



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

PHILIPPE LIMA DUARTE

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA LECTINA
EXTRAÍDA DO FLUIDO CELOMÁTICO DO OURIÇO-DO-MAR, *Echinometra lucunter*,
EXPOSTO A INDUÇÃO BACTERIANA.**

FORTALEZA

2018

PHILIPPE LIMA DUARTE

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA LECTINA
EXTRAÍDA DO FLUIDO CELOMÁTICO DO OURIÇO-DO-MAR, *Echinometra lucunter*,
EXPOSTO A INDUÇÃO BACTERIANA.

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. 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)

D874p Duarte, Philippe Lima.
Purificação e caracterização bioquímica de uma lectina extraída do fluido celomático do ouriço-do-mar, *Echinometra lucunter*, exposto a indução bacteriana / Philippe Lima Duarte. – 2018.
36 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. Rômulo Farias Carneiro.

1. Equinodermos. 2. Lectina. 3. Isolamento. I. Título.

CDD 639.2

PHILIPPE LIMA DUARTE

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UMA LECTINA EXTRAÍDA DO FLUIDO CELOMÁTICO DO OURIÇO-DO-MAR, *Echinometra lucunter*, EXPOSTO A INDUÇÃO BACTERIANA.

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. Rômulo Farias Carneiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre estar comigo mesmo quando minha fé está abalada e por guiar meus passos e iluminar meu caminho.

A minha mãe Veraltina, por sempre ter me apoiado e me ensinado a enfrentar as dores que a vida nos traz. Te agradeço enormemente, te amo muito e obrigado por sempre me compreender, saiba que tudo o que eu conquistar será em sua homenagem, como a senhora sempre diz, “você é meu tudo, minha vida”.

A minha irmã Amábyle Lima, por seu apoio e amizade em todos os momentos. Te amo “Nem”.

Ao meu irmão Matheus Lima, pois apesar das desavenças, sei que sempre torce pelo meu sucesso e saiba que eu estarei aqui sempre que precisar. Te amo.

Ao meu pai José Mauro, pelo carinho e apoio. Obrigado por sempre estar ao meu lado independente de tudo. Te amo.

As minhas saudosas tias Meyrilande e Rivanda, pois sei que sempre estão cuidando e me protegendo de onde quer que estejam. Sinto muitas saudades.

Aos meus tios e tias que sempre me apoiaram durante a minha caminhada. Em especial a minha tia Erivânia, pois ela é um anjo na minha vida.

Aos meus avós Maria e Antônio, pelo carinho, apoio, confiança e por terem me acolhido tão bem durante os três anos que morei com vocês.

As minhas primas Dulina, Samara, Mayla e Beatriz, pela amizade e por sempre estarem ao meu lado.

Ao meu chefe e orientador Rômulo Farias, por aguentar minhas risadas, besteiras e afins, ou seja, pela paciência. Obrigado pela amizade e por todos os ensinamentos acadêmicos. Te admiro muito.

Aos professores Celso Nagano e Alexandre Sampaio, pelos ensinamentos, incentivos e por aceitarem participar da banca.

Ao meu querido professor e tutor Reynaldo Marinho, pela amizade, por sua contribuição na minha formação e por me incentivar. Professor, o senhor é demais. Obrigado por ter me aguentado dois anos como petiano e por não ter dado duas clicadas no botão de excluir.

Aos meus amigos petianos, pelas brigas, comemorações e pelas risadas. Agradeço em especial a Larissa Pinto, Thifany, Jhonatas e Bárbara, pelas conversas jogadas fora, desabafos e principalmente pela amizade.

Aos meus amigos e companheiros de faculdade, Andressa Rocha, Larissa Liberalino, Edson Luiz, Ana Larissa e Danilo Ximenes, pois passamos cinco anos juntos, sofrendo, sorrindo, chorando e agora estamos na reta final, levarei a amizade de vocês para vida toda. Obrigado pelo apoio de cada um.

Aos meus amigos e companheiros de bancada, Alexandra, Ana Kátia, Victória Régia, Vitoria Alves, Nicole Faria, Renata Pinheiro, Renato Farias, Regi Nascimento, Paulo Nascimento, Maria Luiza, Lívia Torquato, por tornarem meus dias alegres e por serem uma família para mim.

Aos meus professores do ensino fundamental, médio e universitário, pela ajuda e ensinamentos, sem vocês eu não estaria aqui.

A única palavra que resume tudo isso é “GRATIDÃO”.

“Part of Me” (Katy Perry)

RESUMO

O Filo Echinodermata compreende um grupo de animais marinhos com cerca de 7.000 espécies. O nome “equinodermata” (L. *echinatus*, espinhoso, + Gr. *derma*, pele + *ata*, caracterizado por) é derivado da presença de espinhos ou protuberâncias externas. São animais marinhos, com alguns representantes estuarinos e importantes componentes do bento costeiro. Os principais representantes do filo são estrelas-do-mar, ofiuróides, ouriços-do-mar, pepinos-do-mar, bolachas-do-mar e os lírios-do-mar. Nos últimos anos, um número significativo de lectinas presentes em invertebrados marinhos foram isoladas, e os estudos sugerem que elas representam um componente importante na defesa destes organismos, sendo parte do sistema imune inato destes animais. Lectinas são proteínas capazes de se ligarem reversivelmente a carboidratos específicos, sem modificar a estrutura dos mesmos. Em invertebrados marinhos, as lectinas podem desempenhar papel de defesa imunológica, contudo, essas proteínas podem participar de vários outros processos biológicos em organismos diferentes. O presente trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar bioquimicamente uma lectina extraída do fluido celomático do ouriço-do-mar, *Echinometra lucunter*, exposto a indução bacteriana. ELA (*Echinometra lucunter agglutinin*) foi isolada a partir da combinação de cromatografias de interação hidrofóbica e exclusão molecular. A nova lectina possui massa molecular nativa de aproximadamente 145 kDa, em SDS PAGE, ELA apresentou uma banda de aproximadamente 45 kDa na presença e ausência de 2-mercaptoetanol. Sua atividade foi estável em pH neutro-alkalino e com ótimo de temperatura a 50 °C, demonstrou também ser dependente de íons divalentes. ELA teve sua atividade inibida por glicoproteínas mucina tipo II e III de estômago de porco.

Palavras-chave: Equinodermos. Lectina. Isolamento.

ABSTRACT

The Echinodermata Phylum comprises a group of marine animals with about 7,000 species. The name "echinodermata" (L.echinatus, prickly, + Gr. Derma, skin + ata, characterized by) derives from the presence of external spines or protuberances. They are marine animals, but with some estuarine representatives, are important components of the coastal bento. The main representatives of the phylum are starfish, ofiurus, sea urchins, sea cucumbers, sea biscuits and sea lilies. In recent years, a significant number of lectins present in marine invertebrates have been isolated, and studies suggest that they represent an important component in the defense of these organisms, being part of the innate immune system of the animals. Lectins are proteins capable of reversibly binding to specific carbohydrates without modifying their structure. In marine invertebrates, lectins may play an immunological defense role; however, these proteins may participate in several other biological processes in different organisms. The present work aimed to purify and characterize biochemically a lectin extracted from the coelomic fluid of the sea urchin, *Echinometra lucunter*, exposed to bacterial induction. ELA (*Echinometra lucunter agglutinin*) was isolated by combination of hydrophobic interaction and size exclusion chromatography. The novel lectin has a native molecular mass of approximately 145 kDa, on SDS PAGE, ELA showed a band of approximately 45 kDa in the presence and absence of 2-mercaptoethanol. Its activity was stable at neutral-alkaline pH and with optimum temperature at 50 ° C, it was also shown to be dependent on divalent ions. ELA had its activity inhibited by mucin glycoproteins type II and III of porcine stomach.

Keywords: Echinoderms. Lectin. Isolation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Exemplos de equinodermos.....	13
Figura 2 -	Morfologia do ouriço-do-mar.....	15
Figura 3 -	Gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE).....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Atividade hemaglutinante do fluido celomático do ouriço-do-mar desafiado e não desafiado por bactérias.....	23
Tabela 2 -	Atividade hemaglutinante da ELA contra eritrócitos humanos em U.H./mL.	25

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Cromatografia de interação hidrofóbica em Fenil-Sepharose 4B do extrato total de <i>Echinometra lucunter</i>	24
Gráfico 2 – Cromatografia de gel filtração da fração retida (pHIC) do fluido celomático do ouriço-do-mar, <i>Echinometra lucunter</i>	25
Gráfico 3 – Efeito do pH na atividade hemaglutinante.....	26
Gráfico 4 – Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante.....	27
Gráfico 5 – Estimativa da massa molecular em gel filtração.....	28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Equinodermos	13
1.2	Taxonomia	14
1.3	Lectinas	16
1.3.1	<i>Definição e aplicações</i>	16
1.3.2	<i>Lectinas de animais</i>	16
1.3.3	<i>Lectinas de invertebrados</i>	17
1.4	Imunidade em equinodermos	18
1.4.1	<i>Sistema imunológico</i>	18
1.4.2	<i>Atuação das lectinas</i>	18
2	METODOLOGIA	19
2.1	Preparo de bactérias para desafio dos ouriços	19
2.2	Coleta dos animais	19
2.3	Preparação do extrato	19
2.4	Purificação da lectina	19
2.5	Caracterização bioquímica	20
2.5.1	<i>Atividade hemaglutinante</i>	20
2.5.2	<i>Testes de inibição da atividade hemaglutinante</i>	21
2.5.3	<i>Efeito do pH, temperatura e EDTA</i>	21
2.5.4	<i>Eletroforese e cromatografia de exclusão molecular</i>	22
3	RESULTADOS	23
3.1	Purificação da lectina	23
3.2	Caracterização bioquímica	24
3.2.1	<i>Atividade hemaglutinante</i>	24
3.2.2	<i>Inibição da atividade hemaglutinante</i>	26
3.2.3	<i>Efeito do pH, temperatura e EDTA</i>	26
3.2.4	<i>Estimativa de massa molecular por eletroforese e exclusão molecular</i>	27
4	DISCUSSÃO	29
5	CONCLUSÃO	32

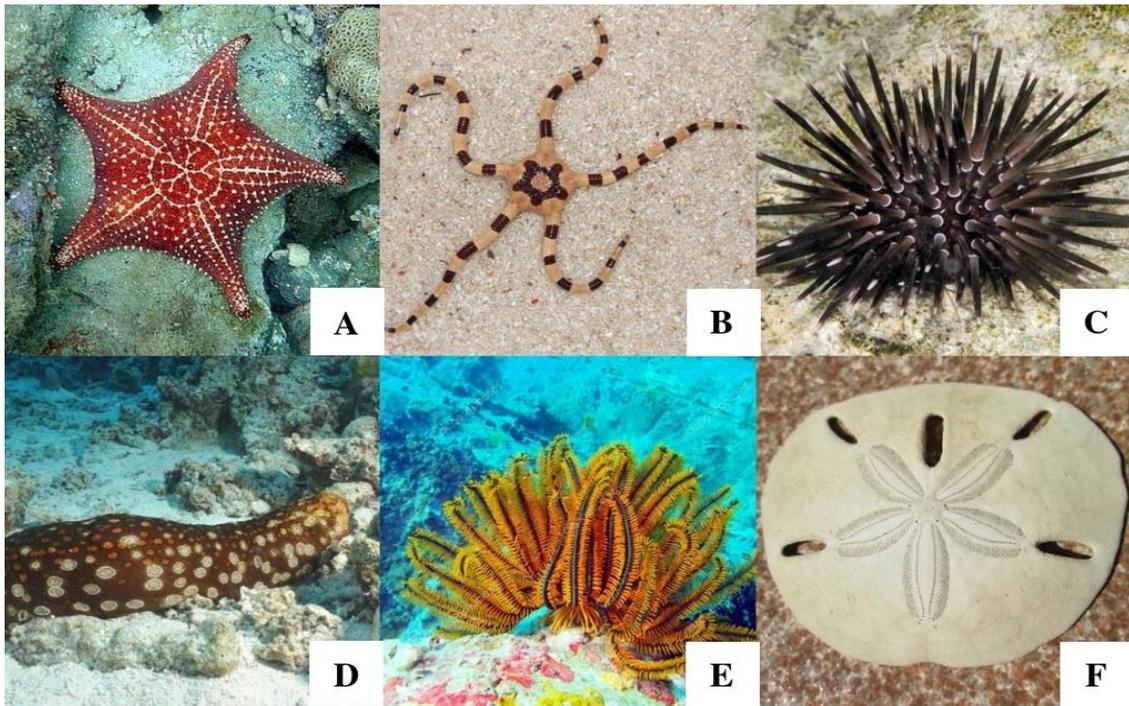
REFERÊNCIAS.....	33
-------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

1.1 Equinodermos

O Filo Echinodermata compreende um grupo de animais marinhos com cerca de 7.000 espécies recentes e 13.000 espécies fósseis (Brusca e Brusca, 2003). O nome equinodermata (*L.echinatus*, espinhoso, + Gr. *derma*, pele + *ata*, caracterizado por) é derivado da presença de espinhos ou protuberâncias externas (HICKMAN *et al.*, 2004). Os equinodermos são marinhos, porém com alguns representantes estuarinos, são importantes componentes do bento costeiro, ocupando e adaptando-se a diversos tipos de substratos duros ou móveis, ou ainda como epizóicos. Os principais representantes do filo são estrelas-do-mar, ofiuróides, ouriços-do-mar, pepinos-do-mar, bolachas-do-mar e os lírios-do-mar (Figura 1) (HICKMAN *et al.*, 2004).

Figura 1- Exemplos de equinodermos



- A) **Estrela-do-mar**. (fonte:<http://www.trilhasemergulho.com.br/mergulho/angra/slides/27-Estrela-do-Mar.jpg>)
 B) **Ofiuróides**. (fonte:https://www.poisson-or.com/20378-large_default/ophiolepis-superba-ophiures-a-pattes-lisses-tigrees-8-10-cm.jpg)
 C) **Ouriço-do-mar**. (fonte:https://calphotos.berkeley.edu/imgs/512x768/4444_4444/0907/0119.jpeg)
 D) **Pepino-do-mar**. (fonte:<https://petfriends.com.br/wp-content/uploads/2016/09/Pepino-do-Mar-1024x535.jpg>)
 E) **Lírios-do-mar**. (fonte:https://st.depositphotos.com/1736021/2779/i/950/depositphotos_27799229-stock-photo-sea-lily-of-the-south.jpg)
 F) **Bolacha-do-mar**. (fonte:https://c1.staticflickr.com/8/7348/13920852890_7f13342e85_b.jpg)

São animais relativamente grandes, quando comparados a invertebrados terrestres, possuindo alguns centímetros de diâmetro. A principal característica do grupo é a sua simetria radial pentamerá, ou seja, o corpo pode ser dividido em cinco partes dispostas ao redor de um eixo central. Porém esta simetria radial foi derivada de um ancestral com simetria bilateral (RUPPERT *et al.*, 2005).

Outras características morfológicas importantes dos equinodermos são a presença de um endoesqueleto calcário espinhoso em placas, sistema ambulacrário, pedicelarias e brânquias dérmicas (HICKMAN *et al.*, 2004).

Equinodermos possuem um sistema hidrovacular, composto de canais celômicos e apêndices superficiais que tem como principal função promover a locomoção dos mesmos. Possuem um celoma espaçoso, trato digestivo bem desenvolvido, não possuem órgãos excretores e as trocas gasosas só ocorrem em algumas classes (RUPPERT *et al.*, 2005).

1.2 Taxonomia

O filo Echinodermata surgiu no período Cambriano, cerca de 600 milhões de anos, sendo, atualmente, subdividido em 5 classes: Crinoidea (crinóides ou lírios-do-mar), Asteroidea (asteróides ou estrelas-do-mar), Ophiuroidea (ofiuróides ou ofiúros), Echinoidea (equinóides ou ouriços-do-mar e bolachas-do-mar), Holothuroidea (holoturóides ou pepinos-do-mar) e Concentricycloidea (RUPPERT *et al.*, 2005).

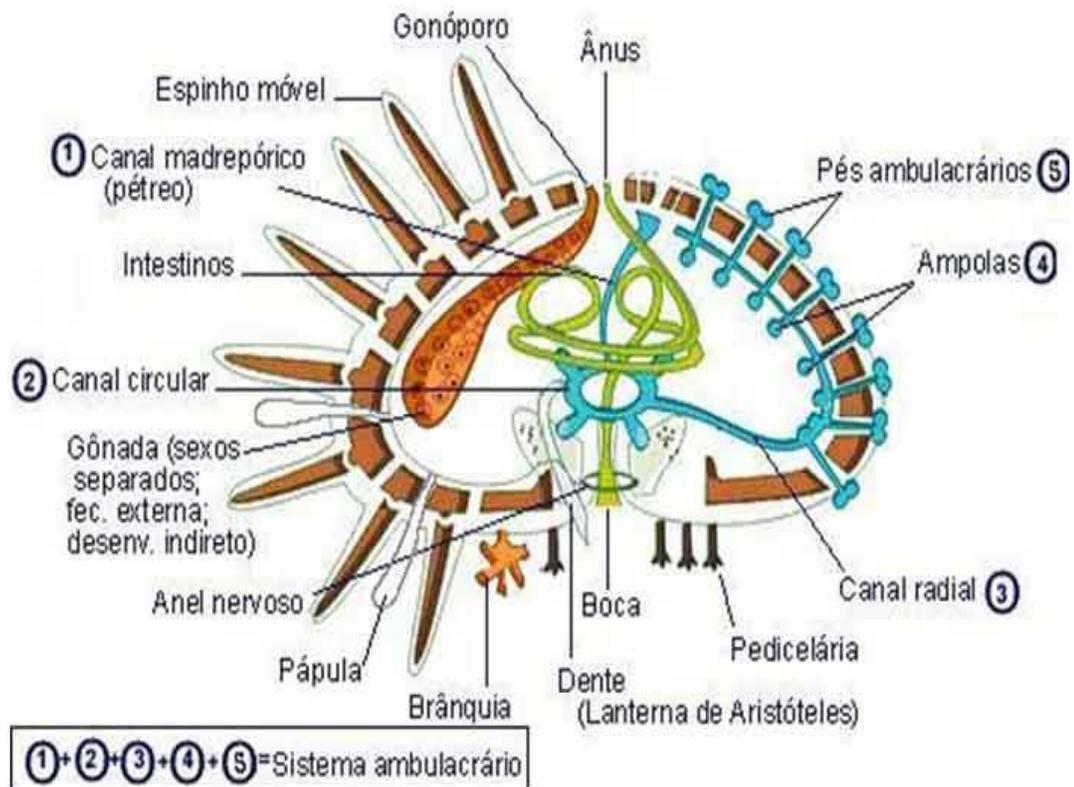
A classe Echinoidea representa os equinodermos de movimento livre, que possuem espinhos móveis que recobrem o corpo, forma circular ou oval, e o corpo é esférico ou achatado ao longo do eixo oral/aboral. A classe é interessante pois existem membros com simetrias tanto radial (característica do filo) quanto bilateral (Figura 2) (RUPPERT *et al.*, 2005).

Os equinodermos radiais da classe Echinoidea são conhecidos como ouriços-do-mar, estes animais possuem o corpo relativamente esférico com vários espinhos móveis. O corpo do ouriço pode ser dividido em dois polos (oral/aboral), no polo oral, encontramos a boca que é voltada para o substrato e uma membrana peristomial, ainda neste polo podemos observar a presença de pés ambulacrais bucais e projeções chamadas de brânquias. O polo aboral contém o periprocto (ânus) e cinco seções contendo pés ambulacrais para a movimentação. (RUPPERT *et al.*, 2005). Equinoideos bilaterais conhecidas como bolachas-do-mar, apresentam adaptações para escavar na

areia. Em contraste com os ouriços, eles apresentam uma concha recoberta por pequenos espinhos, são achatados e os pés ambulacrários são modificados para realizar trocas gasosas (RUPPERT *et al.*, 2005).

Em geral, ouriços e bolachas-do-mar alimentam-se principalmente de algas, porém podem ser generalistas dependendo da área em que vivem. O fluido celômico é o principal meio para o transporte interno e realização de trocas gasosas, quanto a reprodução, são animais dioicos e o desenvolvimento larval é externo (RUPPERT *et al.*, 2005).

Figura 2- Morfologia do ouriço-do-mar



1.3 Lectinas

1.3.1 Definição e aplicações

Proteínas aglutinantes de eritrócitos são conhecidas desde o final do século XIX, inicialmente eram denominadas de fitohemaglutininas ou fitoaglutininas por serem encontradas em extrato de plantas (SHARON; LIS, 2004). Porém, ao passar dos anos tais proteínas foram sendo descobertas em outros organismos, como fungos, algas, animais e vírus (SAMPAIO *et al.*, 1998).

O termo lectina (do latim *legere*, escolher, selecionar, optar) foi proposto em 1954 para denominar aglutininas com habilidade de distinguir eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos (BOYD; SHAPLEIGH, 1972). O termo lectina foi generalizado para todas as aglutininas específicas de carboidratos, de origem não imune (SHARON; LIS, 1972). Sampaio definiu lectinas como proteínas capazes de se ligarem reversivelmente a carboidratos (SAMPAIO *et al.*, 2002).

As lectinas eram pouco evidenciadas no meio científico, até que duas grandes descobertas na década de 60 mudaram este cenário. A primeira está relacionada a descoberta da PHA (*Phaseolus vulgaris agglutinin*) por Peter C. Nowell, lectina do feijão vermelho que é capaz de estimular linfócitos a entrarem em mitose. Tal descoberta impactou a imunologia, pois acreditava-se que os linfócitos eram células incapazes de dividir-se ou diferenciar-se (NOWELL, 1960). A segunda foi a descoberta da WGA (*wheat germ agglutinin*) por Joseph Aub, lectina capaz de aglutinar preferencialmente células malignas (AUB *et al.*, 1965), assim iniciava-se a utilização de lectinas para estudo do câncer.

Em 1965, foi introduzida a cromatografia de afinidade, técnica que facilitava o isolamento das lectinas. Essa metodologia conduziu a um rápido aumento no número destas proteínas purificadas (SHARON, 2008). A partir daí a propriedade biológica das lectinas vem sendo utilizada como ferramenta bioquímica em estudos de interação com carboidratos e na imunologia.

1.3.2 Lectinas de animais

A primeira lectina animal foi isolada de uma enguia por Watkins e Morgan em 1952, apresentando especificidade a L-fucose. Nos anos posteriores, foi isolado a lectina do caranguejo-

ferradura, *Tachypleus tridentatus* (MARCHALONIS; EDELMAN, 1968) e do escargot, *Helix pomatia* (HAMMARSTROM; KABAT, 1969).

David Kilpatrick definiu lectinas animais como “proteínas ou glicoproteínas que reconhecem e interagem com carboidratos específicos, sem participarem do metabolismo dos mesmos e nem pertencerem a qualquer das principais classes de imunoglobulinas”. (KILPATRICK, 2000).

Lectinas de animais apresentam diversas funções, tais como encaminhamento intracelular de glicoconjugados, chaperonas moleculares durante a síntese de glicoproteínas, dentre outras (KILPATRICK, 2002). Porém a principal função das mesmas é atuar como moléculas de reconhecimento dentro do sistema imunológico, e este papel pode ser dividido em quatro categorias; a defesa direta, reconhecimento e tráfico dentro do sistema imunológico, regulação imune, e prevenção da auto-imunidade. (KILPATRICK, 2002).

Inicialmente, as lectinas de animais eram divididas em duas famílias, as lectinas do tipo S, dependentes de sulfidril e as lectinas tipo C, dependentes de cálcio. Atualmente, as lectinas de animais são classificadas em famílias relacionadas aos domínios de reconhecimento a carboidratos, como: Calnexinas, tipo P, tipo M, tipo L, tipo C, tipo R, tipo S, tipo F, ficolinas e lectinas do tipo quitinase (KILPATRICK, 2000; LAVANYA *et al.*, 2014)

1.3.3 Lectinas de invertebrados

Nos últimos anos, um número significativo de lectinas presentes em invertebrados marinhos foram isoladas, e os estudos sugerem que elas representam um componente importante na defesa destes organismos, sendo parte do sistema imune inato dos animais (KILPATRICK, 2000).

Quando comparamos o número de lectinas isoladas de invertebrados marinhos com a diversidade de lectinas purificadas de vertebrados e plantas, notamos que há uma escassez em trabalhos voltados para esta categoria de animais (MELO *et al.*, 2014). Em alguns filos de invertebrados, incluindo Echinodermata, existem trabalhos relacionados a detecção, isolamento e caracterização dessas moléculas. Dentre estes trabalhos há lectinas provenientes de pepino-do-mar (GOWDA *et al.*, 2008), ovos do ouriço-do-mar (CARNEIRO *et al.*, 2015) e estrela-do-mar (KAMIYA *et al.*, 1992).

Alguns estudos revelaram que as lectinas possuem um grande potencial biotecnológico. Ensaio biológicos demonstram, por exemplo, o efeito antibiofilme (CARNEIRO *et al.*, 2017), antibacteriano (LAPORT; SANTOS; MURICY, 2009) e até mesmo anticancerígeno (DHUNA *et al.*, 2005) devido a sua grande especificidade a carboidratos presentes nos mais diversos organismos.

1.4 Imunidade em equinodermos

1.4.1 Sistema imunológico

A função imunológica tem sido dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade adaptativa apresenta uma resposta mais rápida e eficiente dentro do organismo, pois existem neste sistema uma grande variedade de células, receptores de antígenos, além da produção de anticorpos. Já na imunidade inata, que ocorre nos equinodermos, os mesmos possuem receptores genéricos, estes reconhecem padrões em agentes patógenos desencadeando reações para limitar a entrada no organismo (COOPER; ALDER, 2006)

1.4.2 Atuação das lectinas

Por possuírem um sistema imunológico primitivo, o principal mecanismo de defesa contra agentes infecciosos nos invertebrados está na síntese e secreção de proteínas com atividade antimicrobiana e antibacteriana (LI *et al.*, 2014; HAUG *et al.*, 2002), aglutinação (CERVELLO *et al.*, 1996) e auxiliando na fagocitose de partículas estranhas ou patógenos (MAJESKE; BAYNE; SMITH, 2013).

O presente trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar bioquimicamente uma lectina extraída do fluido celomático do ouriço-do-mar, *Echinometra lucunter*, exposto a indução bacteriana.

2 METODOLOGIA

2.1 Preparo de bactérias para desafio dos ouriços

Escherichia coli e *Staphylococcus aureus* foram cultivadas em meio de cultura (LB) a 37°C por 24h ou até que atingissem densidade óptica de 0,8. As suspensões bacterianas foram autoclavadas e resfriadas a 4°C até o uso.

2.2 Coleta dos animais

O material de estudo, espécimes do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*, foram coletados na região entre marés da praia do Pacheco, localizada no município de Caucaia, litoral oeste do Ceará. A coleta do material foi autorizada e regulada pelo órgão ambiental competente (SISBIO ID: 33913-8).

Após a coleta, os animais foram transportados dentro de caixas térmicas até o laboratório. Aproximadamente 100 µL de cada suspensão bacteriana foram injetados na cavidade celomática dos animais e os mesmos permaneceram nas caixas por 3 horas após as injeções.

2.3 Preparação do extrato

O fluido celomático foi extraído com uma pipeta plástica após a remoção da lanterna de Aristóteles e mantido à temperatura ambiente por 1 hora para que pudesse coagular. Os coágulos foram removidos e o fluido centrifugado a 8.000 xg. O sobrenadante denominado extrato bruto foi armazenado a -20 °C para posterior utilização. A preparação do material foi autorizada e regulada pelo órgão ambiental competente (SISGEN ID: ACC97AD).

2.4 Purificação da lectina

O extrato bruto foi descongelado e ao mesmo foi acrescentado sulfato de amônio a concentração final de 500 mM, sendo a mistura centrifugada a 8.000 xg, por 20 minutos, a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante, foi submetido a ensaios de atividade hemaglutinante e quantificação de proteínas solúveis (BRADFORD *et al.*, 1976).

O sobrenadante foi submetido a cromatografia de interação hidrofóbica em matriz de Fenil-Sepharose™ 4B. A coluna (1,0 x 8,0 cm) foi previamente equilibrada com tampão Tris 20 mM, pH 7, contendo sulfato de amônio 500 mM. Após adição da amostra, a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio e os eluatos foram monitorados por espectrofotometria a 280 nm. Quando a absorbância apresentou leitura abaixo de 0,02, a coluna foi então eluída com água destilada e o material retido coletado em frações de 3 mL. As frações que apresentaram atividade hemaglutinante (pHIC) foram reunidas, dialisadas contra água destilada, liofilizadas e posteriormente submetida à cromatografia de gel filtração

O pHIC liofilizado foi solubilizado em tampão Tris 20 mM, pH 7,6; contendo NaCl 150 mM e CaCl₂ 20 mM (TBS/Ca²⁺) e submetido à cromatografia de gel filtração em coluna BioSuite 250 SEC HR (0,78 x 0,30 cm), acoplada a sistema Acquity UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, Waters Corp.). A coluna foi previamente equilibrada com TBS/Ca²⁺ e a cromatografia foi conduzida no mesmo tampão. O fluxo foi mantido em 0,4 mL.min⁻¹ e frações de 0,4 mL foram coletadas. As frações que apresentaram atividade hemaglutinante foram reunidas e armazenadas a -20°C para ensaios posteriores.

2.5 Caracterização bioquímica

2.5.1 Atividade hemaglutinante

Os ensaios de hemaglutinação foram realizados com a utilização de eritrócitos humanos do sistema ABO, obtidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

Após a obtenção dos tipos sanguíneos, foram preparadas as suspensões de eritrócitos nativos e tratados com enzimas proteolíticas. Os eritrócitos foram lavados, em seguida, foram preparadas as suspensões a 3% (v/v) de eritrócitos em NaCl 150 mM.

Para a obtenção de hemácias tratadas com enzimas proteolíticas, as suspensões a 3% foram incubadas separadamente com tripsina e pronase, por 1 hora, em temperatura ambiente. Após a incubação, as suspensões foram lavadas novamente. Após a lavagem, as hemácias foram suspensas e os volumes foram aferidos até que a concentração de eritrócitos a 3% (v/v) em NaCl fosse novamente obtida.

Os ensaios de hemaglutinação foram realizados seguindo o método da dupla diluição seriada, em placas de microtitulação de fundo em V, segundo metodologia padrão (SAMPAIO *et al.*, 1998). A amostra permaneceu incubada por 1 hora em temperatura ambiente e a atividade hemaglutinante foi observada macroscopicamente e expressa em unidades de hemaglutinação (U.H.), unidade inversa da maior diluição de amostra capaz de aglutinar eritrócitos.

2.5.2 Testes de inibição da atividade hemaglutinante

O teste de inibição da atividade hemaglutinante foi realizado em placas de microtitulação de fundo em V, no qual foram adicionados aos poços 50 μL da solução da lectina em TBS com concentração de 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 50 μL das soluções de açúcares diluídas em cada poço. Os resultados observados foram expressos em unidade de concentração mínima de carboidratos e/ou glicoproteínas capaz de inibir a atividade hemaglutinante. (SAMPAIO *et al.*, 1998)

Na inibição da atividade hemaglutinante foram utilizados carboidratos e glicoproteínas, utilizando-se a lectina purificada com a finalidade de determinação da mínima concentração de carboidratos capaz de inibir a aglutinação de eritrócitos.

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 -Dgalactopiranosídeo, 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 mucina de estômago de porco tipo 2 (PSM-II) e mucina de estômago de porco tipo 3 (PSM-III) .

2.5.3 Efeito do pH, temperatura e EDTA

A estabilidade da proteína quanto ao pH foi avaliada através de ensaio de atividade hemaglutinante em tampões de diferentes pH, incubando a lectina (2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) por 1 hora aos seguintes tampões: acetato 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 150 mM.

Para avaliar a estabilidade térmica, amostras da lectina, solubilizada em NaCl 150 mM em concentração de 2 mg.mL⁻¹, foram aquecidas em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C) e posteriormente submetidas a testes de atividade hemaglutinante.

Foi avaliado também o efeito do íon cálcio na atividade hemaglutinante. A lectina solubilizada, foi submetida ao teste de hemaglutinação em tampão TBS/Ca²⁺ e em tampão Tris 20 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM e EDTA 20 mM.

2.5.4 Eletroforese e cromatografia de exclusão molecular

A massa molecular da lectina em condições desnaturantes e o grau de pureza foram avaliados por eletroforese, utilizando-se gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), na presença e na ausência de β-mercaptoetanol (LAEMMLI, 1970). O gel foi submetido a uma corrente de 25 mA e tensão de 150 V, durante 1 hora. A estimativa de massa foi realizada comparando-se a migração da proteína alvo com a migração de uma mistura de marcadores moleculares (albumina sérica bovina - BSA, 66 kDa; álcool desidrogenase - ADH, 45 kDa; anidrase carbônica, 30 kDa; tripsinogênio, 24 kDa; inibidor de tripsina, 20 kDa; lisozima, 14 kDa; aprotinina, 6,5 kDa).

Para estimativa de massa em condições nativas, a lectina isolada foi submetida à cromatografia de gel filtração em coluna BioSuite 250 SEC HR (0,78 cm x 0,30 cm, tamanho de partícula 5 µm) acoplada ao sistema Acquity UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, Waters Corp.). A coluna foi previamente equilibrada e a cromatografia foi conduzida em TBS/Ca²⁺, ao fluxo de 0,4 mL.min⁻¹.

3 RESULTADOS

3.1 Purificação da lectina

Os protocolos de purificação descritos a seguir foram conduzidos utilizando duas amostras diferentes de ouriços: (1) fluido de ouriços não desafiados e (2) fluido de ouriços desafiados pela injeção de bactérias na cavidade celomática dos animais.

O fluido celomático do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* apresentou atividade hemaglutinante contra diferentes eritrócitos testados. O fluido quando desafiado pela presença de bactérias apresentou um acréscimo de aproximadamente 40% de atividade específica em comparação ao fluido de ouriços não desafiados (Tabela 1).

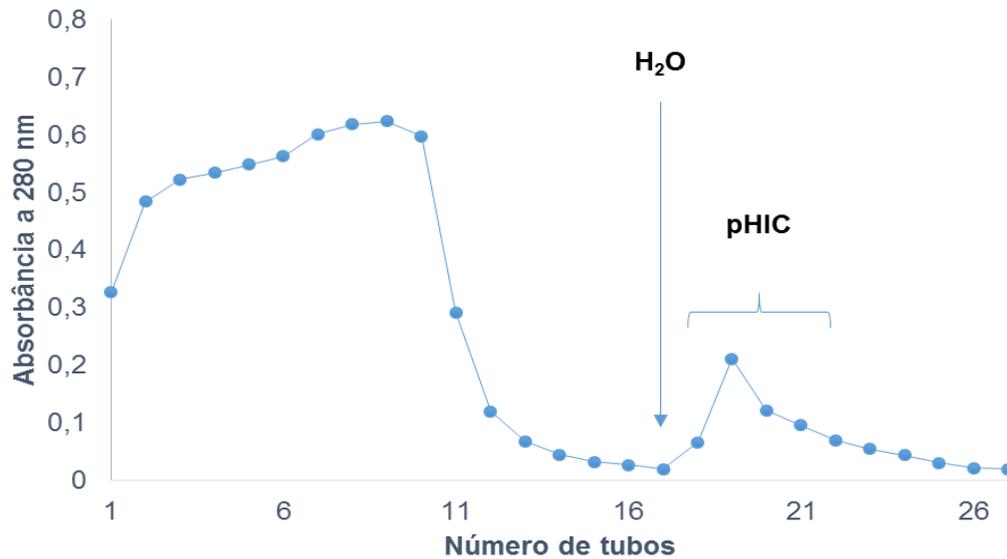
Tabela 1 – Atividade hemaglutinante do fluido celomático do ouriço-do-mar desafiado e não desafiado por bactérias.

Atividade hemaglutinante do ouriço-do-mar, <i>Echinometra lucunter</i>			
	[Proteína] mg/mL	U.H./mL	U.H./ mg
Fluido celomático + Bactérias	0,289	1024	3543
Fluido celomático	0,191	256	2561

Fonte: elaborado pelo autor.

A lectina presente no fluido de *E. lucunter*, denominada ELA (*E.lucunter agglutinin*), foi isolada a partir da combinação de cromatografia de interação hidrofóbica em matriz de fenil-Sepharose™ 4B e cromatografia de gel filtração em matriz BioSuite 250 SEC HR (0,78 x 0,30 cm), acoplada em um sistema Acquity UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, Waters Corp.).

Na cromatografia de interação hidrofóbica as amostras apresentaram perfil de eluição semelhantes. Após a eluição do material retido (pHIC), as frações coletadas que apresentaram atividade hemaglutinante foram reunidas, dialisadas, liofilizadas e armazenadas para os ensaios posteriores (Gráfico 1).

Gráfico 1- Cromatografia de Interação Hidrofóbica em Fenil-Sepharose 4B do extrato total de *Echinometra lucunter*

Fonte: elaborado pelo autor.

Foram aplicados 60 mL de extrato em matriz Fenil-Sepharose™ (1,0 cm x 8,0 cm), a mesma foi equilibrada e lavada com tampão Tris 20 mM, pH 7 contendo sulfato de amônio 0,5 M. As frações retidas foram eluídas com água destilada. O fluxo foi mantido em 3mL.min⁻¹ e frações de 2,5 mL foram coletadas.

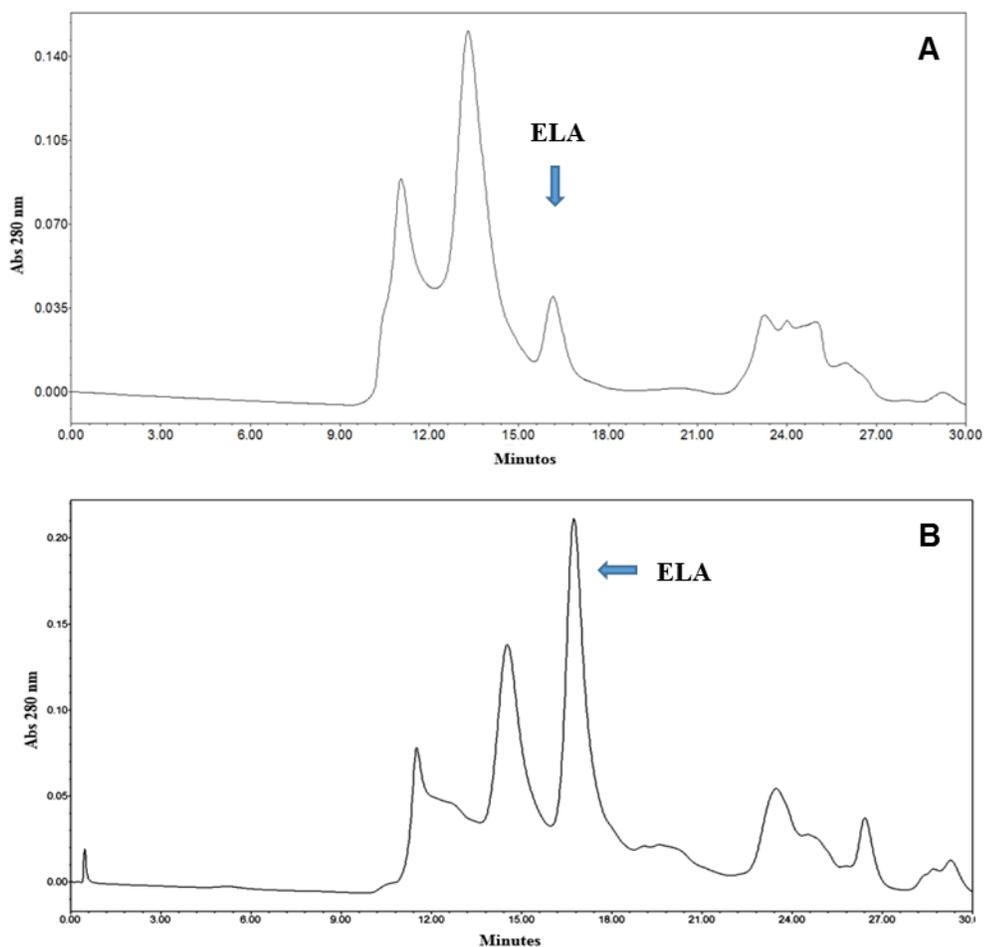
A segunda etapa cromatográfica foi realizada em coluna de gel filtração BioSuite 250 SEC HR (0,78 x 0,30 cm). Na fração do fluido não desafiado observou-se a presença de três picos, onde o terceiro representou a fração hemaglutinante contida no extrato (Gráfico 2A). Quando o fluido celomático desafiado foi utilizado, novamente três picos foram observados, sendo o terceiro (ELA) aumentado significativamente (Gráfico 2B).

3.2 Caracterização bioquímica

3.2.1 Atividade hemaglutinante

A lectina foi capaz de aglutinar eritrócitos humanos do sistema ABO tanto na forma nativa quanto quando tratados com enzimas proteolíticas. ELA apresentou maior atividade contra eritrócitos tratados com tripsina e pronase, mostrando melhor atividade hemaglutinante contra eritrócitos do sangue tipo B tratados com as mesmas enzimas. Em eritrócitos humanos em sua forma nativa, ELA apresentou melhor atividade contra eritrócitos do tipo O e A (Tabela 2).

Gráfico 2 – Cromatografia de gel filtração da fração retida (pHIC) do fluido celomático do ouriço-do-mar, *Echinometra lucunter*



Fonte: elaborado pelo autor.

A. pHIC do fluido de ouriços não desafiados. B. pHIC do fluido de ouriços desafiados. As cromatografias foram realizadas em coluna de gel filtração BioSuite 250 SEC HR (0,78 x 0,30 cm) equilibrada com tampão TBS/Ca²⁺. A cromatografia foi conduzida em TBS/Ca²⁺, o fluxo foi mantido em 0,4 mL.min⁻¹ e frações de 0,4 mL. min⁻¹.

Tabela 2 – Atividade hemaglutinate da ELA contra eritrócitos humanos em U.H./ml

Eritrócitos humanos	Nativos	Tratamento enzimático	
		Tripsina	Pronase
A	32	128	32
B	16	256	256
O	32	128	128

Fonte: elaborado pelo autor.

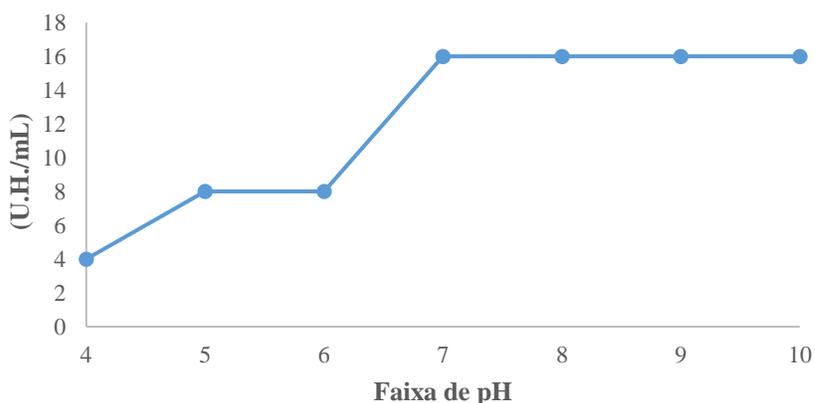
3.2.2 Inibição da atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante de ELA não foi inibida por qualquer dos monossacarídeos ou dissacarídeos testados, apenas pelas glicoproteínas mucina de estômago de porco tipo 2 (PSM-II) e mucina de estômago de porco tipo 3 (PSM-III), com uma mínima concentração inibitória (MIC) de $7,8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para ambas.

3.2.3 Efeito do pH, temperatura e EDTA

ELA mostrou atividade hemaglutinante entre pH 4 e 10, com seu ótimo entre pH 7 e 10. Em pH 4 a atividade apresentou o menor título de hemaglutinação, 4 U.H., enquanto que em pH 5 e 6 a atividade hemaglutinante foi de 8 U.H. (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Efeito do pH na atividade hemaglutinante

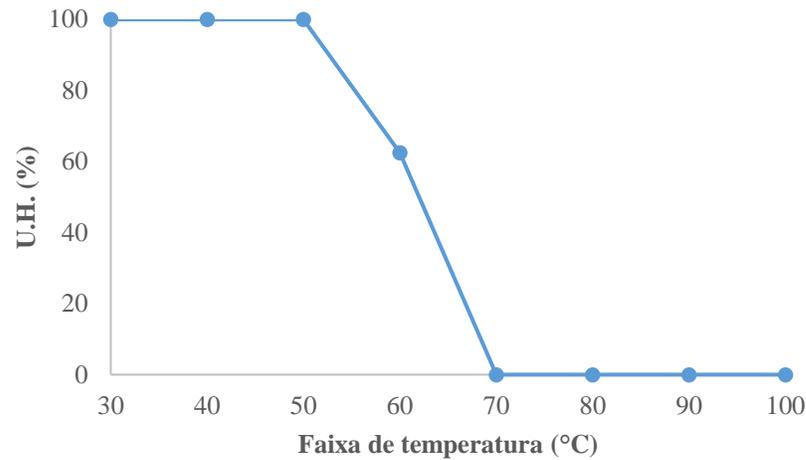


Fonte: elaborado pelo autor.

Atividade hemaglutinante frente a diferentes pH. Os tampões usados foram: acetato 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 150 mM.

No teste de termoestabilidade, ELA mostrou atividade ótima após ser aquecida por 1 hora, em temperatura de até $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. ELA teve sua atividade completamente perdida quando aquecida a uma temperatura de $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 1 hora (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante



Fonte: elaborado pelo autor.

Atividade hemaglutinante mensurada em diferentes temperaturas. ELA foi aquecida em 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 100 °C e posteriormente submetida a teste de atividade hemaglutinante.

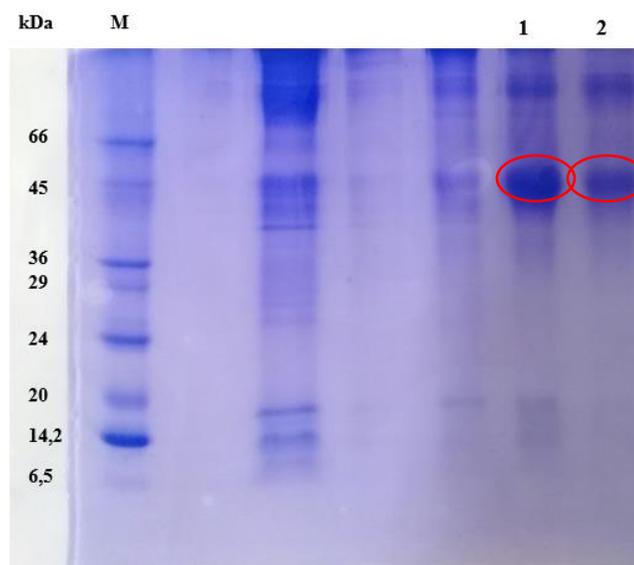
Ao avaliar o efeito da presença e ausência de íons divalentes na atividade hemaglutinante constatou-se que a lectina foi afetada pela presença ou ausência do íon Ca^{2+} testado, não sendo capaz de aglutinar eritrócitos de sangue humano na presença de EDTA.

3.2.4 Estimativa de massa molecular por eletroforese e exclusão molecular

Em SDS-PAGE, sob condições redutoras e não redutoras, ELA apresentou uma banda principal com uma massa de aproximadamente 45 kDa (Figura 3).

Em cromatografia de exclusão molecular em coluna BioSuite 250 SEC HR (0,78 cm x 0,30 cm, tamanho de partícula 5 μm) acoplada em sistema Acquity UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, Waters Corp.) a massa molecular de ELA foi estimada em 145 kDa (Gráfico 5).

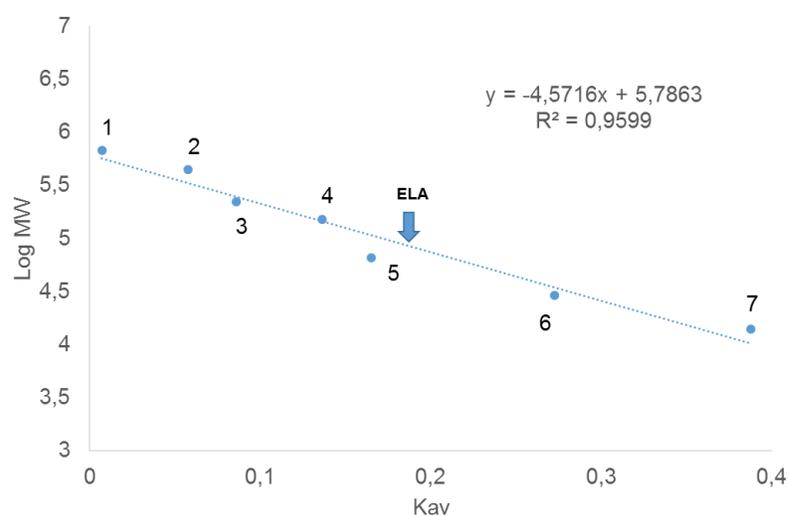
Figura 3 – Gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)



Fonte: elaborado pelo autor

SDS-PAGE, na ausência e na presença de β -mercaptanol, 12%. M) marcador M3913 – SigmaMarker - marcadores moleculares: Albumina (66 kDa), Ovalbumina (45 kDa), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36 kDa), Anidrase carbônica ((29 kDa), Tripsinogênio (24 kDa), Inibidor de tripsina (20 kDa), α -lactalbumina (14,2 kDa), Aprotinina (6,5 kDa); 1- ELA na ausência de β -mercaptoetanol; 2 – ELA na presença de β -mercaptoetanol.

Gráfico 5 – Estimativa da massa molecular em gel filtração



Fonte: elaborado pelo autor.

Curva de calibração onde, 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

Lectinas de ouriços-do-mar tem sido isoladas a partir da combinação de cromatografias. ELA foi isolada utilizando-se cromatografias de interação hidrofóbica e gel filtração, diferenciando-se de outras lectinas de equinodermos descritas na literatura. Por exemplo, a lectina MBL-SN (*Mannan-binding lectins from Strongylocentrotus nudus*) foi isolada a partir da combinação de cromatografia de troca iônica, afinidade e cromatografia de gel filtração (BULGAKOV *et al.*, 2013). *Echinonectin*, proteína dos ovos do ouriço *Lytechinus variegatus* foi purificada combinando-se cromatografias de afinidade e gel filtração (VENO; STRUMSKI e KINSEY, 1990). *Bindin*, lectina de adesão do esperma do ouriço *Strongylocentrotus purpuratus* foi isolada a partir da combinação de cromatografia de afinidade e gel filtração (GLABE *et al.*, 1982). A lectina PISL, *Paracentrotus lividus small lectin* foi isolada utilizando-se apenas cromatografia de troca iônica (DRAGO *et al.*, 2009). A *Echinoidin*, lectina do fluido celomático do ouriço *Anthocardaris crassispina* foi purificada combinando-se cromatografias de troca iônica e afinidade (GIGA; SUTOH E IKAI, 1985). ELEL, lectina dos ovos do ouriço *Echinometra lucunter* foi isolada utilizando-se cromatografia de afinidade (CARNEIRO *et al.*, 2015). SUEL (*sea urchin eggs lectin*), lectina dos ovos do ouriço *Anthocardaris crassispina*) foi purificada por meio de cromatografia de afinidade (SASAKI e AKETA, 1981).

No que se refere a caracterização bioquímica, ELA foi capaz de aglutinar eritrócitos do sistema ABO com preferência por sangue do tipo A e O nativos, porém quando tratados com enzimas proteolíticas, ELA apresentou maior afinidade por sangue do tipo B. Semelhante a ELA, a lectina MBL-SN foi capaz de aglutinar eritrócitos humanos do sistema ABO, porém frente ao sangue do tipo O, demonstrou melhores resultados de hemaglutinação tanto na forma nativa quanto tratado proteoliticamente (BULGAKOV *et al.*, 2013). A lectina *Bindin* também apresentou atividade hemaglutinante para eritrócitos humanos. A PISL e a *Echinoidin* aglutinaram eritrócitos humanos, porém não houve diferença no título de hemaglutinação entre os grupos sanguíneos (DRAGO *et al.*, 2009; GIGA; SUTOH E IKAI, 1985). ELEL foi capaz de aglutinar eritrócitos humanos e eritrócitos de coelho, tanto em suas formas nativas quanto tratados com tripsina (CARNEIRO *et al.*, 2015). A SUEL também apresentou a capacidade de aglutinar eritrócitos humanos (SASAKI e AKETA, 1981).

A atividade hemaglutinante de ELA foi inibida por mucinas de estômago de porco tipo 2 e 3 (PSM-II e PSM-III). Por outro lado, *Bindin* não foi inibida por mucina de estômago de porco, e sim por monossacarídeos como fucose, galactose e lactose (GLABE *et al.*, 1982). ELEL, MBL-SN, *Echinoidin* e SUEL também foram inibidas por monossacarídeos, mas não por mucina de estômago de porco. (CARNEIRO *et al.*, 2015; BULGAKOV *et al.*, 2013; GIGA; SUTOH E IKAI, 1985; SASAKI e AKETA, 1981).

A atividade hemaglutinante de ELA foi ótima em pH 7. Semelhante a ELA, MBL-SN apresenta atividade ótima em pH 7, abaixo de pH 5 tem sua atividade perdida e em pH 8 sua atividade é reduzida (BULGAKOV *et al.*, 2013). Tal fato pode ser explicado devido aos organismos marinhos viverem em um meio onde a faixa ótima de pH está no neutro-alcalino e suas funções fisiológicas dependerem do mesmo.

ELA apresentou atividade hemaglutinante estável em temperaturas de até 50 °C, sua atividade foi abolida a 70°C. ELA é menos termoestável que ELEL, pois ELEL mantém sua atividade total até 60 °C e é abolida somente a 100 °C (CARNEIRO *et al.*, 2015). MBL-SN mostra-se menos termoestável que a ELA, pois a medida em que a temperatura aumenta, sua atividade total diminui gradativamente perdendo-se completamente em temperatura acima de 50 °C (BULGAKOV *et al.*, 2013).

ELA mostrou-se ser dependente de íons divalentes, outras lectinas como MBL-SN e *Echinoidin* também possuem esta dependência, não sendo capazes de aglutinar eritrócitos na presença de uma agente quelante (BULGAKOV *et al.*, 2013; GIGA; SUTOH E IKAI, 1985). ELEL e PISL diferentemente de ELA, não dependem de íons divalentes (CARNEIRO *et al.*, 2015; DRAGO *et al.*, 2009).

Em SDS PAGE, ELA apresentou uma única banda de 45 kDa em condições redutoras e não redutoras e em exclusão molecular massa estimada em 145 kDa, sugerindo que ELA possui a estrutura molecular na forma de um trímero, unidos por interações fracas. A maioria das lectinas descritas na literatura que foram isoladas de equinodermos apresentam conformações de dímero unidos por pontes dissulfeto, incluindo ELEL, MBL-SN, *Echinonectin*, SUEL e *Echinoidin* (CARNEIRO *et al.*, 2015; BULGAKOV *et al.*, 2013; VENO; STRUMSKI e KINSEY, 1990; SASAKI e AKETA, 1981; GIGA; SUTOH E IKAI, 1985).

Com relação a indução bacteriana, ELA apresentou respostas relativas a presença de bactérias *S. aureus* e *E. coli* no fluido celomático. ELEL, que foi purificada a partir da mesma

espécie de ouriço-do-mar (*E. lucunter*) demonstrou ser capaz de aglutinar células bacterianas de *S. aureus* (CARNEIRO *et al.*, 2015). Assim como ELA, MBL-SN foi isolada do fluido celomático e mostrou fazer parte do sistema imunológico do mesmo, visto que reconhece carboidratos específicos da parede celular dos agentes patogênicos que o acometem (BULGAKOV *et al.*, 2013).

Estudos com indução bacteriana foram realizados com outras espécies de equinodermos, em pepinos-do-mar da espécie *Holothuria scabra*, foi isolada uma lectina denominada de HSL a partir da indução ao desafio bacteriano, HSL demonstrou estar diretamente ligada ao sistema de defesa dos pepinos-do-mar, visto que sua expressão aumenta no fluido celomático quando há bactérias presentes no mesmo (GOWDA; GOSWAMI e KHAN, 2008).

5 CONCLUSÃO

Uma nova lectina presente no fluido celomático do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*, denominada de ELA (*Echinometra lucunter agglutinin*), foi purificada por combinação de cromatografia de interação hidrofóbica e cromatografia de exclusão molecular. ELA foi caracterizada bioquimicamente. A nova proteína possui especificidade para eritrócitos humanos tratados com enzimas proteolíticas e mostrou atividade estável em pH neutro-alkalino e em temperaturas até 50 °C. ELA mostrou-se ser dependente de cálcio, não sendo capaz de aglutinar eritrócitos na presença de EDTA. Em SDS-PAGE, teve sua massa estimada em condições redutoras de 45 kDa, em exclusão molecular teve seu peso molecular estimado em 145 kDa. Estudos sobre sua estrutura primária, sequenciamento e ensaios biológicos devem ser conduzidos para avaliar o potencial biotecnológico da mesma e sua possível aplicação na área de antibacterianos.

REFERÊNCIAS

- 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, USA**, v. 54, p. 396-399, 1965.
- BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science, USA**, v. 119, p. 419, 1954.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrates**. 2. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2003.
- BULGAKOV, A. A.; ELISEIKINA, M. G.; KOVALCHUK, S. N.; PETROVA, I. Y.; LIKHATSKAYA, G. N.; SHAMSHURINA, E. V.; RASSKAZOV, V. A. Mannan-binding lectin of the sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. **Marine biotechnology**, v. 15, p. 73-86, 2013.
- CARNEIRO, R. F.; TORRES, R. C. F.; CHAVES, R. P.; DE VASCONCELOS, M. A.; DE SOUSA, B. L.; GOVEIA, A. C. R.; TEIXEIRA, E. H. (2017). Purification, biochemical characterization, and amino acid sequence of a novel type of lectin from *Aplysia dactylomela* eggs with antibacterial/antibiofilm potential. **Marine biotechnology**, v. 19, p. 49-64, 2017.
- CARNEIRO, R. F.; TEIXEIRA, C. S.; MELO, A. A.; ALMEIDA, A. S.; CAVADA, B. S.; SOUSA, O. V.; DA ROCHA, B. A. M.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A.H. L-rhamnose-binding lectin from eggs of the *Echinometra lucunter*: Amino acid sequence and molecular modeling. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 78, p. 180–188, 2015.
- CERVELLO, M. *et al.* Properties of sea urchin coelomocyte agglutinins. **Italian journal of zoology**, v. 63, n. 4, p. 353-356, 1996.
- COOPER, M. D.; ALDER, M. N. The evolution of adaptive immune systems. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 815-822, 2006.
- DHUNA, V.; BAINS, J. S.; KAMBOJ, S. S.; SINGH, J.; SAXENA, A. K. Purification and characterization of a lectin from *Arisaema tortuosum* Schott having in-vitro anticancer activity against human cancer cell lines. **Journal of biochemistry and molecular biology**, v. 38, p. 526, 2005.
- DRAGO, F.; MALAGOLI, D.; PEZZINO, F. M.; D'URSO, V.; SAMMARTANO, F. Presence of a low molecular weight lectin in the coelomic fluid of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. **Inv Surv Journal**, v. 6, p. 15-20, 2009.
- GIGA, Y.; SUTOH, K.; IKAI, A. A new multimeric hemagglutinin from the coelomic fluid of the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. **Biochemistry**, v. 24, n. 16, p. 4461-4467, 1985.

GLABE, C. G.; GRABEL, L. B.; VACQUIER, V. D.; ROSEN, S. D. Carbohydrate specificity of sea urchin sperm binding: a cell surface lectin mediating sperm-egg adhesion. **The Journal of cell biology**, v. 94, p. 123-128, 1982.

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.

HAMMARSTROM, S.; KABAT, E. A. Purification and characterization of a blood-group A reactive hemagglutinin from the snail *Helix pomatia* and a study of its combining site. **Biochemistry**, United Kingdom, v. 8, p. 2696-2705, 1969.

HAUG, T. *et al.* Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 81, n. 2, p. 94-102, 2002.

HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Princípios Integrados de Zoologia**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 846, 2004.

KAMIYA, H., MURAMOTO, K.; GOTO, R.; SAKAI, M. Lectins in the hemolymph of a starfish, *Asterina pectinifera*: purification and characterization. **Developmental and Comparative Immunology**, Vol. 16, pp. 243-250, 1992.

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

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

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

LAPORT, M. S.; SANTOS, O. C. S.; MURICY, G. Marine sponges: potential sources of new antimicrobial drugs. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 86-105, 2009.

LAVANYA, V.; MOHAMED ADIL, A. A.; AHMED, N.; JAMAL, S. Lectins and Onco therapy. **Oncobiology and Targets**, 2014.

LI, H. *et al.* Expression of antimicrobial peptides in coelomocytes and embryos of the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). **Developmental & comparative immunology**, v. 43, n. 1, p. 106-113, 2014.

MAJESKE, A. J.; BAYNE, C. J.; SMITH, L. C. Aggregation of sea urchin phagocytes is augmented in vitro by lipopolysaccharide. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61419, 2013.

MARCHALONIS, J. J.; EDELMAN, G. M. Isolation and characterization of a hemagglutinin from *Limulus polyphemus*. **Journal of molecular biology**, v. 32, n. 2, p. 453-465, 1968.

MELO, A. A.; CARNEIRO, R. F.; SILVA, W. M.; MOURA, R. M.; SILVA, G. C.; SOUSA, O.V.; SABOYA, J. P. S.; NASCIMENTO, K. S.; SAKER-SAMPAIO, S.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H. HGA-2, a novel galactoside-binding lectin from the sea cucumber *Holothuria grisea* binds to bacterial cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 435-442, 2014.

NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in culture of animal and human leukocytes. **Cancer Res.**, USA, v. 20, 462-466, 1960.

RUPPERT, E. E.; FOX, R.S.; BARNES R.D. **Zoologia dos invertebrados**: uma abordagem evolutiva. 7. Ed. São Paulo; Roca, 2005.

SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J. A galactose specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, Netherlands, v. 48, 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 plumosa*. **Journal of Applied Phycology**, Netherlands, v. 14, p.489-495, 2002.

SASAKI, H.; AKETA, K. Purification and distribution of a lectin in sea urchin (*Anthocidaris crassispina*) egg before and after fertilization. **Experimental cell research**, v. 135, n. 1, p. 15-19, 1981.

SHARON, N. Lectins: past, present and future1. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, n. 6, p. 1457, 2008.

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

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

VENO, P. A.; STRUMSKI, M. A.; KINSEY, W. H. Purification and Characterization of Echinonectin, a Carbohydrate-Binding Protein from Sea Urchin Eggs. **Development, growth & differentiation**, v. 32, n. 3, p. 315-319, 1990.