade destas proteínas por grupos sanguíneos humanos (SHARON; LIS, 2004). A capacidade das aglutininas vegetais de distinguir entre eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos foi um fator determinante para a utilização do termo lectina (do latim “*legere*” – escolher) para designar tais proteínas (BOYD; SHAPLEIGH, 1954). Esse termo foi generalizado para abranger todas as aglutininas específicas de açúcar de origem não imune, independentemente da fonte, e da especificidade do tipo de sangue (SHARON; LIS, 1972).

Já nos anos 1960, duas descobertas trouxeram as lectinas para o centro das atenções (SHARON; LIS, 2004). Foi descoberto o efeito mitogênico da lectina do feijão vermelho sobre linfócitos que até então eram considerados indivisíveis (NOWELL, 1960). A segunda descoberta diz respeito a capacidade da lectina de germen de trigo de aglutinar células malignas (AUB *et al.*, 1963, 1965).

A partir destes estudos, o interesse nessas proteínas foi estimulado devido à capacidade de detecção, isolamento e caracterização de glicoconjugados, principalmente glicoproteínas, para histoquímica de células e tecidos e para o exame das alterações que ocorrem

na superfície das células durante os processos fisiológicos e patológicos da diferenciação celular ao câncer (SHARON; LIS, 2004).

1.3 Lectinas de animais

Lectinas animais são conhecidas há mais tempo que as lectinas vegetais, embora os contextos de suas descobertas fossem diferentes e algumas eram descobertas antes de serem identificadas como proteínas que se ligam a carboidratos (KILPATRICK, 2002).

Apesar da primeira atividade hemaglutinante de lectinas ser observada por volta de 1860 no veneno de cobra (KILPATRICK, 2000), mas apenas em 1935 as lectinas animais ganharam notoriedade. Isto se deve a descoberta de uma lectina presente na enguia *Anguilla anguilla*, a qual foi de grande importância no estabelecimento da natureza de carboidratos presentes no sangue humano e para a demonstração de fucose como estrutura imunodominante no grupo sanguíneo O (WATKINS, 2001).

Em 1975, uma lectina encontrada no órgão elétrico da enguia elétrica (TEICHBERG *et al.*, 1975) levou a procura de aglutininas sensíveis a lactose em vários tecidos de vertebrados, o que, em pouco tempo, mostrou que essas proteínas ocorreram universalmente em tecidos de vertebrados (HARRISON, 1991).

As lectinas de animais têm uma grande variedade de funções, e algumas podem ter mais de uma função conhecida, podendo ter papel no sistema imunológico e fora dele. Essas proteínas agem como moléculas de reconhecimento dentro do sistema imunológico, podendo agir de diferentes formas: defesa direta, reconhecimento e tráfico dentro do sistema imunológico, regulação imunológica e prevenção da autoimunidade (KILPATRICK, 2002).

Na defesa direta, várias lectinas encontradas na hemolinfa de invertebrados parecem agir como anticorpos naturais para fornecer a primeira linha de defesa por ligar e neutralizar patógenos, e algumas vezes promovendo a fagocitose por hemócitos. Essas proteínas estão também envolvidas no reconhecimento e migração de células entre o sangue e a linfa no combate aos patógenos. Na modulação imunológica, a eletrolectina da enguia elétrica foi altamente eficaz em prevenir em coelhos, o desenvolvimento de miastenia experimental grave, uma disfunção do sistema imunológico, em coelhos (KILPATRICK, 2002).

A presença de lectinas em animais invertebrados ocorre em quase todos os filos na hemolinfa e fluido celomático (SANTOS *et al.*, 2014). Muitas lectinas já foram isoladas de invertebrados, como insetos (OURTH; NARRA; CHUNG, 2005), moluscos (BANERJEE *et al.*, 2004), crustáceos (YANG *et al.*, 2007), pepinos do mar (GOWDA; GOSWAMI; KHAN, 2008), poliquetas (MOLCHANOVA *et al.*, 2007) e esponjas marinhas (MOURA *et al.*, 2006). Em vertebrados, essas proteínas já foram isoladas de peixes (CARVALHO *et al.*, 2012), cobras (NUNES *et al.*, 2012) e outros animais. Já em humanos, existem lectinas muito bem caracterizadas em diferentes tecidos e células, como os pulmões (KISHORE *et al.*, 2006), soro (BOUWMAN; ROEP; ROOS, 2006) e dendritos (KANAZAWA; TASHIRO; MIYACHI, 2004).

1.4 Lectinas de esponjas

O primeiro relato de lectinas em esponjas foi observado nas espécies *Cliona celata* e *Axinella* sp. em 1968 (DODD; MACLENNAN; HAWKINS, 1968).

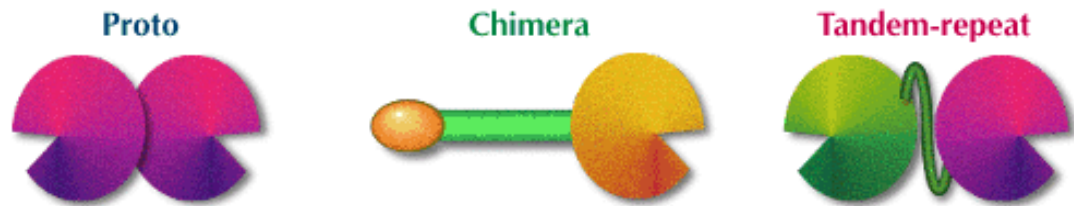
O interesse pelas lectinas de esponja surgiu com o estudo de seus extratos que demonstraram capacidade de aglutinar eritrócitos (DODD; MACLENNAN; ALYOSHKIN, 1968). A classe Demosponge atraiu maiores interesse porque sua biomassa é mais compatível com a purificação de lectinas, se tornando a classe com mais lectinas purificadas (GARDÈRES *et al.*, 2015). Apenas uma lectina da classe Hexactinellida (GUNDACKER *et al.*, 2001). foi estudada e apenas uma lectina foi isolada da classe Calcarea (GARDÈRES *et al.*, 2016).

As lectinas são classificadas em diversas famílias de acordo com sua estrutura primária e sua seletividade de ligação. Em esponjas, lectinas representantes das seguintes famílias: galectinas, lectinas do tipo C e tachylectinas, além de algumas lectinas órfãs já foram identificadas (GARDÈRES *et al.*, 2015).

As galectinas, também chamadas de lectinas do tipo S, são encontradas no reino animal (GARDÈRES *et al.*, 2015) e em fungos (COOPER *et al.*, 1997) e possuem uma seletividade de ligação preferencial para resíduos de galactosídeos. São galectinas as lectinas encontradas nas esponjas *Geodia cydonium*, GCG (WAGNER-HÜLSMANN *et al.*, 1996), *Suberites domuncula* (WIENS *et al.*, 2003), *Halichondria okadai* (KAWSAR *et al.*, 2008) e *Cinachyrella* sp. (FREYMANN *et al.*, 2012). Essa família foi subdividida de acordo com sua arquitetura estrutural, as prototipo, quimera e tandem (Figura 2) (HIRABAYASHI; KASAI, 1993). Os prototipos são dímeros não covalentes, de subunidades idênticas cada uma possuindo

um domínio de reconhecimento a carboidratos. As quimeras têm dois domínios distintos, um domínio não lectina semelhante à colágeno na porção N-terminal e um domínio de reconhecimento a carboidratos na porção C-terminal. As tandem possuem dois domínios de reconhecimento de carboidratos distintos ligados por um peptídeo ligante funcional (GARDÈRES *et al.*, 2015).

Figura 2 – Arquitetura estrutural dos tipos de galectinas.



Fonte: Adaptado de GlycoWord

As galectinas de esponjas diferem das demais galectinas animais porque possuem características estruturais específicas, elas podem criar moléculas complexas na presença de Ca^{2+} , não envolvidos na ligação de carboidratos (MULLER *et al.*, 1997).

As lectinas do tipo C são encontradas em bactérias e animais (GARDÈRES *et al.*, 2015). Esse tipo de lectina é encontrado nas esponjas *Aphrocallites vastus*, AvL (GUNDACKER *et al.*, 2001) e *Lubomirskia baicalensis*, MBL (WIENS *et al.*, 2006). Essa família é um grande grupo com diversas funções. A estrutura dessas lectinas consiste em uma alça dupla característica, estabilizado por duas pontes dissulfeto conservadas localizadas nas bases das alças (ZELENSKY; GREASY 2005).

Tachylectinas possuem seis domínios repetidos, e exibem atividade antimicrobiana contra bactérias, ligando-se a seus carboidratos de membrana (GARDÈRES *et al.*, 2015). Essas lectinas foram encontradas nas esponjas *Suberites domuncula* (SCHRÖDER *et al.*, 2003) e *Ephydatia fluviatilis* (FUNAYAMA *et al.*, 2005).

As lectinas encontradas em esponjas apresentam diversos papéis fisiológicos, como envolvimento na morfogênese e interações celulares, espiculogênese, defesa e comunicação com microrganismos associados (GARDÈRES *et al.*, 2015).

As lectinas por suas propriedades de ligação a carboidratos, demonstraram a capacidade de criar pontes moleculares entre as moléculas e ativar as vias celulares, a fim de

desencadear diferentes respostas celulares (GARDÈRES *et al.*, 2015). As lectinas encontradas na esponja marinha *Axinella polypoides* (ApL I e II) demonstraram estar envolvidas na produção de fibras de espongina (BRETTEING *et al.*, 1983). Essas lectinas também provaram fazer parte das interações célula-célula da esponja, como observado na galectina de *Geodia cydonium*, GCG, que estava envolvido em um sistema complexo ligando as células da esponja através de um fator de agregação (CONRAD *et al.*, 1981).

Em alguns casos, as lectinas mostraram estar envolvidas na formação de espículas nas esponjas, conforme relatado para *Suberites domuncula*, onde a galectina dessa esponja foi detectada no canal axial e na superfície das espículas, interagindo diretamente com a silicateína através de sua região C-terminal, aumentando a atividade da enzima (SCHRÖDER *et al.*, 2006).

Devido à atividade antimicrobiana e atividades citotóxicas contra parasitas, algumas lectinas demonstraram estar diretamente relacionadas com a defesa da esponja, como constatada em *Suberites domuncula*, que mostrou uma atividade contra bactérias Gram negativas (SCHRÖDER *et al.*, 2003). A lectina presente na *Cinachyrella apion* exibiu atividade de aglutinação para *Leishmania chagasi* (MEDEIROS *et al.*, 2010), enquanto *Axinella corrugata* possui uma lectina que mostrou atividade citotóxica para náuplios de artêmias e *Artemia salina* (DRESCH *et al.*, 2012).

As esponjas também são descritas como holobiontes que convivem com uma comunidade microbiana estável e permanente (HENTSCHEL *et al.*, 2006). Além disso, as esponjas também são capazes de discriminar entre as bactérias que são fagocitadas para nutrição, e as bactérias que resistem à digestão (WEHRL; STEINERT; HENTSCHEL, 2007). A lectina de *Halichondria panicea* estimulou a proliferação *in vitro* da bactéria associada *Pseudomonas insolita* enquanto nenhuma atividade proliferativa foi demonstrada para as outras bactérias comensais isoladas (MÜLLER *et al.*, 1981).

Além dos papéis fisiológicos, a atividade aglutinante dessas proteínas destacaram seus potenciais biotecnológicos, como modulação da imunidade de mamíferos, combate contra patógenos humanos e de outros mamíferos, detecção e destruição de câncer, e modulação da atividade neuronal (GARDÈRES *et al.*, 2015).

Lectinas de esponja exibiram atividades mitogênicas em células imunes como observado na lectina da esponja *Axinella corrugata* (DRESCH *et al.*, 2012). A lectina da esponja *Craniella australiensis* mostrou estimulação da divisão celular de linfócitos humanos (XIONG *et*

al., 2006). Apesar da falta de células imunológicas especializadas em esponjas, suas lectinas são capazes de atuar em células de vertebrados como moléculas imunomoduladoras e parecem estar funcionalmente relacionadas a galectinas de vertebrados. Esta última propriedade pode ser usada contra doenças que desencadeiam o esgotamento do sistema imunológico (GARDÈRES *et al.*, 2015).

Como lectinas possuem a capacidade de reconhecer resíduos específicos de açúcar, algumas lectinas de esponja podem se ligar a carboidratos específicos das paredes celulares de microrganismos e, dessa maneira, exibem atividades antimicrobianas (GARDÈRES *et al.*, 2015). A lectina de *Cliona varians* mostrou atividade antibacteriana contra as bactérias Gram positivas *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (MOURA *et al.*, 2006). Esta capacidade antibacteriana poderia ser usada para desenvolver antibióticos contra infecções bacterianas resistentes (GARDÈRES *et al.*, 2015).

Algumas lectinas de esponja também apresentaram efeitos citotóxicos nas células de câncer. A atividade citotóxica da lectina presente na esponja *Haliclona cratera* foi estudada em células de câncer do colo do útero e melanoma humano. As maiores concentrações da lectina levaram a uma diminuição de 50% na sobrevivência das células cancerígenas. (PAJIC *et al.*, 2002). Dessa forma, as lectinas de esponja demonstraram atuar sobre as linhagens celulares de câncer através da inibição da proliferação celular. A especificidade destas lectinas em reconhecer células tumorais pode ser utilizada para discriminar células cancerígenas de células normais, uma vez que os carboidratos de membrana são diferentes em células tumorais (GARDÈRES *et al.*, 2015).

Essas proteínas também podem atuar sobre o sistema nervoso de vertebrados, como observado com as galectinas presentes na esponja *Cinachyrella* sp (UEDA *et al.*, 2013).

1.5 Lectinas do gênero *Chondrilla*

Até o presente trabalho, apenas duas lectinas foram isoladas do gênero *Chondrilla*. A lectina CN foi isolada da esponja marinha *Chondrilla nucula*, a qual apresentou ação mitogênica, sobre linfócitos. Além disso, foi constatada a capacidade de retardar a liberação do vírus HIV, pois células tratadas com a lectina CN exibiram uma menor capacidade de liberar partículas virais (SCHRÖDER *et al.*, 1990).

A outra lectina do gênero foi isolada da esponja marinha *Chondrilla caribensis*. A lectina denominada CCL aglutinou cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*, mostrando um potencial contra a formação de biofilme bacteriano (MARQUES *et al.*, 2017).

O presente trabalho teve como objetivo principal purificar e caracterizar bioquimicamente uma nova lectina presente na esponja marinha *Chondrilla caribensis*.

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta da esponja

Espécimes da esponja marinha *Chondrilla caribensis* foram coletados na região entre marés na praia da Pedra Rachada localizada no município de Paracuru, litoral oeste do Ceará. A coleta do material foi autorizada e regulada pelos órgãos ambientais competentes (SISBIO ID: 33913-8). Após a coleta dos exemplares, os mesmos foram transportados dentro de sacos plásticos em caixas térmicas até o laboratório e armazenados a -20°C.

2.2 Preparação do extrato proteico

Os exemplares foram lavados, liofilizados, triturados e o pó obtido foi embebido em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM e CaCl₂ 20 mM (TBS/Ca²⁺), na proporção de 1:10 (p/v). O extrato foi agitado por uma hora a 25°C, filtrado em um tecido para retenção de partículas grandes, e posteriormente centrifugado a 8000 x g, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi armazenado a -20°C para posterior utilização.

2.3 Teste de hemaglutinação

Para os testes de hemaglutinação foram utilizados eritrócitos humanos do sistema ABO, obtidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE). Os testes foram realizados com eritrócitos humanos tratados e não tratados com as enzimas proteolíticas tripsina e pronase, seguindo o método da dupla diluição seriada, em placas de microtitulação de fundo em V, segundo a metodologia previamente descrita (SAMPAIO *et al.*, 2002).

2.4 Testes de inibição da atividade hemaglutinante

Para a inibição da atividade hemaglutinante foram utilizados carboidratos e glicoproteínas, segundo a metodologia previamente estabelecida (SAMPAIO *et al.*, 2002).

O extrato foi submetido a um teste de inibição da atividade hemaglutinante, para que a especificidade da proteína alvo fosse determinada e posteriormente, o teste foi realizado novamente com a lectina purificada para que fosse determinada a mínima concentração de carboidratos capaz de inibir a aglutinação de eritrócitos (CMI – Concentração Mínima Inibitória).

Os carboidratos utilizados foram: D-xilose, D-ribose, L-fucose, L-arabinose, L-ramnose, D-galactose (Gal), D-manose, D-glicose (Glc), D-glucosamina, D-galactosamina, *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), *N*-acetil-D-galactosamina (GalNAc), ácido D-galacturônico, D-frutose, D-sacarose, D-melibiose, α -D-lactose, β -D-lactose, D-lactulose, D-maltose, D-rafinose, metil- α -D-galactopiranosídeo, metil- β -D-galactopiranosídeo, metil- β -D-tiogalactose, fenil- β -D-galactopiranosídeo, 4-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo, 4-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo, 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo, 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo, e as glicoproteínas fetuína, mucina de estômago de porco tipo 2 (PSM-II) e mucina de estômago de porco tipo 3 (PSM-III).

2.5 Isolamento da lectina

O estudo foi autorizado e regulado pelos órgãos competentes (SISGEN ID: ACC97AD).

O extrato bruto foi à cromatografia de afinidade em matriz de Sepharose™ (1,5 cm x 2,2 cm) previamente equilibrada com TBS/Ca²⁺. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio e as frações não retidas (P1S), com valores de absorbância superiores a 0,1, foram coletadas.

A fração P1S foi acrescida de sulfato de amônio numa concentração final de 1M, o pH foi ajustado para 6,0 e P1S foi submetida à cromatografia de interação hidrofóbica em matriz de fenil-Sepharose (2,5 cm x 2,2 cm). A coluna foi previamente equilibrada com citrato de sódio 50 mM, pH 6,0, contendo sulfato de amônio 1 M. A amostra foi aplicada e a coluna lavada com o tampão de equilíbrio, novamente as frações não retidas (P1F) que apresentaram valores de absorbância superiores a 0,1 foram coletados.

A fração P1F foi dialisada e submetida à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharcel (2,0 cm x 2,2 cm), equilibrada com Tris 50 mM, pH 8,0 e após a aplicação da

amostra, a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio. As frações eluídas (P2D) com Tris 50 mM, pH 8,0, contendo NaCl 200 mM, com valores superiores a 0,05 na absorbância de 280 nm foram coletados.

A fração PD2 foi dialisada, liofilizada e submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephacryl S-200 HR (60 cm x 1,6 cm) equilibrada com tampão fosfato 20 mM, pH 7,0, contendo 100 mM de NaCl.

2.6 Avaliação da pureza da lectina

O grau de pureza da proteína foi avaliado através de eletroforese em gel de poli(acrilamida/dodecil sulfato de sódio) (SDS-PAGE), na ausência e na presença de β -mercaptoetanol, corado com Coomassie Brilliant Blue (LAEMMLI, 1970). O gel de 15% foi submetido a uma corrente elétrica de 25 mA e tensão de 150 V durante 1 h.

2.7 Estimativa de massa molecular

A massa molecular da lectina foi estimada por SDS-PAGE, por meio da comparação da migração da proteína no gel com a migração dos marcadores moleculares da SigmaMarkerTM de massa molecular correspondente a aprotinina bovina (6,5 kDa), α -lactalbumina bovina (14,2 kDa), inibidor de tripsina de soja (20 kDa), tripsinogênio bovino (24 kDa), anidrase carbônica bovina (29 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, coelho (36 kDa), ovalbumina, galinha (45 kDa), albumina bovina (66 kDa).

A massa molecular nativa da lectina foi estimada também por cromatografia de exclusão em uma coluna BioSuite HR 250, 5 μ m acoplada ao sistema H-Class Bio UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography, Waters Corp.), utilizando as proteínas de massa molecular conhecida tiroglobulina bovina (669 kDa), apoferritina, 443 (kDa), β -amilase (220 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e lisozima (14 kDa) como padrão de eluição.

2.8 Caracterização da lectina

A estabilidade térmica da lectina foi avaliada, utilizando amostras da proteína (1 mg.mL^{-1}) aquecidas por 1 hora em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C) e posteriormente submetidas a testes de atividade hemaglutinante (SAMPAIO *et al.*, 1998).

O efeito de íons divalentes na atividade hemaglutinante foi avaliado através da presença de CaCl_2 e EDTA durante os testes de atividade hemaglutinante (SAMPAIO *et al.*, 1998).

Para avaliar a estabilidade da proteína frente a variações de pH, a lectina (1 mg.mL^{-1}) foi solubilizada em NaCl 0,15 M e diluída em tampões de diferentes pH (acetado de sódio 100 mM, pH 4 e pH 5, fosfato de sódio 100 mM, pH 6, tris 100 mM, pH 7 e pH 8, glicina 100 mM, pH 9 e pH 10, todos contendo NaCl 0,15 M), sendo em seguida determinada a atividade hemaglutinante (SAMPAIO *et al.*, 1998).

3. RESULTADOS

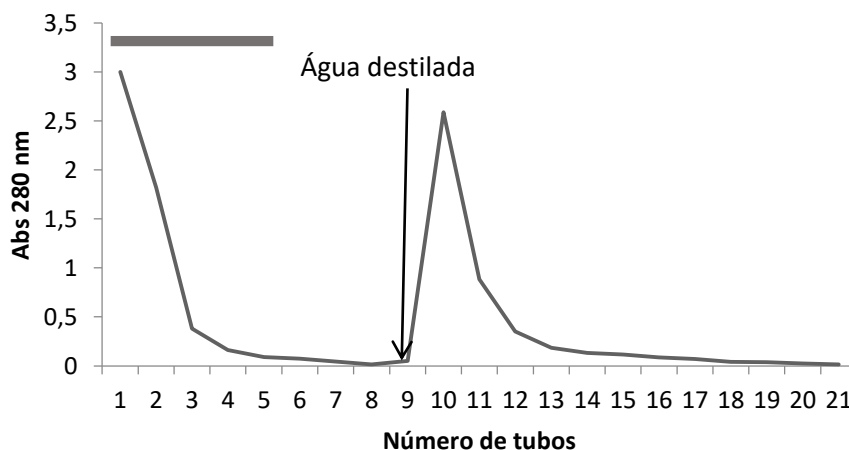
3.1 Purificação da lectina

Uma nova lectina presente na esponja marinha *Chondilla caribensis*, denominada CCL II (*Chondrilla caribensis* lectin II), foi isolada por meio das cromatografias de afinidade, interação hidrofóbica, troca iônica e exclusão molecular.

O extrato bruto foi submetido à cromatografia de afinidade em matriz de Sepharose™ (Figura 3) e as frações monitoradas a 280 nm e através da determinação da atividade hemaglutinante. As frações não retidas, correspondente ao pico não retido (PIS), apresentando atividade hemaglutinante foram agrupadas e utilizadas para etapas posteriores. A atividade hemaglutinante relativa ao pico retido, eluído com adição de lactose 0,3 M, corresponde a lectina já isolada e caracterizada, denominada CCL (MARQUES *et al.*, 2017).

A segunda etapa de purificação foi realizada através de cromatografia de interação hidrofóbica em matriz de fenil-Sepharose (Figura 4), as frações não retidas (PIF) apresentaram forte atividade hemaglutinante, sendo assim coletadas e armazenadas para o terceiro passo de purificação. O pico retido, eluído com água destilada, corresponde aos pigmentos do extrato.

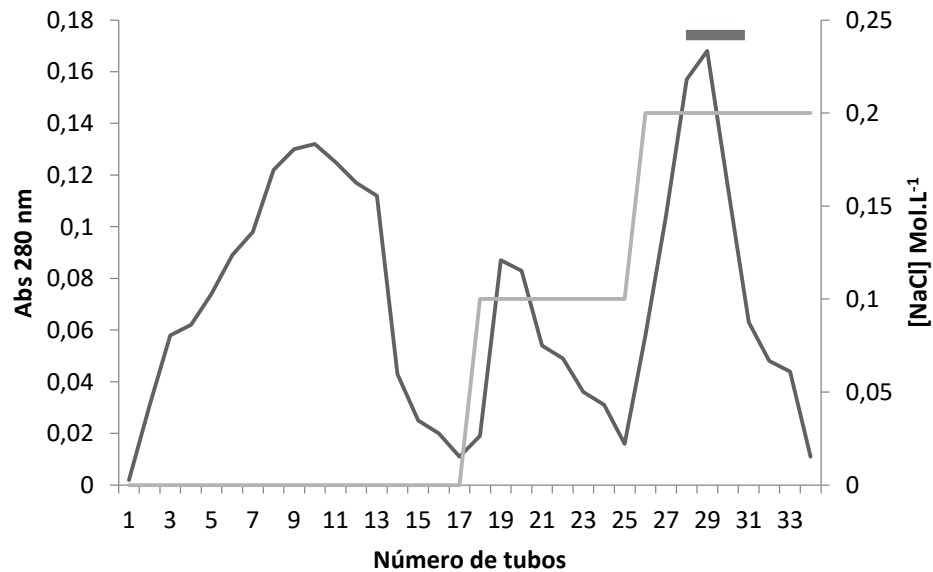
Figura 3 – Cromatografia de interação hidrofóbica em matriz de fenil-Sepharose



Fonte: Autora. A coluna (2,5 cm x 2,2 cm) foi equilibrada e lavada com tampão citrato de sódio 50 mM, pH 6,0, contendo sulfato de amônio 1 M. As frações retidas foram eluídas com água destilada, conforme indicado pela seta. A cromatografia foi conduzida em fluxo de 2 mL.min⁻¹ e frações de 2,5 mL foram coletadas. A barra horizontal indica as frações contidas nos tubos 1 a 5 que foram armazenadas.

A terceira fase de purificação foi realizada através da cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel (Figura 5), as frações eluídas com a adição de 200mM de NaCl apresentaram forte atividade hemaglutinante e seguiram para a próxima etapa de purificação.

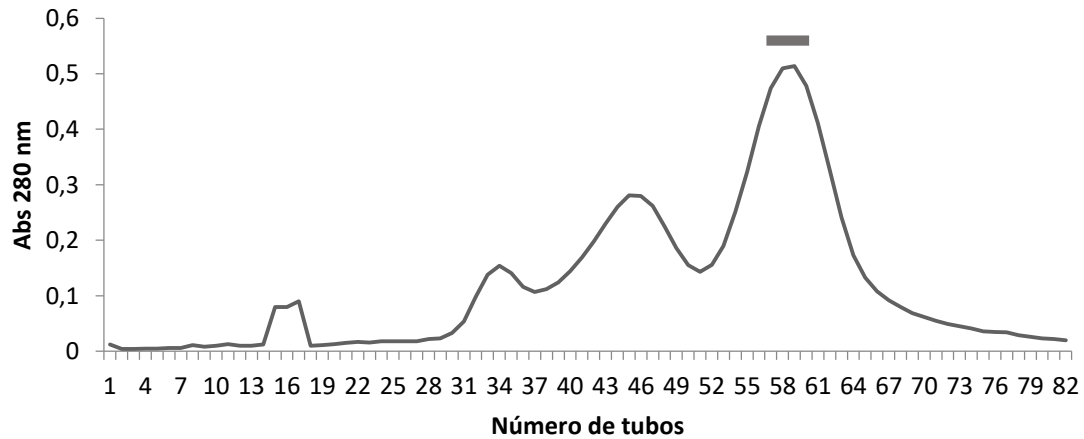
Figura 4 - Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel



Fonte: Autora. A coluna (2,0 cm x 2,2 cm) foi equilibrada e lavada com Tris 50 mM, pH 8,0. As frações retidas foram eluídas com Tris 50mM contendo NaCl 200 mM, pH 8,0, conforme indicado no eixo secundário. A cromatografia foi conduzida com fluxo de 2 mL.min⁻¹, e as frações de 2,5 mL foram coletadas. A barra horizontal indica as frações contidas nos tubos 27 ao 30 que foram armazenadas.

A purificação foi concluída com a cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephacryl S-200 HR (Figura 6), onde a proteína foi eluída com o mesmo tampão de equilíbrio, apresentando forte atividade hemaglutinante nas frações correspondentes ao terceiro pico.

Figura 5 - Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephacryl S-200 HR



Fonte: Autora. A coluna (60 cm x 1,6 cm) foi equilibrada e lavada com fosfato 20 mM, pH 7,0, contendo 100 mM de NaCl. As frações retidas foram eluídas com o mesmo tampão. A cromatografia foi conduzida com fluxo de 1 mL.min⁻¹, e as frações de 2,0 mL foram coletadas. A barra horizontal indica as frações contidas nos tubos 57 ao 63 que foram armazenadas.

3.2 Atividade hemaglutinante

O extrato bruto da esponja marinha *Chondrilla caribensis* apresentou atividade hemaglutinante contra eritrócitos humanos do sistema ABO, nativos e tratados com enzimas proteolíticas.

A lectina purificada (CCL II) também mostrou padrão de aglutinação semelhante ao extrato bruto, aglutinando igualmente todos os eritrócitos humanos testados, nativos e tratados com as enzimas pronase e tripsina. (Tabela 1).

Tabela 1: Atividade hemaglutinante da CCL II com eritrócitos nativos e tratados com enzimas proteolíticas (U.H./mL)

Eritrócitos	Nativo	Pronase	Tripsina
A	256	256	256
B	256	256	256
O	256	256	256

Fonte: Autora

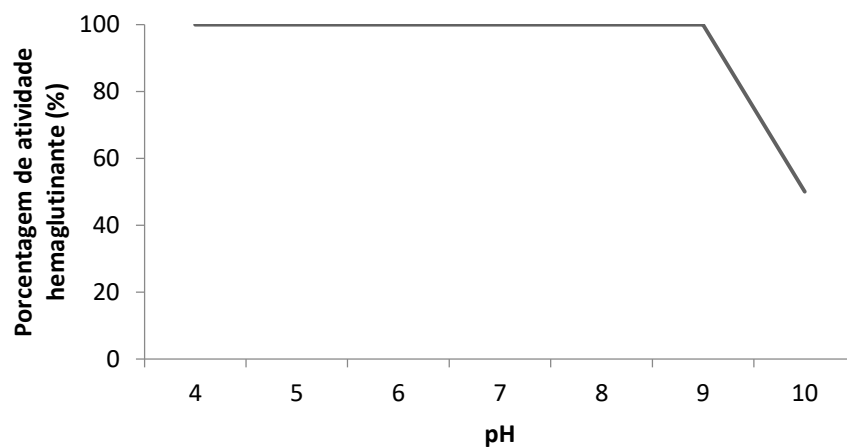
3.3 Inibição da atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante da CCL II foi inibida apenas por fetuína, em uma concentração inibitória mínima (CIM) de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.4 Caracterização físico química

A atividade hemaglutinante da CCL II foi estável entre pH 4 e 9, em pH 10 houve redução de 50% da sua atividade (Figura 7).

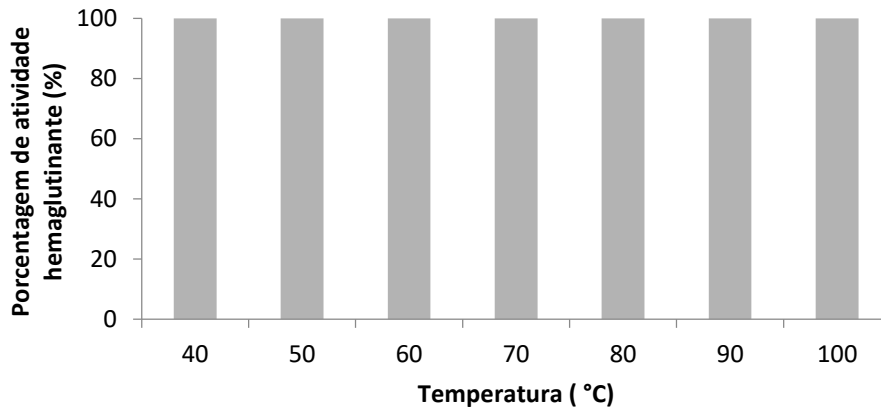
Figura 6 – Efeito do pH na atividade hemaglutinante



Fonte: Autora.

A atividade hemaglutinante de CCL II manteve-se estável até 100°C .(Figura 8).

Figura 7 – Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante



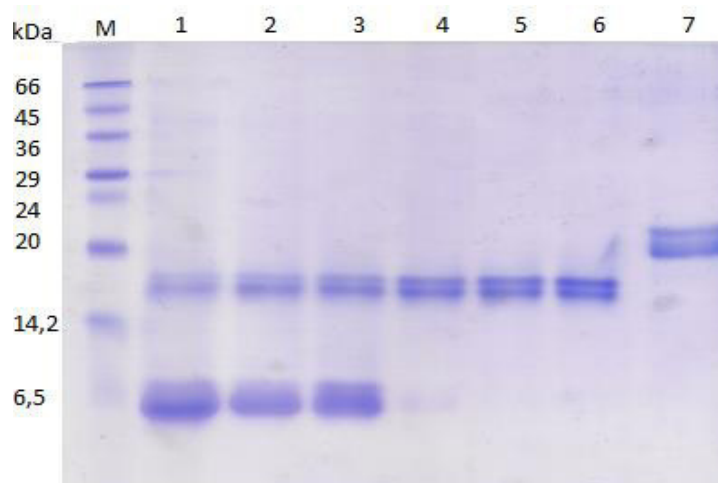
Fonte: Autora.

A atividade hemaglutinante da CCL II não apresentou alteração na presença e ausência de EDTA.

3.5 Estimativa da massa molecular em SDS-PAGE (dodecil-sulfato de sódio)

Em SDS PAGE, CCL II apresentou duas bandas de aproximadamente 15 kDa e 14 kDa na ausência de 2-mercaptoetanol e duas bandas de aproximadamente 20 kDa e 18 kDa na presença de 2-mercaptoetanol (Figura 9).

Figura 8 - SDS-PAGE da cromatografia de exclusão molecular

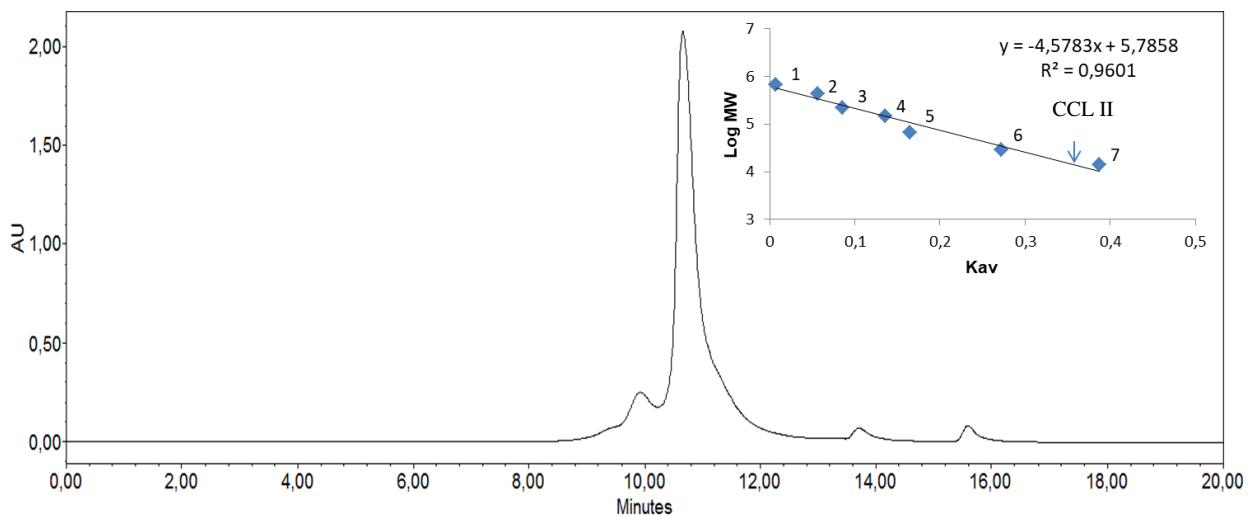


Fonte: Autora. Marcador molecular (M), Fração 57 (1), Fração 58 (2), Fração 59 (3), Fração 60 (4), Fração 61 (5) Fração 62 em condições não redutoras (6), Fração 62 em condições redutoras (7).

3.6 Estimativa da massa molecular nativa

Na cromatografia de exclusão molecular em coluna BioSuite HR 250 (5 μm) acoplada ao sistema H-Class Bio UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography, Waters Corp.), CCL II apresentou um único pico com massa molecular de aproximadamente 18 kDa (Figura 10).

Figura 9 – Estimativa da massa molecular nativa por cromatografia de exclusão molecular



Fonte: Autora. A: Cromatograma da exclusão molecular em BioSuite HR 250, equilibrada com Tris 20 mM, pH 7,0, contendo 100 mM de NaCl. B: A linha representa a curva de regressão linear calculada pelos valores das proteínas padrões: Tiroglobulina bovina, 669 kDa (1), Apoferritina, 443 kDa (2), β -amilase, 220 kDa (3), Álcool desidrogenase, 150 kDa (4), Albumina sérica bovina, 66 kDa (5), Anidrase carbônica, 29 kDa (6) e Lisozima, 14 kDa (7).

4. DISCUSSÃO

As esponjas marinhas são fontes ricas de potentes produtos naturais (SAGAR; KAUR; MINNEMAN, 2010). Mais de 5.300 compostos naturais diferentes foram descobertos de esponjas marinhas e seus microorganismos associados, e cada vez mais, outras centenas de compostos vêm sendo constatados (FAULKNER, 2001).

A diversidade de produtos encontrada em esponjas marinhas é notável: nucleosídeos incomuns, terpenos bioativos, esteróis, peptídeos cíclicos, alcalóides, ácidos graxos, peróxidos e derivados de aminoácidos (SIPKEMA *et al.*, 2005).

Devido à capacidade de sintetizar essas moléculas com diversos papéis na defesa, comunicação ou adaptação ao meio ambiente, as esponjas apareceram como uma fonte de moléculas com grande potencial biomédico (KIM; DEWAPRIYA, 2012). Hoje, as esponjas são amplamente estudadas e várias moléculas são isoladas desses animais, dentre elas, as lectinas.

No presente trabalho, uma nova lectina da esponja marinha *Chondrilla caribensis*, denominada CCL II, foi purificada e caracterizada. CCL II foi purificada por meio da combinação de quatro tipos de cromatografias, afinidade, interação hidrofóbica, troca iônica e exclusão molecular.

Na maioria dos trabalhos de isolamento de lectinas de esponjas, a primeira etapa de purificação envolve cromatografia de afinidade de acordo com a especificidade de carboidratos da lectina (UEDA *et al.*, 2013; KAWSAR *et al.*, 2008). A cromatografia de afinidade é a técnica mais empregada para a purificação de lectinas, visto que a ligação específica entre a lectina e a matriz torna esta cromatografia a mais eficiente para purificações em um único passo. CCL (*Chondrilla caribensis* lectin) foi isolada apenas com essa técnica (MARQUES *et al.*, 2017).

Devido à forte afinidade das lectinas de esponja pelos resíduos de galactosídeos, matrizes de Sepharose ou matrizes conjugadas de lactose são frequentemente utilizadas (KAWSAR *et al.*, 2008), como na purificação das lectinas encontradas nas esponjas *Pellina semitubulosa* (ENGEL *et al.*, 1992), *Chondrilla nucula* (SCHRÖDER *et al.*, 1990), e *Cliona varians* (MOURA *et al.*, 2006).

Em muitos casos, o primeiro passo de purificação é seguido pela cromatografia de filtração em gel, para separar as possíveis outras lectinas presentes de diferentes massas moleculares, como no caso das lectinas isoladas da esponja *Axinella corrugata*, ACL-I e ACL-II

(DRESCH *et al.*, 2012), *Cinachyrella apion* (MEDEIROS *et al.*, 2010) e *Stylissa flexibilis* (HUNG *et al.*, 2018).

Em outros casos a combinação de cromatografias de interação hidrofóbica com troca iônica demonstrou ser bastante útil para a purificação de lectinas de organismos marinhos. As lectinas das esponjas marinhas *Haliclona caerulea*, H-3 (CARNEIRO *et al.*, 2013a) e *Haliclona manglaris* (CARNEIRO *et al.*, 2015) foram isoladas utilizando essas técnicas. A combinação de troca iônica e afinidade também apresentou êxito em estudos com as lectinas isoladas da esponja *Haliclona caerulea*, H-1 e H-2 (CARNEIRO *et al.*, 2013b).

CCL II aglutinou todos os eritrócitos humanos testados, tratados e não tratados com a mesma intensidade de aglutinação, diferentemente da CCL (MARQUES *et al.*, 2017).

O tratamento de eritrócitos com enzimas proteolíticas é um procedimento padrão que expõe resíduos de carboidratos inicialmente inacessíveis, sendo assim muitas lectinas apresentam maior especificidade por hemácias tratadas (SAMPAIO; ROGERS; BARWELL, 1998). Vale ressaltar que as enzimas clivam as proteínas que podem impedir a ligação das lectinas aos carboidratos presentes na superfície celular da hémácia (NAGANO *et al.*, 2002), porém durante a clivagem pode ocorrer a perda de algum carboidrato ligado à proteína clivada e assim diminuir a aglutinação da lectina em estudo.

A atividade hemaglutinante de CCL II foi inibida apenas pela glicoproteína fetuína. Diferentemente, a CCL mostrou ser inibida além da fetuína, pelos dissacarídeos lactose e lactulose (MARQUES *et al.*, 2017). Em geral, as lectinas de esponjas têm mostrado ser inibidas preferencialmente por galactose e seus derivativos, como pode ser evidenciado na lectina CN, que apresentou inibição por lactose, galactose e GalNAc (SCHRÖDER *et al.*, 1990).

Similarmente a CCL II, uma lectina isolada de *Axinella corrugata* (ACL-II) também foi inibida por fetuína e por outros carboidratos (DRESCH *et al.*, 2012), assim como ALL (MIARONS; FRESNO, 2000). De forma semelhante a CCL II, as lectinas CAL, *Craniella australiensis* lectina, H-1 e H-2 de *Haliclona caerulea* (XIONG *et al.*, 2006; CARNEIRO *et al.*, 2013b) não foram inibidas por quaisquer dos monossacarídeos e dissacarídeos testado.

Estudos com CAL e HcL (*Haliclona cratera* lectin), demonstraram que estas lectinas reconhecem os carboidratos presentes nos glicoconjugados da mucina (XIONG *et al.*, 2006; PAJIC *et al.*, 2002).

CCL II mostrou ser resistente em uma ampla faixa de temperaturas e sua capacidade de aglutinar eritrócitos foi evidenciada em até 100°C após 1 hora. Semelhante comportamento foi evidenciado também lectina CN (SCHRÖDER *et al.*, 1990).

Essa capacidade da CCL II de resistir a temperaturas elevadas difere marcadamente da CCL que apresentou perda total da atividade hemaglutinante a 100°C por 1 hora (MARQUES *et al.*, 2017). Muitas lectinas presentes em esponjas marinhas possuem a característica de permanecerem ativas em altas temperaturas (GOMES FILHO *et al.*, 2014), como observada na lectina de *Cinachyrella alloclada* que perde a atividade hemaglutinante somente após aquecimento a 100°C, por 10 minutos (ATTA *et al.*, 1989), ACL-II cuja atividade hemaglutinante apenas é completamente perdida a 100°C (DRESCH *et al.*, 2012) e a lectina da esponja *Haliclona cratera* que manteve sua atividade a 95°C, sendo completamente desnaturada apenas após 60 minutos (PAJIC *et al.*, 2002).

Essa elevada estabilidade térmica foi observada na CCL, onde a lectina foi parcialmente desnaturada em 95°C e com o resfriamento, ocorreu a recuperação parcial da estrutura (MARQUES *et al.*, 2017), o mesmo poderia ocorrer com a CCL II, explicando sua estabilidade em elevadas temperaturas.

A atividade hemaglutinante da CCL II foi estável entre pH 4 e 9. Em pH 10 houve redução de 50%, semelhante ao observado com as lectinas CCL e H-1, que demonstraram melhor atividade na faixa alcalina, em pH 9 (MARQUES *et al.*, 2017; CARNEIRO *et al.*, 2013b). De fato, algumas lectinas de esponja apresentam uma maior estabilidade nessa faixa, como as lectinas ACL-1 e ACL-II da esponja *Axinella corrugata* e CN, que são estáveis até o pH 11 (DRESCH *et al.*, 2012; SCHRÖDER *et al.*, 1990) e a lectina da *Haliclona cratera* que é estável até o pH 10 (PAJIC *et al.*, 2002). Esse comportamento de estabilidade frente a valores de pH na faixa alcalina, observado na maioria das lectinas isoladas de esponjas, pode estar relacionado com o fato da água do mar ser levemente básica.

CCL II mostrou não ser dependente de cátions divalentes, pois o EDTA mostrou ser incapaz de inibir a atividade hemaglutinante, fato também observado como as lectinas isoladas das esponjas marinhas *Chondrilla caribensis* (MARQUES *et al.*, 2017), *Axinella corrugata* (DRESCH *et al.*, 2012), *Craniella australienses* (XIONG *et al.*, 2006), *Haliclona cratera* (PAJIC *et al.*, 2002) e *Haliclona caerulea* (CARNEIRO *et al.*, 2013b). Em geral, a maioria das lectinas

isoladas de esponjas marinhas apresentam atividades independentes de cátions divalentes (GARDÈRES *et al.*, 2015).

Em SDS-PAGE, CCL II demonstrou ser uma proteína heterogênea, possuindo duas bandas com massas moleculares estimadas de 15 kDa e 14 kDa em condições não redutoras, e duas bandas de massas estimadas de 20 kDa e 18 kDa em condições redutoras. Essa diferença observada de valores de massa molecular entre condições redutoras e não redutoras, poderia indicar a presença de pontes dissulfetos na molécula protéica, como foi observado na lectina de *Craniella australiensis* (XIONG *et al.*, 2006). Valores superiores de massa molecular observados em condições redutoras pode ser devido a presença de dissulfetos intramoleculares na lectina (HORI; MATSUBARA; MIYAZAWA, 2000). Na forma não reduzida, a lectina se encontra bem enovelada e compactada, porém quando o 2-mercaptoetanol é adicionado, as pontes sulfeto são quebradas e a proteína se expande, ocupando uma área maior e dificultando sua penetração no gel. Outro indicio da presença dessas ligações é que ligações dissulfetos internas são importantes na estabilização da estrutura da proteína, conferindo assim, a elevada estabilidade térmica e de pH (CARNEIRO *et al.*, 2013a). Podemos também relatar que a migração da proteína em SDS-PAGE é influenciada pela hidrodinâmica e compactação da molécula, assim a presença de ligações dissulfeto pode levar a uma maior compactação, levando a uma migração mais rápida em SDS-PAGE (CARNEIRO *et al.*, 2013a).

Diferentemente da CCL II, CCL não apresentou diferenças de migração entre a forma reduzida e não reduzida, apresentando apenas uma banda de aproximadamente 17 kDa em ambas condições (MARQUES *et al.*, 2017), assim como a lectina CN que apresentou uma única banda de aproximadamente 15.600 Da (SCHRÖDER *et al.*, 1990). Já H-3 isolada da esponja *Haliclona caerulea*, apresentou três bandas na ausência e presença de 2-mercaptoetanol, de 18, 16 e 9 kDa (CARNEIRO *et al.*, 2013a). A lectina da esponja *Axinella polypoides* também apresentou padrão heterogêneo com duas bandas de 15 kDa e 21 kDa em SDS-PAGE (BRETTEING; KABAT, 1976), padrão semelhante a CCL II.

O valor da massa molecular encontrado através de cromatografia de exclusão molecular indica que CCL II é uma proteína homogênea, exibindo um único pico simétrico, com massa estimada de 18 kDa. Esse comportamento de apresentar característica homogênea por exclusão molecular e heterogênea por SDS-PAGE, também foi observado com a lectina H-3 (CARNEIRO *et al.*, 2013a).

As lectinas de esponjas podem possuir vários arranjos estruturais, podendo ser monoméricas (KAWAGISHI *et al.*, 1994), diméricas (CARNEIRO *et al.*, 2013b), triméricas (XIONG *et al.*, 2006), tetraméricas (MARQUES *et al.*, 2017) e multiméricas (MEDEIROS *et al.*, 2010).

Estudos posteriores deverão ser realizados para observar as possíveis aplicações biológicas da CCL II, já que lectinas de esponjas marinhas têm sido evidenciadas como importantes moléculas com potencial biotecnológico.

5. CONCLUSÃO

Uma nova lectina presente na esponja marinha *Chondrilla caribensis* (CCL II) foi purificada pela combinação das cromatografias de afinidade, interação hidrofóbica, troca iônica e exclusão molecular. A lectina possui elevada estabilidade térmica, sendo inibida apenas pela glicoproteína fetuina, exibindo massa molecular nativa de 18 kDa e em SDS-PAGE duas bandas de 14 kDa e 15 kDa em condições não redutoras e de 18 kDa e 20 kDa em condições redutoras.

REFERÊNCIAS

- ATTA, A. M.; BARRAL-NETTO, M.; PEIXINHO, S.; SOUSA-ATTA, M.L. Isolation and functional characterization of a mitogenic lectin from the marine sponge *Cinachyrella alloclada*. **Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 22, n. 3, p. 379-385, 1989.
- AUB, J.C.; TIESLAU, C.; LANKESTER, A. Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes, I. Wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 50, n. 4, p. 613-619, 1963.
- AUB, J.C.; SANFORD, B.H.; COTE, M.N. Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 54, p. 396-399, 1965.
- BANERJEE, S.; CHAKI, S.; BHOWAL, J.; CHATTERJEE, B.P. Mucin binding mitogenic lectin from freshwater Indian gastropod *Belamyia bengalensis*: purification and molecular characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 421, n. 1, p. 125-134, 2004.
- BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v. 22, p. 15-61, 2005.
- BOUWMAN, L. H.; ROEP, B.O.; ROOS, A. Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity. **Human immunology**, v. 67, n. 4-5, p. 247-256, 2006.
- BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, p. 419, 1954.
- BRETTING, H.; KABAT, E.A. Purification and characterization of the agglutinins from the sponge *Axinella polypoides* and a study of their combining sites. **Biochemistry**, v. 15, n. 15, p. 3228-3236, 1976.
- BRETTING, H.; JACOBS, G.; DONADEY, C.; VACELET, J. Immunohistochemical studies on the distribution and the function of the D-galactose-specific lectins in the sponge *Axinella polypoides* (Schmidt). **Cell and tissue research**, v. 229, n. 3, p. 551-571, 1983.
- BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrates**. 2. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2007.
- CARNEIRO, R.F.; MELO, A.A.; ALMEIDA, A.S.; MOURA, R.M.; CHAVES R.P.; SOUSA, B.L.; NASCIMENTO, K.S.; SAMPAIO, S.S.; LIMA, J.P.M.S.; CAVADA, B.S.; NAGANO C.S.; SAMPAIO, A.H. H-3, a new lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*: Purification and mass spectrometric characterization. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, n. 12, p. 2864-2873, 2013a.
- CARNEIRO, R.F.; DE MELO, A.A.; NASCIMENTO, F.E.; SIMPLICIO, C.A.; NASCIMENTO, K.S.; ROCHA, B.A.; SAKER-SAMPAIO, S.; MOURA RDA, 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, n. 1, p. 51-58, 2013b.

CARNEIRO, R.F.; ALMEIDA, A.S.; MELO, A.A.; ALENCAR, D.B.; SOUSA, O.V.; DELATORRE, P.; NASCIMENTO, K.S.; SAMPAIO, S.S.; CAVADA, B.S.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H. A chromophore-containing agglutinin from *Haliclona manglaris*: Purification and biochemical characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 1368-1375, 2015.

CARVALHO, E.V.M.M.; BEZERRA, R.F.; BEZERRA, R.S.; ARAÚJO, J.M.; SANTOS, A.J.G.; CORREIA, M T.S.; COELHO, L.C.B.B. Detection of the first lectin with antimicrobial activity present in serum of the Amazonian fish tambaqui *Colossoma macropomum*. **Fisheries science**, v. 78, n. 4, p. 879-887, 2012.

CONRAD, J.; ZAHN, R.K.; KURELEC, B.; UHLENBRUCK, G.; MÜLLER, W.E.G. Aggregation of sponge cells: Immunological characterization of the species-specific geodia aggregation factor. **Journal of supramolecular structure and cellular biochemistry**, v. 17, n. 1, p. 1-9, 1981.

COOPER, D.N.W.; BOULIANNE, R.P.; CHARLTON, ST.; FARRELL, E.M.; SUCHER, A.; LU, B.C. Fungal galectins, sequence and specificity of two isolectins from *Coprinus cinereus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 3, p. 1514-1521, 1997.

DODD, R.Y.; MACLENNAN, A.P.; HAWKINS, D.C. Haemagglutinins from marine sponges. **Vox Sanguinis**, v. 15, n. 5, p. 386-391, 1968.

DRESCH, R.R.; LERNER, C.B.; MOTHE, B.; TRINDADE, V.M.; HENRIQUES, A.T.; VOZÁRI-HAMPE, M.M. Biological activities of ACL-I and physicochemical properties of ACL-II, lectins isolated from the marine sponge *Axinella corrugata*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 161, n. 4, p. 365-370, 2012.

ENGEL, M.; BACHMANN, M.; SCHRÖDER, H.C.; RINKEVICH, B.; KLJAJIC, Z.; UHLENBRUCK, G.; MÜLLER, W.E.G. A novel galactose- and arabinose-specific lectin from the sponge *Pellina semitubulosa*: isolation, characterization and immunobiological properties. **Biochimie**, v. 74, n. 6, p. 527-537, 1992.

FAULKNER, D. John. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 18, n. 1, p. 1R-49R, 2001.

FREYMANN, D.M.; NAKAMURA, Y.; FOCIA, P.J.; SAKAI, R.; SWANSON, G.T. Structure of a tetrameric galectin from *Cinachyrella* sp.(ball sponge). **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 68, n. 9, p. 1163-1174, 2012.

FUNAYAMA, N.; NAKATSUKASA, M.; KURAKU, S.; TAKECHI, K.; DOHI, M.; IWABE, N.; MIYATA, T.; AGATA, K. Isolation of ef silicatein and ef lectin as molecular markers

- sclerocytes and cells involved in innate immunity in the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis*. **Zoological science**, v. 22, n. 10, p. 1113-1122, 2005.
- GARDÈRES, J.; KONDRACKI, M.L.B.; HAMER, B.; BATEL, R.; SCHRÖDER, H.C.; MÜLLER, W.E.G. Porifera Lectins: Diversity, physiological roles and biotechnological potential. **Marine drugs**, v.13, p.5059-5101, 2015.
- GARDÈRES, J.; COULON, I.D.; ARUL, M.; HAMER, B.; BATEL, R.; MULLER, W.E.G.; KONDRACKI, M.L.B. Purification and partial characterization of a lectin protein complex, the clathrilectin, from the calcareous sponge *Clathrina clathrus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 200, p. 17-27, 2016.
- GOMES FILHO, S.M.; CARDOSO, J.D.; ANAYA, K.; NASCIMENTO, E.S.; LACERDA, J.T.J.G.; MIOSO, R.; GADELHA, T.S.; GADELHA, C.A.A. Marine sponge lectins: Actual status on properties and biological activities. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 348-357, 2014.
- GOWDA, N.M.; GOSWAMI, U.; KHAN, M.I. Purification and characterization of a T-antigen specific lectin from the coelomic fluid of a marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*). **Fish & shellfish immunology**, v. 24, n. 4, p. 450-458, 2008.
- GRAY, J.E. Notes on the Classification of the Sponges. **Annals and Magazine of Natural History**, v. 9, n. 54, p. 442-461, 1872.
- GUNDAKER, D.; LEYS, S.P.; SCHRÖDER, H.C.; MÜLLER, I.M.; MÜLLER, W.E.G. Isolation and cloning of a C-type lectin from the hexactinellid sponge *Aphrocallistes vastus*: a putative aggregation factor. **Glycobiology**, v. 11, n. 1, p. 21-29, 2001.
- HARRISON, L. Soluble β -galactoside-binding lectins in vertebrates. **Lectin Reviews**, v. 1, p. 17-39, 1991.
- HENTSCHEL, U.; USHER, K.M.; TAYLOR, M.W. Marine sponges as microbial fermenters. **FEMS microbiology ecology**, v. 55, n. 2, p. 167-177, 2006.
- HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.I. The family of metazoan metal-independent β -galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. **Glycobiology**, v. 3, n. 4, p. 297-304, 1993.
- HORI, K.; MATSUBARA, K.; MIYAZAWA, K. Primary structures of two hemagglutinins from the marine red alga, *Hypnea japonica*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1474, n. 2, p. 226-236, 2000.
- HUNG, L.D.; LY, B.M.; HAO, V.T.; TRUNG, D.T.; TRANG, V.T.D.; TRINH, P.T.H.; NGOC, N.T.D.; QUANG, T.M. Purification, characterization and biological effect of lectin from the marine sponge *Stylissa flexibilis* (Lévi, 1961). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 216, p. 32-38, 2018.

IMMANUEL, T.; KRISHNAN, P.; RAGHURAMAN, R.; VEERAPPAN, N.; DAM-ROY, S. New records of *Chondrilla australiensis* and *Chondrilla grandistellata* (demospongiae: chondrosida: chondrillidae) from havelock island, south andaman, india. **Journal of Threatened Taxa**, v. 7, n 14, 2015.]

KANAZAWA, N.; TASHIRO, K.; MIYACHI, Y. Signaling and immune regulatory role of the dendritic cell immunoreceptor (DCIR) family lectins: DCIR, DCAR, dectin-2 and BDCA-2. **Immunobiology**, v. 209, n. 1-2, p. 179-190, 2004.

KAWAGISHI, H.; YAMAWAKI, M.; ISOBE, S.; USUI, T.; KIMURA, A.; CHIBA, S.. Two lectins from the marine sponge *Halichondria okadai*. An N-acetyl-sugar-specific lectin (HOL-I) and an N-acetylglucosamine-specific lectin (HOL-II). **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 2, p. 1375-1379, 1994.

KAWSAR, S.M.; 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: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 150, n. 4, p. 349-357, 2008.

KILPATRICK, David C. **Handbook of animal lectins**, properties and biomedical applications. Eddinburg: British library, 2000. 468p.

KILPATRICK, D.C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 187-197, 2002.

KIM, S.K.; DEWAPRIYA, P. Bioactive compounds from marine sponges and their symbiotic microbes: A potential source of nutraceuticals. **Advances in food and nutrition research**, v.65, p. 137-151, 2012.

KISHORE, U.; GREENHOUGH, T.J.; WATERS, P.; SHRIVE, A.K.; GHAI, R.; KAMRAN, M.F.; BERNAL, A.L.; REID, K.B.M.; MADAN, T.; CHAKRABORTY, T. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. **Molecular immunology**, v. 43, n. 9, p. 1293-1315, 2006.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680–683, 1970.

MARQUES, D.N.; ALMEIDA, A.S.; SOUSA, A.R.O.; PEREIRA, R.; ANDRADE, A.L.; CHAVES, R.P.; CARNEIRO, R.F.; VASCONCELOS, M.A.; NETO, L.G.N.; PINHEIRO, U.; VIDEIRA, P.A.; TEIXEIRA, E.H.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H. Antibacterial activity of new lectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.

MEDEIROS, D.S.; MEDEIROS, T.L.; RIBEIRO, J.K.; MONTEIRO, N.K.; MIGLIOLLO, L.; VASCONCELOS, I.M.; UCHOA, A.F.; OLIVEIRA, A.S.; DE 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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29283-29289, 2000.

MOLCHANOVA, V.; CHIKALOVETS, I.; CHERNIKOV, O.; BELOGORTSEVA, N.; LI, W.; WANG, J. H.; YANG, D. Y. O.; ZHENG, Y. T.; LUKYANOV, P. A new lectin from the sea worm *Serpula vermicularis*: Isolation, characterization and anti-HIV activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, n. 2, p. 184-193, 2007.

MOURA, R.M.; QUEIROZ, A.F.S.; FOOK, J.M.S.L.L.; DIAS, A S.F.; MONTEIRO, N.K.V.; RIBEIRO, J.K.C.; MOURA, G.E. D.D.; MACEDO, L.L.P.; SANTOS, E.A.; SALES, M.P. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and Leishmania promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 145, n. 4, p. 517-523, 2006.

MÜLLER, W.E.G.; ZAHN, R.K.; KURELEC, B.; LUCU, C.; MÜLLER, I.M.; UHLENBRUCK, G. Lectin, a possible basis for symbiosis between bacteria and sponges. **Journal of bacteriology**, v. 145, n. 1, p. 548-558, 1981.

MÜLLER, W.E.G.; BLUMBACH, B.; WAGNER-HÜLSMANN, C.; LESSEL, U. Galectins in the phylogenetically oldest metazoa, the sponges [Porifera]. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 9, n. 45, p. 123-130, 1997.

NAGANO, C. S.; MORENO, F. B. M. B.; BLOCH JUNIOR, 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**, v. 9, n.2, p. 159-165, 2002.

NOWELL, P.C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer research**, v. 20, n. 4, p. 462-466, 1960.

NUNES, E.S.; SOUZA, M.A.A.; VAZ, A.F.M.; COELHO, L.C.B.B.; AGUIAR, J.S.; SILVA, T.G.; GUARNIERI, M.C.; MELO, A.M.M.A.; OLIVA, M.L.V; CORREIA, M.T.S. Inactivation and fragmentation of lectin from *Bothrops leucurus* snake venom by gamma irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, n. 4, p. 484-487, 2012.

OURTH, D.D.; NARRA, M.B.; CHUNG, K.T. Isolation of mannose-binding C-type lectin from *Heliothis virescens* pupae. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 335, n. 4, p. 1085-1089, 2005.

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

RUPPERT, E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996.

RÜTZLER, K.; DURAN, S.; PIANTONI, C. Adaptation of reef and mangrove sponges to stress: evidence for ecological speciation exemplified by *Chondrilla caribensis* new species (Demospongiae, Chondrosida). **Marine Ecology**, v. 28, n. s1, p. 95-111, 2007.

SAGAR, S.; KAUR, M.; MINNEMAN, K.P. Antiviral lead compounds from marine sponges. **Marine drugs**, v. 8, p. 2619-2638, 2010.

SAMPAIO, A.H.; ROGERS, D.J.; BARWELL, C.J. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, v.48, n.5, p.765–769, 1998.

SAMPAIO, A.H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C.J.; SAKER-SAMPAIO, S.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; FARIAS, W. R. L. New affinity procedure for the isolation and further characterization of the blood group B specific lectin from the red marine alga *Ptilota plumose*. **Journal of Applied Phycology**, v.14, p.489–495, 2002.

SANTOS, A.F.S.; SILVA, M.D.C.; NAPOLEÃO, T.H.; PAIVA, P.M.G.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. **Current topics in peptide & protein research**, v. 15, p. 41-62, 2014.

SARMA, A.S.; DAUM, T.; MILLER, W.E.G. **Secondary Metabolites from Marine Sponges**. Berlin: Ullstein-Mosby Verlag, 1993.

SCHRÖDER, H. C.; Kljajić, Z.; Weiler, B.E.; Gasić, M.; Uhlenbruck, G.; Kurelec, B.; Müller, W.E.G. The galactose-specific lectin from the sponge *Chondrilla nucula* displays anti-human immunodeficiency virus activity in vitro via stimulation of the (2'-5') oligoadenylate metabolism. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 1, n. 2, p. 99-105, 1990.

SCHRÖDER, H.C.; USHIJIMA, H.; KRASKO, A.; GAMULIN, V.; THAKUR, N.L.; DIEHL-SEIFERT, B.; MÜLLER, I.M.; MÜLLER, W.E.G. Emergence and disappearance of an immune molecule, an antimicrobial lectin, in basal metazoa. A tachylectin-related protein in the sponge *Suberites domuncula*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.32810–32817, 2003.

SCHRÖDER, H.C.; BOREIKO, A.; KORZHEV, M.; TAHIR, M.N.; TREMEL, W.; ECKERT, C.; USHIJIMA, H.; MÜLLER, I.M.; MÜLLER, W.E.G. Co-expression and functional interaction of silicatein with galectin: Matrix-guided formation of siliceous spicules in the marine demosponge *Suberites domuncula*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p.12001–12009, 2006.

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

- SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53-62, 2004.
- SIPKEMA, D.; FRANSSSEN, M.C.; OSINGA, R.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R.H. Marine sponges as pharmacy. **Marine biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 142, 2005.
- SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. Identification of hemagglutinin of jack bean with concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, v. 32, n. 2, p. 227-237, 1936.
- TEICHBERG, V.I.; SILMAN, I.; BEITSCH, D.D.; RESHEFF, G. A beta-D-galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 4, p. 1383-1387, 1975.
- UEDA, T.; NAKAMURA, Y.; SMITH, C.M.; COPITS, B.A.; INOUE, A.; OJIMA, T.; MATSUNAGA, S.; SAKAI, R.; SWANSON, G.T. 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, p.412–425, 2013.
- WAGNER-HÜLSMANN, C.; BACHINSKI, N.; DIEHL-SEIFERT, B.; BLUMBACH, B.; STEFFEN, R.; PANCER, Z.; MÜLLER, W.E.G. A galectin links the aggregation factor to cells in the sponge (*Geodia cydonium*) system. **Glycobiology**, v. 6, n. 8, p. 785-793, 1996.
- WATKINS, W.M. The ABO blood group system: historical background. **Transfusion medicine**, v. 11, n. 4, p. 243-265, 2001.
- WEHRL, M.; STEINERT, M.; HENTSCHEL, U. Bacterial uptake by the marine sponge *Aplysina aerophoba*. **Microbial ecology**, v. 53, n. 2, p. 355-365, 2007.
- WIENS, M.; MANGONI, A.; D'ESPOSITO, M.; FATTORUSSO, E.; KORCHAGINA, N.; SCHRÖDER, H.C.; GREBENJUK, V.A.; KRASKO, A.; BATEL, R.; MÜLLER, I.M.; MÜLLER, W.E.G. The molecular basis for the evolution of the metazoan bodyplan: extracellular matrix-mediated morphogenesis in marine demosponges. **Journal of molecular evolution**, v. 57, n. 1, p. S60-S75, 2003.
- WIENS, M.; BELIKOV, S.I.; KALUZHNYAYA, O.V.; KRASKO, A.; SCHRÖDER, H.C.; PEROVIC-OTTSTADT, S.; MÜLLER, W.E.G. Molecular control of serial module formation along the apical–basal axis in the sponge *Lubomirskia baicalensis*: silicateins, mannose-binding lectin and mago nashi. **Development genes and evolution**, v. 216, n. 5, p. 229, 2006.
- WORMS. Porifera. Disponível em: <<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=558>>. Acesso em: 21 novembro 2018.
- XIONG, C.; LI, W.; LIU, H.; ZHANG, W.; DOU, J.; BAI, X.; DU, Y.; MA, X. A normal mucin-binding lectin from the sponge *Craniella australiensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 1, p. 9-16, 2006.

YANG, H.; LUO, T.; LI, F.; LI, S.; XU, X. Purification and characterisation of a calcium-independent lectin (PjLec) from the haemolymph of the shrimp *Penaeus japonicus*. **Fish & shellfish immunology**, v. 22, n. 1-2, p. 88-97, 2007.

ZELENSKY, A.N.; GREASY, J.E. The C-type lectin-like domain superfamily. **The FEBS journal**, v. 272, n. 24, p. 6179-6217, 2005.