



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA**

RENATO CÉZAR FARIAS TORRES

**DETECÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE EM ESPONJAS MARINHAS
DO LITORAL CEARENSE E PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA DE LECTINAS DAS ESPONJAS MARINHAS *Callyspongia vaginalis* e
*Aplysina fulva***

**FORTALEZA
2020**

RENATO CÉZAR FARIAS TORRES

DETECÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE EM ESPONJAS MARINHAS DO
LITORAL CEARENSE E PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
LECTINAS DAS ESPONJAS MARINHAS *Callyspongia vaginalis* E *Aplysina fulva*

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio

Coorientador: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro

FORTALEZA

2020

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)

T648d Torres, Renato César Farias Torres.

Detecção da atividade hemaglutinante em esponjas marinhas do litoral cearense e purificação e caracterização bioquímica de lectinas das esponjas marinhas *Callyspongia vaginalis* e *Aplysina fulva* / Renato César Farias Torres Torres. – 2020.

58 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.

Coorientação: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.

1. Porífera. 2. Lectina. 3. Purificação. I. Título.

CDD 639.2

RENATO CÉZAR FARIAS TORRES

DETECÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE EM ESPONJAS MARINHAS DO
LITORAL CEARENSE E PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
LECTINAS DAS ESPONJAS MARINHAS *Callyspongia vaginalis* E *Aplysina fulva*

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca.

Aprovada em: ____/____/2020.

BANCA EXAMINADORA

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

Dra. Renata Pinheiro Chaves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus e à minha família, por me guiarem e me auxiliarem nos momentos mais difíceis dessa caminhada. Em especial, minha mãe Fátima e minha irmã Renata que sempre estiveram ao meu lado de forma incondicional.

Ao meu professor e orientador Alexandre Holanda Sampaio, pela oportunidade e confiança ao desempenho do papel como aluno de mestrado. Pela inspiração e o exemplo a ser seguido como pessoa e acadêmico.

Ao meu coorientador, chefe e amigo, Rômulo Farias Carneiro, pela oportunidade, pela confiança e por muitas vezes a paciência. Eu sei que não é fácil, então, obrigado pelos ensinamentos, orientações e conselhos na vida acadêmica e pessoal.

Ao meu professor, Celso Shiniti Nagano, pelas orientações na vida acadêmica e vida pessoal. Pela a contribuição em ensinamentos de vida, conselhos, gargalhadas nas horas vagas e amizade.

À amiga, Renata Pinheiro, pela amizade, conselhos e por ter contribuído em minha formação acadêmica e pessoal.

Ao parceiro e amigo, Regivânio, que esteve presente ao longo de parte da minha vida acadêmica e pessoal. Às tantas discussões saudáveis sobre resultados de pesquisa, às risadas em momentos de piada e à amizade.

Ao parceiro e amigo, Carlos David, pela presença e pelas conversas no tempo vago, pelo riso e algumas histórias compartilhadas em alguns anos de amizade.

Aos amigos e companheiros de bancada, que compartilharam comigo histórias, alegrias e sorrisos, Andressa, Philippe, Victória Regia, Pedro Arthur, Juliana e a todos os colegas que estavam ou ainda estão presentes no dia-a-dia.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

À Capes, pelo financiamento deste trabalho. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Mostro um trecho, uma passagem de um livro antigo para te provar que a vida é linda. Dura, sofrida, carente em qualquer continente, mas boa de se viver em qualquer lugar. A fé na vitória tem que ser inabalável. (O Rappa)

RESUMO

As esponjas pertencem ao filo Porífera e são organismos multicelulares constituídos de células embebidas em uma matriz gelatinosa e enrijecidas por um esqueleto de espículas de carbonato de cálcio ou sílica e colágeno. O interesse nesse filo é inerente aos trabalhos relatados que mostram amplo potencial biotecnológico de macromoléculas com propriedades interessantes, mostrando atividade contra doenças e alguns patógenos, e possivelmente capazes de desempenhar o papel de ferramenta biomédica, como as lectinas. Lectinas são proteínas capazes de se ligarem reversivelmente a carboidratos específicos, sem que causem alterações estruturais nos mesmos. Estas proteínas são capazes de atuar como moléculas de reconhecimento no interior das células, superfícies celulares e fluidos fisiológicos. Em esponjas marinhas, as lectinas podem desempenhar uma variedade de funções, incluindo interação celular, espiculogênese e defesa. O objetivo deste trabalho foi detectar a atividade hemaglutinante em extratos proteicos de esponjas marinhas e purificar e caracterizar lectinas presentes nas esponjas marinhas *Callyspongia vaginalis* e *Aplysina fulva*. Os extratos das 11 espécies testadas apresentaram atividade hemaglutinante e hemolítica contra eritrócitos humanos e de coelho. Denominada de CvP (*Callyspongia vaginalis Protein*), a lectina de *C. vaginalis* foi isolada a partir de combinações cromatográficas de troca iônica em matriz de DEAE-sephacel e DEAE-FF. Esta proteína é composta de três cadeias polipeptídicas ligadas à um cromóforo com absorção a 600 nm. CvP compartilha alta similaridade de sequência com H-3, lectina isolada de *Haliclona caerulea*. Entretanto, CvP não apresentou atividade hemaglutinante, sendo assim, ela foi considerada uma *lectin-like*. AFL (*Aplysina fulva Lectin*), isolada de *A. fulva*, foi purificada através de precipitação com sulfato de amônio seguida de cromatografia de afinidade em matriz de Sepharose 4B. A nova lectina é um dímero de 30 kDa, formado por duas subunidades iguais de 15 kDa ligadas por pontes dissulfeto. Sua atividade hemaglutinante foi estável em pH neutro-alcálico e em temperaturas abaixo de 60°C. A atividade de AFL foi inibida pela glicoproteína mucina de estômago de porco. AFL mostrou potencial na redução dos biofilmes das cepas bacteriana de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*, sendo capaz de desempenhar papel antibacteriano. Assim, duas novas proteínas foram isoladas e caracterizadas bioquimicamente e os resultados apresentados acima servirão como base de aplicação biotecnológica em modelos biológicos diversos.

Palavras Chaves: Porífera. Lectina. Purificação

ABSTRACT

The sponges belong to the phylum Porifera and are multicellular organisms made up of cells embedded in a gelatinous matrix and stiffened by a skeleton of spicules of calcium carbonate or silica and collagen. The interest in this phylum is inherent in the studies reported that show broad biotechnological potential of macromolecules with interesting properties, showing activity against diseases and some pathogens, and possibly capable of playing the role of a biomedical tool, such as lectins. Lectins are proteins capable of reversibly binding to specific carbohydrates, without causing structural changes in them. These proteins are able to act as recognition molecules inside cells, cell surfaces and physiological fluids. In marine sponges, lectins can perform a variety of functions, including cell interaction, spiculogenesis and defense. The aim of this work was to detect hemagglutinating activity in protein extracts from marine sponges and to purify and characterize lectins present in marine sponges *Callyspongia vaginalis* and *Aplysina fulva*. The extracts of the 11 species tested showed hemagglutinating and hemolytic activity against human and rabbit erythrocytes. Called CvP (*Callyspongia vaginalis Protein*), the *C. vaginalis* lectin was isolated from chromatographic combinations of ion exchange in DEAE-sephacel and DEAE-FF matrix. This protein is composed of three polypeptide chains linked to a chromophore with absorption at 600 nm. CvP shares high sequence similarity with H-3, lectin isolated from *Haliclona caerulea*. However, CvP did not show hemagglutinating activity, so it was considered a lectin-like activity. AFL (*Aplysina fulva Lectin*), isolated from *A. fulva*, was purified by precipitation with ammonium sulfate followed by affinity chromatography on Sepharose 4B matrix. The new lectin is a 30 kDa dimer, formed by two equal 15 kDa subunits linked by disulfide bridges. Its hemagglutinating activity was stable at neutral-alkaline pH and at temperatures below 60°C. AFL activity was inhibited by pig stomach mucin glycoprotein. AFL showed potential in reducing the biofilms of the bacterial strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli*, being able to play an antibacterial role. Thus, two new proteins were isolated and biochemically characterized and the results presented above will serve as a basis for biotechnological application in different biological models.

Key-words: Porifera. Lectin. Purification

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel do extrato de <i>Callyspongia vaginalis</i>	31
Figura 2 -	Cromatografia de troca iônica em DEAE-FF do p2 de <i>Callyspongia vaginalis</i>	32
Figura 3 -	Eletroforese de CvP em gel de poliacrilamida a 15% (PAGE)	33
Figura 4 -	Cromatografia de Afinidade em Sepharose 4B da fração 0-70 de sulfato de amônio do extrato de <i>Aplysina fulva</i>	34
Figura 5 -	Eletroforese de AFL em gel de poliacrilamida a 15% (PAGE)	35
Figura 6 -	Efeito do pH na atividade hemaglutinante de AFL	37
Figura 7 -	Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante de AFL	38
Figura 8 -	Cromatografia de Exclusão Molecular a 280 nm de CvP	40
Figura 9 -	Cromatografia de Exclusão Molecular a 600 nm de CvP	41
Figura 10 -	Cromatografia de Exclusão Molecular de AFL	42
Figura 11 -	Determinação da massa molecular de AFL por MALDI-ToF	43
Figura 12 -	Mapa peptídico da <i>lectin-like</i> de <i>Callyspongia vaginalis</i> (CvP)	45
Figura 13 -	Alinhamento da estrutura de CvP, parcialmente obtida por MS/MS, com uma lectina da esponja marinha <i>Haliclona caerulea</i> .	45
Figura 14 -	Espectro de dicroísmo circular de CVP	48
Figura 15 -	Espectro de dicroísmo circular de CVP em diferentes temperaturas	49
Figura 16 -	Curva de regressão da <i>Temperatura de Melting</i> de CvP em diferentes temperaturas	50
Figura 17 -	Espectro de dicroísmo circular de AFL em diferentes temperaturas	51
Figura 18 -	Espectro de dicroísmo circular de AFL em diferentes pH	51
Figura 19 -	Efeitos de AFL na formação do biofilme bacteriano	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Famílias de lectinas e principais funções	17
Tabela 2 -	Detecção de atividade hemaglutinante/hemolítica de extratos aquosos de esponjas marinhas coletadas no litoral do Ceará	29
Tabela 3 -	Purificação da lectina presente no extrato da esponja marinha <i>Aplysina fulva</i>	33
Tabela 4 -	Inibição da atividade hemaglutinante de AFL por açúcares e glicoproteínas	49
Tabela 5 -	Sequência de peptídeos obtidos por digestão com tripsina e quimotripsina da lectin-like de <i>Callyspongia vaginalis</i> (CvP)	44
Tabela 6 -	Sequência interna de peptídeos obtidos por digestão trípica da lectina de <i>Aplysina fulva</i> (AFL)	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Esponjas	12
<i>1.1.2</i>	<i>Classe Desmospongiae</i>	12
1.2	Lectinas	14
<i>1.2.1</i>	<i>Definição</i>	14
<i>1.2.2</i>	<i>Lectinas animais</i>	15
<i>1.2.3</i>	<i>Lectinas em esponjas</i>	17
2	OBJETIVOS	19
3	METODOLOGIA	20
3.1	Coleta das esponjas	20
3.2	Preparos dos extratos	20
3.3	Avaliação da atividade hemaglutinante e hemolítica dos extratos	20
3.4	Purificação das proteínas	21
<i>3.4.1</i>	<i>Purificação da proteína pigmento de <i>Callyspongia vaginalis</i></i>	21
<i>3.4.2</i>	<i>Purificação da lectina de <i>Aplysina fulva</i></i>	22
3.5	Avaliação da atividade hemaglutinante e inibição por carboidratos	22
3.6	Estimativa da massa molecular	23
3.7	Determinação da massa molecular	24
3.8	Determinação da sequência N-terminal	25
3.9	Determinação das sequências internas das proteínas isoladas	25
3.10	Dicroísmo Circular	26
3.11	Avaliação do potencial antibacteriano e antibiofilme	27
<i>3.11.1</i>	<i>Cepas bacterianas e condições de cultura</i>	27
<i>3.11.2</i>	<i>Efeito de AFL sobre células <i>plactônicas</i></i>	27
<i>3.11.3</i>	<i>Ensaio de formação de biofilme</i>	27
<i>3.11.3.1</i>	<i>Quantificação da massa de biofilme</i>	28
<i>3.11.3.2</i>	<i>Quantificação do número de células viáveis do biofilme</i>	28
<i>3.11.3.3</i>	<i>Análise estatística</i>	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1	Coleta das esponjas	29
4.2	Purificação	31

4.2.1	<i>Purificação da proteína pigmento de Callyspongia vaginalis</i>	31
4.2.2	<i>Purificação da lectina de Aplysina fulva</i>	34
4.3	Atividade hemaglutinante	36
4.4	Estimativa de massa molecular	40
4.5	Determinação de massa molecular média	42
4.6	Determinação das sequências internas de CvP	44
4.7	N-terminal e sequências internas de AFL	46
4.8	Dicroísmo Circular	48
4.9	Atividade antibacteriana e antibiofilme de AFL	52
5	CONCLUSÃO	54
6	REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 Esponjas

As esponjas pertencem ao filo Porifera (do latim *porus*, poro + *fera*, portador de). Esponjas são organismo multicelulares, constituídos de células embebidas em uma matriz gelatinosa e enrijecidas por um esqueleto de espículas diminutas de carbonato de cálcio ou sílica e colágeno. Esses organismos não possuem órgão ou tecido verdadeiros, também não possuem sistema nervoso e até mesmo suas células mostram um certo grau de independência coanócitos (HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2004; PECHENIK, 2016).

Esses organismos possuem um grande número de poros e canais que constituem um sistema de filtragem de água. Esses animais dependem de correntes de água passando pelo seu sistema de canais para trazer alimento e oxigênio, para levar para o exterior seus dejetos corpóreos, para a realização de trocas gasosas, bem como para disseminação e coleta de espermatozoides. Em sua forma mais simples, uma esponja é uma bolsa perfurada, suficientemente rígida, cuja superfície interna é revestida com células flageladas. O espaço vazio dentro dessa bolsa é chamado de espongiocele. As células flageladas que revestem a espongiocele são denominadas coanócitos (HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2004; PECHENIK, 2016). A água flui para a espongiocele através de aberturas estreitas chamadas de ostíolos e sai dele através de aberturas mais largas denominada de ósculos (PECHENIK, 2016).

As esponjas variam em tamanho desde alguns milímetros até metros e grandes esponjas podem alcançar mais de 2 metros de diâmetro. Esses animais podem ter cores variadas podendo mesmo apresentar colorações vermelhas, amarelas, laranjas, verdes e púrpuras (HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2004).

As larvas são de forma livre e nadante, mas os organismos adultos são sempre fixos em rochas, conchas, corais ou objetos submersos. Seu padrão de crescimento depende frequentemente da forma do substrato, direção e velocidade das correntes, e da disponibilidade de espaço, de tal modo que sob condições ambientais diferentes, a mesma espécie pode também diferir de forma marcante em sua aparência (HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2004).

1.1.2. Classe *Demospongiae*

A classe *Demospongiae* contém mais de 90% de todas as espécies de esponjas existentes, abrangendo todas as espécies de água doce. Os elementos de sustentação são

compostos por sílica, espongina ou ambas, aparentemente junto com quitina. Todos os membros são de construção leuconóide, ou seja, um sistema aquífero no qual os coanócitos estão restritos a câmaras discretas, dispersos no meso-hilo, interligadas com os poros e ósculos através de canais inalantes e exalantes. As espécies leuconóides exibem uma diversidade de formas: fina e incrustante, ereta e ramificada, multilobada, esférica, tubular, e um único indivíduo pode apresentar mais de 2 m de diâmetro. Existem 65 famílias, contendo cerca de 7 mil espécies (PECHENIK, 2016).

O gênero *Callyspongia* está presente nessa classe e as espécies deste grupo são comuns em zonas tropicais rasas. As espécies podem ser eretas, incrustantes, ramificadas, tubulares ou em forma de vaso; algumas são compactas (PECHENIK, 2016).

O interesse nesse gênero é inerente aos trabalhos que mostram amplo potencial biotecnológico. Ibrahim *et al.*, 2010 mostraram que peptídeos de *C. aerizusa* mostraram atividade citotóxica contra células de câncer de diferentes linhagens. Além disso, um peptídeo também foi capaz de exibir atividade inibitória significativa contra *Candida albicans*. Daletos *et al.*, 2015 relatam atividade antimicrobiana significativa de um peptídeo da mesma espécie contra *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador da tuberculose. Mebs *et al.*, 1997 isolaram uma metaloprotease capaz de hidrolisar caseína e arginina, apresentando especificidade de substrato semelhante à tripsina.

Um composto natural, o Geliusterol E, pertencente a classe dos esteróis, isolado de *C. aff. implexa* foi capaz de inibir o crescimento da bactéria patogênica *Chlamydia trachomatis* (ABDELMOHSEN *et al.*, 2015). Outro metabólito, o álcool bisacetilênico C-20, isolado de *Callyspongia* sp. exibiu a capacidade de inibir a linfangiogênese, podendo ser uma maneira eficaz de reduzir a proliferação de linfomas (SHIROUZU *et al.*, 2013). Além disso, metabólitos dos extratos de *Callyspongia* sp., as callyspongisines A-D, pertencentes a classe dos alcaloides, exibiram atividade inibitória contra enzimas quinase relacionadas a doenças neurodegenerativas (PLISSON *et al.*, 2014).

O gênero *Aplysina* também está presente nessa classe e as espécies deste grupo são comuns em zonas tropicais e subtropicais. Possuem formas variadas e podem ser eretas, ramificadas, tubulares e em forma de vaso (PINHEIRO; HAJDU; CUSTÓDIO, 2007).

Esse gênero mostra amplo potencial como ferramenta biomédica no combate a cepas bacterianas, podendo auxiliar na ação de antibióticos. Lectinas isoladas de *Aplysina lactuca* e *A. lacunosa* mostraram atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* (CARNEIRO *et al.*, 2017; DRESCH *et al.*, 2005; KAZANJIAN; FARIÑAS, 2006).

Assim, o estudo dessas biomoléculas extraídas de esponjas marinhas dos gêneros *Callyspongia* e de *Aplysina* mostram a importância desses gêneros de esponjas frente às inúmeras aplicações biomédicas apresentadas. A característica brevemente apresentada de que lectinas são capazes de reconhecer carboidratos presentes na parede celular de bactérias pode sinalizar a utilização dessas proteínas como ferramentas biomédica de combate à patógenos, por exemplo.

1.2 Lectinas

1.2.1 Definição

A ocorrência na natureza de proteínas aglutinantes de eritrócitos tem sido relatada desde o final do século XIX. Essas proteínas foram referidas como hemaglutininas ou fitohemaglutininas, já que eram, geralmente, detectadas em extratos de plantas (SHARON; LIS, 2004).

Em 1954 Boyd e Shapleigh denominaram de lectinas (do latim *legere*, escolher, selecionar, optar) as proteínas aglutinantes capazes de reconhecer especificamente carboidratos e distinguir diferentes tipos sanguíneos. Esse termo foi generalizado para todas as aglutininas específicas a carboidratos, de origem não imune (SHARON; LIS, 1972). Assim, a forma mais simples de detectar lectinas em extratos de material biológico é examinando a habilidade de aglutinação de eritrócitos (SHARON; LIS, 2003).

Sampaio *et al.*, 2002 definiram lectinas como “proteínas capazes de se ligarem reversivelmente a carboidratos específicos, sem que causem alterações estruturais nos mesmos”. As lectinas estão bem distribuídas na natureza podendo ser encontradas em plantas, algas, fungos, animais (vertebrados e invertebrados) e vírus.

Estas proteínas são capazes de atuar como moléculas de reconhecimento no interior das células, superfícies celulares e fluidos fisiológicos. Devido à capacidade de decifrar o glicocódigo, as lectinas podem ser utilizadas numa variedade de estudos biotecnológicos incluindo pesquisa sobre o câncer e imunologia (SHARON; LIS, 2004).

O interesse nas lectinas foi amplamente estimulado pela demonstração de que são ferramentas valiosas para a detecção, isolamento e caracterização de glicoconjugados, principalmente de glicoproteínas, para histoquímica de células e tecidos e para o exame de alterações que ocorrem nas superfícies celulares durante processos fisiológicos patológicos, da diferenciação celular ao câncer (SHARON; LIS, 2004). Lectinas tem apresentado uma

diversidade de atividades biológicas, tais como inseticida, antitumoral, imunomodulatória, anti-inflamatória, antinociceptiva, antimicrobiana, antiviral e aplicações terapêuticas como, reestruturação epitelial através da produção de queratina, dentre outras (HAMID, *et al.*, 2013; CHEUNG *et al.*, 2015).

1.2.2 *Lectinas animais*

Em animais, lectinas são responsáveis por mediar interações entre células, entre células e a matriz extracelular reconhecendo carboidratos codificados em glicoproteínas ou glicolipídios presentes na superfície celular. Assim, essas proteínas podem estar envolvidas em papéis biológicos de tráfego intracelular, dobramento de outras proteínas, sinalização celular e imunidade (VASTA; AHMED, 2008).

Apesar de lectinas desempenharem diversas funções, sabe-se que o principal papel biológico dessas moléculas em animais está relacionado a imunidade. Essas aglutininas podem desempenhar defesa direta, reconhecimento e tráfego dentro do sistema imunológico, regulação imune e prevenção de autoimunidade (KILPATRICK, 2002).

A lectina de *Helix pomatia*, por exemplo, parece estar associada a aglutinação de patógenos (SANCHEZ *et al.*, 2006). Em crustáceos, diversas lectinas têm sua expressão alterada mediante infecções virais ou bacterianas, funcionando por vezes como opsoninas (ZHANG *et al.*, 2013). Estas lectinas, em geral, são específicas ao ácido siálico, um carboidrato componente da parede bacteriana e que não é produzido por crustáceos (UTARABHAND *et al.*, 2017). Tal especificidade evidencia a função destas lectinas como proteínas de reconhecimento de padrões (PRP) capazes de detectar padrões moleculares associados a patógenos (PMAPs).

Lectinas também parecem estar envolvidas na embriogênese, como evidenciado em fêmeas de *Fenneropenaeus merguensis*, onde uma lectina teve sua expressão aumentada de acordo o avanço da maturação gonadal (UTARABHAND *et al.*, 2017). Nos casos do aracnídeo *Tachypleus tridentatus* e do molusco *Aplysia kurodoi*, as lectinas estão presentes nos ovos e parecem também estarem relacionadas ao desenvolvimento das larvas (MOTOHASHI *et al.*, 2017; NAGAI *et al.*, 1999).

A identificação de uma lectina presente nos nematocistos de cnidário *Sinularia lochmodes* e na superfície celular do dinoflagelado *Symbiodinium* sp. evidencia uma função de mediação entre o hospedeiro e seu simbiote. Neste caso, a lectina poderia estar envolvida

inclusive na mudança morfológica das células do dinoflagelado, do estágio de vida livre para o estágio endossimbiótico (JIMBO *et al.*, 2000; KITA *et al.*, 2015).

De uma maneira geral, a função das lectinas está intimamente ligada à sua estrutura, portanto há um constante esforço de catalogar estas proteínas quanto a seus aspectos estruturais.

Inicialmente, essas proteínas foram classificadas em duas grandes famílias: tipo C e tipo S, com base na sequência de aminoácidos dos domínios de ligação que requeriam cálcio ou um grupo tiol, respectivamente, para exibirem atividade (IWAKI *et al.*, 1999).

A família de lectinas do tipo C é a mais abundante em animais, pode ser dividida em subfamílias e possui uma diversidade de funções biológicas, atuando no sistema imune inato e sendo capazes de eliminar patógenos ou mesmo auxiliar na fagocitose realizada por células dendríticas ou macrófagos. Lectinas do tipo C também podem atuar no sistema imune adaptativo ativando respostas imune específica de linfócitos T. Em peixes, essas proteínas podem desempenhar papel de defesa imunológica, como demonstrado na corvina amarela *Larimichthys crocea*, cuja lectina é expressa diferencialmente frente ao desafio com bactérias patogênicas (AO *et al.*, 2015; GHAZARIAN *et al.*, 2011)

A família das galectinas (tipo S) também está envolvida em uma ampla variedade de papéis biológicos e podem estar envolvidas, por exemplo, na transmissão de sinais celulares através da interação lectina-carboidrato, reconhecendo glicoproteínas e glicolipídios presentes nas superfícies das células. Em peixes, galectinas podem estar envolvidas também com o sistema imune (ARASU *et al.*, 2017; GHAZARIAN *et al.*, 2011).

Atualmente, sabe-se que há pelo menos 19 famílias de lectinas identificadas (Tabela 1), as quais são classificadas por sua estrutura primária, especificidade à carboidratos e função (CARNEIRO, 2013).

Tabela 1 - Famílias de lectinas e principais funções

Família de Lectinas	Ligante	Função
Anexinas	Glicosaminoglicano; heparina	Inibição de fosfolipase, coagulação sanguínea, tráfego de membrana, ligação a proteínas do citoesqueleto, atividade de canal de membrana, sinalização intracelular
Canelxina e Calreticulina	Glc ₁ Man ₉ GlcNAc ₂	Asseguram a dobragem adequada de proteínas recém-sintetizadas
Ficolinas	ManNAc;GlcNAc; GalNAc	Sistema imune inato
Kaliklektinas	Manose	Protease serínica
Lectinas do tipo C	Manose/glicose ou galactose e derivados	Adesão celular, sistema imune inato, proteína surfactante, opsonização
Lectinas do tipo F	Fucose	Função intra e extracelular, secreção de glicoproteínas, interação célula-célula, sinalização, transporte
Lectinas do tipo F-box	GlcNAc	Reconhecimento de proteínas mal enoveladas
Lectinas do tipo H	Galactose	Adesão celular, Reconhecimento <i>self/non-self</i> de células

Lectinas do tipo I (Siglecs)	Ácido siálico	Inibidores de Sinalização, Infecção, adesão celular
Lectinas do tipo L		Tráfego e secreção de glicoproteínas
Lectinas do tipo M	Glicanos de manose	Degradação de glicoproteínas malformadas
Lectinas do tipo P	Manose-6-fosfato	Papel essencial na formação de lisossomos funcionais, tráfego de glicoproteínas
Lectinas do tipo Quitinase	Quito oligossacarídeo	Expressa na musculatura lisa, condrócitos, neutrófilos, macrófagos
Lectinas do tipo R	GalNAc, lactose, lactulose	-
Lectinas do tipo S (Galectinas)	B-Galactosídeos	Atividade anti-apoptótica, atividade apoptótica, <i>Splicing</i> doRNA, embriogênese, função imune, regulação de crescimento celular
Lectinas do tipo X	GalNAc	Imunidade inata, fertilização, embriogênese
Lectinas ligantes de Ramnose	L-Ramnose;D-Galactose	Proteínas de reconhecimento padrões associados a patógenos
Pentraxinas	DNA e fosfolípido	Sistema imune inato, atenuação de resposta inflamatória, reconhecimento de patógeno específico
Tachylectinas	Lipopolissacarídeo	Resposta imune

Fonte: Tabela adaptada de Carneiro, 2013

1.2.3 Lectinas em esponjas

Em esponjas marinhas, as lectinas podem desempenhar uma variedade de funções, incluindo interação celular, espiculogênese e defesa. A lectina de *Aphrocallistes vastus* (AvL), por exemplo, é capaz de mediar a agregação de células da própria esponja (GUNDACKER *et al.*, 2001). As lectinas purificadas de *Suberites domuncula*, Sd galectin 1 e Sd galectin 2, estão envolvidas em processos de formação dos canais na esponja e no processo de biomineralização e formação de espículas silicosas (SCHRÖDER *et al.*, 2006; WIENS *et al.*, 2003). As lectinas de *Haliclona caerulea* (H-1 e H-2) apresentaram citotoxicidade contra nauplios de artêmia, o que sugere o envolvimento dessas lectinas na defesa do organismo contra patógenos (CARNEIRO *et al.*, 2013a).

Além dos estudos de purificação e caracterização dessas proteínas, hoje, alguns trabalhos demonstram seu enorme potencial biotecnológico. As lectinas de *Chondrilla caribensis* e *A. lactuca* foram capazes de reduzir a biomassa e aglutinar bactérias patogênicas, tais como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Escherichia coli* (CARNEIRO *et al.*, 2017; MARQUES *et al.*, 2018).

As lectinas de *Haliclona caerulea* (H-3) e de *H. manglares* (HMA) mostraram atividade antioxidante na proteção contra oxidação e branqueamento do β -caroteno e na quelação de íons ferrosos (CARNEIRO *et al.*, 2013b; CARNEIRO *et al.*, 2015). H-3 também foi capaz de induzir a apoptose células de câncer de mama humano da linhagem MCF7 (NASCIMENTO NETO *et*

al., 2018). A lectina de *H. cratera* (HcL) também mostrou atividade contra células de câncer da linhagem HeLa. (PAJIC, 2002).

Tendo em vista tal potencial biotecnológico e considerando a disponibilidade destes organismos no litoral Cearense, se faz necessário a contínua prospecção, objetivando identificar e caracterizar novas lectinas que possam ser utilizadas e exploradas quanto às suas propriedades biotecnológicas.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Identificar a atividade hemaglutinante em extratos aquosos de esponjas marinhas e purificar, caracterizar bioquimicamente e avaliar os efeitos inibitórios de biofilmes bacterianos de duas novas lectinas presente nos extratos aquosos das esponjas marinhas *Callyspongia vaginalis* e *Aplysina fulva*.

Objetivos específicos

- Detectar atividade hemaglutinante nos extratos proteicos de esponjas marinhas.
- Isolar duas novas lectinas de *C. vaginalis* e *A. fulva*.
- Caracterizar bioquimicamente as novas proteínas isoladas. Estimando massa molecular, efeitos do pH e temperatura, inibição de carboidratos e dependência de íons metálicos sobre a atividade hemaglutinante.
- Determinar a massa molecular das proteínas através de espectrometria de massas (MS).
- Determinar a sequência de aminoácidos através da combinação de peptídeos sequenciados por espectrometria de massas (MS/MS).
- Avaliar a estrutura secundária das proteínas por Dicroísmo Circular.
- Avaliar o potencial da lectina de *A. fulva* na inibição de biofilmes bacterianos.

3. METODOLOGIA

3.1 Coleta das esponjas

As esponjas marinhas *Aiolochoiria crassa*, *Aplysina cauliformis*, *Aplysina fistularis*, *Aplysina fulva*, *Callyspongia vaginalis*, *Clatria nicoleae*, *Erylus formosus*, *Geodia* sp., *Ircinia* sp.1, *Ircinia* sp.2 e *Topsentia ophiraphides* foram coletadas em um ponto de mergulho do Parque Estadual Marinho da Pedra da Risca do Meio (03°35'19"S e 038°24'32"W), localizado no município de Fortaleza, litoral do Ceará. A coleta dos animais foi previamente autorizada pelos órgãos ambientais competentes (SISBIO ID: 33913-8). Após a coleta, os animais foram transportados dentro de caixas térmicas até o laboratório e armazenados a -20°C para utilização posterior.

3.2 Preparo dos Extratos

As esponjas foram cortadas em pequenos pedaços e maceradas em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM e CaCl₂ 20 mM (TBS/Ca²⁺), na proporção 1:2 (p/v). A mistura foi filtrada em tecido de nylon para a retenção de partículas maiores e, posteriormente, foi centrifugada à 8000 xg, por 20 minutos, a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante, denominado extrato bruto, foi submetido à determinação de proteínas totais solúveis pelo método de Bradford (1976) e ensaios de atividade hemaglutinante. A manipulação do patrimônio genético dos animais também foi previamente autorizada pelos órgãos competentes (SISGEN ID: AC14AF9).

3.3 Avaliação da atividade hemaglutinante dos extratos

Os testes de hemaglutinação foram realizados com a utilização de eritrócitos humanos do sistema ABO, obtidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) e eritrócitos de coelhos mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Ceará.

Após a obtenção dos tipos sanguíneos, foram preparadas as suspensões de eritrócitos nativos e tratados com as enzimas proteolíticas pronase e tripsina. Os eritrócitos foram lavados 6 vezes em diluição de 10 volumes de NaCl 150 mM. Em seguida, foram preparadas as suspensões a 3% de eritrócitos em NaCl 150 mM (v/v). 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 por 6 vezes em diluição de 10 volumes em NaCl 150 mM. Após a lavagem, as hemácias foram suspensas e os volumes foram aferidos até que a concentração de eritrócitos a 3% em NaCl 150 mM (v/v) fosse novamente obtida.

Os ensaios de hemaglutinação foram realizados através do método da dupla diluição seriada, em placas de titulação de fundo V, seguindo metodologia padrão descrita por Sampaio *et al.*, 1998. Inicialmente, foram adicionados aos poços 50 μ L de TBS/Ca²⁺, 50 μ L das amostras, que foram diluídas seriadamente em cada fileira de poços, e em seguida, 50 μ L das soluções de eritrócitos preparadas. As amostras permaneceram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente e a atividade hemaglutinante foi observada macroscopicamente e expressa em títulos de hemaglutinação (U.H.), unidade inversa da maior diluição de amostra capaz de aglutinar os eritrócitos.

3.4 Purificação das proteínas

3.4.1 Purificação da proteína pigmento de *Callyspongia vaginalis*

O extrato de *Callyspongia vaginalis* foi dialisado contra água destilada e posteriormente contra tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6. Em seguida, o material foi centrifugado e o sobrenadante foi submetido à cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-Sephacel (1,0 cm x 4,0 cm). A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20mM, pH 7,6. Após a adição da amostra, a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio e os eluatos, denominados p1-DEAE, foram monitorados por espectrofotometria a 280 nm até quando a absorbância apresentou leitura abaixo de 0,02. Posteriormente, uma fração retida (p2-DEAE) foi eluída da coluna utilizando tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, contendo NaCl 200 mM. Os eluatos de p2-DEAE foram coletados em tubos de 3 mL e monitorados a 280 nm até quando a absorbância apresentou leitura abaixo de 0,02. As frações do p2 foram reunidas, dialisadas contra água destilada, liofilizadas e posteriormente submetidas a cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE FF, acoplada em sistema AKTA HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

O p2-DEAE foi solubilizado em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 e submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE FF. A coluna foi previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 20mM, pH 7,6 e lavada com o mesmo tampão de equilíbrio. A

cromatografia foi conduzida ao fluxo de 1 mL.min⁻¹ e frações de 1 mL foram coletadas. As proteínas retidas foram eluídas através de gradiente linear de NaCl (0-1M), as frações que apresentaram pigmentação foram reunidas, dialisadas, liofilizadas e denominadas CvP (*Callyspongia vaginallis protein*).

3.4.2 Purificação da lectina de *Aplysina fulva*

As esponjas foram cortadas em pequenos pedaços e maceradas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8, contendo NaCl 150 mM (TBS), na proporção 1:10 (p/v). A mistura foi filtrada em tecido de nylon para a retenção de partículas maiores e, posteriormente, foi centrifugada à 7000xg, por 30 minutos, a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante, denominado extrato bruto, foi submetido à determinação de proteínas totais solúveis pelo método de Bradford (1976) e ensaios de atividade hemaglutinante.

O extrato bruto foi submetido a precipitação com sulfato de amônio, em saturação de 70%, sendo então a mistura mantida em repouso por quatro horas. Em seguida o material foi centrifugado, o sobrenadante descartado e o precipitado solubilizado em tampão TBS. A suspensão foi novamente centrifugada e o sobrenadante aplicado em coluna de Sepharose 4B (1,0 cm x 6,0 cm) ativada com HCl 0,1 M. A coluna foi previamente equilibrada com TBS. Após a adição da amostra, a coluna foi lavada com o mesmo 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 tampão glicina 50 mM, pH 2,6, contendo NaCl 150 mM. O material retido foi coletado em frações de 3 mL e as frações que apresentaram atividade hemaglutinante foram reunidas, dialisadas contra água destilada, liofilizadas e denominadas AFL (*Aplysina fulva lectin*).

3.5 Avaliação da atividade hemaglutinante e inibição por carboidratos

Os testes de hemaglutinação para ambas as proteínas isoladas foram conduzidos como descrito anteriormente na seção 3.3.

O efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante de AFL (1 mg.mL⁻¹) foi avaliado através de ensaio de atividade hemaglutinante em tampões de diferentes pH, incubando a solução da lectina 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 e glicina 100 mM pH 9 e pH 10, todos contendo NaCl 150 mM.

Para avaliar o efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante de AFL (1 mg.mL⁻¹), amostras da lectina, solubilizada em NaCl 150 mM, foram 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 em tampão TBS/Ca²⁺.

O efeito do íon cálcio na atividade hemaglutinante também foi avaliado. AFL(1 mg.mL⁻¹) solubilizada em NaCl 150 mM, foi submetida ao teste de hemaglutinação em tampão TBS/Ca²⁺ e em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM e EDTA 20 mM. Após 1 hora de incubação, a atividade hemaglutinante foi determinada.

Na inibição da atividade hemaglutinante foram utilizados carboidratos e glicoproteínas, utilizando-se AFL em TBS/Ca²⁺ purificada com a finalidade de determinação da mínima concentração capaz de inibir a aglutinante de eritrócitos.

Os carboidratos utilizados foram: D-xilose, D-ribose, L-fucose, L-arabinose, L-ramnose, D-galactose, D-manose, D-glicose, D-glicosamina, D-galactosamina, *N*-acetil-D-glicosamina, *N*-acetil-D-galactosamina, *N*-acetil-D-manosamina, ácido D-galacturônico, D-frutose, D-sacarose, D-melibiose, α -D-lactose, β -D-lactose, D-lactulose, D-maltose, D-rafinose, manana de *Saccharomyces cerevisiae*, metil- α -D-galactopiranosideo, metil- β -D-galactopiranosideo, metil- β -D-tiogalactose, fenil- β -D-galactopiranosideo, 4-nitrofenil- α -D-galactopiranosideo, 4-nitrofenil- β -D-galactopiranosideo, 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosideo, e as glicoproteínas fetuína bovina e mucina de estômago de porto tipo 2 (PSM-II).

O teste de inibição da atividade hemaglutinante foi realizado em placas de microtitulação de fundo V, no qual foram adicionados aos poços 25 μ L da solução da lectina em TBS com concentração capaz de aglutinar eritrócitos com título igual a 4 UH e 25 μ L das soluções de açúcares diluídas em cada poço. A lectina permaneceu incubada na presença dos carboidratos por 30 minutos e posteriormente foram adicionados 25 μ L da solução de eritrócitos dos quais a lectina teve menor preferência. 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).

3.6 Estimativa da massa molecular

O grau de pureza e homogeneidade das proteínas foi avaliado através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), na presença e ausência de β -mercaptoetanol (LAEMMLI, 1970). O gel 15% foi submetido a uma corrente de 25 mA e tensão de 150 V, durante 1 hora.

A massa molecular das proteínas em condições desnaturantes foi estimada através da comparação da migração das proteínas purificadas com proteínas de peso molecular conhecido (albumina sérica bovina – BSA, 66 kDa; ovalbumina de ovo de frango, 45 kDa; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 36 kDa; anidrase carbônica, 29 kDa; tripsinogênio, 24 kDa; α -lactalbumina, 14, 2 kDa; aprotinina, 6,5kDa), presentes no kit SigmaMarker™ *low range* (Sigma Aldrich, MO).

Para a estimativa de massa em condições nativas, as proteínas foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular em coluna BEH SEC 1.7 μ m (0.46 x 30 cm), acoplada ao sistema Acquity H-Class UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, Waters Corp.). A coluna foi equilibrada e as cromatografias conduzidas em TBS. O tempo de eluição das proteínas foram determinados em comparação com o tempo de eluição de proteínas com massa molecular conhecida (tiroglobulina, 669 kDa, apoferritina, 443 kDa, β -amilase, 200 kDa, álcool desidrogenase, 150 kDa, BSA, 66 kDa, anidrase carbônica, 29 kDa e ribonuclease, 14 kDa). A coluna foi previamente equilibrada e a cromatografia foi conduzida em tampão TBS, ao fluxo 0,3 mL.min⁻¹. A absorvância foi monitorada entre 280 nm. Quando CvP foi analisada, a absorvância foi monitorada entre 400 e 700 nm, além de 280 nm.

3.7 Determinação da massa molecular

A massa molecular média das proteínas isoladas nas formas nativas e alquiladas foram determinadas por espectrometria de massas através de MALDI-ToF, utilizando um espectrômetro de massas Autoflex MALDI-ToF/ToF (Bruker Daltonics, Alemanha).

Alternativamente a massa molecular média da lectina foi determinada por espectrometria de massas, utilizando um espectrômetro de massa híbrido Synapt HDMS (Waters Corp.), através de Ionização por Nano Eletrospray (nESI). As soluções proteicas (10 μ mol μ L⁻¹) em 50% de acetonitrila (ACN), contendo de 0,1% ácido fórmico foram diretamente infundidas no espectrômetro com um fluxo de 1 μ L min⁻¹ e os dados foram adquiridos com o auxílio do software Mass Lynx 4.1.

Para a determinação de grupos sulfidrilas livres, a AFL (1 mg.mL⁻¹) foi, previamente, incubada em 4-vinilpiridina (4-VP) 5 mM, por 45 minutos e ao abrigo da luz. Para a quantificação de cisteínas totais, a lectina foi reduzida em solução de ditioneitol (DTT) 10 mM, por 1 hora, a 56°C. Posteriormente, a solução lectínica foi alquilada com a adição de VP 5 mM e guardada ao abrigo da luz por 45 minutos.

AFL piridiletalada (PE-AFL) foi carregada em coluna de fase reversa BEH C-4 acoplada a um sistema Acquity H-Class UPLC (Waters Corp, MA, USA). A coluna foi previamente equilibrada com ACN 5%, contendo ácido trifluoracético 0,1%. O fluxo foi mantido em 0,5 mL.min⁻¹ e a cromatografia foi monitorada em 280 nm e 216 nm. Os eluatos foram secados em concentrador à vácuo e submetidos as análises por MALDI e ESI.

3.8 Determinação da sequência N-terminal

A análise de degradação por Edman foi realizada no sequenciador automático de proteínas e peptídeos PPSQ-31A (Shimadzu). A amostra foi aplicada ao equipamento e os PTH-aminoácidos do N-terminal da lectina foram separados em uma coluna ODS 2.0 x 250 nm (Wakosil) ligada a uma bomba LC-20AT. A absorbância foi detectada a 269 nm com um Detector UV-VIS SPD-20A.

3.9 Determinação das sequências internas das proteínas isoladas

Para o sequenciamento de aminoácidos, as proteínas foram submetidas à eletroforese (SDS-PAGE-12%) e as bandas proteicas foram excisadas do gel e transferidas para microtubos de centrifugação, contendo 1 mL de acetonitrila (ACN). Após 10 minutos, a ACN foi removida e os tubos foram secados.

Para reduzir e alquilar os *spots* de gel, 50 µL de uma solução de bicarbonato de amônio 25 mM, contendo DTT 10 mM foram adicionados aos tubos. As amostras foram aquecidos à 56°C, por 30 minutos. Posteriormente, a solução contendo bicarbonato de amônio e DTT foi removida e 1 mL de ACN foi adicionado aos tubos. Após 5 min, a ACN foi removida e 50 µL de bicarbonato de amônio 25 mM, contendo iodoacetamida (IAA) 55 mM foram adicionados aos tubos. Os tubos foram guardados em repouso e ao abrigo da luz por 45 minutos. O sobrenadante foi removido, 1 mL de ACN foi adicionado aos tubos e estes foram submetidos à agitação por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente removido e os spots congelados (SHEVCHENKO *et al.*, 2007).

Para digestão, os spots foram novamente hidratados em solução de bicarbonato de amônio 25 mM, contendo tripsina ou quimotripsina na razão 1:50 (enzima:substrato). As digestões foram paradas com a adição de 2 µL de ácido fórmico (AF) 2%. Para a extração de peptídeos, os microtubos foram centrifugados a 2000 xg, por 2 minutos. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de solução de ACN 50%, contendo AF 5% e os tubos foram colocados em

agitação por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e transferido para tubos limpos. O processo de extração foi repetido por duas vezes. Por fim, foram adicionados 500 μL de ACN 100% e os tubos foram deixados em repouso por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e reunido (SHEVCHENKO *et al.*, 2007). Os peptídeos oriundos das digestões proteolíticas foram aplicados em coluna de fase reversa C18 (75 μm x 100 mm), acoplada a um sistema Acquity UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, Waters Corp.) e eluídos por gradiente linear de ACN, contendo AF 0,1%.

O espectrômetro de massas foi calibrado com fragmentos de íon de [Glu] fibrinopeptídeo B e operou em modo positivo na faixa de m/z 50 a 3000, sob voltagem do capilar de 3,0 kV e temperatura da fonte de 263 K. As análises de LC-MS/MS foram conduzidas de acordo com a função DDA (*Data Dependent Analysis* – Análise Dependente de Dados), sendo selecionados para análise de MS/MS íons precursores com carga (z) entre 2⁺ e 4⁺.

Os íons selecionados foram fragmentados por Dissociação Induzida por Colisão (CID), utilizando argônio como gás de fragmentação. Os espectros foram coletados e processados pelos programas MassLynx v4.1 e ProteinLynx v2.4 (Waters Corp.). Os espectros de fragmentação CID foram processados manualmente pelo uso da ferramenta PepSeq (Waters). A estrutura primária foi obtida por sobreposição das sequências dos peptídeos gerados após digestão

3.10 Dicroísmo Circular

As análises por espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD) foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco International Co., Tóquio, Japão) conectado a um *peltier* com temperatura controlada. As proteínas solubilizadas em tampão Fosfato 20 mM, pH, 7,0 com concentração de 0,2 a 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram dispostas em uma cubeta de quartzo retangular com 1 mm de caminho óptico. Os espectros foram adquiridos no intervalo de 190 a 240 nm (*far-UV*), a uma velocidade de varrimento de 100 $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$, em diferentes temperaturas (25, 40, 50, 60, 70, 80 e 90°C) e pH variado (2, 4, 7, 9, 12). A predição de estrutura secundária foi realizada pelo servidor *on-line* DICROWEB, utilizando a ferramenta CONTIN (SPOELDER; GRONDELLE; GROEN, 1990; GREENFIELD, 2007).

3.11 Avaliação do potencial antibacteriano e antibiofilme

3.11.1 Cepas bacterianas e condições de cultura

Os ensaios para avaliar a atividade antimicrobiana foram realizados com as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12128 e *Escherichia coli* ATCC 11303. As bactérias foram cultivadas em meio Agar Triptona de soja (TSA; Himedia, Índia) e incubadas a 37°C por 24 h. Após o crescimento no meio sólido, algumas colônias isoladas foram removidas, inoculadas em Caldo Triptona de Soja (TSB; Himedia, India) e incubadas durante 24h a 37°C, sob agitação constante. As células foram colhidas por centrifugação durante 10 minutos, 9000 xg , a 4°C. As células foram suspensas em TSB e a densidade celular de cada suspensão bacteriana foi ajustada para uma concentração final de 1×10^6 unidades formadoras de colônias (CFU.mL⁻¹), por densidade óptica a 620 nm.

3.11.2 Efeito de AFL sobre células plactônicas

Os efeitos da lectina sobre as células planctônicas foram avaliados pelo método de microdiluição. Resumidamente, a lectina foi diluída em NaCl 150 mM em concentrações variando de 7,8 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As soluções lectínicas foram incubadas placas de poliestireno de 96 poços a 100 μL de células bacterianas, previamente ajustadas 1×10^6 células.mL⁻¹, a cada poço. As microplacas foram incubadas a 37°C durante 24 h em agitação constante e a densidade óptica foi medida a 620 nm utilizando um leitor de microplacas (SpectraMax® I3, Molecular Devices LLC, CA, EUA).

3.11.3 Ensaio de formação de biofilme

Os efeitos sobre a formação de biofilme foram avaliados conforme proposto por Vasconcelos *et al.* (2014), com algumas modificações. Placas de poliestireno estéreis de 96 poços foram preparadas seguindo os mesmos passos anteriormente estabelecidos para o crescimento celular planctônico. Entretanto, duas placas foram utilizadas: uma para a quantificação de biomassa por cristal violeta e outra para enumeração de células viáveis de biofilme.

3.11.3.1 *Quantificação da massa de biofilme*

Para quantificar a biomassa total de biofilme formada foi utilizado um método colorimétrico. Após o desenvolvimento do biofilme, o conteúdo de cada poço foi removido e os poços foram lavados duas vezes com 200 μL de NaCl 150 mM para remover células fracamente aderentes. Para fixação dos biofilmes foram adicionados 200 μL de metanol (99%) a cada poço. Após 15 min, o metanol foi removido e as placas foram deixadas secar a 25°C. Em seguida, 200 μL de cristal violeta foram adicionados a cada poço. Após 5 min, o excesso de violeta de cristal foi removido e as placas foram lavadas duas vezes com água. Por último, 200 μL de ácido acético (33%, v/v) foram adicionados aos poços, para dissolver o cristal violeta ligado à massa do biofilme e a absorbância foi medida a 590 nm usando um leitor de microplacas (SpectraMax® I3).

3.11.3.2 *Quantificação do número de células viáveis do biofilme*

A fim de determinar o número de células viáveis, os poços foram lavados com NaCl 150 mM e, em seguida, 200 μL da mesma solução foram adicionados a cada poço contendo biofilmes. As placas foram colocadas em banho ultrassônico por 10 min para liberação das células envoltas por biofilme. Diluições decimais em série das suspensões obtidas foram plaqueadas em TSA para permitir a determinação da viabilidade. As placas foram então incubadas durante 24 h a 37°C, e o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (CFU.mL^{-1}) foi determinado.

3.11.3.3 *Análise estatística*

As análises estatísticas foram realizadas pelo GraphPad Prism® versão 5.0 do Microsoft Windows®. Os dados de todos os ensaios foram comparados utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA), com teste de Bonferroni *post hoc*. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Coleta das esponjas

Onze espécies de esponjas marinhas tiveram o extrato aquoso testado para atividade hemaglutinante e hemolítica contra eritrócitos humanos do sistema ABO, nativos e tratados proteoliticamente, e eritrócitos de coelho (Tabela 2).

Tabela 2 – Detecção de atividade hemaglutinante/hemolítica de extratos aquosos de esponjas marinhas coletadas no litoral do Ceará.

Espécie	A _{NOR}	A _{TRIP}	A _{PRON}	O _{NOR}	O _{TRIP}	O _{PRON}	COELHO _{NOR}
<i>Aiolochoxia crassa</i>	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴
<i>Aplysina cauliformis</i>	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴
<i>Aplysina fistularis</i>	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴
<i>Aplysina fulva</i>	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴
<i>Callyspongia vaginalis</i>	H	H	H	H	H	H	2 ²
<i>Clatria nicoleae</i>	H	H	H	H	H	H	H
<i>Erylus formosus</i>	H	H	H	H	H	H	H
<i>Geodia sp.</i>	H	H	H	H	H	H	-
<i>Ircinia sp. 1</i>	2 ³	2 ³	2 ³	2 ¹	2 ¹	2 ¹	2 ¹
<i>Ircinia sp. 2</i>	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴	2 ⁴
<i>Topsentia ophiraphides</i>	H	H	H	H	H	H	H

Fonte: o Autor

Screening da atividade hemaglutinante e hemolítica dos extratos de 10 espécies de esponjas marinhas coletadas no litoral do Ceará. Atividade hemaglutinante descrita em títulos de hemaglutinação (2^x) e atividade hemolítica descrita com a letra H. Tipos de eritrócitos testados: A_{NORMAL}; A_{TRIPSINA}; A_{PRONASE}; O_{NORMAL}; O_{TRIPSINA}; O_{PRONASE}; COELHO_{NORMAL}.

Os extratos das esponjas testadas *Aiolochoxia crassa*, *Aplysina cauliformis*, *Aplysina fistularis*, *Aplysina fulva*, *Ircinia sp. 1*, *Ircinia sp. 2* apresentaram atividade hemaglutinante. Os extratos de *Clatria nicoleae*, *Erylus formosus*, *Geodia sp.* e *Topsentia*

ophiraphides apresentaram atividade hemolítica e um extrato, o de *Callyspongia vaginalis*, apresentou atividade hemolítica para os sangues do sistema ABO e atividade hemaglutinante para o sangue de coelho.

Assim, metade dos extratos testados apresentaram atividade hemaglutinante para todos os tipos sanguíneos testados. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos de detecção de atividade hemaglutinante/hemolítica utilizando extratos aquosos de animais marinhos (DRESCH *et al.*, 2005; MEBS; WEILER; HEINKE, 1985; MOURA *et al.*, 2015).

As atividades hemaglutinantes dos extratos de *Aiolochoia crassa*, *Aplysina cauliformes*, *Aplysina fistularis* e *Ircinia* sp. 2 não mostraram especificidade para qualquer grupo sanguíneo testado. Entretanto, o extrato de *Ircinia* sp. 1 mostrou preferência para sangue humano tipo A tratado e não tratado enzimaticamente. Essa preferência sugere a especificidade de ligação a *N*-acetil-galactosamina (SHARON; LIS, 2004).

O extrato de *Callyspongia vaginalis* apresentou atividade hemolítica e hemaglutinante de forma similar ao extrato testado do espécime *Callyspongia viridis*, enquanto outros espécimes do gênero *Callyspongia* exibiram somente a atividade hemaglutinante ou não foram capazes de aglutinar ou hemolisar eritrócitos (MEBS; WEILER; HEINKE, 1985).

Os extratos de *Clatria nicoleae*, *Erylus formosus*, *Geodia* sp. e *Topsentia ophiraphides* mostraram apenas atividade hemolítica. Interessantemente, a atividade hemolítica de *Geodia* sp. não se mostra presente contra eritrócitos de coelho, somente contra os diferentes tipos de eritrócitos humanos testados, sugerindo uma possível especificidade na interação de moléculas presentes no extrato com os carboidratos presentes nas membranas dos eritrócitos presentes no sistema ABO. Isso pode ser justificado pela diferente composição e variedade dos tipos sanguíneos de coelho, que possuem antígenos com carboidratos e glicanos distintos dos que estão presentes no sangue humano (RAVINDRANATH *et al.*, 1985; SCHAUER, 1982).

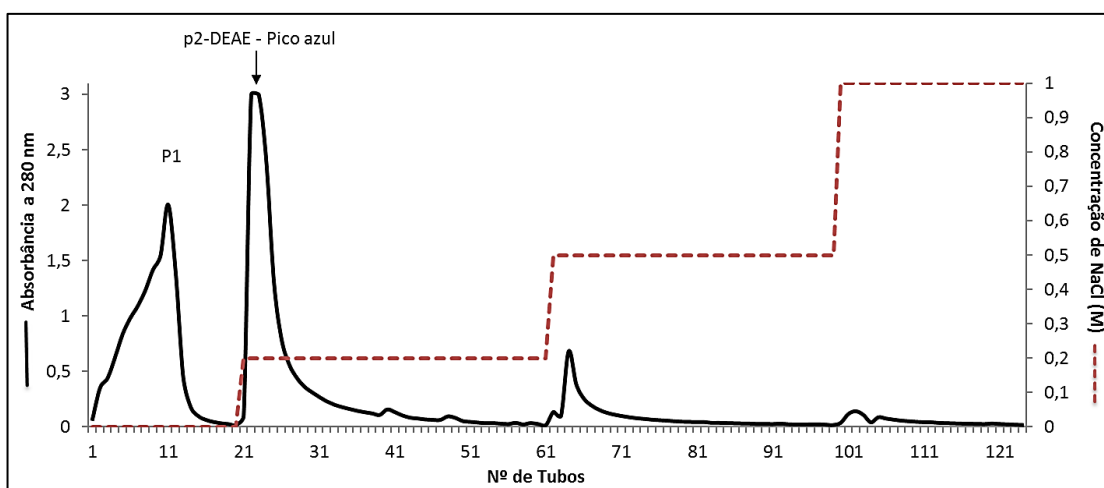
É interessante pontuar que o *screening* realizado para a detecção das atividades hemaglutinante/hemolítica dos extratos serviu não apenas para a realização deste trabalho, mas também para o desenvolvimento de outros projetos de pesquisa alocados no laboratório.

4.2 Purificação

4.2.1 Purificação da proteína de *Callispongia vaginalis*

Uma proteína presente no extrato da esponja marinha *Callispongia vaginalis*, CvP, foi isolada por cromatografias de troca iônica consecutivas em coluna de DEAE-Sephacel (Figura 1) e DEAE FF (Figura 2), acoplada em sistema AKTA HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

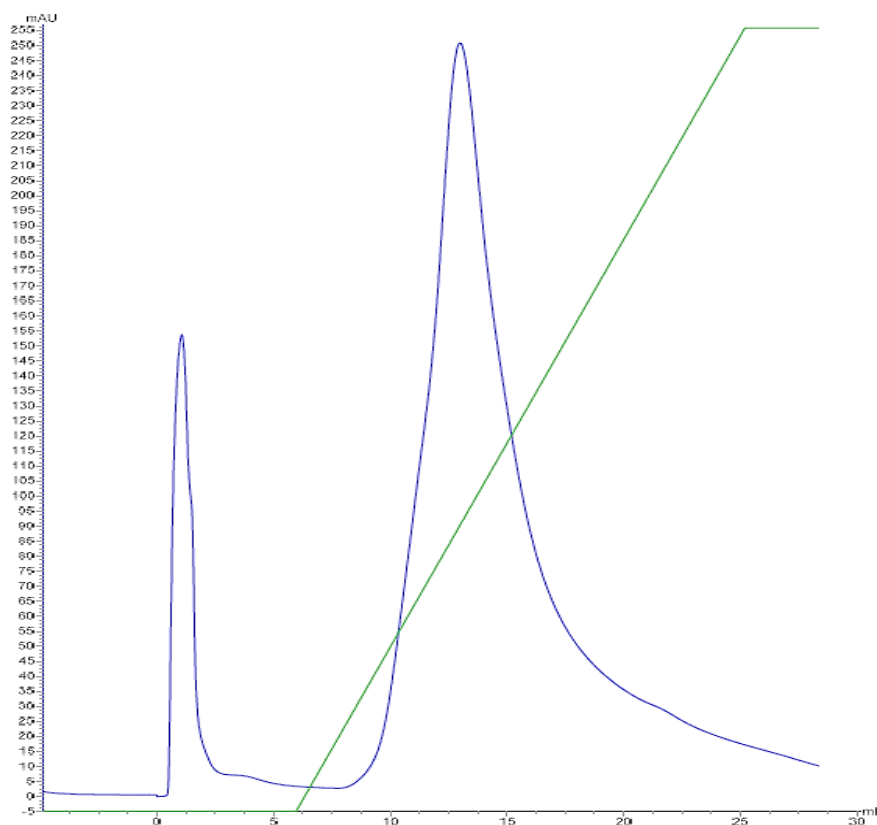
Figura 1 – Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel do extrato de *Callispongia vaginalis*



Fonte: o Autor

Cromatografia em coluna de DEAE (1,0 cm x 4,0 cm), previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6. Foram aplicados 50 mL do extrato dialisado e a proteína-pigmento (CVP) foi eluída em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, contendo NaCl 200 mM. O fluxo foi mantido a 2 mL.min⁻¹ e frações de 2 mL foram coletadas

Figura 2 – Cromatografia de troca iônica em DEAE FF do p2 de *Callyspongia vaginalis*



Fonte: o Autor

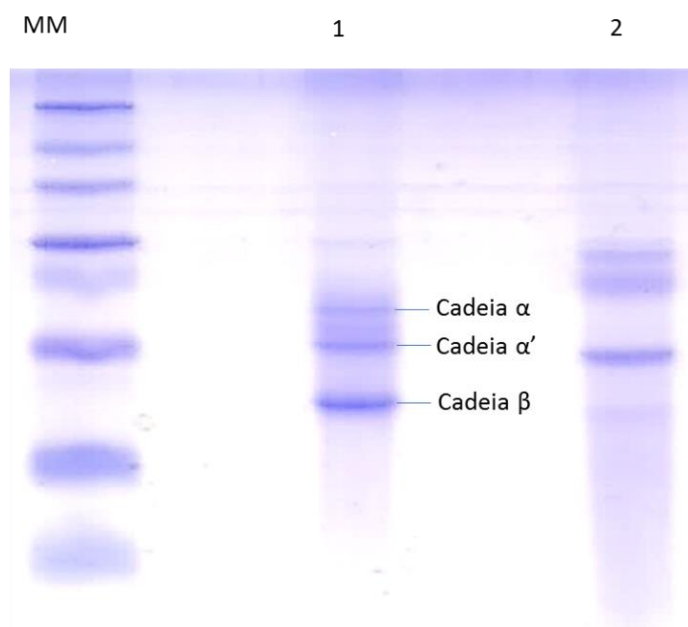
Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE FF acoplada em sistema AKTA HPLC. A coluna foi previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 e lavada com o mesmo tampão de equilíbrio. A proteína-pigmento (CVP) foi eluída através de gradiente linear de NaCl (0-1M) em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, contendo NaCl 200 mM. O fluxo foi mantido a 1 mL.min⁻¹.

A interação iônica dos grupos carregados negativamente presentes na proteína com a matriz de DEAE-Sephacel permitiu a adsorção de CvP (*Callyspongia vaginalis Protein*) e a separação parcial de contaminantes.

Durante o processo de purificação de CvP foi observado que a presença da proteína era acompanhada da coloração azul. De forma semelhante a CvP, proteínas pigmentadas de esponjas marinhas podem ser isoladas a partir da combinação de passos cromatográficos. A lectina H-3, *Halilectin-3* foi isolada a partir da combinação de cromatografias de interação hidrofóbica em fenil-Sepharose e troca iônica em DEAE (CARNEIRO *et al.*, 2013a, 2013b). A lectina HMA, de *Haliclona manglaris*, também foi isolada a partir da combinação de cromatografias de interação hidrofóbica em fenil-Sepharose e troca iônica em DEAE (CARNEIRO *et al.*, 2015).

Em SDS-PAGE, sob condições não redutoras, CvP apresentou três bandas principais de massa molecular estimada em 22, 18 e 14,5 kDa. Em condições redutoras, 28, 24 e 18kDa, sugerindo a presença de pontes dissulfeto intracadeia (Figura 3).

Figura 3– Eletroforese de CvP em gel de poliacrilamida a 15% (PAGE)



Fonte: o Autor

SDS-PAGE, na ausência e na presença de β -mercaptanol, 15%. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. MM – Marcadores Moleculares: BSA, 66 kDa; ovalbumina de ovo de frango, 45 kDa; Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 36 kDa; anidrase carbônica; 29 kDa; tripsinogênio, 24 kDa; tripsina, α -lactalbumina, 14, 2 kDa; aprotinina, 6,5kDa. 1 – CvP na ausência de β -mercaptanol; 2 - CvP na presença de β -mercaptanol

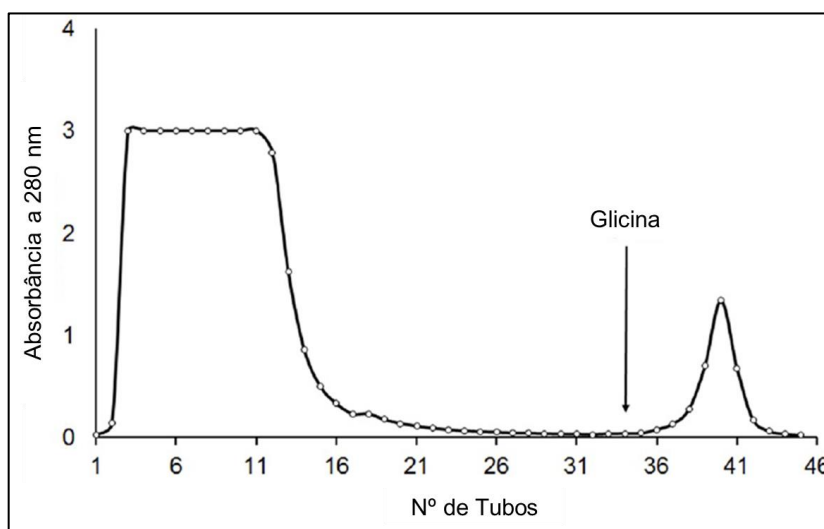
De forma similar à CvP, outras proteínas pigmentadas isoladas a partir de esponjas marinhas também são compostas por mais de uma cadeia polipeptídica de tamanhos distintos. A H-3 é composta por três cadeias polipeptídicas de massa molecular aparente de 18 kDa, 16 kDa e 9 kDa na ausência e na presença de agentes redutores (CARNEIRO *et al.*, 2013b). A lectina HMA é formada por duas cadeias polipeptídicas de massa molecular aparente de 22 kDa e 15 kDa, na presença e na ausência de condições redutoras (CARNEIRO *et al.*, 2015).

Além do perfil eletroforético, CvP compartilha várias características com H-3 e HMA, incluindo semelhança de estrutura primária (ver adiante), exceto a habilidade de aglutinar eritrócitos.

4.2.2 Purificação da lectina de *Aplysina fulva*

Uma lectina presente no extrato da esponja marinha *Aplysina fulva*, AFL, foi isolada a partir de cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B, ativada com HCl 0,1 M (Figura 4). AFL foi purificada 56 vezes e representou 49% da atividade hemaglutinante total do extrato (Tabela 3).

Figura 4 – Cromatografia de Afinidade em Sepharose 4B da fração 0-70 de sulfato de amônio do extrato de *Aplysina fulva*



Fonte: o Autor

Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B (1,0 cm x 6,0 cm), previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8, contendo NaCl 150 mM. Foram aplicados 70 mL da fração₀₋₇₀ do extrato na matriz e a lectina (AFL) foi eluída em tampão Glicina 50 mM, pH 2,6, contendo NaCl 150 mM. O fluxo foi mantido a 1 mL.min⁻¹ e frações de 2 mL foram coletadas.

Tabela 3 - Purificação da lectina presente no extrato da esponja marinha *Aplysina fulva*

Fração	Vol (mL)	Título (U.H.mL ⁻¹)	Proteína Total (mg)	U.H Total	Ativ. específica (U.H.mg ⁻¹)	Purificação (vezes)	Rendimento (%)
Extrato Bruto	125	256	700	32 000	45,7	1	100
F0-70	91	512	601	46 592	77,6	1,7	146
AFL	61	256	6,1	15 619	2560	56	49

Fonte: o autor

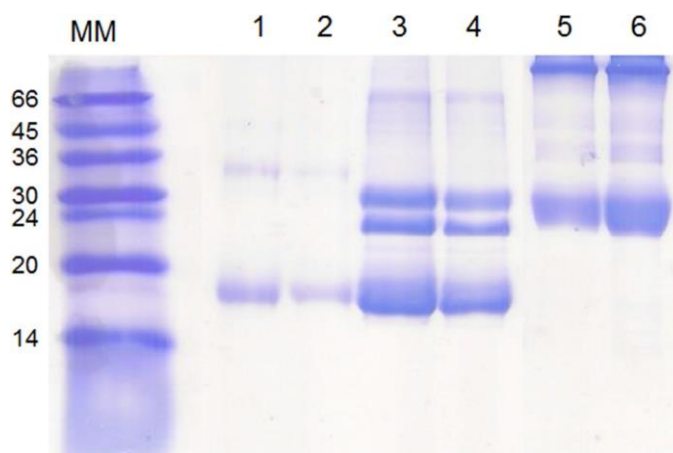
Após a precipitação da lectina com sulfato de amônio, a atividade hemaglutinante foi concentrada na fração 0-70 de saturação do sal, a proteína solubilizada foi submetida à cromatografia. A interação da lectina com a matriz cromatográfica foi interrompida pela eluição

em tampão glicina, pH 2,6. O baixo pH foi responsável pela alteração no *folding* do sítio de reconhecimento a carboidratos, tornando possível a dissociação da proteína.

De forma similar à AFL, é comum o isolamento de lectinas de esponjas marinhas a partir de cromatografias de afinidade realizadas em uma variedade de matrizes. A lectina H-1, de *Haliclona caerulea*, foi isolada a partir de cromatografia de afinidade em matriz de estroma de eritrócitos humanos tipo A (CARNEIRO *et al.*, 2013a). A lectina Clathrilectina, de *Clathrina clathrus*, também foi isolada a partir de cromatografia de afinidade em matriz de lactose e *N*-acetil-galactose (GARDÈRES *et al.*, 2016). As lectinas CCL, de *Chondrilla caribensis*, e CvL, de *Cliona varians*, foram isoladas a partir de cromatografia de afinidade em matrix de Sepharose (MARQUES *et al.*, 2018; MOURA *et al.*, 2006). A lectina ALL, de *Aplysina lactuca*, foi isolada a partir de cromatografia de afinidade em matriz de goma de guar (CARNEIRO *et al.*, 2017).

Em SDS-PAGE, sob condições não redutoras, AFL apresentou duas bandas, uma principal de aproximadamente 30 kDa e uma banda de aproximadamente 70 kDa. Em condições redutoras, na presença de β -mercaptoenol, a banda principal teve massa estimada em 15 kDa e outras duas bandas tiveram massa estimada em torno de 30 kDa. AFL-piridiletalada (PE-AFL) mostrou uma banda principal de aproximadamente 16 kDa e uma banda de coloração fraca com aproximadamente 34 kDa (FIGURA 5).

Figura 5 – Eletroforese de AFL em gel de poliacrilamida a 15% (PAGE)



Fonte: o Autor

SDS-PAGE, na ausência e na presença de β -mercaptanol/vinilpiridina, 15%. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. MM – Marcadores Moleculares: BSA, 66 kDa; ovalbumina de ovo de frango, 45 kDa; Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 36 kDa; anidrase carbônica, 29 kDa; tripsinogênio, 24 kDa; tripsina, α -lactalbumina, 14, 2 kDa; aprotinina, 6,5kDa. 1 - 40 μ g de PE-AFL; 2 - 40 μ g de PE-AFL; 3 - 40 μ g de AFL na presença de β -mercaptanol; 4 - 20 μ g de AFL na presença de β -mercaptanol; 5 - 20 μ g de AFL; 6 - 40 μ g de AFL

A banda eletroforética de 15 kDa, em condições redutoras, corresponde a unidade monomérica de AFL, enquanto que as bandas com massa de 30 kDa possivelmente sejam unidades diméricas que resistiram à redução. As bandas de 16 kDa e 34 kDa, quando a AFL foi reduzida e alquilada, também sugerem que a proteína possui unidades ligadas por pontes dissulfeto.

Interessantemente, sob condições não redutoras, a banda de 30 kDa corresponde à condição dimérica de AFL, entretanto, a banda correspondente a 70 kDa sugere a formação de oligômero de massa elevada com unidades possivelmente ligadas por pontes dissulfeto.

ALL apresentou uma única banda proteica de 28 kDa, em condições não redutoras. Em condições redutoras, a lectina apresentou uma banda larga em torno de 19 kDa, sugerindo que a proteína também seja um dímero com subunidades ligadas por pontes dissulfeto, semelhante à AFL (CARNEIRO *et al.*, 2017). A lectina CvL, de *Cliona varians*, também mostrou uma banda de 106 kDa, sob condições não redutoras e 28 kDa, sob condições redutoras (MOURA *et al.*, 2006).

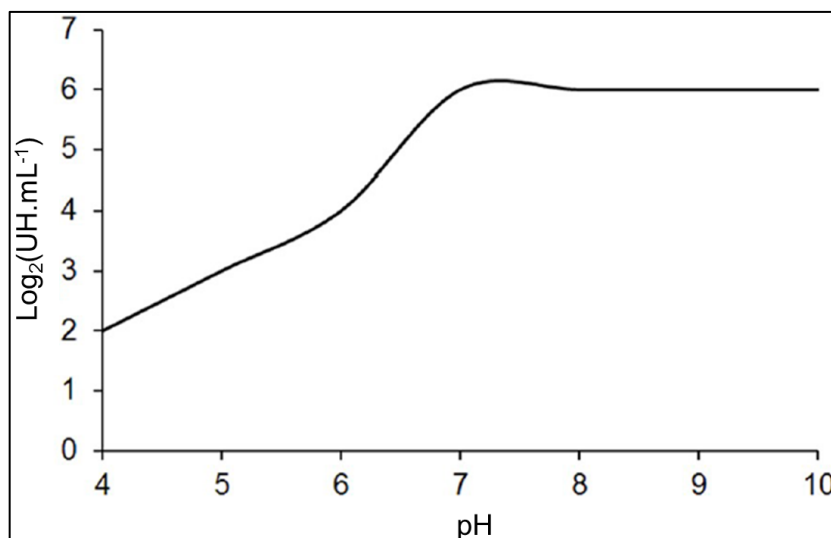
Diferente de AFL e ALL, a lectina AAL, de *Aplysina archeri*, apresentou uma única banda eletroforética com massa molecular estimada em 16 kDa, na presença e na ausência de β -mercaptanol (MIARONS; FRESNO, 2000).

4.3 Atividade hemaglutinante

CvP não apresentou atividade hemaglutinante para qualquer dos eritrócitos testados. Por outro lado, AFL (1 mg.mL^{-1}) foi capaz de aglutinar igualmente todos os tipos eritrócitos humanos do sistema ABO e eritrócitos de coelho, tratados e não tratados com enzimas proteolíticas, exibindo o título de 256 U.H.mL^{-1} e atividade específica de 2560 U.H.mg^{-1} .

AFL mostrou atividade hemaglutinante entre pH 4 e 10, com seu maior título de aglutinação entre pH 7 e 10. Em pH 5, a atividade hemaglutinante era de 50% da máxima (Figura 6). Tal como a lectina CCL, que mostrou seu maior título em pH 9 (MARQUES *et al.*, 2018), AFL possui atividade ótima e grande estabilidade em pH alcalino. ALL mostrou melhor atividade pH 7 e, de forma similar à AFL, a atividade é decrescida consideravelmente em pH 5 e 6. (CARNEIRO *et al.*, 2017). CvL também mostrou melhor atividade entre pH 6 e 8 (MOURA *et al.*, 2006).

Figura 6 – Efeito do pH na atividade hemaglutinante de AFL



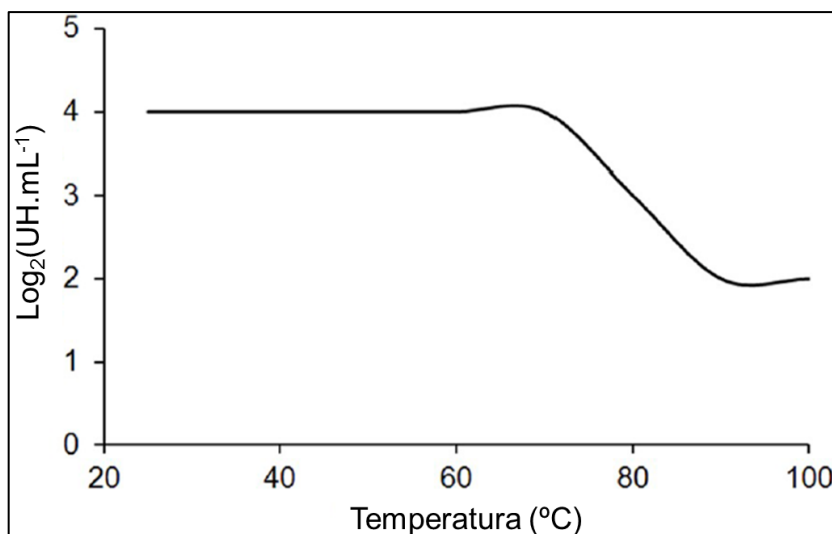
Fonte: o Autor

Atividade hemaglutinante frente a diferentes pH. Os tampões usados foram: acetato de sódio 100 mM, pH 4 e pH 5; fosfato de sódio, pH6; Tris 100 mM, pH 7 e pH 8; glicina 100 mM, pH 9 e pH 10; todos contendo NaCl 150 mM

É comum observar que esponjas marinhas possuam lectinas com atividade hemaglutinante com seu maior título de aglutinação em pH neutro-alcalino. Provavelmente, isso se deve às condições em que os organismos marinhos se encontram em seu habitat, a água do mar que é levemente alcalina por conta do tamponamento causado pelo sistema carbonato-bicarbonato (CARNEIRO *et al.*, 2017; DE MELO *et al.*, 2014; MARQUES *et al.*, 2018; MOURA *et al.*, 2006).

No teste de termoestabilidade, AFL mostrou atividade ótima após ser aquecida por 1 hora, em temperaturas de até 70°C. No entanto, a proteína perdeu 25% da sua atividade quando aquecida em temperatura de 80°C por 1 hora. AFL teve sua atividade diminuída em 50% quando aquecida em temperatura de 100°C, por 1 hora (Figura 7).

Figura 7 – Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante de AFL.



Fonte: o Autor

Atividade hemaglutinante mensurada em diferentes temperaturas. AFL foi aquecida em 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C e posteriormente submetida a teste de atividade hemaglutinante

De forma semelhante, a CCL perdeu atividade apenas quando foi aquecida à 100°C, por 1 hora, mostrando alta termoestabilidade (MARQUES *et al.*, 2018). ALL mostrou atividade ótima quando aquecida até 60°C, sendo a atividade diminuída consideravelmente quando aquecida à temperaturas mais altas e tendo a atividade completamente abolida quando aquecida à 90°C (CARNEIRO *et al.*, 2017). CvL também mostrou atividade ótima quando aquecida até 60°C, sendo completamente abolida quando aquecida à 80°C (MOURA *et al.*, 2006).

Ao avaliar o efeito da presença e da ausência de íons divalentes na atividade hemaglutinante, constatou-se que a AFL não foi afetada pela presença ou ausência do íon Ca^{2+} , sendo capaz de aglutinar eritrócitos mesmo na presença de EDTA. A ALL também mostrou não ter a atividade afetada pela presença ou ausência de íons divalentes e EDTA (CARNEIRO *et al.*, 2017). De forma similar, CCL mostrou não ser dependente de íons divalentes (MARQUES *et al.*, 2018).

AAL teve a atividade abolida na presença de EDTA, mostrando que a lectina é dependente de íons metálicos como mediadores da ligação à carboidratos (MIARONS; FRESNO, 2000). CvL também mostrou ser dependente de cálcio para exibir atividade efetiva (MOURA *et al.*, 2006).

A atividade hemaglutinante de AFL foi inibida por alguns açúcares simples, sendo eles galactose, L-raminose, lactose e lactulose com uma mínima concentração inibitória (MIC)

de 50 μM , e pelas glicoproteínas mucina de estômago de porco tipo 2 (PSM-II) e mucina de estômago de porco tipo 3 (PSM-III) com uma MIC de $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Tabela 4).

Tabela 4 – Inibição da atividade hemaglutinante de AFL por açúcares e glicoproteínas

Açúcar	MIC
Galactose	50 mM
L-Ramnose	50 mM
Lactose	50 mM
Lactulose (gal β 1 \rightarrow 4fru)	50 mM
Glicoproteínas	
PSM-II	$8 \mu\text{g mL}^{-1}$
PSM-III	$8 \mu\text{g mL}^{-1}$

Fonte: o Autor

MIC – Mínima concentração inibitória

É interessante observar que o perfil de inibição de AFL mostrou preferência para galactose e para dissacarídeos compostos por galactose com ligação do tipo gal β 1 \rightarrow 4, como a lactose e a lactulose. Além disso, a AFL mostrou ser específica às glicoproteínas mucina de estômago de porco tipo II e tipo III, sugerindo o reconhecimento da galactose presente na estrutura dos glicanos.

ALL possui um perfil de preferência à carboidratos semelhante a AFL, sendo inibida por lactose e mucina (CARNEIRO *et al.*, 2017). Também de forma semelhante, a inibição da atividade hemaglutinante de AAL foi observada na presença de galactose e seus derivados, e de glicoproteínas (MIARONS; FRESNO, 2000). CvL também mostrou afinidade por galactose e pelo dissacarídeo lactose (MOURA *et al.*, 2006).

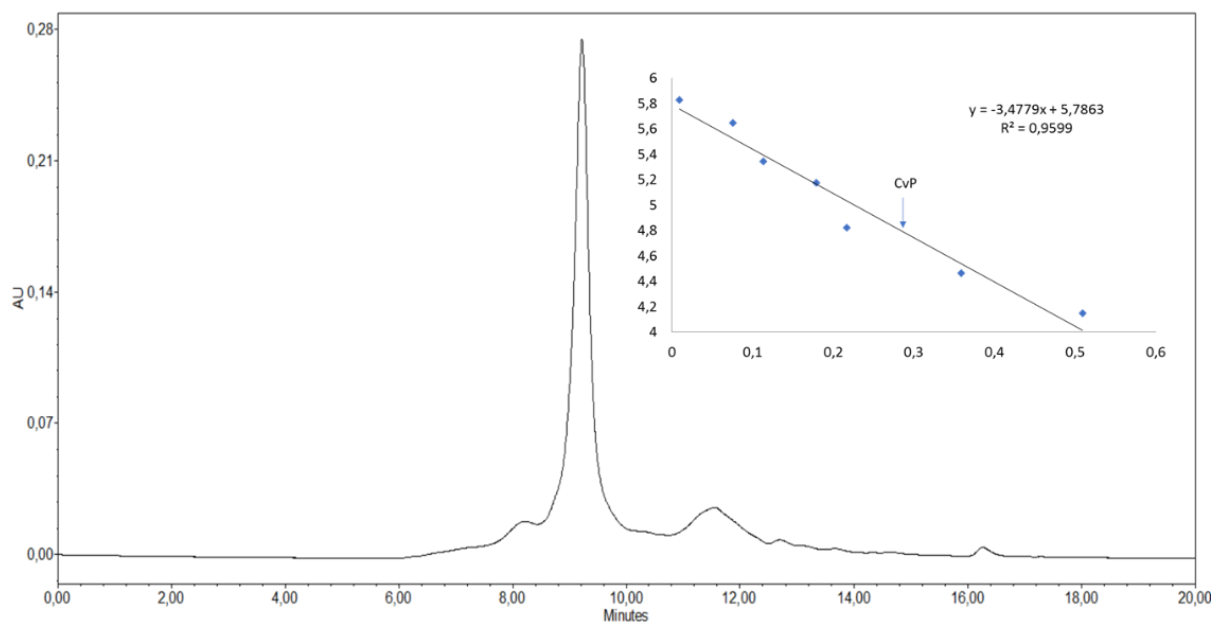
CCL mostrou pouca afinidade pelo dissacarídeo lactose, embora, de forma semelhante à AFL, tenha mostrado alta afinidade pelas glicoproteínas PSM-II e PSM-III (MARQUES *et al.*, 2018)

Sendo assim, é possível observar que lectinas de esponjas marinhas parecem ter afinidade por galactose e seus derivados com ligação do tipo gal β 1 \rightarrow 4, e por glicoproteínas do tipo *O*-glicanos (CARNEIRO *et al.*, 2017; MARQUES *et al.*, 2018; MIARONS; FRESNO, 2000; MOURA *et al.*, 2006)

4.4 Estimativa da massa molecular

A massa molecular de CvP foi estimada em 54 kDa através de cromatografia de exclusão molecular, referente a soma das cadeias polipeptídicas α (22 kDa), α' (18 kDa) e da cadeia β (14,5 kDa) (Figura 8). Também foi evidenciado um pico de absorção a 600 nm, referente a presença de um cromóforo responsável por dar a cor azul a proteína (Figura 9).

Figura 8 – Cromatografia de Exclusão Molecular a 280 nm

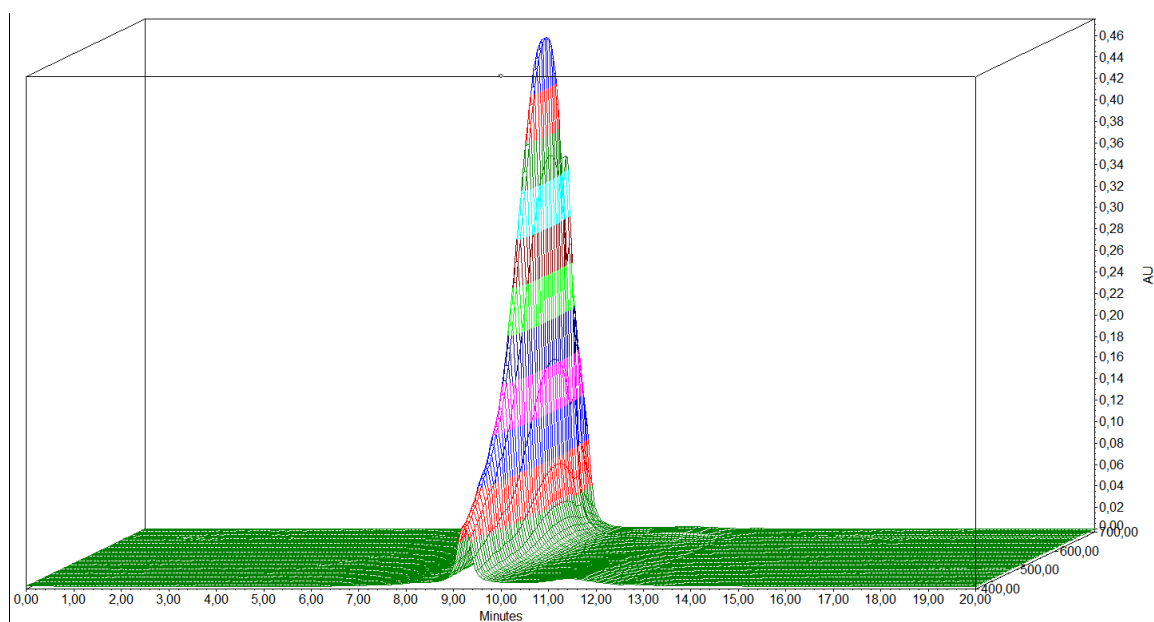


Fonte: o Autor

Cromatografia de exclusão molecular em coluna em coluna BioSuite 250 HR (0,78 cm x 0,30 cm, tamanho de partícula 5 μ m) acoplada em sistema Acquity UPLC. A coluna foi previamente equilibrada e a cromatografia foi conduzida em tampão fosfato 20mM, pH 7,0, contendo NaCl 150 mM com fluxo de 0,3 mLmin⁻¹.

Marcadores: 1) Tiroglobulina (669 kDa); 2) Apoferritina (443 kDa); 3) β -amilase (200 kDa); 4) Álcool desidrogenase (150 kDa); 5) BSA (66 kDa)

Figura 9 – Cromatografia de Exclusão Molecular monitorada entre 400-700 nm



Fonte: o Autor

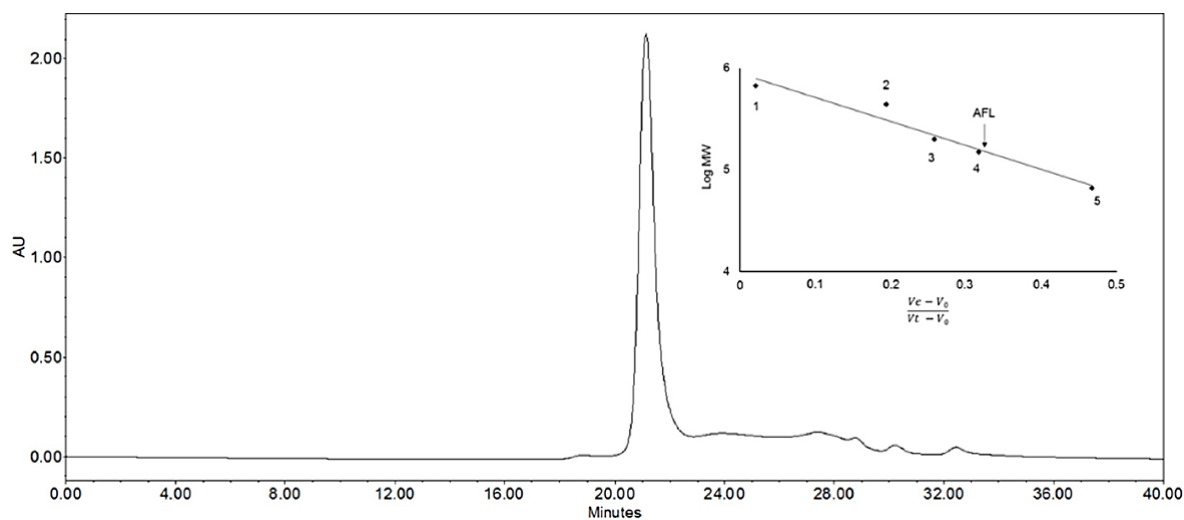
Cromatografia de exclusão molecular em coluna em coluna BioSuite 250 HR (0,78 cm x 0,30 cm, tamanho de partícula 5 μ m) acoplada em sistema Acquity UPLC. A coluna foi previamente equilibrada e a cromatografia foi conduzida em tampão fosfato 20mM, pH 7,0, contendo NaCl 150 mM com fluxo de 0,3 mLmin⁻¹. A cromatografia foi monitorada por absorvância entre 400-700 nm.

Em invertebrados marinhos a presença de moléculas com pigmentos pode estar relacionada à proteção contra raios-UV, visto a capacidade de absorção de luz em um determinado comprimento de onda, e à ação antioxidante contra radicais livres (BANDARANAYAKE, 2006).

H-3 também mostrou massa molecular nativa sob gel filtração de 40 kDa e um pico de absorção a 620 nm. Como observado, de forma similar à H-3, CvP também exibiu um pico cromatográfico referente a presença de um cromóforo em sua estrutura. HMA, uma lectina de *Haliclona manglaris*, mostrou um pico simétrico com massa molecular estimada sob gel filtração de 55 kDa e também possui um cromóforo, este com absorção máxima a 660 nm. Não foi possível determinar a estrutura pigmento de CvP, de forma similar a H-3 (CARNEIRO *et al.*, 2013b, 2015).

A cromatografia de exclusão molecular em coluna BioSuite 250 HR SEC (0.78 x 30 cm), acoplada ao sistema Acquity UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, Waters Corp.), estimou a massa molecular de AFL em 150 kDa (Figura 10).

Figura 10 – Cromatografia de Exclusão Molecular



Fonte: o Autor

Cromatografia de exclusão molecular em coluna em coluna BioSuite 250 HR (0,78 cm x 0,30 cm, tamanho de partícula 5 μ m) acoplada em sistema Acquity UPLC. A coluna foi previamente equilibrada e a cromatografia foi conduzida em tampão fosfato 20mM, pH 7,0, contendo NaCl 150 mM com fluxo de 0,4 mLmin⁻¹. Marcadores: 1) Tiroglobulina (669 kDa); 2) Apoferritina (443 kDa); 3) β -amilase (200 kDa); 4) Álcool desidrogenase (150 kDa); 5) BSA (66 kDa)

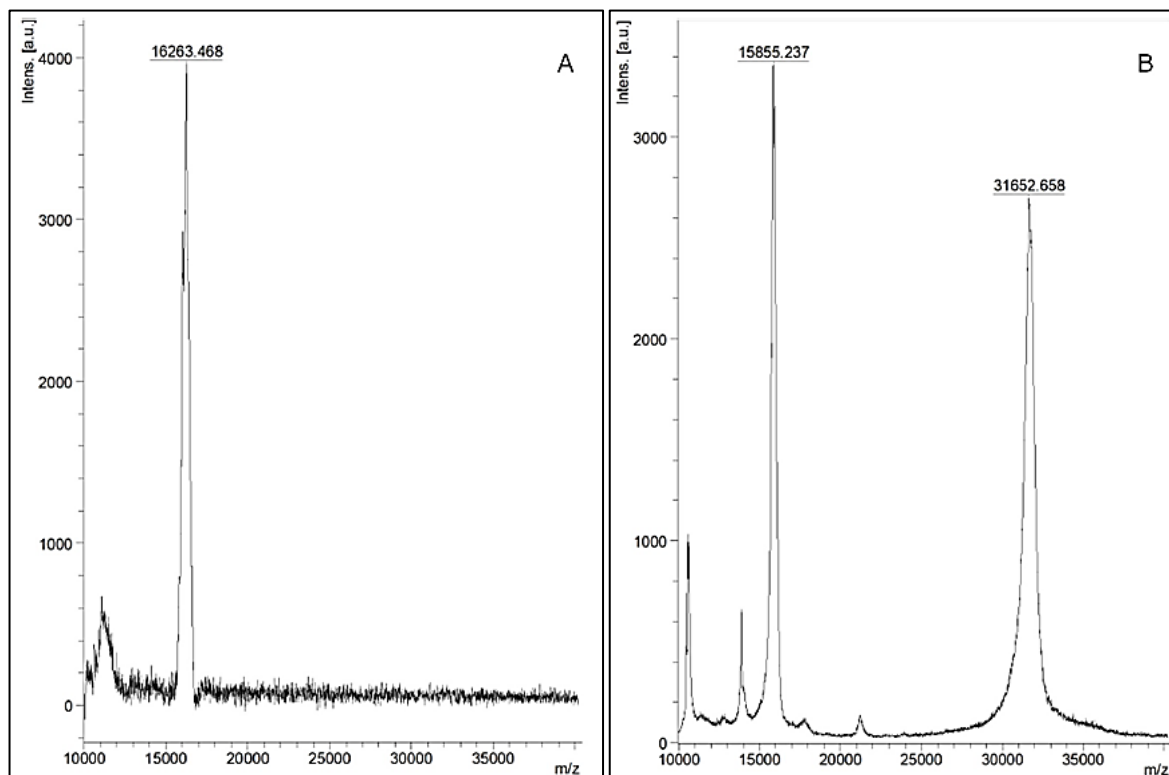
Os resultados relatados de ALL em cromatografia de exclusão molecular mostraram que essa proteína apresenta em sua forma nativa conformação oligomérica de massa molecular de aproximadamente 94 kDa (CARNEIRO *et al.*, 2017). AAL apresentou em exclusão molecular, um pico simétrico de 63 kDa, (MIARONS; FRESNO, 2000). CCL em gel filtração teve sua massa molecular estimada em 54 kDa, (MARQUES *et al.*, 2018). CvL apresentou perfil em exclusão molecular de 114 kDa (MOURA *et al.*, 2006). Os dados de SDS-PAGE e gel filtração sugerem que essas lectinas apresentam, em sua forma nativa, conformação oligomérica com subunidades ligadas por interações fracas ou pontes dissulfeto.

4.5 Determinação da massa molecular média

A massa molecular média de CvP por MS não foi determinada. Por outro lado, a determinação da massa média de AFL por MALDI-ToF MS evidenciou dois íons de m/z 31.652 \pm 5 e 15.855 \pm 5, correspondentes aos estados com uma e duas cargas, respectivamente (Figura 11B). AFL, previamente alquilada com 4-VP não mostrou acréscimo de massa, indicando a ausência de cisteínas livres (dado não mostrado). Entretanto, quando AFL foi, primeiramente,

reduzida e alquilada foi evidenciado um íon de m/z de 16.263 ± 5 Da, indicando a presença de cisteínas envolvidas em pontes dissulfeto (Figura 11A).

Figura 11 – Determinação da massa molecular de AFL por MALDI-ToF



Fonte: o Autor

(A) Massa molecular de AFL piridiletilada determinada. (B) Massa molecular de AFL em condição nativa determinada.

A massa dimérica da proteína foi determinada em 31.652 Da, assim, a massa monomérica é de 15.826 Da. Quando feito o cálculo da diferença da massa monomérica de AFL em relação a massa da lectina reduzida e alquilada é possível observar um incremento de massa de 437 Da. Assim, é possível evidenciar a presença de 4 cisteínas envolvidas em pontes dissulfeto. Cada grupo tiol presente nas cisteínas envolvidas em pontes dissulfeto recebe um acréscimo de massa de aproximadamente 104 Da, referente a piridiletilação ($437 \text{ Da}/104 \text{ Da} = 4,2$ cisteínas). Os resultados sugerem que as cisteínas estejam envolvidas em pelo menos uma ponte dissulfeto intercadeia. Entretanto, não foi possível determinar se há pontes dissulfeto em ligação intracadeia. ALL mostrou a presença de 3 cisteínas em sua estrutura, sendo responsáveis por uma ponte intercadeia e outra intracadeia (CARNEIRO *et al.*, 2017).

4.6 Determinação das sequências internas de CvP

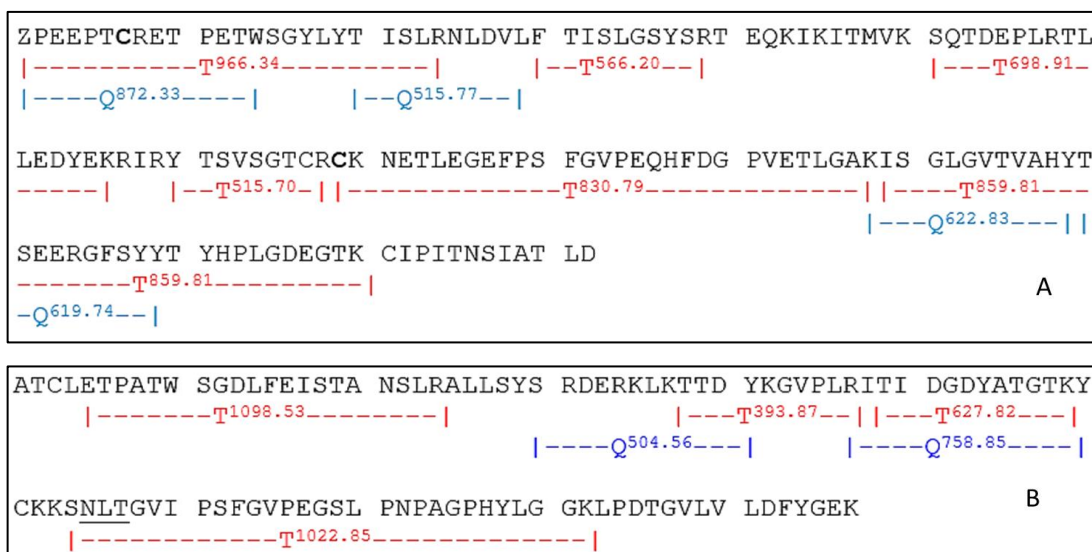
A estrutura primária de CvP foi parcialmente determinada utilizando espectrometria de massas. Dez peptídeos obtidos por digestão com tripsina e cinco peptídeos obtidos por digestão com quimotripsina foram sequenciados manualmente e permitiram a identificação parcial das sequências das cadeias polipeptídicas α e α' e da cadeia β (Tabela 5). Os aminoácidos sequenciados compõem aproximadamente 71% do total de aminoácidos (Figura 12).

Tabela 5 – Sequência de peptídeos obtidos por digestão com tripsina e com quimotripsina da *lectin-like* de *Callyspongia vaginalis* (CvP)

m/z	Sequência	Massa		Δ (Da)
		Observada	Calc	
Cadeia α e α'				
T _{966.34}	ZPEEPTCRETPETWSGYLYTISLR	2895.00	2895.33	0.33
T _{566.20}	FTISLGYSR	1129.36	1129.57	0.22
T _{698.91}	SQTDEPLRTLLEDYEK	2091.80	2092.04	0.24
T _{515.70}	YTSVSGTCR	1029.37	1029.45	0.08
T _{830.79}	CKNETLEGEFSPFGVPEQHFDGPNVETLGAK	3318.12	3318.55	0.43
T _{859.81}	ISGLGVTVAHYTSEERGFSSYYTYHPLGDQ GTK	1717.62	1717.86	0.23
Cadeia β				
T _{1098.53}	ETPATWSGDLFEISTANSLR	2194.01	2194.05	0.04
T _{393.7}	TTDYKGVPLR	1178.57	1178.59	0.02
T _{627.82}	TIDGDYATGTKY	1253.60	1253.61	0.01
T _{1022.85}	<u>SNLT</u> GVIPSPFGVPEGSLPNPAGPHYLGGK	3065.52	2861.47	-203
Cadeia α e α'				
Q _{872.33}	ZPEEPTCRETPETW	1741.65	1741.72	0.07
Q _{515.77}	TISLRNLDVLF	1029.54	1029.58	0.04
Q _{622.83}	KISGLGVTVAHY	1243.63	1243.69	0.06
Q _{619.74}	TSEERGFSSYY	1237.54	1237.52	-0.02
Cadeia β				
Q _{504.56}	SRDERKLKTTDY	1515.68	1515.75	0.07
Q _{758.85}	RITIDGDYATGTKY	1510.77	1510.67	0.10

Fonte: o Autor

Peptídeos manualmente sequenciados após digestão triptica dos spots de CvP sob condição não redutora. T-peptídeos obtidos a partir da digestão com tripsina. Q- peptídeos obtidos a partir da digestão com quimotripsina

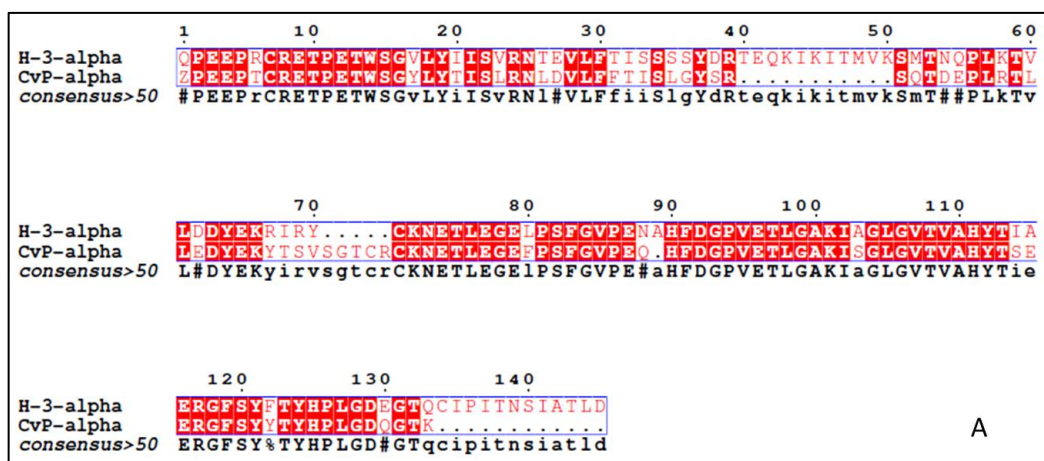
Figura 12 – Mapa peptídico da *lectin-like* de *Callispongia vaginalis* (CvP)

Fonte: o Autor

Mapa peptídico das seqüências das cadeias alfa (A) e beta (B) de CvP. T- peptídeos obtidos a partir da digestão com tripsina. Q- peptídeos obtidos a partir da digestão com quimotripsina. As seqüências não cobertas pelos peptídeos sequenciados foram completadas com a seqüência da proteína putativa de *Amphimedon queenslandica* XP_019856687.1.

Apesar de não mostrar aglutinar eritrócitos, as seqüências de CvP apresentaram alto grau de similaridade com H-3 e com uma proteína putativa codificada no genoma de *Amphimedon queenslandica* XP_019856687.1 (CARNEIRO *et al.*, 2013b) (Figura 13).

Figura 13 – Alinhamento da estrutura de CvP, parcialmente obtida por MS/MS, com uma lectina da esponja marinha *Haliclona caerulea*.



	1	10	20	30	40	50
H-3-beta	AATCK	ETPP	TWSGHLFEIST	DNPRRADISY	SREBKIDT	TDYKGVPLRTID.DYATGTK
CvP-beta	...	ETPA	TWSGDLFEISTANSIR	...	SREBKIKT	TDYKGVPLRTIDGDYATGTK
consensus>50	aatckETPa	TWSGdLFEISTdNplRadisySR#EkKidT	TDYKGVPLRiTIdgDYATGTK			

	60	70	80	90	100
H-3-beta	YCRK	SNLTGT	IPIFGVPD	KLPS	PAGPHYLGGLPSTGVLVLDfyGek
CvP-beta	Y...	SNLTGv	IPsFGVPEGSLPN	PAGPHYLGGL	...
consensus>50	YcrkSNLTGv	IPsFGVPEGSLPN	PAGPHYLGGLp	stgvlvldfygek	

Fonte: o Autor

Sequências das cadeias alfa (A) e beta (B) de CvP e H-3 alinhadas com o auxílio da ferramenta MultiAlin

Como já evidenciado em SDS-PAGE, de forma similar à H-3, CvP é composta por duas cadeias alfa e uma cadeia beta. As sequências parciais das cadeias alfa de 22 e 18 kDa obtidas por MS/MS de CvP mostraram similaridade de 65% e identidade de 71% com as cadeias alfa de H-3. As sequências parciais da cadeia beta de 14,5 kDa de CvP mostraram similaridade de 70% e identidade de 78% com a cadeia beta de H-3. Como já dito, CvP também possui característica eletroforética e a presença de um cromóforo ligado a sua estrutura peptídica, também de forma similar a HMA. Assim, CvP foi considerada uma *lectin-like*, isto é, uma proteína semelhante as lectinas que, contudo, não apresenta a capacidade de aglutinar os eritrócitos testados (CARNEIRO *et al.*, 2013b, 2015).

As sequências parciais de CvP permitiram a identificação de um sítio de *N*-glicosilação presente na cadeia β encontrado no peptídeo tríptico *m/z* 1022,85 (SNLTGvIPsFGVPEGSLPNPAGPHYLGGLK). Mesmo após o sequenciamento completo do peptídeo, ainda é possível evidenciar uma diferença de 203 Da entre a massa observada e a massa calculada. Possivelmente essa diferença é observada pela presença de um resíduo de *N*-acetilhexosamina no sítio de glicosilação. De forma similar, a lectina H-3 também apresentou sítio de *N*-glicosilação na cadeia β com o primeiro resíduo do glicano sendo uma *N*-acetilhexosamina (CARNEIRO *et al.*, 2013b).

4.7 N-terminal e sequências internas de AFL

Os 15 primeiros aminoácidos do N-terminal da proteína foram determinados pela degradação de Edman e tiveram a sequência composta por: 1 GHIDLEFDVGQXIQA 15 . Essa sequência foi muito semelhante ao N-terminal de ALL: 1 DHIDLEFDVGQXIQA 15 (dados não publicados). Apesar do comportamento complexo de AFL apresentado em SDS-PAGE, só foi encontrada uma única sequência N-terminal.

A estrutura primária de AFL foi parcialmente determinada pela sequência de peptídeos obtidos por MS/MS. Dezesesseis peptídeos obtidos por digestão com tripsina foram determinados (TABELA 6), sendo sete peptídeos referentes a banda de 15 kDa, cinco peptídeos referentes a banda de 30 kDa e quatro peptídeos referentes a banda de 70 kDa. Alguns peptídeos determinados por MS/MS foram encontrados em todas as bandas eletroforéticas. Os peptídeos com m/z 443,26 (TPVNLVSR) e m/z 689,38 (VEFGNSGNDVLR) foram sequenciados a partir das bandas de 16, 30 e 70 kDa.

Tabela 6 – Sequência interna de peptídeos obtidos por digestão trípica da lectina de *Aplysina fulva* (AFL)

m/z	Sequência	Massa		Δ (Da)
		Observada	Calculada	
AFL spot 15 kDa				
763,38	VQFDDQGYDAVLR	1524,74	1524.72	-0.02
720,41	VQFSNSGFDAVLR	1438,81	1438.72	-0.09
713,39	VQFSNSGYDAVLR	1424,77	1424.70	-0.07
689,38	VEFGNSGNDVLR	1376,75	1376.66	-0.09
437,25	TPVNTVSR	872,49	872.47	-0.02
443,27	TPVNLVSR	884,52	884.50	-0.02
565,82	LASESWNPAR	1129,63	1129.65	-0.08
AFL spot 30 kDa				
690,34	FFLFSYASGWR	1379.67	1379.66	-0.01
676,35	QHLFSYASGWR	1350.69	1350.64	-0.05
689,38	VEFGNSGNDVLR	1376.77	1376.66	-0.11
443,23	TPVNLVSR	884.46	884.50	0.04
AFL spot 70 kDa				
689,32	VEFGNSGNDVLR	1376.64	1376.66	0.03
763,36	VQFDDQGYDAVLR	1524.70	1524.72	0.02
437,22	TPVNTVSR	872.43	872.47	0.04
443,26	TPVNLVSR	884.50	884.50	0.00

Fonte: o Autor

Peptídeos manualmente sequenciados após digestão trípica dos spots de AFL (15 e 30 kDa, sob condições redutoras e 70 kDa, sob condição não redutora).

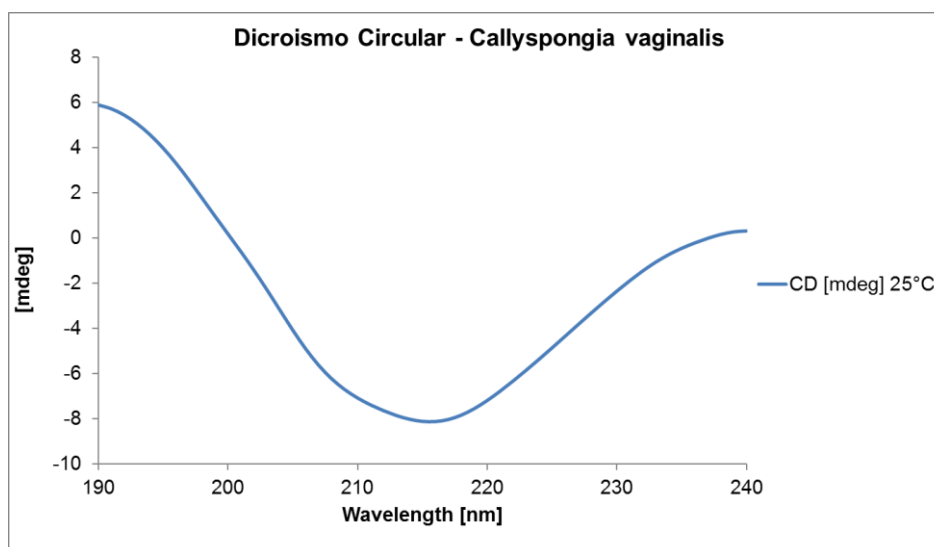
Os peptídeos da proteína com m/z 763,38; 720,41; 713, 39; 689, 39; 565, 82 possuem alto grau de similaridade com a ALL.

Além disso, em ambas as lectinas foram observadas sequências de peptídeos muito similares, como por exemplo, m/z 689,38 (VEFGNSGNDVLR) e m/z 763,38 (VQFDDQGYDAVLR), sugerindo que as proteínas podem ser constituídas por estruturas primárias em *tandem*, ou seja, por domínios com sequências repetidas (CARNEIRO *et al.*, 2017).

4.8 Dicroísmo Circular

Os espectros adquiridos por Dicroísmo Circular de CvP mostraram uma grande banda positiva em torno de 190 nm e uma banda negativa com mínimo entre 210 e 220 nm, característica inerente a proteínas compostas predominantemente por estruturas β (SREERAMA; WOODY, 2003). Quando os espectros foram analisados com o auxílio da ferramenta de predição CONTIN, alocado no servidor online DICROWEB (SPOELDER; GRONDELLE; GROEN, 1990), mostraram que a estrutura secundária teórica da proteína é formada predominantemente por 60% de β -estruturas, 3% de α -helice e 37% de estruturas desordenadas (Figura 14).

Figura 14 – Espectro de dicroísmo circular de CVP



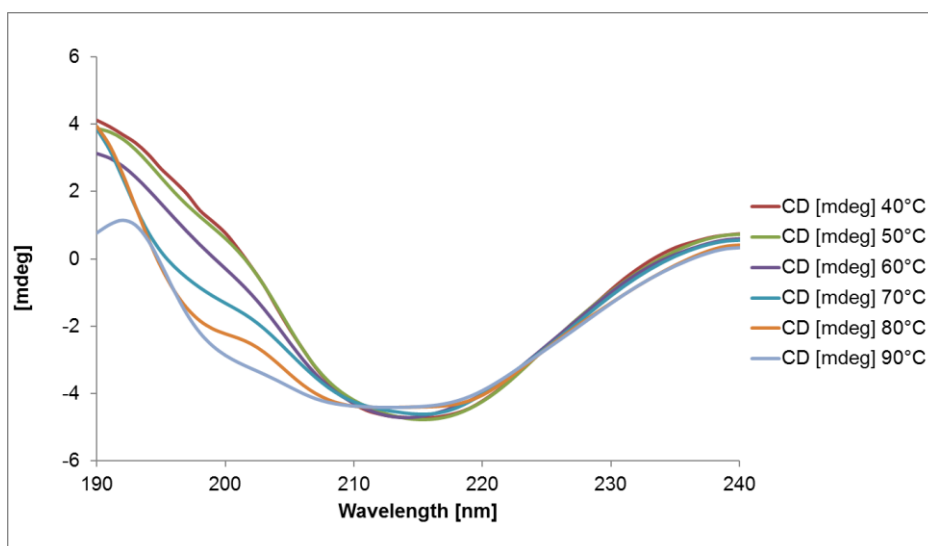
Fonte: o Autor

Espectro de Dicroísmo Circular (*Far-UV*; 190 a 240 nm) de CvP

Proteínas com predominância de estruturas β podem ser classificadas como proteínas β_I e proteínas β_{II} . Proteínas β_I são compostas por grande quantidade de β -folhas e os espectros de Dicroísmo Circular possuem como característica uma grande banda positiva em torno de 190 nm e uma banda negativa entre 210 e 200 nm. Proteínas β_{II} são compostas por grande quantidade de fitas β e estruturas desordenadas, e os espectros de Dicroísmo Circular possuem como característica uma pequena banda positiva em torno de 190 nm e uma banda negativa em torno de 200 nm. Assim, é possível classificar CvP como uma proteína do tipo β_I (SREERAMA; WOODY, 2003).

As modificações na estrutura secundária de CvP em função da temperatura também foram observadas através do monitoramento das mudanças nos espectros de Dicroísmo Circular. Algumas alterações foram observadas nas absorbâncias máximas e mínimas do espectro, sugerindo perda de estrutura secundária (Figura 15).

Figura 15 – Espectro de dicroísmo circular de CvP em diferentes temperaturas



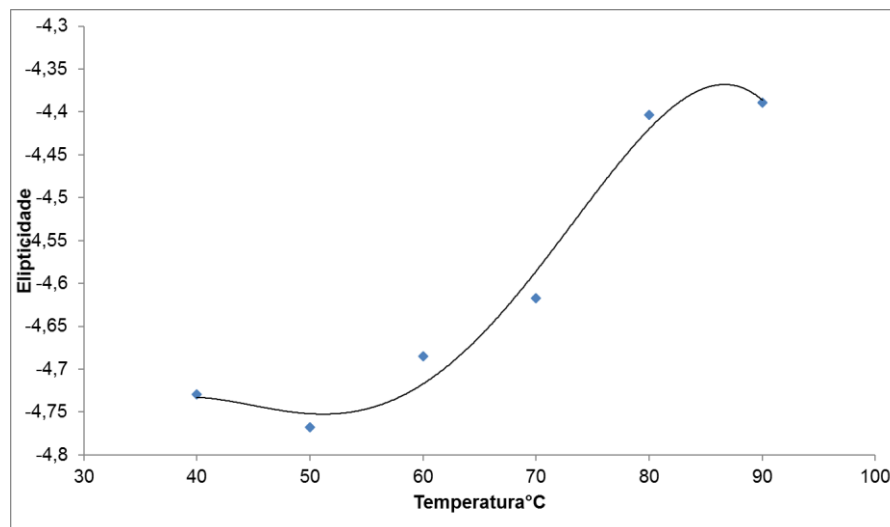
Fonte: o Autor

Espectro de Dicroísmo Circular (*Far-UV*; 190 a 240 nm) de CvP incubada em diferentes temperaturas (°C).

Essas modificações dos espectros adquiridos em diferentes temperaturas estão relacionadas ao comportamento das proteínas em solução. Com o aquecimento da solução proteica, muitas proteínas tendem a formar agregados ou a precipitar após serem desdobradas (RANJBAR; GILL, 2009).

Além disso, a temperatura de *Melting* (T_M) de CvP foi calculada em função dos valores de elipticidade na maior e na menor temperatura. Quando os espectros de Dicroísmo Circular de uma proteína são alterados em função de diferentes temperaturas, a modificação pode ser utilizada para calcular parâmetros termodinâmicos de dobramento da proteína, como a T_M . A temperatura de *Melting* é definida como a quantidade de calor em que pelo menos 50% da estrutura da proteína passa do estágio dobrado para o não dobrado. Proteínas com estruturas parcialmente desnaturadas podem apresentar perda significativa de funções relacionadas a interação proteína com proteína ou proteína com ligante (GREENFIELD, 2007; RANJBAR; GILL, 2009). A temperatura de *Melting* (T_M) de CvP foi calculada em 69, 62°C (Figura 16).

Figura 16 – Curva de regressão da *Temperatura de Melting* de CvP em diferentes temperaturas



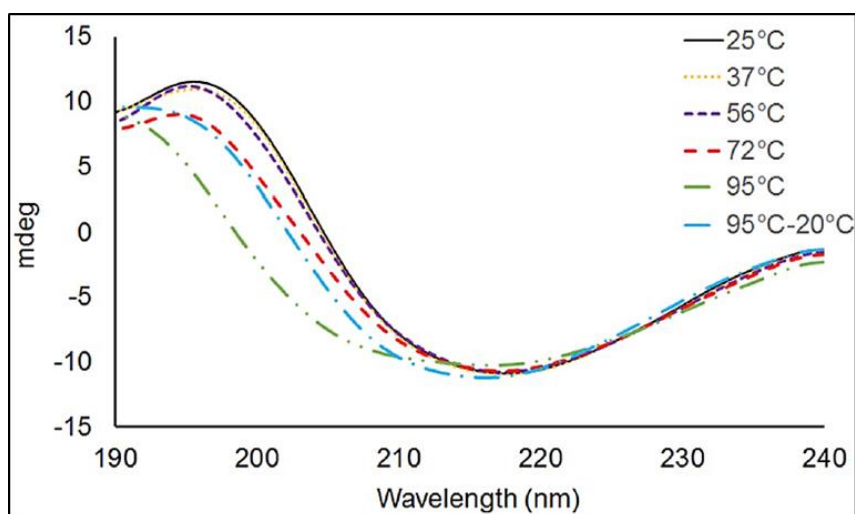
Fonte: o Autor

Os espectros adquiridos por Dicroísmo Circular de AFL mostraram um mínimo de 216 nm e quando analisados com o auxílio da ferramenta de predição CONTIN, do servidor online DICROWEB (SPOELDER; GRONDELLE; GROEN, 1990), mostraram que a estrutura secundária teórica da proteína é formada predominantemente por 61% de β -estruturas, 2% de α -helices e 36% de estruturas desordenadas. Também é possível classificar AFL como uma proteína do tipo β_1 (SREERAMA; WOODY, 2003).

Lectinas de esponjas marinhas tem mostrado predominância de conformações β em suas estruturas secundárias. Semelhante à AFL, ALL é maioritariamente formada por conformações β , sendo composta de 35% de folhas- β e 23% de voltas- β (CARNEIRO *et al.*, 2017). Também de forma similar, CCL é composta por 74% de estruturas β (MARQUES *et al.*, 2018).

As modificações na estrutura secundária de AFL em função da temperatura e pH também foram observadas através do monitoramento das mudanças nos espectros de Dicroísmo Circular. Algumas alterações foram observadas nas absorvâncias máximas e mínimas do espectro, sugerindo perda de estrutura secundária sob certas condições. A estrutura secundária de AFL mostrou resistência às variações de temperatura abaixo de 72°C. A alteração mais significativa foi observada a 95°C, porém, quando a proteína foi resfriada à 20°C foi possível observar a recuperação parcial da estrutura secundária (Figura 17).

Figura 17 – Espectro de dicroísmo circular de AFL em diferentes temperaturas



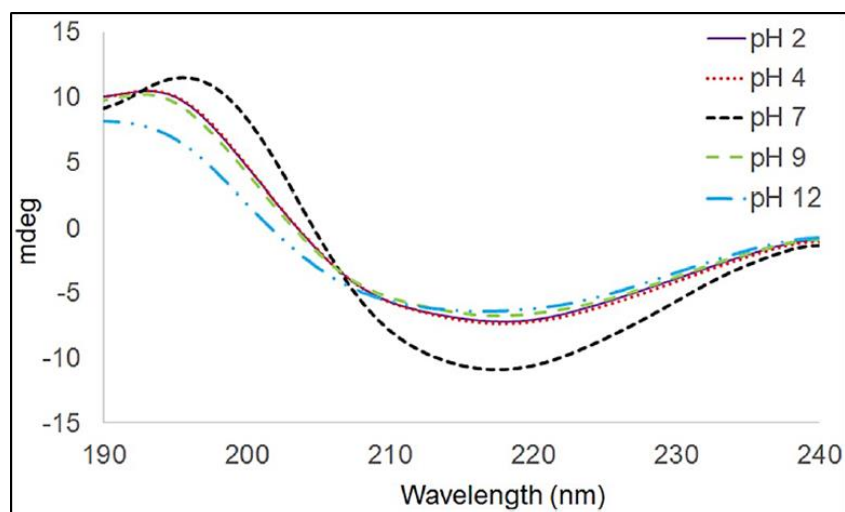
Fonte: o Autor

Espectro de Dicroísmo Circular (*Far-UV*; 190 a 240 nm) de AFL incubada em diferentes temperaturas (°C).

De forma bastante semelhante, a estrutura secundária de CCL mostrou ser bastante estável quando aquecida em temperaturas até 75°C, tendo modificações na estrutura secundária quando aquecida à 95°C, mas recuperando parcialmente a estrutura secundária quando resfriada a 20°C (MARQUES *et al.*, 2018).

Quando AFL foi testada em diferentes valores de pH, a lectina mostrou estabilidade em pH 7, porém, foram observadas alterações significativas nos espectros de dicroísmo circular quando em outros pH, sugerindo a desnaturação da proteína (Figura 18).

Figura 18 – Espectro de dicroísmo circular de AFL em diferentes pH



Fonte: o Autor

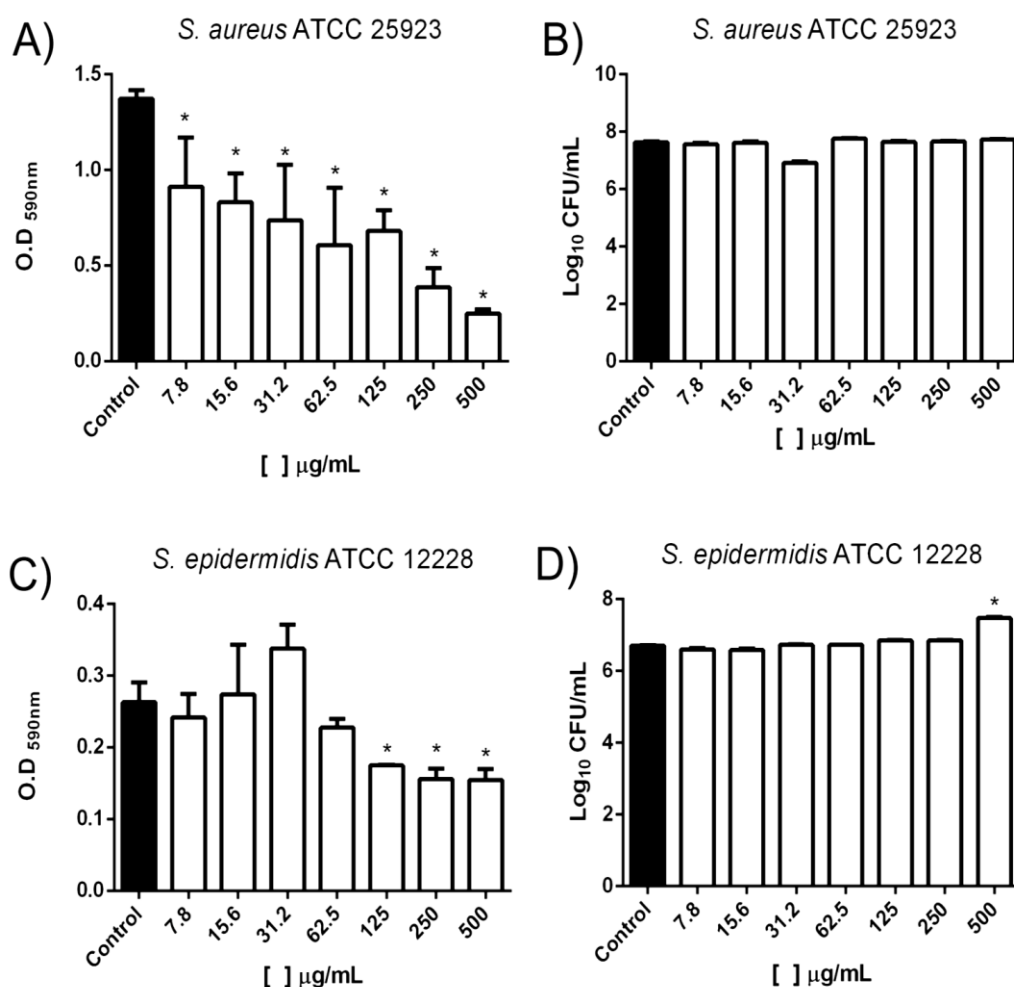
Espectro de Dicroísmo Circular (*Far-UV*; 190 a 240 nm) de AFL incubada em diferentes pH

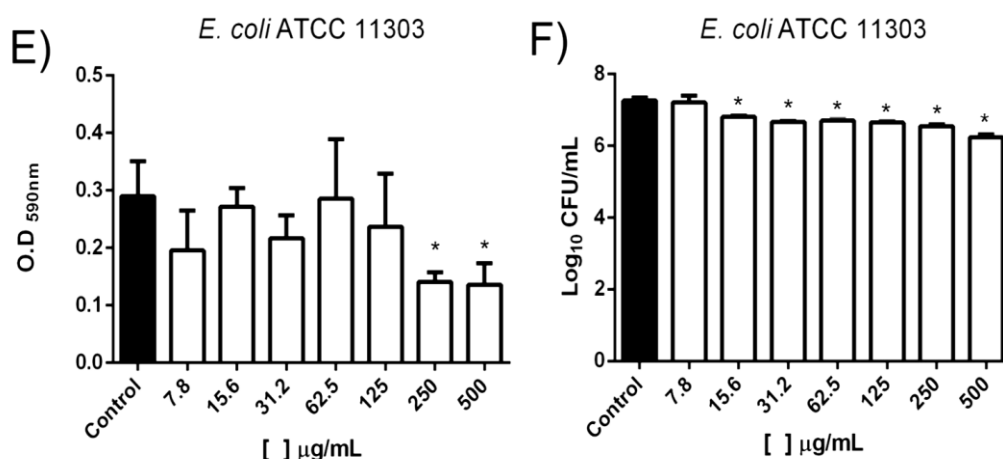
Diferentemente de AFL, CCL mostrou ter a estrutura secundária bastante estável entre pH 2 e 10, exibindo uma leve alteração no espectro de dicróismo circular quando encubada em pH 12 (MARQUES *et al.*, 2018)

4.9 Atividade antibacteriana e antibiofilme de AFL

A lectina foi capaz de reduzir as massas dos biofilmes de todas as cepas bacterianas testadas. AFL se mostrou eficiente em todas as concentrações testadas contra *Staphylococcus aureus*. Quando testada contra *S. epidermidis* e *Escherichia coli*, a lectina foi capaz de reduzir a massa dos biofilmes quando em concentrações mais altas. Interessantemente, AFL não mostrou redução significativa no número de células viáveis dos biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis*. AFL não foi capaz de inibir o crescimento planctônicos das cepas testadas. Porém, foi capaz de reduzir as unidades formadoras de colônia de *E. coli* em torno de 0,5-1 log₁₀ (Figura 19).

Figura 19 – Efeitos de AFL na formação do biofilme bacteriano





Fonte: o Autor

Quantificação da biomassa do biofilme medido por cristal violeta para os biofilmes de de *S. aureus* (A), *S. epidermidis* (C) e *E.coli* (E). Valores médios dos logaritmos das unidades formadoras de colônias de *S. aureus* (B), *S. epidermidis* (D) e *E.coli* (F).

ALL também foi capaz de exibir atividade contra cepas bacterianas de *S. aureus* e *E. coli*, causando aglutinação (CARNEIRO *et al.*, 2017).

CCL mostrou ser capaz de reduzir significativamente as massas dos biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis*. A atividade da lectina foi inibida na presença de α -lactose, evidenciando a participação do sítio de ligação a carboidrato da lectina na atividade contra cepas bacterianas (MARQUES *et al.*, 2018). CvL também foi capaz de reduzir o crescimento bacteriano de *S. aureus* em 90% (MOURA *et al.*, 2006).

Lectinas de invertebrados tem mostrado que atuam como proteínas capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos, sendo capazes de reconhecer e se ligarem a lipopolissacarídeos, peptídeoglicanos, β -glicanos e mananas presentes em diversos microorganismos (GARDÈRES *et al.*, 2015). A atividade de lectinas de esponjas marinhas contra cepas bacterianas patogênicas pode indicar um possível uso dessas moléculas como potencializadores de ação antibiótica (CARNEIRO *et al.*, 2017; MARQUES *et al.*, 2018; MOURA *et al.*, 2006).

5. CONCLUSÃO

Foram detectadas as atividades hemaglutinantes e hemolíticas em extratos aquosos de diversas espécies de esponjas marinhas presentes no litoral do Estado do Ceará. Assim, a partir detecção das atividades dos extratos, duas novas proteínas foram isoladas das espécies *Callyspongia vaginalis* e *Aplysina fulva*. CvP é uma proteína pigmento sem atividade hemaglutinante, mas com estrutura primária similar à lectina H-3, composta por três cadeias polipeptídicas e tendo a presença de um cromóforo de coloração azul, sendo caracterizada como *lectin-like*. A *lectin-like* mostrou estabilidade térmica de sua estrutura secundária e é composta por grande quantidade de folhas β , sendo classificada como proteína do tipo β_1 . AFL é uma lectina com interessante comportamento em SDS-PAGE, evidenciando a capacidade de formar oligômeros. AFL teve sua estrutura primária parcialmente determinada e mostrou similaridade com à lectina ALL. A estrutura secundária de AFL mostrou ser bastante estável quando submetida à testes em diferentes temperaturas, mas pouco estável em diferentes pH. AFL é ligante de galactose e é específica a glicoproteína mucina. Além disso, AFL exibiu atividade contra cepas bacterianas, evidenciando potencial utilização como agente antimicrobiano.

REFERÊNCIAS

- ABDELMOHSEN, U. *et al.* Antichlamydial Sterol from the Red Sea Sponge *Callyspongia aff. implexa*. **Planta Medica**, [s.l.], 81(05), 382–387, 2015
- AO, J. *et al.* Molecular Characterization and Biological Effects of a C-Type Lectin-Like Receptor in Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*) **Int. J. Mol. Sci.**, [s.l.], 16, 29631–29642, 2015
- ARASU, A. *et al.* Bactericidal activity of fish galectin 4 derived membrane-binding peptide tagged with oligotryptophan. **Developmental and Comparative Immunology** [s.l.], (2017), doi: 10.1016/j.dci.2017.01.019.
- BANDARANAYAKE, W. M. The nature and role of pigments of marine invertebrates. **Natural Product Reports**, [s.l.], v. 23, n. 2, p. 223–255, 2006.
- BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, [s.l.], 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**, [s.l.], v. 72, p. 248 - 254 , 1976.
- CARNEIRO, RÔMULO FARIAS. **Lectinas da esponja marinha *Haliclona (Soestella) caerulea***. 2013. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* Halilectin 1 (H-1) and Halilectin 2 (H-2): Two new lectins isolated from the marine sponge *Haliclona caerulea*. **Journal of Molecular Recognition**, [s.l.], v. 26, n. 1, p. 51–58, 2013a.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* H-3, a new lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*: Purification and mass spectrometric characterization. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [s.l.], v. 45, n. 12, p. 2864–2873, 2013b.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* Isolation, biochemical characterization and antibiofilm effect of a lectin from the marine sponge *Aplysina lactuca*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 99, p. 213–222, 2017.
- CARNEIRO, RÔ. F. *et al.* A chromophore-containing agglutinin from *Haliclona manglaris*: Purification and biochemical characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 72, p. 1368–1375, 2015.
- CHEUNG, R.C.F. *et al.* Marine lectins and their medicinal applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 99, p. 3755-3773, 2015.
- DALETOS, G. *et al.* Callyaerins from the Marine Sponge *Callyspongia aerizusa*: Cyclic Peptides with Antitubercular Activity. **J. Nat. Prod.**, [s.l.], 2015, 78, 1910–1925
- DE MELO, A. A. *et al.* HGA-2, a novel galactoside-binding lectin from the sea cucumber

holothuria grisea binds to bacterial cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.]. v. 64, p. 435–442, 2014.

DO NASCIMENTO-NETO, L. G. *et al.* A. Halilectin-3, a Lectin from the Marine Sponge *Haliclona caerulea*, Induces Apoptosis and Autophagy in Human Breast Cancer MCF7 Cells Through Caspase-9 Pathway and LC3-II Protein Expression. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, [s.l.]. v. 18, p. 521-528, 2018.

DRESCH, R. R. *et al.* Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porifera) nativas da costa atlântica do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.]. v. 15, n. 1, p. 16–22, 2005.

FUNAYAMA, N. *et al.* 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**, [s.l.]. v. 22, n. 10, p. 1113–1122, 2005.

GARDÈRES, J. *et al.* **Porifera lectins: Diversity, physiological roles and biotechnological potential**. [s.l.: s.n.]. v. 13

GARDÈRES, J. *et al.* 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**, [s.l.]. v. 200, p. 17–27, 2016.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; & OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, [s.l.]. 113(3), 236–247, 2011.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. **Nature Protocols**, [s.l.]. v. 1, n. 6, p. 2527–2535, 2007.

GUNDACKER, D. *et al.* Isolation and cloning of a C-type lectin from the hexactinellid sponge *Aphrocallistes vastus*: A putative aggregation factor. **Glycobiology**, [s.l.]. 11, 21–29, 2001

HAMID, R. *et al.* Lectins: proteins with diverse applications. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, [s.l.]. v. 3, p. S93-S103, 2013.

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

IBRAHIM, S.R. *et al.* Callyaerins A–F and H, new cytotoxic cyclic peptides from the Indonesian marine sponge *Callyspongia aerizusa*. **Bioorg. Med. Chem**, [s.l.]. 18, 4947–4956, 2010.

IWAKI, D. *et al.* Functional and structural diversities of C-reactive proteins present in horseshoe crab hemolymph plasma. **Eur J Biochem**, [s.l.]. 264:314–326, 1999.

JIMBO, M. *et al.* The d-galactose-binding lectin of the octocoral *Sinularia lochmodes*: characterization and possible relationship to the symbiotic dinoflagellates. **Comparative**

Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, [s.l]. 125(2), 227–236, 2000

KAZANJIAN, A.; FARIÑAS, M. (Porifera : Aplysinidae). v. 54, n. December, p. 189–200, 2006.

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

KITA, A. *et al.* Crystal structure of a symbiosis-related lectin from octocoral. **Glycobiology**, [s.l]. 25(9), 1016–1023, 2015. doi:10.1093/glycob/cwv033

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

MARQUES, D. N. *et al.* Antibacterial activity of a new lectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l]. v. 109, p. 1292–1301, 2018.

MEBS, D. *et al.* A protease from the marine sponge *Callyspongia schulzi*. **IUBMB Life** [s.l]. 42(4), 789–797, 1997.

MEBS, D.; WEILER, I.; HEINKE, H. F. Bioactive proteins from marine sponges: Screening of sponge extracts for hemagglutinating, hemolytic, ichthyotoxic and lethal properties and isolation and characterization of hemagglutinins. **Toxicon**, [s.l]. v. 23, n. 6, p. 955–962, 1985.

MIARONS, P. B.; FRESNO, M. Lectins from tropical sponges. Purification and characterization of lectins from genus *Aplysina*. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l]. v. 275, n. 38, p. 29283–29289, 2000.

MOTOHASHI, S. *et al.* Isolation, Amino Acid Sequences, and Plausible Functions of the Galacturonic Acid-Binding Egg Lectin of the Sea Hare *Aplysia kurodai*. **Marine Drugs**, [s.l]. 15(6), 161. doi:10.3390/md15060161, 2017.

MOURA, R. M. *et al.* CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, [s.l]. v. 145, n. 4, p. 517–523, 2006.

MOURA, R. M. *et al.* Hemagglutinating/Hemolytic activities in extracts of marine invertebrates from the Brazilian coast and isolation of two lectins from the marine sponge *Cliona varians* and the sea cucumber *Holothuria grisea*. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, [s.l]. v. 87, n. 2, p. 973–984, 2015.

NAGAI, T. *et al.* Purification, Characterization, and Amino Acid Sequence of an Embryonic Lectin in Perivitelline Fluid of the *Horseshoe Crab*. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l]. 274(53), 1999.

- PAJIC, I. *et al.* A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: Isolation, characterization and biological activity. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, [s.l]. 132, 213–221, 2002.
- PECHENIK, J. A. **Biologia dos invertebrados** – 7. ed. – Porto Alegre : AMGH, 2016.
- PINHEIRO, U. D. S.; HAJDU, E.; CUSTÓDIO, M. R. *Aplysina nardo* (porifera, verongida, aplysinidae) from the Brazilian coast with description of eight new species. **Zootaxa**, [s.l]. n. 1609, p. 1–51, 2007
- PLISSON, F. *et al.* Biomolecular Chemistry from an Australian marine sponge ,. p. 1579–1584, 2014.
- RANJBAR, B.; GILL, P. Circular dichroism techniques: Biomolecular and nanostructural analyses- A review. **Chemical Biology and Drug Design**, [s.l]. v. 74, n. 2, p. 101–120, 2009.
- RAVINDRANATH, M. H. *et al.* Purification and characterization of an O-acetylsialic acid-specific lectin from a marine crab *Cancer antennarius*. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l]. v. 260, n. 15, p. 8850–8856, 1985.
- SAMPAIO, A.H. *et al.* 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**. [s.l]. v. 14, p. 489–495, 2002.
- SAMPAIO, A.H.; ROGERS, D.J.; BARWELL, C.J. A galactose specific lectin from the red marine algae *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, [s.l]. v. 48, p. 765-769, 1998.
- SANCHEZ, J.F. *et al.* Biochemical and structural analysis of *Helix pomatia* agglutinin. A hexameric lectin with a novel fold. **J Biol Chem**, [s.l]. 281:20171–20180, 2006.
- SCHAUER, B. Y. R. **Functions of Sialic Acids**. [s.l: s.n.]. v. 40
- SCHRÖDER, H.C. *et al.* Co-expression and functional interaction of silicatein with galectin: Matrix-guided formation of siliceous spicules in the marine demosponge *Suberites domuncula*. **J. Biol. Chem.**, [s.l]. 281, 12001–12009, 2006.
- SHARON, N. AND LIS, H. (2003) **Lectins**. 2nd Edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognize molecules. **Glycobiology**, [s.l]. v.14, n.11, p.53-62, 2004.
- SHARON, N.; LIS, H. Lectins: Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, [s.l]. v. 177, p. 949-959, 1972.
- SHEVCHENKO, A. *et al.* In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, [s.l]. 1(6), 2856–2860, 2007. doi:10.1038/nprot.2006.468
- SHIROUZU, T. *et al.* Structure, synthesis, and biological activity of a C-20 bisacetylenic alcohol from a marine sponge *Callyspongia* sp. **Journal of Natural Products**, [s.l]. v. 76, n. 7, p. 1337–1342, 2013.

SPOELDER, H. J. W.; GRONDELLE, R. VAN; GROEN, F. C. A. Estimation of Protein Secondary Structure Analysis from Circular Dichroism Spectra and Error. v. 118, p. 110–118, 1990.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Structural composition of β I- and β II-proteins. **Protein science : a publication of the Protein Society**, [s.l]. v. 12, n. 2, p. 384–388, 2003

UTARABHAND, P. *et al.* Sialic acid-specific lectin participates in an immune response and ovarian development of the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, [s.l]. v. 203, p. 132–140, 2017.

WIENS, M. *et al.* The Molecular Basis for the Evolution of the Metazoan Bodyplan: Extracellular Matrix-Mediated Morphogenesis in Marine Demosponges. **Journal of Molecular Evolution**, [s.l]. v. 57, n. SUPPL. 1, p. 60–75, 2003.

VASTA, G.; AHMED, H. Introduction to Animal Lectins. **Animal Lectins**, n. July 2017, p. 2–10, 2008.

ZHANG, X. W. *et al.* Overexpression of a C-type lectin enhances bacterial resistance in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. **Fish and Shellfish Immunology**, [s.l]. v. 34, n. 5, p. 1112–1118, 2013.

VASCONCELOS M. A. *et al.* Effect of algae and plant lectins on planktonic growth and biofilm formation in clinically relevant bacteria and yeasts. **Biomed Res Int**. [s.l]. 2014. doi:10.1155/2014/365272