



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

JULIANA SAMPAIO NOGUEIRA MARQUES

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTRUTURAL DE
UMA LECTINA DA ESPONJA MARINHA *Cinachyrella alloclada*

FORTALEZA

2021

JULIANA SAMPAIO NOGUEIRA MARQUES

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTRUTURAL DE UMA
LECTINA DA ESPONJA MARINHA *Cinachyrella alloclada*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia e Genética de Organismos Aquáticos.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio

FORTALEZA

2021

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)

- M318p Marques, Juliana Sampaio Nogueira.
Purificação, caracterização físico-química e estrutural de uma lectina da esponja marinha *Cinachyrella alloclada* / Juliana Sampaio Nogueira Marques. – 2021.
43 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.
1. Esponjas marinhas. 2. Lectinas. 3. Estrutura. I. Título.

CDD 639.2

JULIANA SAMPAIO NOGUEIRA MARQUES

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTRUTURAL DE UMA
LECTINA DA ESPONJA MARINHA *Cinachyrella alloclada*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia e Genética de Organismos Aquáticos.

Aprovada em: 22 / 04 / 2021

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 do Estado de Minas Gerais (UEMG)

À Deus.

Ao meu marido, João Ananias.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me deu forças e sabedoria para concluir cada desafio desse percurso.

Ao meu marido, João Ananias, pela compreensão e por estar ao meu lado sempre que precisei. Essa conquista é nossa.

Aos meus avós, Francisco e Fátima, que me amaram e educaram da melhor forma possível.

Ao meu filho João Brian, que me encheu de amor e alegria quando precisei.

Ao meu orientador Dr. Alexandre Sampaio, pelos ensinamentos e ter me dado a oportunidade de realizar essa pesquisa.

Ao professor Dr. Rômulo Farias, pelos ensinamentos e por me ajudar na elaboração desta pesquisa.

Ao professor Dr. Celso Nagano, pelos ensinamentos e momentos de descontração.

À Dra. Renata, pelos ensinamentos e auxílio no laboratório.

Aos meus amigos do laboratório: Andressa, Jéssica, Pedro, Philippe, Regivânio e Renato. Obrigada pelos ensinamentos e me socorrerem nos momentos de aflição, e por tornarem esse caminho mais leve.

“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu. É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu.” (TREM BALA, 2017)

RESUMO

As esponjas são animais pertencentes ao filo Porífera, um dos mais antigos e morfológicamente mais simples dos filos metazoários existentes. As esponjas pertencentes ao gênero *Cinachyrella* são frequentemente chamadas de “esponjas bola de golfe” e “esponjas da lua” devido à sua forma esférica e às depressões circulares (porocalices), que comumente aparecem em sua superfície. As esponjas marinhas têm chamado a atenção por possuírem uma gama de componentes químicos bioativos e moléculas com aplicações biotecnológicas promissoras e, dentre estas moléculas, encontram-se as lectinas, que são proteínas ou glicoproteínas que apresentam ligação específica e reversível a carboidratos e que possuem diversas atividades biológicas já descritas, como efeito citotóxico, mitogênico, anticâncer, anti-HIV e antibiofilme. Uma lectina de *Cinachyrella alloclada* (CaL) foi purificada a partir de uma combinação de precipitação com sulfato de amônio a 70%, cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sephacel e exclusão molecular em coluna Sephacryl S 300 HR. A lectina CaL aglutinou preferencialmente eritrócitos tripsinizados do tipo O e sua atividade hemaglutinante foi inibida por galactosídeos e por mucinas. A atividade da lectina foi máxima em pH 7,0, mostrou termoestabilidade até 50 °C e não dependência de cátions divalentes. A massa molecular do monômero foi estimada em 16 kDa. As sequências de aminoácidos dos peptídeos identificados perfazem cerca de 73% da estrutura primária da lectina, e apresentam similaridade com outras galectinas de esponjas marinhas. Assim, a lectina CaL pode ser utilizada em estudos futuros para avaliar sua potencial aplicação como ferramenta biotecnológica.

Palavras-chave: esponjas marinhas; lectinas; estrutura.

ABSTRACT

Sponges are animals belonging to the Porifera phylum, one of the oldest and most morphologically simple of the existing metazoan phyla. Sponges belonging to the genus *Cinachyrella* are often called “golf ball sponges” and “moon sponges” because of their spherical shape and circular depressions (porocalices) that commonly appear on their surface. Marine sponges have drawn attention for having a range of bioactive chemical components and molecules with promising biotechnological applications and, among these molecules, are the lectins, which are proteins or glycoproteins that have specific and reversible binding to carbohydrates and that have several biological activities already described, such as cytotoxic, mitogenic, anti-cancer, anti-HIV and anti-biofilm effects. A lectin from *Cinachyrella alloclada* (CaL) was purified by a combination of precipitation with 70% ammonium sulfate, ion exchange chromatography on a DEAE-Sephacel column and size exclusion on a Sephacryl S 300 HR column. The CaL lectin preferentially agglutinated type O trypsinized erythrocytes and its hemagglutinating activity was inhibited by galactosides and mucins. The lectin activity was maximum at pH 7.0, showed thermostability up to 50 °C and did not depend on divalent cations. The molecular mass of the monomer was estimated at 16 kDa. The amino acid sequences of the identified peptides make up about 73% of the primary structure of the lectin, and are similar to other marine sponge galectins. Thus, the CaL lectin can be used in future studies to assess its potential application as a biotechnological tool.

Keywords: marine sponges; lectins; structure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esponjas do gênero <i>Cinachyrella</i>	14
Figura 2 – Classificação estrutural das galectinas.....	17
Figura 3 – Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sephacel.....	28
Figura 4 – Cromatografia de Exclusão molecular.....	28
Figura 5 – Efeito do pH na atividade hemaglutinante de CalL.....	31
Figura 6 – Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante de CalL.....	32
Figura 7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15 % na presença de SDS (SDS-PAGE).....	33
Figura 8 – Mapa peptídico da lectina CalL.....	35
Figura 9 – Alinhamento da sequência parcial de aminoácidos de CalL e CchG de <i>Cinachyrella</i> sp.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lectinas isoladas de esponjas marinhas.....	19
Tabela 2 – Atividade hemaglutinante da lectina CalL.....	29
Tabela 3 – Inibição da atividade hemaglutinante de CalL por açúcares e glicoproteínas.....	30
Tabela 4 – Sequência de aminoácidos dos peptídeos de CalL determinados por MS/MS.....	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Poríferos	12
<i>1.1.1</i>	<i>Características gerais</i>	12
<i>1.1.2</i>	<i>Classe Demospongiae</i>	13
1.2	Lectinas	14
<i>1.2.1</i>	<i>Lectinas de animais</i>	15
<i>1.2.2</i>	<i>Lectinas de esponjas marinhas</i>	16
<i>1.2.3</i>	<i>Lectinas do Gênero Cinachyrella</i>	18
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo geral	23
2.2	Objetivo específico	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Coleta dos animais	24
3.2	Preparo do extrato	24
3.3	Determinação da atividade hemaglutinante e teste de inibição	24
3.4	Isolamento e determinação da pureza da lectina	25
3.5	Efeito do pH, temperatura e íons divalentes na atividade hemaglutinante	25
3.6	Estimativa da massa molecular	26
3.7	Sequenciamento de aminoácidos	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
4.1	Purificação da lectina	27
4.2	Atividade hemaglutinante	28
4.3	Inibição da atividade hemaglutinante	29
4.4	Caracterização físico-química da lectina	30
<i>4.4.1</i>	<i>Efeito do pH na atividade hemaglutinante</i>	30
<i>4.4.2</i>	<i>Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante</i>	31
<i>4.4.3</i>	<i>Efeito de íons divalentes na atividade hemaglutinante</i>	32
4.5	Eletroforese e estimativa da massa molecular	32
4.6	Sequenciamento de aminoácidos através de espectrometria de massas sequencial (MS/MS)	34
5	CONCLUSÃO	37

REFERÊNCIAS.....	38
-------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

1.1 Poríferos

1.1.1 Características gerais

As esponjas são animais pertencentes ao filo Porifera, um dos mais antigos e morfológicamente mais simples dos filos metazoários (seres multicelulares) existentes. Possuem uma distribuição global, estando presente em regiões polares, temperadas e tropicais, habitando mares e águas continentais, desde ambientes rasos até grandes profundidades (GLOECKNER *et al.*, 2013).

São organismos bentônicos, sésseis e filtradores. Utilizam células flageladas (coanócitos) para a movimentação da água através de canais, com exceção das esponjas carnívoras, pertencentes à família Cladorhizidae, onde o sistema de filtração é reduzido ou ausente, e se alimentam de pequenos invertebrados que ficam presos na superfície adesiva da esponja (GLOECKNER *et al.*, 2013; HESTETUN *et al.*, 2017).

Os processos fisiológicos das esponjas, como nutrição, respiração, excreção e reprodução, ocorrem através do sistema aquífero, que é composto por um conjunto tridimensional de canais ramificados que distribuem água para todo o corpo do animal. A forma desse sistema está constantemente em reorganização, o que se traduz em uma grande plasticidade morfológica das esponjas em diferentes ambientes (MURICY *et al.*, 2007).

Esses organismos não possuem construção tecidual, apresentam células móveis capazes de se diferenciar em outros tipos de células (totipotência) e conferir plasticidade à forma de crescimento. Em muitas espécies, seu corpo é sustentado por um esqueleto formado por espículas de sílica ou carbonato de cálcio (HOOPER *et al.*, 2002; MURICY *et al.*, 2007).

As esponjas possuem uma grande variedade de formas, cores e tamanhos, existindo desde espécies incrustantes finas até esponjas maciças com alguns metros de tamanho. Sua consistência pode ser mole, compressível, frágil ou dura como uma rocha. As formas das esponjas também podem variar entre os indivíduos da mesma espécie em resposta a fatores ambientais como hidrodinâmica, luz e turbidez, o que dificulta sua identificação taxonômica (GLOECKNER *et al.*, 2013; VAN SOEST *et al.*, 2012).

As relações ecológicas que as esponjas têm com diversos grupos taxonômicos as tornam importantes para o estudo e monitoramento de ecossistemas bentônicos e qualidade ambiental. Seus canais abrigam uma rica fauna, como crustáceos, poliquetas, moluscos,

equinodermos, dentre outros, e algumas espécies abrigam também bactérias simbiotas (MURICY *et al.*, 2007; WÖRHEIDE *et al.*, 2012). Além da importância ecológica, possuem um grande interesse comercial, por produzirem substâncias bioativas com potencial farmacológico (MURICY *et al.*, 2007).

O filo possui cerca de 9.300 espécies e está dividido taxonomicamente em quatro classes: Calcarea, Hexactinellida, Demospongiae e Archaeocyatha (extinta). No Brasil são encontradas, aproximadamente, 600 espécies, que estão distribuídas principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste (MORROW; CÁRDENAS, 2015; MURICY, 2020; VAN SOEST *et al.*, 2020).

1.1.2 Classe Demospongiae

A classe Demospongiae é a maior representante do filo porífera, com cerca de 494 espécies catalogadas no Brasil. As esponjas pertencentes a esta classe possuem grande diversidade de cores e algumas espécies dispõem de esqueleto formado por espículas de sílica ou fibras de espongina (tipo de colágeno), com simetria monaxônica, um único eixo espicular, ou tetraxônica, com quatro eixos espiculares (MURICY *et al.*, 2007, MURICY *et al.*, 2020).

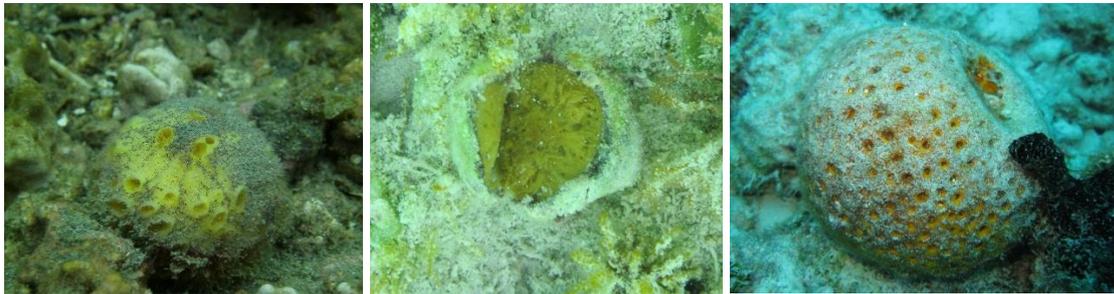
A família Tetillidae é caracterizada por possuir formas esféricas ou elípticas. São frequentemente chamadas de “esponjas bola de golfe” e “esponjas da lua” devido à sua forma esférica e depressões circulares (porocalices) que comumente aparecem em sua superfície. Possuem poucos caracteres taxonômicos que podem ser utilizados para diferenciar os gêneros, e alguns são difíceis de serem reconhecidos (SZITENBERG *et al.*, 2013).

O gênero *Cinachyrella* (Figura 1), pertencente à família Tetillidae, é caracterizado por possuir porocalices, ausência de córtex e espículas auxiliares. Possui cerca de 58 espécies descritas, e, até o momento, foram catalogadas 5 espécies no Brasil (MURICY, 2020; VAN SOEST *et al.*, 2020; RÜTZLER; SMITH, 1992).

Esse gênero tem despertado atenção por possuir componentes químicos bioativos com aplicações farmacêuticas promissoras. Machida *et al.* (2014) isolaram de *Cinachyrella* sp. um esteroide com atividade estrogênica. O extrato etanólico da esponja marinha *Cinachyrella* sp. apresentou toxicidade para células HeLa (NURHAYATI *et al.*, 2014). Uma lectina isolada de *Cinachyrella apion* foi capaz de aglutinar formas promastigotas de *Leishmania chagasi* (MEDEIROS *et al.*, 2010) e mostrou atividade anticâncer (RABELO *et al.*, 2012). Outra lectina obtida do extrato de *Cinachyrella* sp. apresentou atividade moduladora em receptores ionotrópicos de glutamato (UEDA *et al.*, 2013). A lectina CalL, de *Cinachyrella alloclada*,

apresentou atividade mitogênica sobre linfócitos humanos (ATTA *et al.*, 1989).

Figura 1 – Esponjas do gênero *Cinachyrella*.



Cinachyrella aloclada

Cinachyrella apion

Cinachyrella kuekenthali

Fonte: <https://enciclovida.mx/especies/45760>; <https://spongeguide.uncw.edu/speciesinfo.php?species=231>; <https://spongeguide.uncw.edu/speciesinfo.php?searchtype=0&species=171>.

1.2 Lectinas

Em 1954, o termo lectina (originado do verbo latino “*legere*”, que significa “selecionar”) foi usado pela primeira vez por Boyd e Sharpleigh, para definir proteínas capaz de aglutinar diferencialmente eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos. Eles descrevem as lectinas como “proteínas capazes de se ligarem de forma não covalente e reversível a carboidratos, aglutinar e/ou precipitar polissacarídeos e glicoproteínas” (BOYD; SHARPLEIGH, 1954).

Essas proteínas já eram conhecidas, desde o final do século XIX, como hemaglutininas ou fitohemaglutininas, porque eram capazes de aglutinar eritrócitos e foram primeiramente encontradas em plantas. Em 1889, Hermann Stillmark extraiu uma hemaglutinina tóxica da semente de mamona, *Ricinus communis*, que recebeu o nome de ricina. Posteriormente, H. Hellin, identificou a abrina, outra hemaglutinina tóxica, em extrato da ervilha do rosário (*Abrus precatorius*). Ricina e abrina foram utilizadas como antígenos modelos em estudos imunológicos realizados por Paul Ehrlich (1891), que demonstrou a especificidade da resposta do anticorpo, o fenômeno da memória imunológica e a transferência da imunidade humoral de uma mãe para seu filho (SHARON; LIS, 2004).

Em 1965, Agrawal e Goldstein descreveram a cromatografia de afinidade como processo de purificação da concanavalina A, uma lectina extraída de *Canavalia ensiformis*, sendo esse método rapidamente difundido, o que contribuiu para o aumento de lectinas isoladas. Ainda na década de 60, percebeu-se que as lectinas aglutinavam não apenas eritrócitos, mas também outros tipos de células. Ao longo dos anos descobriu-se que essas proteínas estavam

presentes não só em plantas, mas também em diversos organismos como fungos, bactérias, algas e animais (SHARON; LIS, 2004; SHARON, 2007).

Até o início da década de 70, havia pouco interesse nessas proteínas, porém, esse cenário mudou com a demonstração de que as lectinas podem ser uma ferramenta extremamente importante para investigação de carboidratos na superfície celular e suas alterações em células cancerígenas. A capacidade das lectinas de detectar variações sutis nas estruturas dos carboidratos tem ampla implicações em processos biológicos importantes (ASHRAF; KHAN, 2003; SHARON, 2007).

A definição de lectina evoluiu e atualmente elas são descritas como “[...] proteínas ou glicoproteínas, que diferem de uma imunoglobulina, com pelo menos um domínio de ligação a carboidratos, e essa ligação não envolve nenhuma modificação enzimática ou qualquer clivagem dos carboidratos” (GARDÈRES *et al.*, 2015).

Diversas atividades biológicas de lectinas já foram relatadas, como atividade antibacteriana (HUNG *et al.*, 2015), anti-HIV (ALEXANDRE *et al.*, 2012), anti-inflamatória (FONTENELLE *et al.*, 2018), antibiofilme (JAYANTHI *et al.*, 2017), antifúngica (HASAN; OZEKI, 2019), e apoptose de células cancerígenas (BHUTIA *et al.*, 2019). Essas proteínas também atuam como mediador na defesa do hospedeiro (GARRED *et al.*, 2016) e possuem aplicabilidade no reconhecimento de espécies, como foi mostrado por Athamna *et al.* (2006) para o gênero *Mycobacterium*, através do processo de aglutinação.

1.2.1 Lectinas de animais

Acredita-se que o primeiro registro de lectina animal foi realizado pelo pesquisador Weir Mitchell. Ele publicou, em 1886, um estudo sobre o veneno de cascavel, que contém uma descrição de aglutinação. Sendo assim, o primeiro registro de atividade lectinica foi realizado por Mitchell e não por Herman Stillmark, que fez sua publicação sobre a Ricina em 1888 (KILPATRICK, 2002).

Em 1952, Watkins e Morgan isolaram a lectina da enguia europeia, *Anguila anguila*, que apresentou especificidade de ligação a L-fucose, sendo esta a primeira lectina animal isolada. Posteriormente, foram isoladas a lectina do caranguejo ferradura, *Limulus polyphemus*, (MARCHALONIS; EDELMAN, 1968) e do caracol, *Helix pomatia*, (HAMMARSTROM; KABAT, 1969). Em 1975, uma aglutinina foi isolada da enguia elétrica, *Electrophorus electricus* (TEICHBERG *et al.*, 1975), específica a β -galactosídeos, dando origem, assim, a família das lectinas do tipo S, também conhecidas como galectinas.

As lectinas de animais possuem diversas funções fisiológicas, tais como interação célula-célula, mediação de receptores de endocitose, regulação de crescimento celular, dentre outros. Suas funções estão relacionadas, de forma generalizada, ao sistema imunológico. O papel das lectinas pode estar envolvido no reconhecimento e tráfico de moléculas dentro do sistema imunológico (KILPATRICK, 2002).

As lectinas de animais são classificadas em 18 famílias, de acordo com sua estrutura primária e seletividade de ligação à carboidratos (CARNEIRO, 2013).

1.2.2 Lectinas de esponjas marinhas

Inicialmente, as lectinas de esponjas eram alvo de pesquisa por possuírem capacidade de aglutinar eritrócitos humanos. Porém, ao longo do tempo, percebeu-se que essas proteínas possuíam atividades biológicas, tornando-se um potencial biotecnológico a ser explorado (GARDÈRES *et al.*, 2015). Como por exemplo, a lectina isolada da esponja *Geodia cydonium*, que demonstra ser capaz de estimular a divisão celular de linfócitos humanos (BRETTING *et al.*, 1981).

Dodd *et al.* descreveram a presença de lectinas em esponjas pela primeira vez em 1968, quando trabalhavam com *Axinella* sp e *Cliona celata*. Entretanto, somente em 1976 ocorreu a purificação de duas lectinas da espécie *Axinella polypoides*, através de cromatografia de afinidade em uma matriz de SepharoseTM (BRETTING; KABAT, 1976).

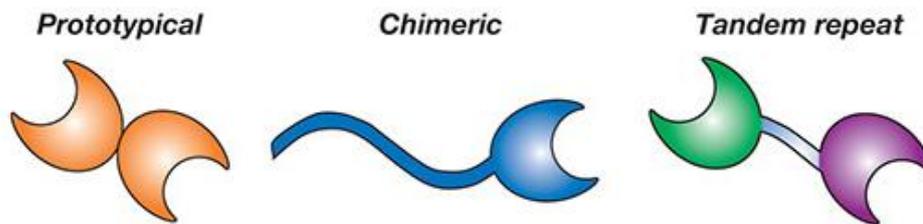
Apesar do grande número de espécies de esponjas marinhas descritas, poucas lectinas foram purificadas a partir desses organismos (Tabela 1). Dentre essas lectinas estão representantes das famílias de lectinas do tipo C, Tachylectinas e galectinas (lectinas do tipo S).

As lectinas do tipo C são uma superfamília de proteínas contendo um domínio lectínico do tipo C (CTLD: C - *type lectin like*), que possui uma estrutura com uma alça dupla estabilizada por duas pontes de sulfeto altamente conservadas localizadas na base da segunda alça. Apesar de possuírem a sequência do domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) altamente conservados, possuem funções diferentes, que podem ou não acontecer na presença de íons Ca²⁺ (ZELENSKY; GREADY, 2005).

Na família das Tachylectinas estão presentes proteínas que possuem seis domínios repetidos. Normalmente apresentem atividade antibacteriana, pois possuem habilidade de ligar-se a lipopolissacarídeos (LPS) presentes em bactérias, sugerindo provável função de defesa do organismo (KILPATRICK, 2002).

As galectinas possuem afinidade de ligação para resíduos de galactosídeos. De acordo com sua estrutura, essa família está dividida em três subfamílias (Figura 2): prototipo – com um DRC por unidade, que pode se associar como homodímeros; tandem – com dois DRC em uma mesma cadeia polipeptídica; e químera – com um DRC e um domínio rico em resíduos de prolina, glicina e tirosina, através dos quais pode formar oligômeros. As galectinas de esponjas diferem das galectinas de outros animais, pois podem formar grandes moléculas complexas na presença de íons Ca^{2+} e possuem afinidade de ligação com açúcares contendo *N*-acetil-galactosamina (GalNAc) (HIRABAYASHI *et al.*, 1993; MÜLLER *et al.*, 1997).

Figura 2 – Classificação estrutural das galectinas.



Fonte: Adaptado de Cummings *et al.*, 2017. Representação esquemática dos tipos de galectinas: prototipo (laranja), químera (azul) e tandem (verde e violeta).

Inicialmente, as galectinas foram chamadas de lectinas do tipo S, pois acreditava-se que essas proteínas dependiam de grupos sulfidrila para ligarem-se aos carboidratos (CUMMINGS *et al.*, 2017). Entretanto, hoje sabe-se que a localização original das galectinas é o citosol, que é um ambiente altamente reduzido, não formando ligações dissulfeto em sua forma natural (ST-PIERRE *et al.*, 2020).

As galectinas exibem grande diversificação funcional, pois além de atuarem no reconhecimento de patógenos, também desempenham importante papel como reguladoras de respostas imunológicas e inflamatórias, atuando também na indução de apoptose em alguns tipos de células (CUMMINGS *et al.*, 2017).

Algumas lectinas de esponjas não se encaixam nas famílias existentes, pois não possuem informações estruturais suficientes, sendo chamadas de lectinas “órfãs”. Gardères e colaboradores (2015) propõem um agrupamento dessas lectinas de acordo com sua afinidade de ligação, com os seguintes grupos: lectinas contendo ponte de dissulfeto intracadeia, lectinas de ligação à mucina, lectinas de ligação a *N*-acetil-D-glucosamina / *N*-acetil-D-galactosamina e grupo diversos.

As lectinas isoladas de esponjas marinhas possuem diversas atividades biológicas, como efeito citotóxico e mitogênico (DRESCH *et al.*, 2012), anticâncer (PAJIC *et al.*, 2002),

anti-HIV (SCHRÖDER *et al.*, 1990), defesa contra parasitas fúngicos (DRESCH *et al.*, 2012), e antibiofilme (CARNEIRO *et al.*, 2017a). Muitas lectinas de esponjas exibem efeito antibacteriano devido sua capacidade de se ligar a resíduos de açúcar específicos das paredes celulares das bactérias, como os lipopolissacarídeos (LPS) das Gram-Negativa (SCHRÖDER *et al.*, 2003) e ácido teicóico das Gram-Positiva (MOURA *et al.*, 2006).

1.2.3 Lectinas do gênero *Cinachyrella*

O primeiro trabalho com lectinas do gênero *Cinachyrella* (Figura 1) foi realizado por Atta *et al.* (1989). Eles isolaram uma lectina (CaL) de *C. alloclada*, através de cromatografia de filtração em gel (coluna Sephadex G25) e de afinidade (coluna de Sepharose 4B). CaL apresentou massa molecular de aproximadamente 17 kDa. A atividade de ligação foi inibida por D-galactose e lactose e exibiu atividade mitogênica em linfócitos.

A lectina isolada de *C. apion* (CaL), com massa molecular de 124 kDa, formada por 8 subunidades de 15,5 kDa, unidas por interação hidrofóbica, e estável até 60 °C, mostrou potencial na sua utilização em diagnósticos de protozoários patogênicos, como *Leishmania chagasi* (MEDEIROS *et al.*, 2010). CaL também demonstrou potencial em estudos para tratamentos de câncer, pois exibiu atividade citotóxica em células HeLa, induzindo apoptose através da ativação da via intrínseca mitocondrial (RABELO *et al.*, 2012).

Através de cromatografia de afinidade foram isoladas duas galectinas, CchG 1 e CchG 2, a partir de *Cinachyrella* sp., e elas demonstraram ser tolerantes a altas temperaturas (100 °C). Essas galectinas se agrupam para formar um tetrâmero estável. CchG 1 (16 kDa) e CchG 2 (18 kDa) demonstraram possuir atividade neuromodulatória, reduzindo o tempo em que o neurotransmissor chega nos receptores de glutamato (UEDA *et al.*, 2013). CchG1 foi a primeira lectina de esponja a ter sua estrutura tridimensional determinada por cristalografia de raios-X. Ela possui um arranjo tetramérico de formato toroidal rígido (formato de “rosca”) (FREYMANN *et al.*, 2012).

Para entender melhor o papel fisiológico e o potencial biotecnológico dessas proteínas, torna-se necessário o conhecimento de suas características bioquímicas e estruturais. Além disso, os estudos sobre lectinas de esponjas marinhas ainda são bastante escassos. Embora já tenham havido estudos prévios da presença de uma lectina em *Cinachyrella alloclada*, não existem trabalhos relativos aos aspectos da caracterização bioquímica mais avançados, nem sobre a caracterização estrutural da lectina, o que possibilitará maior potencial de aplicação biotecnológica dessa proteína.

Tabela 1 – Lectinas isoladas de esponjas marinhas.

Lectina	Espécie	Massa Molecular (Sub.)	Carboidratos inibidores	Atividade biológica
Galectinas				
CaL	<i>Cinachyrella alloclada</i>	16 kDa (3)	Galactosídeos	Aglutinação de eritrócitos humanos; Atividade mitogênica em linfócitos humanos.
CchG 1	<i>Cinachyrella</i> sp.	13 kDa (4)	Galactosídeos	Aglutinação de eritrócitos de coelho; Atividade modulatória dos receptores de glutamato humano.
CchG 2	<i>Cinachyrella</i> sp.	13 kDa (4)	Galactosídeos	Aglutinação de eritrócitos de coelho.
CCL	<i>Chondrilla caribensis</i>	15 kDa (4)	Galactosídeos	Aglutinação de eritrócitos humanos e de coelho; Aglutinação e atividade antibiofilme: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Escherichia coli</i> .
GCG	<i>Geodia cydonium</i>	15 kDa (4)	Galactosídeos	Atividade modulatória dos receptores de glutamato humano; Aumento da taxa de crescimento da atividade mitótica de células de linfoma de camundongo L5178y em linfócitos humanos.
HoL-30	<i>Halichondria okadai</i>	30 kDa (2)	Galactosídeos	Aglutinação de eritrócitos humanos e de coelho.
Sd galectin 1	<i>Suberites domuncula</i>	22 kDa	Galactosídeos	Nd
Sd galectin 2	<i>Suberites domuncula</i>	31 kDa	Galactose	Nd
Lectinas tipo C				
AvL	<i>Aphrocallistes vastus</i>	34 kDa	Galactosídeos	Nd
Lb MBL	<i>Lubomirskia baicalensis</i>	13 kDa	Manose	Nd

Tabela 1 – Lectinas purificadas de esponjas. Continuação

Lectina	Espécie	Massa Molecular (Sub.)	Carboidratos inibidores	Atividade biológica
Tachylectinas				
Ef lectin	<i>Ephydatia fluviatilis</i>	27 kDa	Lipopolissacarídeos	Nd
Sd lectin	<i>Suberites domuncula</i>	27 kDa	Lipopolissacarídeos	Atividade antibacteriana em <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> .
Lectinas sem classificação				
ApaL I	<i>Aaptos papillata</i>	21 kDa (2)	GlcNAc	Nd
ApaL II	<i>Aaptos papillata</i>	16 kDa	GlcNAc / GalNAc	Nd
ApaL III	<i>Aaptos papillata</i>	16 kDa	GlcNAc / GalNAc	Nd
AaL	<i>Aplysina archeri</i>	16 kDa (4)	Galactosídeos	Aglutinação de eritrócitos humanos, coelho, rato e bovino.
AFL	<i>Aplysina fulva</i>	16 kDa	Mucina	Atividade Antibiofilme: <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> e <i>E. coli</i> .
AIL	<i>Aplysina lacunosa</i>	16 kDa (4)	Galactosídeos	Aglutinação de eritrócitos humanos, coelho, rato e bovino.
ALL	<i>Aplysina lactuca</i>	32 kDa (2)	Galactosídeos	Atividade antibiofilme: <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>
AcL I	<i>Axinella corrugata</i>	78 kDa	N-acetil	Atividade de quimiotaxia em neutrófilos de rato; Efeito mitótico para células mononucleares humanas; Efeito citotóxico contra <i>Artemia salina</i> .
AcL II	<i>Axinella corrugata</i>	80 kDa	N-acetil; galactose	Aglutinação de eritrócitos de coelho.
ApL I	<i>Axinella polypoides</i>	15 kDa	Galactosídeos	Atividade mitogênica em linfócitos humanos.
ApL II	<i>Axinella polypoides</i>	15 kDa	Galactosídeos	Nd
ApL III	<i>Axinella polypoides</i>	Nd	Galactosídeos	Nd
ApL IV	<i>Axinella polypoides</i>	Nd	Ácido hexurônico	Nd
ApL V	<i>Axinella polypoides</i>	Nd	Galactosídeos	Nd

Tabela 1 – Lectinas isoladas de esponjas marinhas. Continuação.

Lectina	Espécie	Massa Molecular (Sub.)	Carboidratos inibidores	Atividade biológica
Clathrilectin	<i>Clathrina clathrus</i>	208 + 180 kDa	<i>N</i> -acetil	Aglutinação de eritrócitos de coelho.
CnL	<i>Chondrilla nucula</i>	15 kDa (4)	Galactose	Atividade mitótica em linfócitos de camundongo e humanos; Modulação do período de liberação do HIV pelas células infectadas.
CaL	<i>Cinachyrella apion</i>	17 kDa (8)	Lactose	Aglutinação de <i>Leishmania chagasi</i> ; Atividade antiproliferativa contra células HeLa, PC3 e 3T3.
CtL	<i>Cinachyrella tenuiviolacea</i>	22 kDa	Lactose	Aglutinação de eritrócitos humanos.
CvL	<i>Cliona varians</i>	27 kDa (4)	Galactosídeos	Atividade antibacteriana contra <i>Bacillus subtilis</i> e <i>S. aureus</i> ; Aglutinação de <i>Leishmania chagasi</i> ; Atividade citotóxica contra células K562 e Jurkat.
CcL	<i>Crambe crambe</i>	14 kDa	Fucose	Aglutinação de eritrócitos humanos e de coelho; Atividade mitogênica em linfócitos humanos;
CAL	<i>Craniella australiensis</i>	18 kDa (3)	Mucina	Atividade mitogênica em linfócitos humanos; Atividade mitogênica em esplenócitos BALB/c.
DaL	<i>Desmapsana anchorata</i>	18 kDa (2)	Galactosídeos	Aglutinação de eritrócitos humanos; Atividade mitogênica em linfócitos humanos.
HoL-1	<i>Halichondria okadai</i>	21 kDa (4)	<i>N</i> -acetil	Aglutinação de eritrócitos humanos.
HoL-2	<i>Halichondria okadai</i>	42 kDa	<i>N</i> -acetillactosamina	Aglutinação de eritrócitos humanos.
HoL-18	<i>Halichondria okadai</i>	18 kDa	Lipopolissacarídeos	Atividade antibacteriana: <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Shigella boydii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Aspergillus niger</i> ; Atividade antifúngica; Efeito citotóxico contra HeLa, MCF-7 e T47D.
HpL	<i>Halichondria panicea</i>	21 kDa (4)	Ácidos urônicos	Nd

Tabela 1 – Lectinas isoladas de esponjas marinhas. Conclusão.

Lectina	Espécie	Massa Molecular (Sub.)	Carboidratos inibidores	Atividade biológica
Halilectin 1 (H-1)	<i>Haliclona caerulea</i>	40 kDa	Nd	Aglutinação de eritrócitos de coelho; Efeito citotóxico em <i>Artemia nauplii</i> .
Halilectin 2 (H-2)	<i>Haliclona caerulea</i>	14 kDa (2)	Mucina	Aglutinação de eritrócitos de coelho; Efeito citotóxico em <i>Artemia nauplii</i> .
Halilectin 3 (H-3)	<i>Haliclona caerulea</i>	11 (2) + 18 kDa	GalNAc	Aglutinação de eritrócitos humanos e de coelho. Atividade anticâncer: apoptose e autofagia (MCF7).
HcL	<i>Haliclona cratera</i>	15 kDa (2)	Galactosídeos	Aglutinação de eritrócitos humanos e de ovelhas; Atividade citotóxica contra células HeLa e FemX; Efeito mitogênico fraco em linfócitos T humanos.
HL	<i>Haliclona sp.</i>	24 kDa	Lactose	Aglutinação de eritrócitos humanos.
HMA	<i>Haliclona manglaris</i>	15 (2) + 25 kDa	Tiroglobulina	Aglutinação de eritrócitos de coelho.
PsL	<i>Pelina semitubulosa</i>	34 kDa (6)	Galactosídeos	Efeito mitogênico em linfócitos do baço de camundongos; Liberação de interleucina-1 de macrófagos peritoneais de camundongo; Produção de interleucina-2 por culturas de linfócitos em murinos.

Fonte: Adaptado de Gardères *et al.*, 2015; CARNEIRO *et al.*, 2015; CARNEIRO *et al.*, 2017a; CARNEIRO *et al.*, 2019; GARDÈRES *et al.*, 2016; HASAN; OZEKI, 2019; MARQUES *et al.*, 2018; NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2018. Nd – Não determinado. GalNAc – *N*-acetilgalactosamina; GlcNAc – *N*-acetilglicosamina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Purificar, caracterizar bioquimicamente e determinar a estrutura primária de uma lectina presente na esponja marinha *Cinachyrella alloclada*.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um novo protocolo de purificação da lectina de *Cinachyrella alloclada*;
- Determinar o pH ótimo para a atividade hemaglutinante da lectina;
- Determinar a temperatura ótima para a atividade hemaglutinante da lectina;
- Determinar se a lectina é dependente de íons divalentes;
- Determinar a estrutura primária da lectina isolada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta dos animais

Os espécimes da esponja marinha *Cinachirella alloclada* foram coletados na zona entre marés da praia da Pedra Rachada, no município de Paracuru, Ceará, Brasil, com autorização prévia dos órgãos ambientais competentes (SISBIO ID: 33913-8).

Os animais foram transportados em sacos plásticos para o Laboratório de Biotecnologia Marinha (BIOMAR-LAB) e armazenados a -20 °C até o uso.

A espécie foi identificada e um voucher foi depositado no Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Pernambuco, PE, Brasil.

3.2 Preparo do extrato

Após descongeladas, as esponjas foram cortadas em pedaços pequenos e depois trituradas e homogeneizadas, na proporção de 1:2 (p/v), em tampão Tris 20 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM, CaCl₂ 20 mM, e com adição de L-cisteína 5 mM para manter a proteína na forma reduzida. A mistura foi filtrada através de tecido de nylon e centrifugada durante 30 min a 9000 xg a 4 °C. O sobrenadante foi denominado extrato bruto e uma alíquota foi coletada para ser analisada quanto à atividade hemaglutinante (SAMPAIO *et al.*, 1998).

O acesso ao patrimônio genético foi autorizado pelo órgão ambiental competente (SISGEN: ACC97AD).

3.3 Isolamento e determinação da pureza da lectina

O extrato bruto foi submetido à precipitação com sulfato de amônio a 70% de saturação e permaneceu a 4 °C por 4 h. As proteínas precipitadas foram sedimentadas através de centrifugação por 30 min a 9000 xg a 4 °C, depois solubilizadas em um pequeno volume de tampão de extração e dialisadas. A fração obtida (F 0/70), cerca de 30 mL, foi aplicada em uma matriz de cromatografia de troca iônica DEAE – Sephacel (2 x 4,5 cm) previamente equilibrada com tampão Tris 50 mM, pH 7,6. As proteínas não ligadas à coluna foram removidas com tampão de equilíbrio. Já as proteínas retidas na coluna foram eluídas com o tampão Tris 50 mM, pH 7,6, contendo NaCl 0,2 e 0,5 M. As frações que apresentaram atividade hemaglutinante

foram reunidas, dialisadas contra água destilada, liofilizadas e submetida a cromatografia de exclusão molecular.

A cromatografia de exclusão molecular foi realizada em um AKTA Pure (GE Healthcare Bio-Sciences), utilizando uma coluna Sephacryl S 300 HR a um fluxo de 1 mL/min. A coluna foi equilibrada e eluída com o tampão TBS pH 7,6 acrescido de L-cisteína 5 mM. As frações correspondentes à lectina foram reunidas, dialisadas contra água destilada e liofilizadas para posterior utilização.

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para avaliar a pureza e homogeneidade da proteína (LAEMMLI, 1970). O gel utilizado (15%) foi submetido a uma corrente elétrica de 25 mA e tensão de 150 V durante 1 h.

3.4 Determinação da atividade hemaglutinante e teste de inibição

A determinação da atividade hemaglutinante e os testes de inibição foram realizados através do método de dupla diluição seriada em placas de microtitulação de fundo V, de acordo com Sampaio *et al.* (1998), com algumas modificações. Os eritrócitos humanos (tipo O) foram obtidos junto ao Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE). As suspensões de hemácias a 3% foram utilizadas em suas formas nativas e tratadas com protease (tripsina).

Os seguintes açúcares e glicoproteínas foram utilizados nos testes de inibição: D-xilose, D-ribose, L-fucose, L-arabinose, L-ramnose, D-galactose (Gal), D-manose, D-glicose (Glc), D-glucosamina, D-galactosamina, *N*-acetil-D-glicosamina (GlcNAc), *N*-acetil-D-galactosamina (GalNAc), ácido D-galacturônico, D-frutose, D-sacarose, D-melibiose, α -D-lactose, β -D-lactose, D-lactulose, D-maltose, D-rafinose, metil- α -D-glicopiranosídeo, metil- α -D-galactopiranosídeo, metil- β -D-galactopiranosídeo, metil- β -D-tiogalactose, fenil- β -D-galactopiranosídeo, 4-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo, 4-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo, 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo, fetuína, asialofetuína, tiroglobulina, mucina submaxilar bovina (BSM) e mucina estomacal suína (PSM) tipo 2.

3.5 Efeito do pH, temperatura e íons divalentes sobre a atividade hemaglutinante

O efeito do pH, temperatura, íons divalentes e EDTA sobre a atividade hemaglutinante da lectina foi avaliado conforme descrito por Sampaio *et al.* (1998), utilizando placas de microtitulação em V. A atividade foi avaliada em diferentes tampões com valores de

pH que variaram de 4 a 10. A temperatura variou entre 25 e 90 °C.

3.6 Estimativa da massa molecular por SDS-PAGE

A massa molecular aparente da lectina foi estimada através de eletroforese (SDS-PAGE), pela comparação da migração da lectina com marcadores de massa molecular presentes no kit SigmaMarker™ *low range* (aprotinina do pulmão bovino (6.500 Da), α -lactalbumina do leite bovino (14.200 Da), inibidor de tripsina da soja (20.000 Da), tripsinogênio do pâncreas bovino (24.000 Da), anidrase carbônica de eritrócitos bovinos (29.000 Da), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase do músculo de coelho (36.000 Da), ovalbumina do ovo de galinha (45.000 Da) e albumina de soro bovino (66.000)). A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 15%, e em cada poço foi aplicado 20 μ L da proteína, na presença e ausência do agente redutor β -mercaptoetanol e corado com Comassie (LAEMMLI, 1970).

3.7 Determinação da estrutura primária

A sequência de aminoácidos foi determinada por espectrometria de massas em tandem (MS-MS). Após a eletroforese (SDS-PAGE-12%), as bandas da proteína foram excisadas, reduzidas e alquiladas com ditionitrito (DTT) e iodoacetamida (IAA), respectivamente, como descrito por Shevchenko *et al.* (2007).

A digestão da proteína foi realizada com tripsina e quimotripsina, e para tal, as bandas proteicas foram reidratadas em solução de bicarbonato de amônio 25 mM. As enzimas foram adicionadas a uma proporção de 1:50 (enzima:substrato). As digestões foram mantidas a 37 °C por 16 h. Após o período de incubação, as digestões foram interrompidas com 2 μ L de ácido fórmico 5% (AF).

Os peptídeos, extraídos de acordo com Shevchenko *et al.* (2007), foram separados em uma nanocoluna de fase reversa C18 (100 μ m x 100 mm) em um sistema nanoAcquity e eluídos por gradiente linear de acetonitrila (ACN), contendo 0,1% de ácido fórmico (AF).

Os eluatos foram analisados em um espectrômetro de massas híbrido (ESI-Q-ToF) (Synapt, HDMS, Waters Corp, MA, EUA), que operou em modo positivo na faixa de m/z de 50 a 3000, com temperatura da fonte de 363 K e voltagem do capilar de 3,5 kV. Os espectros de dissociação induzidos por colisão (CID) foram coletados e interpretados manualmente e os peptídeos sequenciados foram pesquisados em bancos de dados NCBI e Uniprot. A estrutura primária foi obtida através da sobreposição das sequências encontradas dos peptídeos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação da lectina

A lectina CalL foi purificada a partir da esponja marinha *Cinachyrella alloclada*, através de um novo protocolo de purificação, que combina precipitação com sulfato de amônio a 70%, cromatografia de troca iônica em coluna DEAE – Sephacel, e cromatografia de exclusão molecular em uma coluna Sephacryl S 300 HR a um fluxo de 1 mL/min. Atta e colaboradores (1989) isolaram a lectina CalL através de cromatografia de exclusão molecular (coluna Sephadex G25) e de afinidade (coluna de Sepharose 4B).

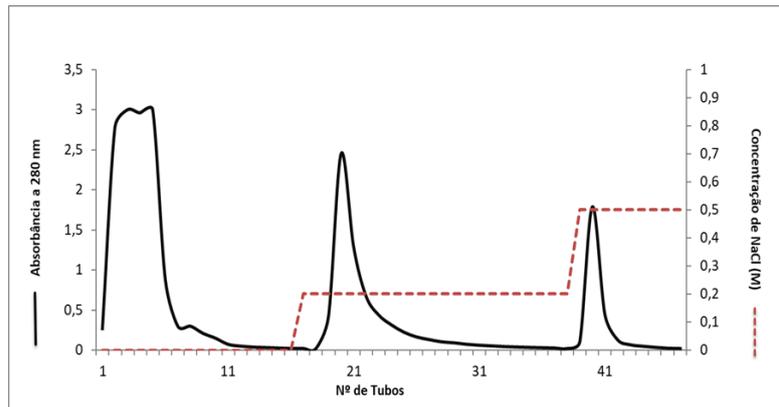
A lectina CAL, extraída da esponja *Craniella australiensis* também foi purificada através da combinação de cromatografia de troca iônica e exclusão molecular (XIONG *et al.*, 2006).

A maioria dos processos de purificação de lectinas de esponjas marinhas são compostos por duas etapas. A primeira etapa de purificação normalmente envolve uma cromatografia de afinidade, baseando-se na especificidade de carboidrato da lectina. A segunda etapa envolve, geralmente, uma cromatografia de exclusão molecular, um processo que separa as proteínas de acordo com a massa molecular (GARDÈRES *et al.*, 2015).

Na cromatografia de troca iônica (Figura 3), as proteínas não ligadas foram eluídas com Tris 50 mM e as proteínas retidas foram eluídas em dois picos distintos, um referente à eluição com Tris 50 mM com adição de NaCl 0,2 M e outro com adição de NaCl 0,5 M. O segundo pico, referente às frações eluídas com Tris 50 mM com NaCl 0,5 M, apresentou atividade hemaglutinante, sendo então unidas, liofilizada e submetida a cromatografia de exclusão molecular.

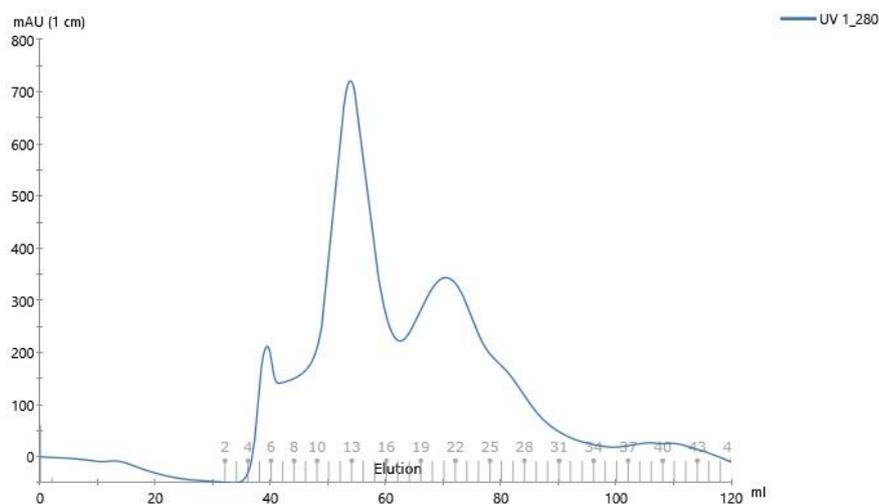
Na cromatografia de exclusão molecular (Figura 4) houve uma separação das proteínas quanto ao seu peso molecular, resultando em quatro picos. O terceiro pico foi formado predominantemente pela lectina na forma oligomerizada, estando presente também a sua forma reduzida, e o quarto pico foi formado principalmente pela forma reduzida da lectina, conforme observado em SDS-PAGE. As frações coletadas foram testadas quanto a sua atividade hemaglutinante, e as que aglutinaram eritrócitos (frações 25 a 34) foram reunidas, dialisadas contra água destilada, liofilizadas e guardadas para posterior utilização.

Figura 3 – Cromatografia de Troca iônica em coluna DEAE-Sephacel.



Fonte: Autor. Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE equilibrada com Tris 50 mM e eluída com Tris 50 mM + NaCl (0, 0,2 e 0,5 M). Volume aplicado foi de 30 mL. As frações foram monitoradas a 280 nm.

Figura 4 – Cromatografia de exclusão molecular.



Fonte: Autor. Cromatografia de exclusão molecular coluna Sephacryl S 300 HR acoplada a um sistema AKTA Pure (GE Healthcare Bio-sciences) com um fluxo de 1 mL.min⁻¹. A coluna foi equilibrada e eluída com o tampão TBS com adição de L-cisteína e pH 7,6. As frações foram monitoradas a 280 nm.

4.2 Atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante da lectina CaIL foi testada em eritrócitos humano do tipo O, em sua forma nativa e tratado com enzima proteolítica (Tripsina). A lectina aglutinou todos os eritrócitos testados (Tabela 2), porém, mostrou uma maior atividade hemaglutinante para eritrócitos tratados com tripsina. O aumento na atividade hemaglutinante em eritrócitos tratados com tripsina pode ser explicado pelo aumento da exposição de carboidratos e glicoconjugados antes não expostos na superfície dos eritrócitos (SAMPAIO, 1997).

Atta *et al.* (1989) evidenciaram que CaL aglutinou todos os eritrócitos humanos do tipo ABO. Diversos trabalhos relatam a atividade hemaglutinante de lectinas em eritrócitos humanos, como CaL de *Cinachyrella apion* (MEDEIROS *et al.*, 2010), e HoL-1 e 2 de *Halichondria okadai* (KAWAGISHI, *et al.*, 1994).

Tabela 2 - Atividade hemaglutinante da lectina CaL.

Eritrócitos	U.H./mL
Tipo O - Nativo	1.024
Tipo O - Tripsina	2.048

Fonte: Autor.

4.3 Inibição da atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante da lectina CaL foi inibida por alguns açúcares e glicoproteínas testados (Tabela 3). Os açúcares 4-fenil- β -Galactosídeo e β -Metil-Tiogalactosídeo, inibiram a atividade de CaL nas concentrações 100 e 50 mM, respectivamente, mas 4-fenil- α -Galactosídeo, Lactulose, β -Lactose e α -Lactose inibiram a lectina com concentrações do carboidrato de 12,5, 6,25, 6,25 e 3,12 mM, respectivamente. As glicoproteínas mucina de estômago suíno tipo 2 e 3 também inibiram fortemente a atividade hemaglutinante da lectina, pois uma pequena concentração (0,0156 e 0,0078 mg/mL, respectivamente) foi capaz de inibir a atividade de CaL. Na pesquisa realizada por Atta e colaboradores (1989), CaL foi inibida por D-galactose e lactose. Estes resultados sugerem que CaL possui especificidade de ligação à galactose e resíduos de galactosídeos.

A maioria das lectinas de esponjas marinhas são específicas a galactose e galactosídeos (GARDÈRES *et al.*, 2015). Além das galectinas, outras lectinas também possuem afinidade por galactosídeos, como AvL, de *Aphrocallistes vastus* (GUNDACKER *et al.*, 2001) pertencente à família das lectinas do tipo C, e outras lectinas que ainda não foram classificadas em nenhuma família, como as lectinas ApL I e II de *Axinela polypoides* (BRETTING; KABAT, 1976).

Assim como CaL, a lectina H-2 (CARNEIRO *et al.*, 2013), isolada da esponja marinha *Haliclona caerulea*, também foi inibida pela glicoproteína mucina de porco suína.

Tabela 3 - Inibição da atividade hemaglutinante de CalL por açúcares e glicoproteínas.

Açúcares e Glicoproteínas	CIM*
4-fenil- α -Galactosídeo	12,5 mM
4-fenil- β -Galactosídeo	100 mM
β -Metil-Tiogalactosídeo	50 mM
Lactulose	6,25 mM
α -Lactose	3,12 mM
β -Lactose	6,25 mM
Mucina tipo 2	0,0156 mg/mL
Mucina tipo 3	0,0078 mg/mL

Fonte: Autor. *Concentração Inibitória Mínima.

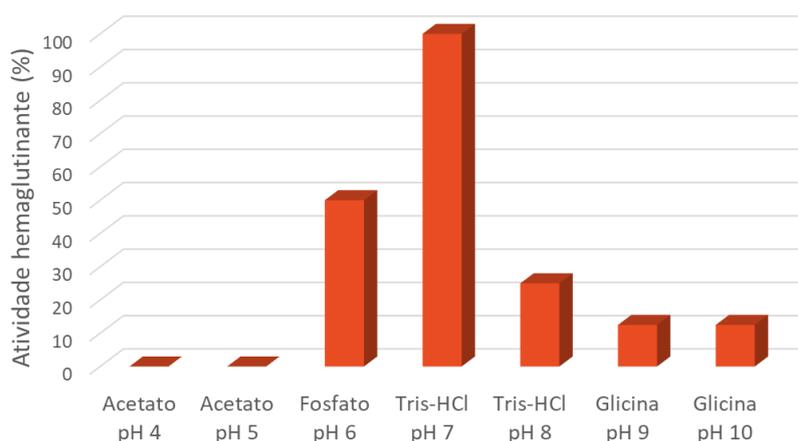
4.4 Caracterização físico-química da lectina

4.4.1 Efeito do pH na atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante da lectina chegou ao seu máximo em pH 7,0 (Figura 5), assim como a lectina AFL, isolada da esponja marinha *Aplysina fulva* (CARNEIRO *et al.*, 2019). Houve uma redução de 50% da atividade de CalL em pH 6,0. Essa redução foi ainda maior em pH alcalino (8 a 10). Valores de pH de 4,0 a 5,0 acarretaram hemólise dos eritrócitos.

Uma maior atividade hemaglutinante na faixa de pH neutro à alcalino é comumente encontrado em lectinas de esponjas marinhas (GARDÈRES *et al.*, 2015), como na lectina CvL, de *Cliona varians* (MOURA *et al.*, 2006), e AcL I, de *Axinella corrugata* (DRESCH *et al.*, 2008), o que pode ser explicado pelo excelente sistema de tamponamento que o ambiente marinho possui.

Figura 5 - Efeito do pH na atividade hemaglutinante de CaL.



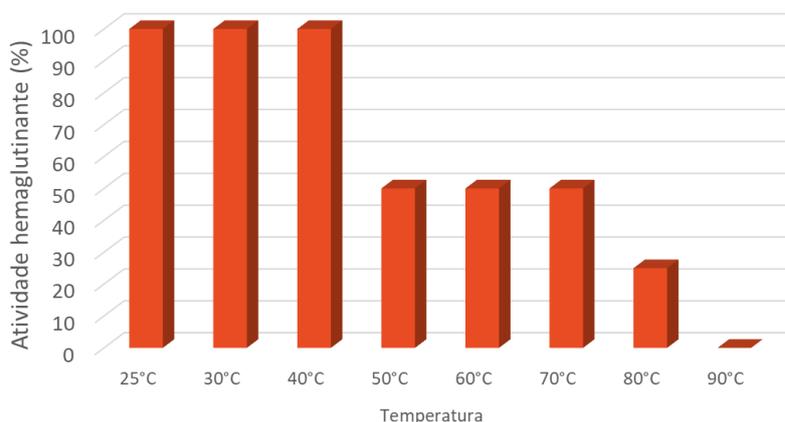
Fonte: Autor. A atividade hemaglutinante foi expressa em porcentagem de hemaglutinação.

4.4.2 Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante da lectina permaneceu estável até 40 °C (Figura 6). Houve uma redução de 50% na hemaglutinação nas temperaturas de 50 a 70 °C, perdendo totalmente sua atividade hemaglutinante quando aquecida a 90 °C por 1 hora, se comportando de forma semelhante às outras lectinas de esponjas marinhas (GARDÈRES *et al.*, 2015). Atta *et al.* (1998) não observaram nenhum efeito negativo na atividade hemaglutinante de CaL após seu aquecimento a 60 °C por 10 minutos.

Algumas lectinas isoladas de esponjas marinhas são termorresistentes, como as lectinas Ccgh 1 e 2, de *Cinachyrella* sp., que se mantêm estáveis mesmo aquecidas a 100 °C (UEDA *et al.*, 2013). A lectina CAL, isolada de *Craniella australiensis*, também apresentou atividade a 95 °C (XIONG *et al.*, 2006). Essa resistência a elevadas temperaturas, exercida por algumas lectinas, pode estar relacionada com a presença de pontes dissulfeto, tornando a proteína estável o suficiente para resistir ao tratamento térmico (UEDA *et al.*, 2013). A manutenção da atividade hemaglutinante frente a variações de temperatura favorece o potencial de aplicação biotecnológica dessa molécula.

Figura 6 – Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante de CaL.



Fonte: Autor. A atividade hemaglutinante foi expressa em porcentagem de hemaglutinação.

4.4.3 Efeito de íons divalentes na atividade hemaglutinante

A lectina CaL mostrou ser independente de íons de cálcio para exercer sua atividade hemaglutinante. A lectina continuou aglutinando os eritrócitos no teste realizado com tampão contendo EDTA, que é um composto que age como quelante de íons metálicos, fazendo com que lectinas dependentes de íons cálcio percam sua atividade hemaglutinante em sua presença.

A maioria das lectinas isoladas de esponjas marinhas também possuem atividade hemaglutinante independente de cátions divalentes (GARDÈRES *et al.*, 2015), assim como a CaL, lectina de *Cinachyrella apion* (MEDEIROS *et al.*, 2010), e CchG 1 e 2 de *Cinachyrella sp.* (UEDA *et al.*, 2013).

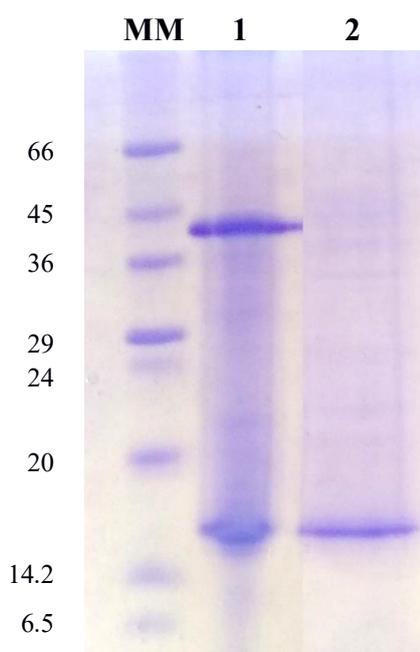
4.5 Eletroforese e estimativa da massa molecular

Através de SDS-PAGE (Figura 7), a massa molecular aparente da lectina foi estimada em aproximadamente 16 kDa em condições redutoras. Em condições não redutoras, CaL apresentou duas bandas proteicas, uma de aproximadamente 43 kDa e outra de aproximadamente 16 kDa, sugerindo que a proteína sofre oligomerização. O resultado encontrado está de acordo com a pesquisa de Atta *et al.* (1989), que trabalhando com a lectina CaL encontraram, em SDS-PAGE, uma banda de aproximadamente 17 kDa na forma reduzida, que também ocorreu de forma predominante na forma nativa, juntamente com homodímeros ligados covalentemente.

A oligomerização é a formação de complexos proteicos a partir da ligação de dois ou mais monômeros. Esse fenômeno está muitas vezes relacionado à funcionalidade da proteína no sistema biológico, e pode ser modulado por um ligante, temperatura, pH, íons metálicos, dentre outros (KUMARI; YADAV, 2019). Entretanto, a atividade hemaglutinante de CaL só está presente em sua forma reduzida, pois quando forma um oligômero, perde sua capacidade de hemaglutinação, que pode ser explicado pelo fato de CaL ser uma galectina. Como o ambiente natural dessas proteínas é o citosol, que é um ambiente reduzido, elas não formam pontes dissulfeto em suas formas naturais, embora contenham alguns resíduos de cisteína. Sendo assim, sua atividade de ligação é exercida apenas na forma reduzida (ST-PIERRE *et al.*, 2020).

As lectinas de esponjas marinhas formam variados tipos de organização oligomérica. A lectina H-2, de *Haliclona caerulea*, forma um dímero (CARNEIRO *et al.*, 2013), a CvL, de *Cliona varians*, forma um tetrâmero (MOURA *et al.*, 2006), e a CaL, de *Cinachyrella apion*, forma um octâmero (MEDEIROS *et al.*, 2010). Essas associações podem ocorrer através de interações fracas ou pontes dissulfeto (GARDÈRES *et al.*, 2015).

Figura 7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15 % na presença de SDS (SDS-PAGE).



Fonte: Autor. SDS-PAGE 15%. **MM**: Marcador molecular (aprotinina, pulmão bovino (6.500 Da), α -lactalbumina, leite bovino (14.200 Da), inibidor de tripsina, soja (20.000 Da), tripsinogênio, pâncreas bovino (24.000 Da), anidrase carbônica, eritrócitos bovinos (29.000 Da), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, músculo de coelho (36.000 Da), ovalbumina, ovo de galinha (45.000 Da) e albumina, soro bovino (66.000)). **1**: 20 μ L de CaL não reduzida. **2**: 20 μ L de CaL reduzida.

4.6 Sequenciamento de aminoácidos através de espectrometria de massas sequencial (MS/MS)

Após a digestão da proteína, realizada com tripsina e quimotripsina, 19 peptídeos foram sequenciados (Tabela 4). Juntos estes dados somam 11.688 Da, o que equivale a 73 % dos 16.000 Da estimados para a massa molecular de CalL.

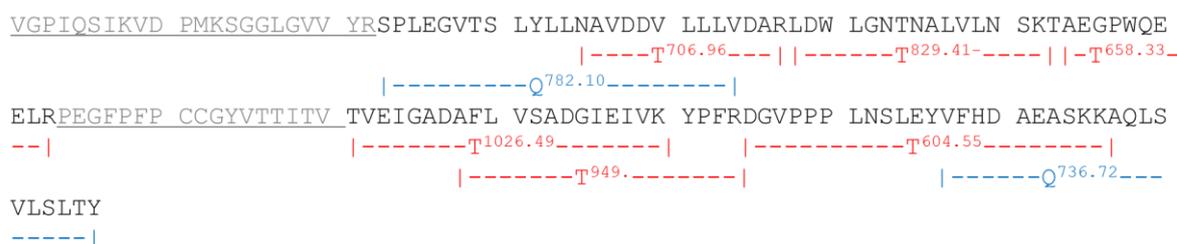
Tabela 4 – Sequência de aminoácidos dos peptídeos de CalL determinados por MS/MS.

Peptídeo	m/z	Sequência	Massa		Δ (Da)
			Observada	Calculada	
T1	829.41	LDWLGNTNALVLNSK	1656.77	1656.88	0.11
T2	636.84	VTQQDLVLNSR	1271.65	1271.68	0.03
T3	625.80	YDNNVLALNSK	1249.58	1249.63	0.05
T4	622.31	VDEQALVLNSR	1242.60	1242.65	0.05
T5	429.74	NALVLNSK	857.44	757.49	0.05
T6	402.67	VDWLGSK	803.31	803.41	0.10
T7	764.35	DNGVDDLLLLVDR	1526.69	1526.79	0.10
T8	706.89	NAVDDVLLLVDAR	1411.68	1411.76	0.08
T9	509.91	VNDGDDLLLLVDAR	1526.72	1526.79	0.07
T10	478.23	LLLDNDPR	954.43	954.51	0.08
T11	1152.53	DGVDPPLNLSEYVFHDAEASK	2302.08	2302.07	-0.01
T12	604.55	DGVPPPLNSLEYVFHDAEASKK	2412.12	2412.19	0.07
T13	801.35	YLQYSFHDNEASK	1600.67	1600.71	0.04
T14	658.33	TAEGPWQEELR	1314.61	1314.62	0.01
T15	949.01	GFLVSVNGIEIANYPFR	1894.95	1894.99	0.04
T16	1026.49	TVEIGADAFLVSADGIEIVK	2045.98	2045.08	0.01
Q1	676.37	VFHDAEASKKAQLSSLSAH	2025.08	2025.02	-0.06
Q2	736.72	VFHDAEASKKAQLSVLSLTY	2206.17	2206.16	-0.01
Q3	782.10	SPLEGVTSLYLLNAVDDVLLLV	2342.26	2342.26	0.00

Fonte: Autor. T1 – T7: Peptídeos obtidos na digestão com tripsina. Q1 – Q3: Peptídeos obtidos na digestão com quimotripsina.

Dos dezenove peptídeos sequenciados, oito apresentaram semelhança com a sequência de CchG (Figura 8), uma galectina isolada da esponja marinha *Cinachyrella* sp. (UEDA *et al.*, 2013).

Figura 8 – Mapa peptídico da lectina CaL.



Fonte: Autor. A sequência de CchG foi utilizada como *template*. Aminoácidos sublinhados: região sem cobertura para os peptídeos sequenciados.

O alinhamento da sequência parcial de aminoácidos de CaL com a sequência primária de CchG mostrou 54% de identidade e 64% de similaridade entre as sequências (Figura 9). CaL possui a mesma sequência conservada de CchG (NVLVLNSK) que contribui para a base do sítio de ligação ao carboidrato das galectinas (FREYMANN *et al.*, 2012).

Dos 5 aminoácidos (His44, Arg48, Asn61, Trp69 e Glu72) que medeiam as interações polares entre a lactose e a congerin II, lectina da enguia *Conger conger*, CaL apresenta 4 deles (SHIRAI *et al.*, 2002). As diferenças encontradas em alguns resíduos de aminoácidos em algumas galectinas, podem explicar as interações de ligações com uma maior variedade de carboidratos (FREYMANN *et al.*, 2012).

Uma das características da família das galectinas, é a similaridade estrutural em seus domínios de reconhecimento de carboidratos (CUMMINGS *et al.*, 2017). Dentre os resíduos de aminoácidos mais conservados entre as galectinas, CaL apresenta 6 deles (LRVNWER), e 3 dos aminoácidos conservados (FPF) estão presentes na região da estrutura primária de CaL ainda não determinada (Figura 9).

Além da semelhança estrutural, CaL também compartilha algumas características bioquímicas com CchG, como atividade hemaglutinante independente de cálcio e afinidade por galactosídeos (UEDA *et al.*, 2013).

Figura 9 – Alinhamento da sequência parcial de aminoácidos de CalL e CchG de *Cinachyrella* sp.

```

      1      10      20      30      40 *      * 50      * 60
galectin,  TGPIQSIKVDPKKSGGLGVVYRSPDKGRVSLYLYNDGEDILLVVDARFDWRGEQNVLVLN
CaL       .....SPLGVTSLYLLNAVDDVLLLVDARLDWLGNTNALVLN
consensus>50  tgpIQSIKVDPKKSGGLGVVYRSPleGvvSLYLLNdV#D!LLvVDARlDwlg#qNvLVLN

      *70 * *      **80      90      100      110      120
galectin,  SKFAGCEWGPVVRPEGFPFPCCGYVTTITVrVEIGADGFIISANGIEIVKYPYRDGLPPP
CaL       SKTARCPWQEEELRT.....VEIGADAFVLSADGIEIVKYPFRDGVPPP
consensus>50  SKfAeGeWqeEvRpegfpfpccgyvttitvrVEIGADaFi!SA#GIEIVKYP%RDGvPPP

      130      140
galectin,  VTKFQYVFQDOEASEKAQLESLSAYY
CaL       LNSLEYVFDDEASKKAQLSVLSLTY
consensus>50  vnkI#YVFqDqEASeKAQLeVLSlyY

```

Fonte: Autor. As caixas vermelhas representam os aminoácidos idênticos. Região pontilhada representa a região não identificada pelos peptídeos sequenciados. * Aminoácidos conservados na família das galectinas.

5 CONCLUSÃO

Um novo protocolo para isolamento da lectina da esponja marinha *Cinachyrella alloclada*, CalL, foi determinado e se mostrou eficiente. CalL manteve sua atividade hemaglutinante frente a variações de temperatura, o que favorece seu potencial de aplicação biotecnológica. A lectina apresenta atividade apenas em sua forma reduzida, perdendo sua atividade em ambiente oxidativo, devido sua natureza citoplasmática. Cerca de 73% da estrutura primária da lectina foi determinada, sendo necessário mais estudos para determinar sua estrutura completa. A lectina CalL é uma galectina, sendo uma das poucas representantes desta família de lectinas em metazoários basais. Sendo assim, CalL se torna um excelente objeto de estudo para trabalhos futuros que objetivem compreender o surgimento e a evolução desta importante classe de proteínas, bem como para sua potencial aplicação como uma ferramenta biotecnológica.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, B. B. L.; GOLDSTEIN, I. J. Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextrans. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 96, p. 23c-25c, 1965.
- ALEXANDRE, K.B. *et al.* The lectins griffithsin, cyanovirin-N and scytovirin inhibit HIV-1 binding to the DC-SIGN receptor and transfer to CD₄(+) cells. **Virology**, [s.l.], v. 423(2), p. 175-186, 2012.
- ASHRAF, M.T.; KHAN, R.H. Mitogenic lectins. **Medical Science Monitor**, [s.l.], v. 9, p. 265-269, 2003.
- ATHAMNA, A. *et al.* Rapid identification of *Mycobacterium* species by lectin agglutination. **Journal of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 65, ed. 2, p. 209-215, 2006.
- ATTA, A.M. *et al.* Isolation and functional characterization of a mitogenic lectin from the marine sponge *Cinachyrella alloclada*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s.l.], v. 22, p. 3379-3385, 1989.
- BHUTIA, S. K. *et al.* Plant lectins in cancer therapeutics: 30 Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. **Pharmacological Research**, [s.l.], v. 144, p. 8-18, 2019.
- BOYD, W.C.; SHARPLEIGH, E. Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, [s.l.], v. 119, p. 419, 1954.
- BRETTING, H.; KABAT, E.A. Purification and characterization of the agglutinins from the sponge *Axinella polypoides* and a study of their combining sites. **Biochemistry**, Reino Unido, v. 15, p. 3228-3236, 1976.
- BRETTING, H. *et al.* A mitogenic lactosebinding lectin from the sponge *Geodia cydonium*. **The Journal of Immunology**, [s.l.], v. 127, p. 1652-1658, 1981.
- CARNEIRO, R. F. **Lectinas da esponja marinha *Haliclona (soestella) caerulea***. 2013. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- CARNEIRO, R.F. *et al.* Halilectin 1 (H-1) and Halilectin 2 (H-2): Two new lectins isolated from the marine sponge *Haliclona caerulea*. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s.l.], v. 45, p. 51-58, 2013.
- CARNEIRO, R. 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.
- 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, 2017a.

CARNEIRO, R. F. *et al.* Purification, biochemical characterization, and amino acid sequence of a novel type of lectin from *Aplysia dactylomela* eggs with antibacterial/antibiofilm potential. **Marine Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 49-64, 2017b.

CARNEIRO, R. F. *et al.* A new mucin-binding lectin from the marine sponge *Aplysina fulva* (AFL) exhibits antibiofilm effects. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s.l.], v. 662, p. 169-176, 2019.

CUMMINGS, R. D. *et al.* Galectins. In: VARKI, A. *et al.* **Essentials of Glycobiology**. 3^a ed. New York, Cold Spring Harbor, 2017, Capítulo 36. Disponível em: <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453091/doi: 10.1101/glycobiology.3e.036](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453091/doi:10.1101/glycobiology.3e.036)>

DODD, R.Y. *et al.* Haemagglutinins from marine sponges. **Vox Sanguis**, [s.l.], v. 15, n.5, p. 386, 1968.

DRESCH, R.R. *et al.* ACL-I, a lectin from the marine sponge *Axinella corrugata*: Isolation, characterization and chemotactic activity. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 148, p. 23-30, 2008.

DRESCH, R.R. *et al.* Biological activities of ACL-I and physicochemical properties of ACL-II, lectins isolated from the marine sponge *Axinella corrugata*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, [s.l.], v. 161, p. 365-370, 2012.

EHRlich P. Experimentelle Untersuchungen über Immunität. I. Ueber Ricin. **Deutsche medizinische Wochenschrift**, [s.l.], v. 17, p. 976-979, 1891.

EHRlich P. Experimentelle Untersuchungen über Immunität. II. Ueber Abrin. **Deutsche medizinische Wochenschrift**, [s.l.], v. 17, p. 1218-1219, 1891.

FONTENELLE, T. P. C. *et al.* Lectin obtained from the red seaweed *Bryothamnion triquetrum*: Secondary structure and anti-inflammatory activity in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 12, p. 1122-1130, 2018.

FREYMANN, D.M. *et al.* Structure of a tetrameric galectin from *Cinachyrella* sp. (ball sponge). **Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography**, [s.l.], v. 68, p. 1163-1174, 2012.

GARDÈRES, J. *et al.* Porifera lectins: Diversity, physiological roles and biotechnological potential. **Marine Drugs**, Suíça, v. 13, p. 5059-5101, 2015.

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.

GARRED, P. *et al.* A journey through the lectin pathway of complement - MBL and beyond. **Immunological Reviews**, [s.l.], v. 271, p. 74-97, 2016.

- GLOECKNER, V. *et al.* Unique and species-specific microbial communities in *Oscarella lobularis* and other Mediterranean *Oscarella* species (Porifera: Homoscleromorpha). **Marine Biology**, [s.l.], v. 160, p. 781-791, 2013.
- 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.], v. 11, p. 21–29, 2001.
- HAMMARSTROM, S.; KABAT, E.A. Purification and characterization of a blood-group a reactive hemagglutinin from the snail *Helix pomatia* and a study of its combining site. **Biochemistry**, Reino Unido, v. 8, p. 2696-2705, 1969.
- HASAN, I.; OZEKI, Y. Histochemical localization of N-acetylhexosamine-binding lectin HOL-18 in *Halichondria okadai* (Japanese black sponge), and its antimicrobial and cytotoxic anticancer effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 124, p. 819-827, 2019.
- HESTETUN, J. T. *et al.* A review of carnivorous sponges (Porifera: Cladorhizidae) from the Boreal North Atlantic and Arctic. **Zoological Journal of the Linnean Society**, [s.l.], v. 181, n. 1, p. 1-69, 2017.
- HIRABAYASHI, J.; KASAI, K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: Structure, function and molecular evolution. **Glycobiology**, [s.l.], v. 3, p. 297-304, 1993.
- HOOPER, J.N.A., VAN SOEST, R.W.M., WILLENZ, P. **Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2002.
- HUNG, L. D. *et al.* Biological activity, cDNA cloning and primary structure of lectin KSA-2 from the cultivated red alga *Kappaphycus striatum* (Schmitz) Doty ex Silva. **Phytochemistry Letters**, [s.l.], v. 14, p. 99-105, 2015.
- JAYANTHI, S. *et al.* Purification, characterization and functional analysis of the immune molecule lectin from the haemolymph of blue swimmer crab *Portunus pelagicus* and their antibiofilm properties. **Fish & Shellfish Immunology**, [s.l.], v. 62, p. 227-237, 2017.
- KAWAGISHI, H. *et al.* Two lectins from the marine sponge *Halichondria okadai*. An N-acetyl-sugar-specific lectin (HOL-I) and an N-acetylglucosamine-specific lectin (HOL-II). **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 269, p. 1375-1379, 1994
- KILPATRICK, D. C. Animal lectins: A historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [s.l.], v. 1572, n. 2-3, p. 187-197, 2002.
- KUMARI, N.; YADAV, S. Modulation of protein oligomerization: An overview. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, [s.l.], v. 149, p. 99-113, 2019.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, [s.l.], v. 227, p. 680-685, 1970.

- MACHIDA, K. *et al.* Cinanthrenol A, an estrogenic steroid containing phenanthrene nucleus, from a marine sponge *Cinachyrella* sp. **Organic Letters**, [s.l.], v. 16, n. 6, p. 1539-1541, 2014.
- MARCHALONIS, J.J.; EDELMAN, G.M. Isolation and characterization of a hemagglutinin from *Limulus polyphemus*. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 32, p. 453-465, 1968.
- 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.
- MEDEIROS, D.S. *et al.* A lactose specific lectin from the sponge *Cinachyrella apion*: purification, characterization, N-terminal sequences alignment and agglutinating activity on *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, [s.l.], v. 155, n. 3, p. 211-216, 2010.
- MORROW, C.; CÁRDENAS, P. Proposal for a revised classification of the Demospongiae (Porifera). **Frontiers in Zoology**, [s.l.], v. 12, n. 7, 2015.
- 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 - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, [s.l.], v. 145, p. 517-523, 2006.
- MÜLLER, W.E.G. *et al.* Galectins in the phylogenetically oldest metazoa, the sponge (Porifera). **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, [s.l.], v. 45, p. 123-130, 1997.
- MURICY, G. *et al.* Filo Porifera. In **Atlas de invertebrados marinhos da região central da Zona Econômica Exclusiva brasileira - Parte 1** (H.P. Lavrado & M.S. Viana, org.). Museu Nacional, Rio de Janeiro, p. 25-57, 2007.
- MURICY, G 2020. Porifera in **Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil**. PNUD. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/6>>. Acesso em: 01 jul. 2020.
- NASCIMENTO-NETO, L. G. *et al.* 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, n. 4, p. 521-528, 2018.
- NURHAYATI A. P. D. *et al.* The Anticancer Activity of Marine Sponge *Cinachyrella* sp. (Family Tetillidae). IPTEK, **The Journal for Technology and Science**, [s.l.], v. 25, n. 3, p. 71, 2014.
- PAJIC, I. *et al.* A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: Isolation, characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, [s.l.], v. 132, p. 213-221, 2002.
- RABELO, L. *et al.* A lactose-binding lectin from the marine sponge *Cinachyrella apion* (Cal) induces cell death in human cervical adenocarcinoma cells. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 10, p. 727-743, 2012.

RÜTZLER, K.; SMITH, K. P. Guide to western Atlantic species of *Cinachyrella* (Porifera: Tetillidae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, [s.l.], v. 105, n. 1, p. 148-164, 1992.

SAMPAIO, A.H. **Lectins from *Ulva* and *Ptilota* species**.1997.191p. Ph.D. Thesis. University of Portsmouth, Inglaterra, 1997.

SAMPAIO, A. H. *et al.* A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 48, n. 5, p. 765-769, 1998.

SCHRÖDER, H.C. *et al.* The galactose-specific lectin from the sponge *Chondrilla nucula* displays anti-human immunodeficiency virus activity in vitro via stimulation of the (2'-5') oligoadenylate metabolism. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, [s.l.], v. 1, p. 99-105, 1990.

SCHRÖDER, H.C. *et al.* Emergence and disappearance of an immune molecule, an antimicrobial lectin, in basal metazoa. A tachylectin-related protein in the sponge *Suberites domuncula*. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 278, p. 32810 - 32817, 2003.

SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **The Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 282, n. 5, p. 2753-2764, 2007.

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

SHEVCHENKO, A. *et al.* In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 1, n. 6, p. 2859-2860, 2007.

SHIRAI, T. *et al.* Crystal structure of a conger eel galectin (congerin II) at 1.45Å resolution: implication for the accelerated evolution of a new ligand-binding site following gene duplication. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 321, n. 5, p. 879-89, 2002.

STILLMARK, P. H. Uber Ricin. **Arb. Pharmakol Institute Dorpart**, [s.l.], v. 3, p. 59-151, 1889.

ST-PIERRE, G. *et al.* Metazoan Soluble β -Galactoside-Binding Lectins, Galectins: Methods for Purification, Characterization of Their Carbohydrate-Binding Specificity, and Probing Their Ligands. In. HIRABAYASHI, Jun. **Lectin Purification and Analysis: Methods in Protocols**. 1 ed. Tsukuba: Humana Press, 2020. Cap. 5, 39-54.

SZITENBERG, A. *et al.* Phylogeny of Tetillidae (Porifera, Demospongiae, Spirophorida) Based on Three Molecular Markers, **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [s.l.], v. 67, n. 2, p.509-519, 2013.

TEICHBERG, V.I. *et al.* A b-D galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 72, p. 1383-1387, 1975.

TREM bala. Intérprete: Ana Vilela. Compositor: Ana Vilela. *In*: Ana Vilela. Rio de Janeiro: Som Livre, 2017. 1 CD, faixa 1.

UEDA, T. *et al.* Isolation of novel prototype galectins from the marine ball sponge *Cinachyrella* sp. guided by their modulatory activity on mammalian glutamate-gated ion channels. **Glycobiology**, [s.l.], v. 23, n. 4, p. 412-425, 2013.

VAN SOEST, R. W. M. *et al.* Global diversity of sponges (Porifera). **PLoS ONE**, [s.l.], v. 7, n. 4, e35105, 2012.

VAN SOEST, R.W.M. *et al.* **Banco de Dados Mundial Porifera**. Disponível em: <<http://www.marinespecies.org/porifera>>. Acesso em: 01 jul. 2020.

WATKINS, W.M.; MORGAN, W.T.J. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. **Nature**, [s.l.], v. 169, p. 825-826, 1952.

WÖRHEIDE, G *et al.*, Chapter One - Deep Phylogeny and Evolution of Sponges (Phylum Porifera). **Advances in marine Biology**, [s.l.], v. 61 , p. 1-78, 2012.

XIONG, C. *et al.* A normal mucin-binding lectin from the sponge *Craniella australiensis*. **Comparative Biochemistry Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 143, p. 9-16, 2006.

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