



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

RÔMULO FARIAS CARNEIRO

LECTINAS DA ESPONJA MARINHA *Haliclona (Soestella) caerulea*.

FORTALEZA
2013

RÔMULO FARIAS CARNEIRO

LECTINAS DA ESPONJA MARINHA *Haliclona (Soestella) caerulea*.

Dissertação de mestrado submetida à coordenação do Curso de Pós Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

Área de concentração: Biologia Estrutural

Orientador: Dr. Alexandre Holanda Sampaio
Co-Orientador: Dr Celso Shiniti Nagano

FORTALEZA
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- C2901 Carneiro, Rômulo Farias.
Lectinas da esponja marinha *Holiclona (soestella) caerulea* / Rômulo Farias Carneiro. – 2013.
214f. : il. color., enc. : 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Biologia Estrutural.
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.
Coorientação: Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano.
1. Lectinas. 2. Esponja marinha. 3. Proteína. 4. Cromóforo. 5. Espectrometria de massas.
I. Título.

CDD 574.192

RÔMULO FARIAS CARNEIROLECTINAS DA ESPONJA MARINHA *Haliclona (Soestella) caerulea*.

Dissertação de mestrado submetida à coordenação do Curso de Pós Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Biologia Estrutural.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará



Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha
Universidade Federal do Ceará



Prof. Dr. Raniere da Mata Moura
Universidade Potiguar

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente minha irmã Alyne e minha mãe Aila, pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida.

À minha namorada, Renata, a quem, para mim, faltam palavras para descrever o quão maravilhosa é.

Ao meu orientador, Alexandre Holanda Sampaio, pela fé demonstrada em mim. Pelo aprendizado e pelo exemplo que é como pessoa e como pesquisador.

Ao professor Celso Shiniti Nagano, pela imensa contribuição neste trabalho, pela paciência, pelas broncas, pelos conselhos e pela amizade.

Ao professor Raniére da Mata Moura, a quem prezo muito por todo o conhecimento passado e pela amizade.

Aos professores Bruno Anderson, Benildo Cavada e à professora Kyria Santiago, pelas oportunidades e pelos “puxões de orelha”.

Aos grandes amigos que fiz no BioMol-group: Arthur, Alexandra, Bruno Lopes, Ito, Guilherme, Júnior, Claudener, Fernando, Sâmia, Rafael, Héilton, Raquel, Alysson, Eduardo e Mayron.

A todas as pessoas que estiveram diretamente envolvidas neste trabalho: Arthur Alves, Renata Pinheiro, Bruno Lopes, Mayara Santiago e Alexandra de Almeida. Muito obrigado, além de grandes amigos, são excelentes profissionais.

Ao professor João Paulo, pela ajuda com a predição gênica.

À Sula Salani, pela identificação da esponja.

À professora Cintia, pelo sequenciamento dos produtos gênicos.

Aos funcionários e professores do Departamento de Bioquímica, em especial à professora Ana Lúcia, pelo aprendizado.

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”

Fernando Pessoa

RESUMO

Lectinas podem ser definidas como proteínas/glicoproteínas que reconhecem carboidratos de maneira específica, mas não participam do metabolismo dos mesmos e não pertencem a nenhuma das principais classes de imunoglobulinas. As lectinas são proteínas ubíquas, estando presente em todos os organismos conhecidos. Em células animais, lectinas têm sido encontradas no citoplasma, no núcleo e associadas a membranas das mais diversas organelas e nos mais variados tipos celulares. Tais lectinas animais podem ser classificadas em famílias distintas com base em suas características físico químicas, função e especialmente em sua identidade de estrutura primária e terciária. O objetivo deste trabalho foi purificar duas novas lectinas da esponja marinha *Haliclona (Soestella) caerulea* e caracterizar estruturalmente uma delas. Espécimes de *H.caerulea* foram coletados na praia do paracuru, Ceará. Duas lectinas (H-1 e H-3) foram isoladas por técnicas clássicas de química de proteínas. A estrutura primária de uma delas foi determinada por espectrometria de massas e RACE. A atividade tóxica das lectinas foi avaliada frente a náuplios de *Artemia* e cepas das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. H-1 e H-3 apresentaram características distintas da lectina previamente isolada de *H. caerulea*. H-1 é uma proteína monomérica de aproximadamente 40 kDa enquanto que H-3 é uma proteína trimérica com cadeias com massa aproximada de 9, 16 e 18 kDa. H-3 aglutina eritrócitos humanos do tipo A e B e foi inibida GalNAc e PSM, H-1 aglutina diversos grupos sanguíneos e não pôde ser inibida por nenhum açúcar testado. H-1 foi tóxica a náuplios de *Artemia* ($LC_{50}=6,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e H-3 foi considerada não tóxica ($LC_{50}=414,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$). H-3 é uma proteína azul, pois interage com um cromóforo de 597 Da com absorção máxima a 620 nm. A estrutura primária de H-3 foi determinada e revelou-se única, não sendo conhecida nenhuma lectina com estrutura similar. H-3 apresenta um glicano híbrido composto por Hex₇NAcHex₇DeoxiHex₂. A cadeia α de H-3 sofre um processamento proteolítico complexo que ainda não foi completamente elucidado. Além disso, H-3 foi cristalizada, mas não foi possível a obtenção de um padrão de difração que permita a resolução da estrutura. Em suma, duas novas lectinas foram isoladas e fora observado pela primeira vez a interação entre uma lectina e um cromóforo natural. Pela primeira vez também, fora determinada a composição glicídica de uma lectina de esponja.

Palavras chaves: Lectina, cromóforo, espectrometria de massas, 3'RACE, top down-MS.

ABSTRACT

Lectins are proteins/glycoproteins that recognize carbohydrate of a specific way, but not participate in the metabolism of the same and do not belong to any of major classes of immunoglobulins. Lectins are ubiquitous proteins, present in all known organisms. In animal cells, lectins have been found in the cytoplasm, in the nucleus and as membrane-associated proteins, in diverse organelles and cells. Animal lectins can be classified into distinct families based on their physicochemical characteristics, especially in their function and identity of primary and tertiary structure. The aim of this study was to purify, characterize structural and biologically new lectins from the marine sponge *Haliclona (Soestella) caerulea*. *H. caerulea* specimens were collected in Paracuru beach, Ceará. Two lectins (H-1 and H-3) were isolated by classical techniques of protein chemistry. The primary structure of H-3 was determined by mass spectrometry and RACE. The toxic activity of lectins was evaluated against *Artemia* nauplii and *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains. H-1 and H-3 showed distinct characteristics of the lectin previously isolated from *H. caerulea*. H-1 is a monomeric protein of 40 kDa whereas H-3 is a heterogeneous protein with chains of 9, 16 and 18 kDa. H-3 binds human erythrocytes of A and B type and was inhibited by GalNAc and PSM, H-1 binds different blood groups and could not be inhibited by any sugar tested. H-1 was toxic to *Artemia* nauplii ($LC_{50} = 6.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and H-3 was not considered toxic ($LC_{50} = 414.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). H-3 is a blue protein that interacts with a chromophore of 597 Da of maximum absorbance at 620 nm. The primary structure of H-3 revealed a unique amino acid sequence no similar to any animal lectins known. H-3 has a hybrid glycan comprising by Hex7NAcHex7DeoxiHex2. The α -chain of H-3 undergoes complex proteolytic processing that not been fully elucidated. Moreover, H-3 was crystallized, but was not possible to obtain a diffraction pattern that permits solving the structure. In short, two new lectins were isolated and out first observed the interaction between a lectin and natural chromophore. Furthermore, for the first time given the composition glycidic out of a sponge lectin.

Key words: Lectin, chromophore, mass spectrometry, 3' RACE, top down-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura cristalina da calnexina e o modelo hipotético para a interação de uma glicoproteína com Cnx.	18
Figura 2 -	Domínios e estrutura oligomérica das ficolinas	19
Figura 3 -	Estrutura de um CTLD típico.	21
Figura 4 -	Estrutura de <i>Anguila anguila</i> lectin (AAA) complexada com α fucose.	25
Figura 5 -	Expressão célula-específica de Siglecs no sistema hematopoiético e células imunes de humanos.	27
Figura 6 -	Arranjo característico de lectinas de leguminosas e lectinas tipo L.	28
Figura 7 -	Estrutura tridimensional de CEL-III.	31
Figura 8 -	Classificação estrutural de galectinas.	32
Figura 9 -	Galectinas desempenham importantes papéis durante diferentes estágios do ciclo celular.	33
Figura 10 -	Estrutura tridimensional da lectina ligante de ramnose, CSL3 complexada com Melobiose.	36
Figura 11 -	Arranjo pentamérico de uma pentraxina humana.	37
Figura 12 -	Alinhamento dos domínios da tachylectina-1	39
Figura 13 -	Estrutura tetramérica de CchG (<i>Cinachyrella</i> sp. Galectin).	45
Figura 14 -	Cromatografia de afinidade em Estroma-Sephadex.	64
Figura 15 -	Cromatografias de interação hidrofóbica em fenil-Sepharose e troca iônica.	65
Figura 16 -	Eletroforese das Halilectinas purificadas em gel de poliacrilamida.	68
Figura 17 -	Cromatografia de exclusão molecular em matriz TSK G3000SWXL.	68
Figura 18 -	Cromatografia de exclusão molecular em matriz Sephacryl S-200 HR	69
Figura 19 -	Efeito do pH e temperatura sobre a atividade das Halilectinas.	69
Figura 20 -	SDS-PAGE de H-3 corada com ácido periódico de Schiff.	70
Figura 21 -	Espectro de absorção de H-3 na faixa do visível.	71
Figura 22 -	Cromatografia de fase reversa em coluna Sephasil C-8.	72
Figura 23 -	Espectros de massas intactas das frações da cromatografia de fase reversa em Sephasil C8.	73
Figura 24 -	Top Down da cadeia α' .	74
Figura 25 -	Espectro de massa deconvoluído da cadeia α .	75

Figura 26 -	Top Down do íon 18.891 ± 2 Da.	75
Figura 27 -	Espectro de massa das cadeias de H-3 após tratamento com IAA	76
Figura 28 -	Cadeias de H-3 reduzidas e alquiladas.	77
Figura 29 -	Espectro de massas da cadeia α deglicosilada.	78
Figura 30 -	Espectro de massas de α H3 deglicosilada e predição do glicano.	79
Figura 31 -	Mapa peptídico da cadeia α de H-3.	80
Figura 32 -	Mapa peptídico da cadeia β de H-3.	82
Figura 33 -	Eletroforese em gel de agarose. Produto 3'RACE.	84
Figura 34 -	Alinhamento entre as sequências obtidas por MSMS x RACE.	84
Figura 35 -	Estrutura primária de α H-3.	85
Figura 36 -	Alinhamento entre os domínios repetidos de α H-3.	86
Figura 37 -	Sequencia da lectina putativa de <i>Amphimedon queenslandica</i> .	86
Figura 38 -	Alinhamentos entre as cadeias α de pAqL e H-3.	87
Figura 39 -	Microcristais de H-3.	88
Figura 40 -	Cristais de H-3	89
Figura 41 -	Possíveis formações oligoméricas de H-3.	92
Figura 42 -	Biossíntese e processamento eucarioto de glicoproteínas N-ligadas.	101
Figura 43 -	Possível oligossacarídeo presente em H-3.	102
Figura 44 -	Processamento pós traducional hipotético das cadeias α de H-3 e pAqL.	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Subdivisão das lectinas do tipo C.	23
Tabela 2 -	Purificação das Halilectinas.	66
Tabela 3 -	Inibição da atividade hemaglutinante de H-1 e H-3.	67
Tabela 4 -	Peptídeos sequenciados de α H-3.	81
Tabela 5 -	Peptídeos sequenciados de β H-3.	83

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Lectinas.....	16
1.1.1 Considerações iniciais	16
1.1.2 Definição.....	17
1.1.3 Lectinas animais.....	18
1.1.3.1 Famílias de lectinas animais	19
Anexinas	19
Calnexina e calreticulina	20
Ficolinas.....	21
Kaliklectinas.....	22
Lectinas do tipo C e proteínas contendo o CTLD.	22
Lectinas do tipo F	26
Lectinas do tipo F-box	27
Lectinas do tipo H	28
Lectinas do tipo I (Siglecs)	28
Lectinas do tipo L	30
Lectinas do tipo M.....	31
Lectinas do tipo P	31
Lectinas do tipo Quitinase.....	32
Lectinas do tipo R.....	32
Lectinas tipo S (Galectinas)	34
Lectinas do tipo X	36
Lectinas ligantes de Ramnose	36
Pentraxinas	38
Tachylectinas.....	39
1.1.3.2 Lectinas de Esponja	40
1.1.3.1.1 Lectinas do gênero <i>Haliclona</i>	44
1.1.3.1.2 Biologia estrutural de lectinas de esponja.....	45
2 OBJETIVO	49
2.1 Objetivo geral.....	49
2.2 Objetivos específicos.....	49
3 METODOLOGIA	50
3.1 Coleta e extração.	50

	14
3.2 Preparo dos estromas e montagem da matriz cromatográfica	50
3.3 Purificação das lectinas	50
3.4 Preparo de eritrócitos, atividade hemaglutinante e inibição por açúcares.	52
3.5 Caracterização físico química de H-1 e H-3.	53
3.6 Eletroforese e estimativa da massa molecular de H-1 e H-3.	54
3.7 Cromatografia de exclusão molecular e estimativa da massa molecular nativa de H-1 e H-3.....	55
3.8 Teste de letalidade sobre náuplios de <i>Artemia</i>	56
3.10 Cromatografia de fase reversa, determinação da massa molecular por espectrometria de massas e fragmentação <i>top down</i> -MS de H-3.....	57
3.11 Determinação de grupos SH livres e pontes S-S de H-3, através de espectrometria de massas.	58
3.12 Deglicosilação e determinação da massa molecular de H-3 deglicosilada.	59
3.13 Eletroforese e clivagens proteolíticas de H-3.....	59
3.14 Digestão <i>in situ</i> e extração de peptídeos de H-3.....	60
3.15 LC-MS/MS e sequenciamento de H-3 por espectrometria de massas sequencial.	61
3.16 Clonagem da cadeia α de H-3.	61
3.16.1 Extração de RNA	61
3.16.2 Eletroforese em gel de agarose.	62
3.16.3 Síntese do DNA complementar.....	62
3.16.5 Amplificação do produto 3'RACE de H-3.....	63
3.16.6 Ligação do produto de amplificação ao vetor pGEM-T-easy.....	63
3.16.7 Transformação de células competentes.	63
3.16.8 Purificação dos plasmídeos recombinantes e análise da sequencia do fragmento.	64
2.17 Análises de bioinformática	64
2.18 Cristalização de H-3.	65
4. RESULTADOS	66
4.1 Purificação das lectinas	66
4.2 Atividade hemaglutinante e inibição.	67
4.3 Caracterização físicoquímica de H-1 e H-3	69
4.4 Toxicidade de Halilectinas contra náuplios de <i>Artemia</i>	73
4.5 Atividade antimicrobiana e aglutinação de bactérias	73
4.6 Cromatografia de fase reversa, determinação da massa molecular por espectrometria de massas e fragmentação top down de H-3.	74
4.7 Determinação de grupos SH livres e pontes dissulfeto de H-3	78
4.8 Deglicosilação e determinação da massa molecular de α H-3 deglicosilada	79
4.9 Determinação da estrutura primária de H-3	82

	15
4.10 Clonagem da cadeia α	85
4.11 Análise de bioinformática	87
4.12 Cristalização da lectina H-3	90
5. DISCUSSÃO	92
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.	110
REFERÊNCIAS	111
ANEXO A – Representação esquemática do processo de purificação das Halilectinas.	126
ANEXO B - Halilectin 1 (H-1) and Halilectin 2 (H-2): two new lectins isolated from the marine sponge Haliclona caerulea.....	127
ANEXO C- H-3, a new lectin from the marine sponge Haliclona caerulea: Purification and mass spectrometric characterization.	128

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lectinas

1.1.1 Considerações iniciais

Uma característica própria da maioria, senão de todas as proteínas, é sua habilidade de combinar-se reversível e especificamente com diversas moléculas. Lectinas representam uma classe de proteínas capazes de reconhecer carboidratos, promover aglutinação de glicoconjugados e células, sem, contudo, realizar atividade catalítica (SHARON; LIS, 2004).

A primeira descrição de uma lectina data de 1853 quando Charcot e Robin observaram estruturas semelhantes a cristais em tecidos patológicos. Estas estruturas, posteriormente ficaram conhecidas como cristais de Charcot-Leyden. Atualmente, é sabido que se trata da forma pura de uma única proteína, a galectina-10 (ACKERMAN, *et al.*, 1993).

De fato, a primeira atividade lectínica só foi observada em 1860, por S. Weir Mitchell trabalhando com veneno da serpente *Crotalus durissus* (MITCHELL, 1860). Depois, em 1888, Stillmark obteve uma fração aglutinante e tóxica a partir do extrato da mamona (*Ricinus communis*). A esta fração ele atribuiu a denominação de ricina (STILLMARK, 1888).

A partir do século XX a presença de lectinas foi relatada em diferentes organismos e algumas aglutininas foram purificadas. No entanto, estas proteínas eram vistas apenas como curiosidade científica e não como objeto de estudo relevante (SHARON; LIS, 2004).

Na década de 1960, duas constatações mudaram a perspectiva em torno das lectinas. A primeira, realizada por Peter Nowell em 1960, evidenciou que a lectina PHA (isolada de sementes de *Phaseolus vulgaris*) estimulava linfócitos a entrarem em mitose (NOWELL, 1960). Esta descoberta abalou o campo da imunologia, pois até então se acreditava que os linfócitos eram indivisíveis (SHARON; LIS, 2004).

A outra constatação importante, em se tratando de lectinas, foi de autoria de Joseph Aub que provou que a WGA (*wheat germ agglutinin*) tinha a habilidade de aglutinar preferencialmente células malignas (AUB *et al.*, 1965). Este trabalho evidenciava, pela primeira vez, que nas transformações oncogênicas ocorriam modificações nos padrões de glicosilação da superfície celular (SHARON; LIS, 2004).

A partir de então as lectinas passaram a atrair o interesse de muitos pesquisadores e trabalhos que relatam a caracterização bioquímica e estrutural destas moléculas são até hoje realizados com certo grau de importância.

1.1.2 Definição

O termo lectina (derivado do latim “*legere*”, escolher) foi primeiramente empregado por W.C. Boyd e E. Shapleigh (1954). O termo foi escolhido por conta de algumas aglutininas de plantas serem capazes de diferenciar grupos sanguíneos e aglutinar de maneira mais efetiva certas células em detrimento de outras (BOYD; SAHPLEIGH, 1954).

Mais tarde, em 1972, em uma influente revisão, Sharon e Lis definiram lectinas como “proteínas específicas a carboidratos capazes de aglutinar células e precipitar glicoconjugados” (SHARON; LIS, 1972). Pouco depois, em 1980, Goldstein e colaboradores aperfeiçoaram a definição proposta por Sharon e Lis e postularam que lectinas seriam “proteínas/glicoproteínas de origem não imune ligantes de carboidratos, capazes de aglutinar células e precipitar glicoconjugados” (GOLDSTEIN *et al.*, 1980).

Pela primeira vez, a definição de lectinas excluía imunoglobulinas e anticorpos, que reconhecidamente ligam-se a carboidratos. Contudo, as duas definições citadas acima não contemplavam proteínas monovalentes como a heveína, capazes de ligar-se a carboidratos, mas não hábeis a aglutinar células. Além disso, as duas definições deixavam à margem da interpretação a inclusão de enzimas que reconhecem e se ligam, mesmo que de forma catalítica, a carboidratos.

Em 1988, Barondes incluiu proteínas como a heveína e excluiu enzimas da definição de lectinas. A nova definição tratava lectinas como “qualquer proteína, que não seja uma enzima ou um anticorpo, capaz de ligar-se a carboidratos” (BARONDES, 1988). Entretanto, esta definição não foi bem aceita pela comunidade científica que a considerava ampla demais.

Eis que em 1995, Peumans e Van Damme propuseram a definição mais aceita até hoje. Os autores supracitados postularam que lectinas seriam “proteínas ou glicoproteínas de origem não imune com pelo menos um sítio não catalítico de ligação que reconhecem e interagem de forma reversível com carboidratos específicos” (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

A definição proposta por Peumans e Van Damme é muito aceita por estudiosos de lectinas vegetais. Já para as lectinas animais, esta definição peca no conceito de “origem não imune”.

As lectinas são parte muito importante do sistema imune de animais, atuando de duas maneiras: diretamente como primeira linha de defesa, ou, indiretamente por promoverem a proteção apropriada via gerenciamento do tráfego de leucócitos ou via transmissão de sinais entre células especializadas (KILPATRICK, 2000).

É claro que a maioria das lectinas animais, do ponto de vista estrutural, são claramente distintas de anticorpos, mas existem imunoglobulinas exclusivamente específicas a carboidratos (GALILU, 1993). Para Kilpatrick as imunoglobulinas específicas a carboidratos podem ser estudadas como lectinas com domínio tipo imunoglobulina e classificadas em uma família a parte, a família de lectinas do tipo-I (KILPATRICK, 2000). O mesmo autor sugere que lectinas sejam “proteínas/glicoproteínas que reconhecem carboidratos de maneira específica, mas não participam do metabolismo dos mesmos e não pertencem a nenhuma das principais classes de imunoglobulinas” (KILPATRICK, 2000) e esta parece ser a definição mais adequada para tratar lectinas animais.

1.1.3 Lectinas animais

Em 1860, Weir Mitchell descobriu uma hemaglutinina no veneno da serpente *Crotalus durissus* (MITCHELL, 1860). Embora hemaglutininas como estas tenham sido prioritariamente estudadas em plantas, atualmente moléculas que se ligam a carboidratos têm sido igualmente enfatizadas em animais (KILPATRICK, 2000; VASTA; AHMED, 2008). Estes estudos revelam que as lectinas servem como mediadores de eventos que envolvem o reconhecimento de carboidratos em diferentes tecidos: embrionários e adultos, animais e vegetais.

Lectinas animais têm sido encontradas no citoplasma, no núcleo e associadas a membranas das mais diversas organelas e nos mais variados tipos celulares. Na superfície celular as lectinas podem atuar como receptores, agindo na seletividade, adesão e migração celular (LEHMANN *et al.*, 1990; ROSEN *et al.*, 1989), bem como no reconhecimento de glicoproteínas circulantes (ASHWELL *et al.*, 1982). As lectinas animais parecem também atuar como receptores para as glicoproteínas da matriz extracelular: elastina e laminina (COOPER *et al.*, 1994; HINEK *et al.*, 1988), como receptores para glicosaminoglicanos que medeiam a ligação de proteoglicanos a carboidratos de outras glicoproteínas (DOEGE *et al.*,

1987), e, como primeiro passo na adesão de células do sistema imune (ROSEN *et al.*, 1993). Proteínas com afinidade por açúcares também funcionam como primeira linha de defesa contra infestações patogênicas (CASH *et al.*, 2006).

1.1.3.1 Famílias de lectinas animais

Embora o número de lectinas animais continue a crescer, estas lectinas podem ser classificadas em famílias distintas com base em suas características físico químicas, função e especialmente em sua identidade de sequência (KILLPATRICK, 2000). A classificação recente indica que a maioria das lectinas animais pode ser agrupada em um dos cinco principais grupos: lectinas dependentes de Ca^{2+} (tipo C), galectinas (tipo S), receptores de manose-6-fosfato (tipo P), Siglecs e outras lectinas do tipo imunoglobulina ligantes de ácido siálico (tipo I) e lectinas animais relacionadas as lectinas de leguminosas vegetais (tipo L) (DRICKAMER, 2006).

Além destes grupos, as lectinas animais podem ser divididas em outras 14 famílias, totalizando, até o momento, 19 famílias que estão apresentadas a seguir.

Anexinas

Anexinas constituem uma família de 13 proteínas estruturalmente relacionadas, dependentes de Ca^{2+} e ligantes de fosfolípeos. Elas consistem de quatro ou oito domínios repetidos com cerca de 70 resíduos de aminoácidos cada e com um domínio N-terminal que é altamente variável em sequência e comprimento, o qual distingue os diferentes membros da família. Acredita-se que o domínio N-terminal confere a diversidade funcional, uma vez que a atividade de ligação a fosfolípeo mediada por Ca^{2+} provavelmente reside em cada unidade de repetição (ISHITSUKA *et al.*, 1998).

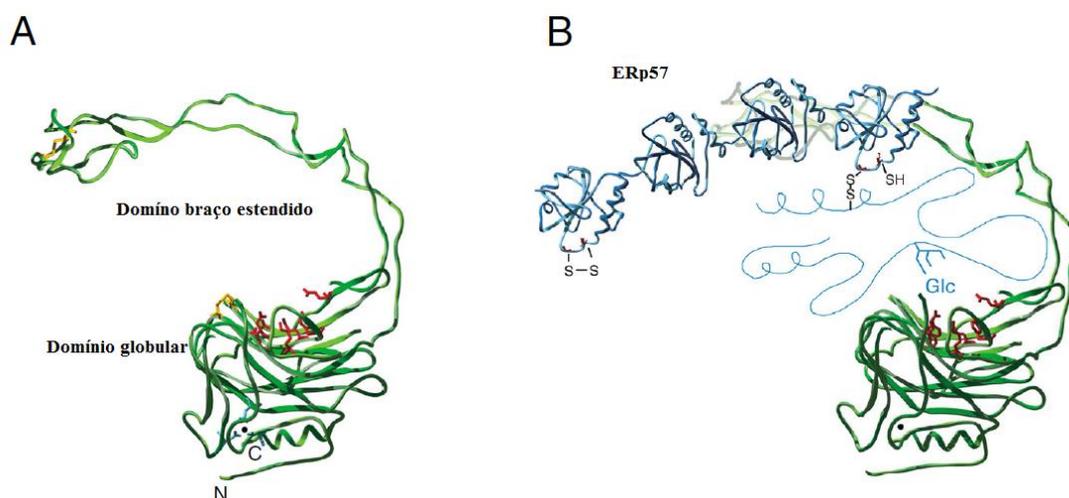
Dentre as funções propostas para as anexinas estão: inibição da fosfolipase A2 e coagulação do sangue, regulação do tráfego de membrana e exocitose, ligação a proteínas do citoesqueleto, atividade de canal de membrana e sinalização intracelular como um substrato de quinase (RAYNAL *et al.*, 1994; SWAIRIO *et al.*, 1994). No entanto, o conhecimento completo de suas funções fisiológicas não foi totalmente elucidado.

Calnexina e calreticulina

Calnexina (Cnx) e calreticulina (Crt) são proteínas relacionadas que compreendem um sistema de chaperonas moleculares do retículo endoplasmático (RE) e que asseguram a dobragem adequada de glicoproteínas recém-sintetizadas. A especificidade por glicoproteínas é conferida por um domínio lectínico que reconhece o oligossacarídeo precursor $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, característico de glicoproteínas recém-formadas. Além disso, Cnx e Crt possuem sítios de ligação para ATP, Ca^{2+} e ERp57, uma enzima que catalisa a formação de pontes de sulfeto (WILLIAMS, 2006).

A estrutura cristalográfica de Cnx (FIGURA 1) revela dois domínios: um β -sanduíche globular que se assemelha a estrutura característica de lectinas de leguminosas; e um braço estendido de 140 Å que consiste de duas fitas β formando uma conformação em grampo (SCHRAG *et al.*, 2001). Crt, por outro lado, teve somente o domínio braço estendido resolvido por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). O domínio braço de Crt é similar ao de Cnx, mas menos alongado (ELLGAARD *et al.*, 2001). Acredita-se ainda que Crt possua um domínio globular similar a Cnx, uma vez que as duas proteínas compartilham 39% de identidade de sequência e possuem as mesmas propriedades de ligação a oligossacarídeos (VASSILAKOS *et al.*, 1998; WARE *et al.*, 1995).

Figura 1 - Estrutura cristalina da calnexina e o modelo hipotético para a interação de uma glicoproteína com Cnx.



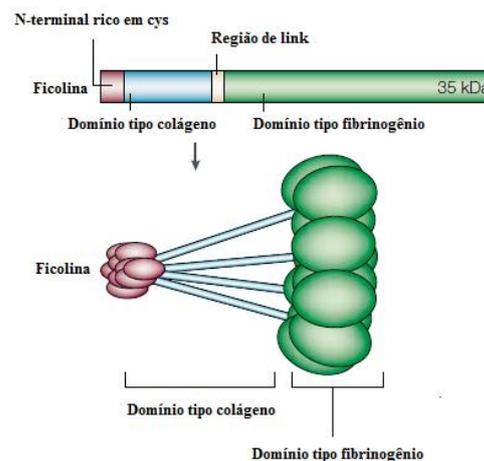
Adaptado de Williams, 2006. **A.** O domínio globular contém o sítio de ligação a oligossacarídeos, estando os aminoácidos responsáveis pela ligação a glicose destacados em vermelho. **B.** Calnexina (verde) está associada com ERp57 (azul).

Ficolinas

Ficolinas representam um grupo de proteínas solúveis constituintes do sistema imune inato. A classificação de ficolinas como lectinas é controversa porque o domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC) das ficolinas é específico para grupos acetil, podendo este mesmo DRC ligar-se tanto a carboidratos (ex: ManNAc, GlcNAc e GalNAc) quanto a moléculas não glicídicas, tais como N-acetilglicina, N-acetilcisteína e acetilcolina (DRICKAMER, 2006).

A cadeia polipeptídica de uma ficolina (FIGURA 2) consiste de um pequeno domínio N-terminal, um domínio do tipo colágeno, um pequeno *link* e um domínio do tipo fibrinogênio (FUJITA, 2002).

Figura 2 - Domínios e estrutura oligomérica das ficolinas



Adaptado de Fujita, 2002. Cada cadeia polipeptídica é composta por um domínio do tipo colágeno, um domínio do tipo fibrinogênio, um pequeno *link* e uma região N-terminal.

As ficolinas humanas L e H são proteínas do soro que representam a primeira linha de defesa do sistema imune. As ficolinas L e H ligam-se a superfície de patógenos, via interação com carboidratos e desencadeiam a ativação de proteases serínicas associadas a proteínas ligantes de manose (MASPs, *MBP-mannose binding proteins-associated serine proteases*), levando a eliminação do patógeno. A ficolina L atua também como opsonina, promovendo a fagocitose de patógenos por neutrófilos (ENDO *et al.*, 2011).

Ficolinas estão presentes em mamíferos e no anfíbio *Xenopus laevis*. Uma proteína que contém um domínio do tipo fibrinogênio, em conjunto com uma região de colágeno foi predita no genoma da ave *Gallus gallus*, mas não há relatos de ficolinas em peixes. Ficolinas também estão presentes nos fluidos corporais da ascídia *Halocynthia roretzi*,

um organismo invertebrado cordado. As ficolinas da ascídia diferem ligeiramente na organização das ficolinas dos animais superiores, tendo uma região mais curta de colágeno e uma região mais longa de *link* entre os domínios do tipo colágeno e fibrinogênio (DRICKAMER, 2006).

Com algumas exceções, as ficolinas presentes em espécies não humanas não são verdadeiras ortólogas das ficolinas humanas, embora possam desempenhar funções equivalentes. Ficolinas não estão presentes nos invertebrados modelos *C. elegans* e *Drosophila*, mas duas proteínas do caranguejo ferradura *Tachypleus tridentatus* tem domínios de ligação do tipo fibrinogênio que apresentam uma alta similaridade aos domínios homólogos das ficolinas de mamíferos, apesar de que nas lectinas do caranguejo não haja domínios do tipo colágeno (GOKUDAN *et al.*, 1999). Estas "tachylectins", TL-5A e TL-5B, são específicas para grupos *N*-acetil presentes em ambos, carboidratos e não carboidratos, e são uma parte fundamental do sistema imunológico inato no caranguejo ferradura (GOKUDAN *et al.*, 1999).

Kaliklektinas

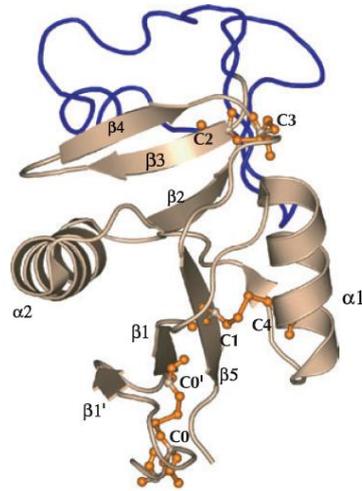
São lectinas de teleosteos encontradas no muco secretado pelos peixes *Platycephalus indicus* e *Lophimus setigerus* (TSUTSUI *et al.*, 2012). As *kaliklektinas* são estruturalmente semelhantes às cadeias pesadas das calicreínas plasmáticas humanas e aos fatores de coagulação XI de mamíferos (TSUTSUI *et al.*, 2012). Calicreínas são proteases serínicas encontradas no plasma e tecido de mamíferos.

As *kaliklektinas* atualmente descritas são ligantes de manose, possuindo quatro domínios repetidos por monômero, dependentes de Ca^{2+} e apresentam-se como dímeros ligados por pontes dissulfeto (TSUTSUI *et al.*, 2012). Não obstante, não se assemelham estruturalmente as lectinas do tipo C.

Lectinas do tipo C e proteínas contendo o CTLD.

A superfamília de proteínas contendo um domínio lectínico do tipo C (CTLD - *C-type lectin like*) compreende um vasto grupo de proteínas extracelulares de metazoários com funções diversificadas. A estrutura do CTLD (FIGURA 3) consiste de um *loop* duplo estabilizado por duas pontes de sulfeto altamente conservadas localizadas na base do segundo *loop* (ZELENSKY; GREASY, 2005).

Figura 3 - Estrutura de um CTLD típico.



Adaptado de ZELENSKY; GREARY, 2005. Os *loops* responsáveis pela ligação a carboidratos estão destacados em azul. As pontes disulfeto apresentam-se como bastões laranja, incluindo as duas pontes invariáveis: C2 e C3.

O termo lectina do tipo C foi introduzido inicialmente para designar um grupo de lectinas dependentes de Ca^{2+} . Com o acúmulo de informações estruturais a respeito de tais lectinas ficou claro que a atividade relativa à ligação a carboidratos era mediada por uma compacta região da proteína, o DRC. A comparação entre os DRCs de diferentes lectinas do tipo C revelou resíduos conservados e motivos característicos do domínio (DRICKAMER, 1993). Estudos cristalográficos confirmaram que o DRC das lectinas tipo C tem uma estrutura globular compacta, diferente de todos os *folds* lectínicos até então conhecidos. Este domínio ficou conhecido como DRC tipo C ou domínio lectínico do tipo C (WEIS *et al.*, 1991). Com o crescimento do número de sequências protéicas determinadas ficou claro que nem todas as proteínas que contêm os resíduos chave e o padrão estrutural conservado de lectinas do tipo C são verdadeiramente capazes de ligar-se a Ca^{2+} ou mesmo a carboidratos. Para resolver esta contradição, o termo CTLD é usado para designar toda proteína que apresente o DRC do tipo C independente da habilidade de ligar-se a Ca^{2+} ou mesmo a carboidratos (ZELENSKY; GREARY, 2005).

CTLDs, com poucas exceções, são encontrados somente em metazoários. Genes codificadores de CTLDs tem sido detectados em todos os genomas sequenciados de metazoários. No genoma de *C.elegans*, por exemplo, CTLD é o 7º domínio mais abundante (CONSORTIUM, 1998).

Em invertebrados, ao contrário do que ocorre em vertebrados, as proteínas que contêm CTLDs só possuem um domínio por monômero e desempenham somente a função

atribuída ao CTLD, função esta que é de ordem imune, uma vez que tais proteínas assumem o mesmo papel das imunoglobulinas de vertebrados (VASTA *et al.*, 1999).

Lectinas o tipo C tem sido isoladas de diversos invertebrados marinhos, incluindo craca (MURAMOTO; KAMIYA, 1987), ouriço-do-mar (GIGA *et al.*, 1987), pepino-do-mar (HATAKEYMA *et al.*, 1994), estrela-do-mar (KAKIUCHI *et al.*, 2002), esponja (GUNDACKER *et al.*, 2002) e ascídia (SUZUKI *et al.* 1990). Geralmente, estas lectinas são específicas a galactose e GalNAc.

Em organismos não metazoários, os CTLDs encontrados podem ser divididos em dois grupos. O primeiro grupo inclui CTLDs identificados em bactérias parasitas e vírus, em ambos os casos a proteína contendo o CTLD estaria envolvida na interação com o hospedeiro. É sugerido que haja, entre este grupo e os CTLDs de metazoários, uma evolução convergente. O segundo grupo inclui duas proteínas de planta e uma proteína putativa codificada por uma janela aberta de leitura (ORF - *Open Read Frame*) encontrada no genoma da bactéria planctônica *Pirellula sp.* A função, bem como, a origem do último grupo não está clara (ZELENSKY; GREASY, 2005).

A maioria da lectinas do tipo C liga-se a manose/glicose ou a galactose e derivados. Lee e colaboradores sugerem que os grupos livres 3-OH e 4-OH dos anéis glicídicos são essenciais para a interação entre os receptores de asialoglicoproteínas (proteínas que contêm o CTLD) e seus ligantes (galactose e derivados). Os autores observaram também que estas duas hidroxilas são de igual importância para a ligação de MBP-A, uma lectina do tipo C ligante de manose que foi isolada do fígado de ratos (LEE *et al.*, 1991). Uma vez que o grupo 4-OH tem orientações diferentes para manose e galactose, o mecanismo para o reconhecimento é diferente (LEE *et al.*, 1991).

Os CTLDs possuem quatro átomos de Ca^{2+} , no entanto, somente o Ca^{2+} na posição 2 participa da interação com carboidratos. Os átomos 1, 3 e 4 parecem desempenhar papéis estruturais na manutenção da conformação do domínio (ZELENSKY; GREASY, 2005). Análises de sequência revelam que na posição do Ca^{2+} 2, relativa aos aminoácidos Glu¹⁹³, Asn²⁰⁵ e Asp²⁰⁶, os resíduos são altamente conservados nas lectinas do tipo C, independente de sua especificidade. Por outro lado, as posições 185 e 187 são Glu e Asn, respectivamente, nas lectinas do tipo C ligantes de manose, e Gln e Asp, respectivamente, nas lectinas ligantes de galactose (KOLATKAR; WEIS, 1996).

Mutantes da lectina MBP-A, uma lectina ligante de manose do tipo ¹⁸⁵EPN¹⁸⁷, foram produzidos a partir de variações nas posições 185 E → Q e 187 N → D e tiveram sua especificidade determinada. Como previsto, foi constatado que a MBP-A mutante ¹⁸⁵QPD¹⁸⁷

possuía especificidade para galactose de ordem três vezes maior que para manose (DRICKAMER, 1992). Quando, além das posições 185 e 187, a posição 189 também foi modificada (F→W), o mutante originado (¹⁸⁵QPD¹⁸⁹W) apresentou afinidade para galactose de maneira similar as lectinas QPD naturais (IOBST, DRICKAMER, 1994).

Embora a especificidade das lectinas do tipo C seja determinada por poucos aminoácidos conservados, dentro do CTLD, que possui em média 130 aminoácidos, existem somente 14 resíduos invariantes e 18 posições conservadas (DRICKAMER; TAYLOR, 1993). Assim, a superfamília de lectinas do tipo C é extremamente heterogênea a respeito de estrutura primária. Baseando-se nesta heterogeneidade e na diversidade funcional das lectinas do tipo C, Drickamer (2002) propôs a subdivisão destas lectinas em sete subfamílias. Por outro lado, Zelensky e Gready recentemente propuseram a inclusão de mais 10 subfamílias, totalizando 17 (TABELA 1).

Tabela 1 - Subdivisão das lectinas do tipo C

	Subfamília	Função
I	Lecticanas	Adesão celular; integração tecidual
II	Asialoglicoproteínas	Reciclagem de glicoproteínas; reprodução.
III	Colectinas	Sistema imune inato; reconhecimento de patógenos
IV	Selectinas	Adesão celular
V	Receptores de células NK	Inibição e ativação de células NK
VI	Receptores multi CTLD	Reciclagem endocítica
VII	Grupo Reg	Regeneração das ilhotas pancreáticas
VIII	Condrolectinas e lailinas	Reciclagem endocítica; adesão celular
IX	Tetranectinas	Ativação do plaminogênio
X	Poliscistina	Desconhecida
XI	Atractina	Em ratos, é associada a mutações
XII	Eosinófilas	Agentes citotóxicos contra parasitas
XIII	DGCR2	Desconhecida
XIV	Trombomodulina	Envolvida na inflamação e na adesão celular
XV	BimLec	Desconhecida
XVI	SEEC	Desconhecida
XVII	CBCP/Frem1/QBRICK	Adesão celular

Adaptado de ZELENSKY e GREARY (2005).

Dentre as funções propostas para as lectinas do tipo C, a adesão celular mediada pelas selectinas e a participação das colectinas no sistema imune inato merece um enfoque especial.

As selectinas são proteínas transmembranares do tipo I, cujo domínio extracelular consiste em um NH₂-terminal contendo um CTLD (DRICKAMER; TAYLOR, 1993).

As selectinas-L estão presentes em células T e direcionam estas células para os nódulos linfáticos periféricos, enquanto que as selectinas-E e -P permitem a interação ente o endotélio e os neutrófilos e monócitos, respectivamente. Além disso, a selectina-P media a ligação entre plaquetas e o endotélio (LASKY, 1992).

A variedade de ligantes endógenos que podem ser reconhecidos pelas selectinas continua a ser totalmente estabelecida, mas é sabido que todas as estruturas relacionadas com o antígeno de Lewis X sializado são reconhecidas por selectinas (LASKY, 1992). As estruturas relacionadas ao antígeno de Lewis X, nas quais o ácido siálico é substituído por um grupo sulfato são também ligantes para a selectina-E (YUEN *et al* 1992). Estes resultados sugerem que uma parte do sítio de ligação das selectinas deve acomodar um ligante com carga negativa (DRICKAMER; TAYLOR, 1993).

As colectinas são proteínas solúveis que se organizam em oligômeros (9-27 subunidades). O COOH-terminal das colectinas possui o DRC, enquanto que o NH₂-terminal contém um domínio do tipo colágeno. O grupo das colectinas inclui as MBLs e a congulinina bovina, além das proteínas surfactantes pulmonares (DRICKAMER; TAYLOR, 1993). As colectinas reconhecem carboidratos da superfície celular de patógenos e desempenham um papel importante na resposta imune inata (DRICKAMER; TAYLOR, 1993).

A proteína humana ligante de manose (MBP - *Mannose Binding Protein*) é uma colectina secreta no fígado. O monômero da MBP possui 32 kDa e se associa em trímeros, esses trímeros são as unidades para a formação de estruturas multiméricas de até nove unidades (KAWASAKI *et al.*, 1983). A MBP pode atuar como opsonina, bem como ativar, através de sua ligação a um patógeno, os componentes complementos séricos do sistema imune, que consistem de um conjunto de proteínas capazes de atacar o patógeno extracelular (TABONA *et al.*, 1995).

Baixos níveis de MBP no soro podem estar associados com um nível desregulado de fagocitose por leucócitos e susceptibilidade a infecções (SUPER *et al.*, 1989).

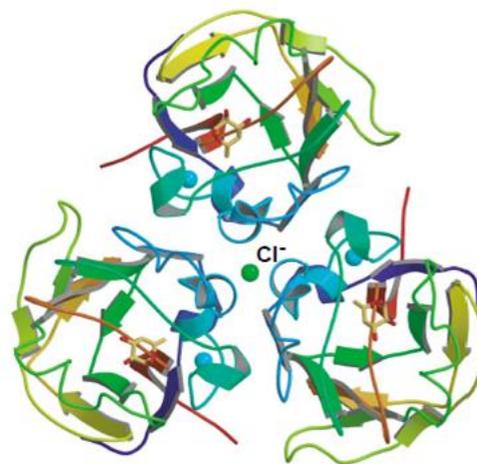
Lectinas do tipo F

As lectinas do tipo F são lectinas ligantes de fucose encontradas em vertebrados ectotérmicos, protocordados e invertebrados. A família de lectinas do tipo F é a mais recente

família de lectinas a ser identificada. As lectinas F possuem um único sítio de ligação a fucose e um motivo de ligação a Ca^{2+} (ODOM, 2004).

A resolução da estrutura tridimensional da lectina da enguia europeia, AAA (*Anguila anguila agglutinin*) revelou um novo tipo de *fold* de lectinas, o *fold* tipo F (FIGURA 4). O *fold* do tipo F consiste de um sanduíche β (*jelly roll*) composto por duas folhas β de três e cinco fitas antiparalelas. A estrutura nativa de AAA, de maneira similar as colectinas, é homotrimérica (BIANCHET; ODOM, 2002).

Figura 4 - Estrutura de AAA complexada com α fucose.



Adaptado de Bianchet; Odom, 2002. A figura é colorida no N ao C-terminal em PROGRESSÃO de azul à vermelha.

Lectinas do tipo F-box

Proteínas F-box estão entre os principais componentes do sistema de regulação das ubiquitinas. As ubiquitinas estão relacionadas com a regulação, localização e atividade das proteínas citoplasmáticas mal formadas. A proteína Fbs 1 (*F-box system 1 protein*) reconhece ubiquitina por um domínio de reconhecimento elipsoide formado por um sanduíche de cinco fitas β antiparalelas. O sítio de ligação a carboidratos, específico a dissacarídeos de GlcNAc, está localizado no lado oposto do domínio de reconhecimento a ubiquitina e é formado por dois *loops* que conectam as fita. A especificidade de Fbs1 a dissacarídeos de GlcNAc permite o reconhecimento de glicoproteínas mal enoveladas, uma vez que todas as glicoproteínas *N*-ligadas apresentam o core comum GlcNAc_2 (DRICKAMER, 2006).

Lectinas do tipo H

Lectinas do tipo H incluem a lectina isolada de *Helix promatia* (HPA), a lectina do octocoral *Sinularia lochmodes* (SLL-2) e as discoidinas isoladas de *Dictyostelium discoideum*. Essas lectinas compartilham cerca de 30% de identidade, além da afinidade por galactose.

HPA é produzida nas glândulas albumínicas e nos ovos do caracol *H.promatia*. HPA é uma glicoproteína que possui sua estrutura nativa formada por seis subunidades idênticas organizadas em um trímero de dímeros, cujos últimos são ligados por pontes dissulfeto (HAMMARSTROM *et al.*, 1997).

SLL-2 é uma proteína de 122 kDa formada por 8 subunidades idênticas ligadas por interações fracas. SLL-2 parece estar envolvida no reconhecimento e manutenção do simbionte *Symbiodinium* sp. presente em *S.lochmodes* (JIMBO *et al.*, 2000).

Lectinas do tipo I (Siglecs)

As lectinas tipo imugloblinas ligantes de ácido siálico (Siglecs - *Sialic acid-binding Ig-type lectins*) pertencem à superfamília das imunoglobulinas e formam a principal divisão das lectinas do tipo I. Elas são proteínas de membrana do tipo I caracterizadas por um domínio do tipo imunoglobulina no amino terminal que contém o sítio de ligação a ácido siálico (VASTA, AHMED, 2008).

As Siglecs podem ser divididas em duas subfamílias: o grupo evolutivamente conservado, mas distantemente relacionado, das sialoadesinas (proteínas relacionadas à Sn, CD22 e MAG); e o grupo evolutivamente relacionado à CD33, que compartilha de 50% a 99% de identidade em sua estrutura primária (VASTA; AHMED, 2008).

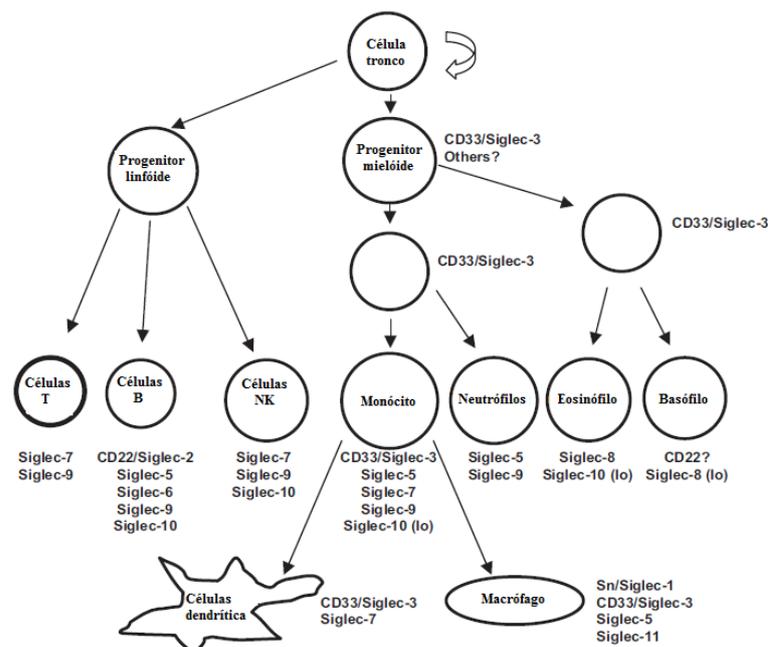
Com poucas exceções, as Siglecs são expressas em células do sistema hematopoiético. O padrão de expressão das Siglecs varia bastante (FIGURA 5). Enquanto algumas são restritamente expressas, outras são amplamente produzidas. Por exemplo, a Siglec Sn é principalmente expressa por macrófagos, CD22 por células B, Siglec-8 por eosinófilos e a Siglec-7 por células NK (*Natural Killer*), por outro lado, a Siglec-9 é expressa por uma gama de células, incluindo neutrófilos, monócitos, células dendríticas e células NK (VASTA; AHMED, 2008).

A função das Siglecs varia consideravelmente, uma vez que sua especificidade por ácidos siálicos é significativamente diferente. A maioria das Siglecs relacionadas à CD33

e CD22 são receptores inibidores de sinalização, contendo um ou mais imunoreceptores em suas porções citoplasmática, enquanto que Sn parece estar envolvida na interação célula-célula (VASTA; AHMED, 2008).

As Siglecs parecem também estar envolvidas na infecção de mamíferos por alguns patógenos. A capacidade de produzir ácido siálico apareceu de maneira tardia ao longo da evolução, começando com os deuterostomos, portanto os ácidos siálicos estão normalmente ausentes na maioria dos patógenos, incluindo bactérias e protozoários (ANGATA *et al.*, 2002). Alguns destes patógenos têm, entretanto, adquirido a habilidade para apresentar ácido siálico em suas superfícies como uma forma de disfarce, de maneira a driblar o sistema imune inato e prevenir seu reconhecimento como organismos forasteiros (VIMR *et al.*, 2004).

Figura 5 - Expressão célula-específica de Siglecs no sistema hematopoiético e células imunes de humanos.



Adaptado de VARKI e; ANGATA, 2006. O padrão de expressão de Siglecs nas células precursoras da membrana óssea não está elucidado, exceto no caso da CD33/Siglec-3.

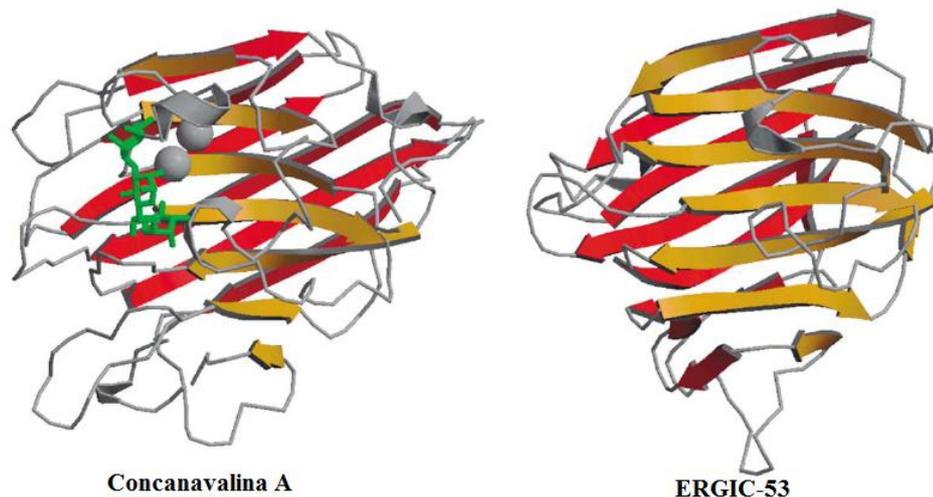
Além disso, muitos vírus possuem abundância de ácidos siálicos em seus capsídeos, uma vez que estes são fabricados em células hospedeiras. Sendo assim, é possível que os patógenos sializados usem o ácido siálico não só como proteção, mas também como um mediador que facilite sua entrada na célula, explorando a capacidade de ligação a ácido

siálico das siglecs. É sabido, por exemplo, que o vírus da gripe suína, infesta células mediante interação com a siglec Sn (VANDERHEIJDEN *et al.*, 2003).

Lectinas do tipo L.

Estas lectinas são caracterizadas por possuírem um DRC luminal muito similar ao DRC das lectinas de leguminosas (FIGURA 6), mas as lectinas animais tipo-L são proteínas de membrana envolvidas no sistema de secreção do RE, enquanto que as lectinas de leguminosas são proteínas solúveis (ITIN *et al.*, 1996).

Figura 6 - Arranjo terciário característico de lectinas de leguminosas Lectinas tipo L.



Adaptado de Lloris, 2002. Concanavalina A complexada com trimanosídeo; ERGIC-53 nativa, uma lectina do tipo L.

As células animais expressam quatro tipos de lectinas tipo-L: ERGIC-53 (*ER Golgi intermediate compartment protein* of 53 kDa - Proteína de 53 kDa do compartimento intermediário entre o RE e o complexo de Golgi), VIP36 (*vesicular integral membrane protein* of 36 kDa – proteína de 36 kDa integrante de membrana vesicular), ERGL (*ERGIC53 like protein* – proteína tipo ERGIC53) e VIPL (*VIP36 like protein* – proteína tipo VIP36). Estas lectinas compartilham um domínio lectínico luminal do tipo L, mas diferem no que diz respeito à presença de um domínio em espiral espiralada (ERGIC-53 e ERGL) e um sítio de N-glicosilação (VIP36 e VIPL) (VASTA, AHMED, 2008).

ERGIC-53 é a classe de lectinas tipo L mais bem estudada, enquanto os dados sobre VIP36, ERGLS e VIPL são bastante escassos. Mesmo assim, a informação atual sobre a

função das lectinas tipo L, sugere que todos os quatro grupos estão envolvidos no tráfego e secreção de glicoproteínas (VASTA, AHMED, 2008).

Lectinas do tipo M

As lectinas do tipo-M estão relacionadas e apresentam alto grau de similaridade com as α -manosidases, mas lhes faltam os resíduos chave para a catálise, bem como uma ponte de sulfeto que parece ser essencial para a atividade enzimática. Como resultado, as M-lectinas ligam-se aos glicanos de manose de glicoproteínas do lúmen do RE, mas não têm função catalítica (DRICKAMER, 2006).

Como outras famílias de lectina intracelulares, a família das lectinas de tipo M é de tamanho modesto. Mamíferos têm três classes de M-lectinas: EDEM1, EDEM2 e EDEM3 (*ER-associated degradation enhancing α -mannosidase-like proteins* - proteínas tipo α -manosidases associadas ao RE que aumentam a degradação). Estas proteínas são, em geral, conservadas em metazoários, embora EDEM1 esteja ausente em *Drosophila*, por exemplo. Leveduras tem uma lectina de tipo M única, Mnl1, que está relacionada com a EDEM1 (VASTA; AHMED, 2008; DRICKAMER, 2006).

Lectinas do tipo P

O DRC tipo P foi originalmente identificado em dois tipos de proteínas transmembranares I, os receptores de manose 6-fosfato dependentes de cations e independente de cations (CD-MPR e CI-MPR, respectivamente). A designação "tipo-P" refere-se à especificidade do DRCs nestas proteínas a manose-6-fosfato (M6P). O CD-MPR e CI-MPR são conservados em vertebrados e também estão presentes em organismos cordados evolutivamente mais antigos, como ascídias (DRICKAMER, 2006).

O CD-MPR bovino é composto por um peptídeo sinal de 28 resíduos no N-terminal, uma região extracitoplasmática de 159 resíduos, uma região transmembranar de 25 resíduos e um domínio citoplasmático de 67 resíduos. A região extracitoplasmática do CD-MPR bovino contém seis resíduos de cisteína que estão engajados na formação de três pontes dissulfeto intramoleculares que são essenciais para o *foldings* correto do receptor (WENDLAND *et al.*, 1991).

Por outro lado, os CI-MPR contém uma região N-terminal de 44 resíduos, uma longa região extracitoplasmática de 2.269 resíduos, uma região transmembranar de 23

resíduos e um C-terminal citoplasmático de 163 resíduos. A região extracitoplasmática é composta por 15 domínios similares de cerca 150 resíduos cada, que são similares (15-38 %) ao domínio extracelular do CD-MPR (VASTA; AHMED, 2008).

Os MPRs desempenham um papel essencial na formação dos lisossomos funcionais, orientando hidrolases ácidas solúveis recém sintetizadas contendo uma etiqueta de manose-6-fosfato para os lisossomas (VASTA; AHMED, 2008).

Lectinas do tipo Quitinase

As lectinas do tipo quitinase ou Qui-lectinas são proteínas de mamíferos que pertencem à família 18 das glicosídeo hidrolases. Trata-se de uma família de proteínas solúveis, intracelulares ou secretadas, que têm uma estrutura semelhante ao barril triose-fosfato isomerase, por vezes, com a inserção de um pequeno domínio α - β (DRICKAMER, 2006).

Proteínas semelhantes à quitinases são estruturalmente homólogas as quitinases verdadeiras, mas carecem dos resíduos catalíticos. Mamíferos não produzem quitina, mas possuem um pequeno número de quitinases, sendo esta classe de enzimas representadas pelas quitinases ácidas (AMCase) e pelas quitotriosidases, tais proteínas parecem estar envolvidas no sistema imune inato (DRICKAMER, 2006).

Em mamíferos, mas não em outros vertebrados, existem ainda proteínas muito similares às quitinases supracitadas. A principal delas, YKL-40, mantém o sítio hidrofóbico de ligação e conseqüentemente a alta afinidade a quitoligossacarídeos. A YKL-40 é expressa, em humanos, por uma variedade de células, tais como células da musculatura lisa, condrócitos, neutrófilos e macrófagos (DRICKAMER, 2006).

Lectinas do tipo R

Lectinas do tipo R são aquelas que se assemelham as proteínas tóxicas de vegetais, como a ricina e a abrina. Em invertebrados, a lectina hemolítica do pepino-do-mar *Cucumaria echinata* (CEL-III) merece especial conotação.

CEL-III é uma lectina dependente de Ca^{2+} capaz de lisar células mediante sua oligomerização e posterior formação de poros permeáveis a íons nas membranas das células alvo. A oligomerização de CEL-III na membrana é devida a modificações conformacionais,

disparadas pela ligação da lectina ao açúcar da superfície celular (HATAKEYMA *et al.*, 1996).

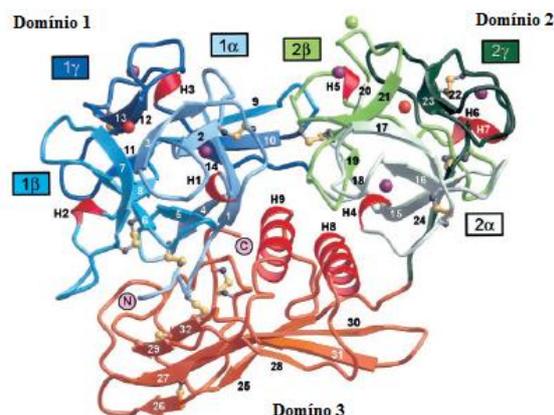
CEL-III reconhece GalNAc de maneira mais acentuada que qualquer outro carboidrato simples, seguido por lactose e lactulose. CEL-III é capaz de hemolisar eritrócitos humanos de maneira mais efetiva, enquanto que não causa danos a hemácias de coelho e cavalo. A atividade hemolítica, não obstante, pode ser inibida pelos carboidratos supracitados, indicando que a habilidade de hemolisar células é dependente do reconhecimento celular específico (HATAKEYMA *et al.*, 1995).

CEL-III também exibe forte citotoxicidade sobre algumas linhagens malignas, especialmente sobre MDCK, contudo não afeta outras linhagens como CHO (*Chinese hamster ovary*), sugerindo mais uma vez que a atividade biológica de CEL-III é mediada pelo reconhecimento celular específico (ODA *et al.*, 1997).

A estrutura primária de CEL-III consiste de 432 aminoácidos dispostos em três domínios: dois domínios (1 e 2) semelhantes a cadeia B da ricina, sendo estes domínios responsáveis pela ligação a carboidratos; e um terceiro domínio (3) bastante hidrofóbico responsável pela modificação conformacional que leva a oligomerização (NAKANO *et al.*, 1999).

Análises por cristalografia de raios X revelaram que os domínios semelhantes à cadeia B da ricina adotam um *fold* do tipo β trevo (FIGURA 7) e que cada um destes dois domínios possui três subdomínios (α , β e γ) que adotam um falso trímero. Cada subdomínio, exceto 1β , contém um íon Ca^{2+} e três íons Mg^{2+} . O domínio hidrofóbico, C-terminal, apresenta um novo *fold* com folhas β estendidas com duas α hélices orientadas quase que perpendicularmente as folhas β (UCHIDA *et al.*, 2004).

Figura 7 - Estrutura tridimensional de CEL-III.



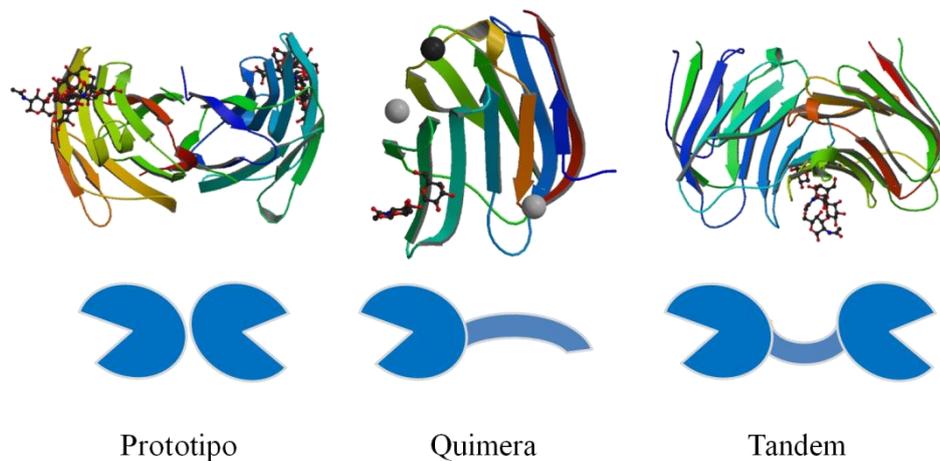
Adaptado de UCHIDA *et al.*, 2004. Domínios 1-3 estão coloridos em azul, verde e laranja, respectivamente.

Lectinas tipo S (Galectinas)

Galectinas são membros de uma família de lectinas animais ligantes de β galactosídeos e que evolutivamente conservam elementos estruturais e resíduos chave no DRC (BARONDES *et al.*, 1994). 15 membros da família das galectinas têm sido identificados e classificados em três grupos (FIGURA 8): prototipo (galectina-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -15); quimera (galectina-3); e tipo tandem (galectina-4, -6, -8, -9 e -12) (HIRABAYASHI *et al.*, 2002).

Protogalectinas consistem de apenas um DRC com cerca de 130 resíduos (Mr 14 kDa), podendo usualmente formar homodímeros e apresentar atividade hemaglutinante. A quimerogalectina possui, além do DRC, um domínio amino terminal do tipo colágeno, portanto não pode causar hemaglutinação. As tandemgalectinas possuem dois DRCs homólogos na mesma cadeia polipeptídica (KILPATRICK, 2002).

Figura 8 - Classificação estrutural de galectinas.

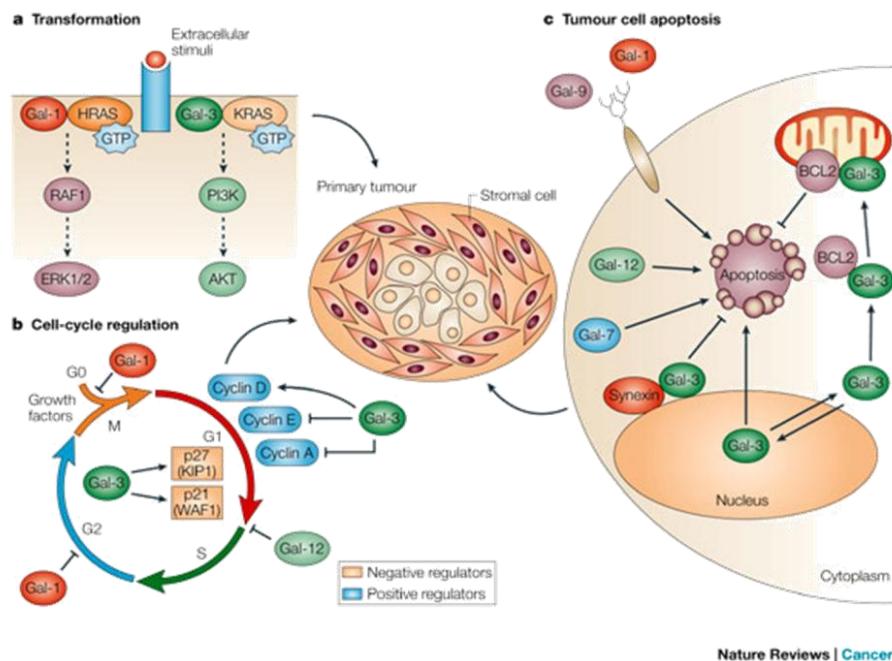


Adaptado de Hirabayashi *et al.*, 2002. Representação esquemática de prototipo (Galectina 1 complexada com um oligossacarídeo biantenário, 1SLC); quimera (Galectina 3 complexada com N-acetilactosamina, 1KJL) e tandem (Galectina 9 complexada com antígeno T, 2D6P).

A função das galectinas é diversa e varia de acordo com a estrutura e localização da mesma. Galectinas podem desempenhar importantes papéis durante diferentes etapas de processos tumorais (FIGURA 9). A galectina-1 e a galectina-3 podem mediar a transformação neoplástica pela interação com oncogenes, tais como Ras. As galectinas podem também controlar a progressão tumoral por meio da modulação do ciclo celular. Em particular, a galectin-3 regula os níveis de reguladores do ciclo celular, incluindo as ciclinas (A, E e D) e os inibidores de ciclo celular: p21 e p27. As galectinas podem ainda regular a apoptose.

Galectinas-1 e -9 induzem a apoptose de células tumorais quando adicionadas exogenamente à célula, enquanto que as galectinas-7 e -12 promovem a apoptose através de mecanismos intracelulares. Endogenamente, a galectina-3 tem atividade anti apoptótica e desloca-se para a membrana perinuclear e mitocôndria quando a célula tem estímulos apoptóticos (FU-TONG; RABINOVICH, 2005).

Figura 9 - Galectinas desempenham importantes papéis durante diferentes estágios do ciclo celular.



Adaptado de Fu-Tong; Rabionovich, 2005.

A galectina-3 é uma proteína de 31 kDa que apresenta em sua estrutura primária 250 resíduos de aminoácidos distribuídos em três domínios: um domínio amino terminal; um domínio intermediário do tipo colágeno, rico em glicina, tirosina e prolina; e um domínio carboxi terminal. O domínio amino terminal consiste de 12 resíduos contendo sítios para fosforilação que regulam a atividade da proteína. O domínio do tipo colágeno contém dois sítios de reconhecimento a metaloproteinases. No carboxi terminal reside o DRC de 140 resíduos que define a família de galectinas (BARONDES *et al.*, 1994; HERRMAN *et al.*, 1993).

Predominantemente, a galectina-3 é encontrada no citoplasma, contudo, ela pode adentrar o núcleo por duas vias: via passiva (difusão); e por transporte ativo (NAKAHARA *et*

al., 2004). A galectina-3 pode também ser secretada por uma via não clássica, uma vez que não se encontram sequências sinais consenso para secreção (HUGHES *et al.*, 1999).

As galectinas-1 de diversas fontes compartilham cerca de 80 % de identidade de sequência, formam dímeros e não possuem glicanos, ou mesmo domínios transmembranares em sua constituição. Grupos sulfidrilas não são essenciais para a ligação a carboidratos, mas inativação oxidativa está associada a mudanças conformacionais ocorridas devido formação de pontes dissulfeto intramoleculares (KILPATRICK, 2002).

A galectina-1 é capaz de induzir a apoptose de diversas células e parece estar envolvida na seleção do timo (PERILLO *et al.*, 1995). Além disso, é sugerido que a galectina-1 desempenha um papel no *splicing* do pré -RNA mensageiro (VYAKARMAN *et al.*, 1997).

Lectinas do tipo X

Lectinas do tipo X são proteínas dependentes de Ca^{2+} , mas que não apresentam um DRC do tipo C.

A primeira lectina do tipo X, XL35, foi identificada nos oócitos e embriões do sapo *Xenopus laevis*. XL35 é uma lectina ligante de galactose/GalNAc de 45 kDa que forma oligômeros de até 500 kDa. A estrutura primária de XL35 possui 313 aminoácidos e três potenciais sítios para *N*-glicosilação, além de um peptídeo sinal no amino terminal (LEE *et al.*, 1997). A estrutura primária da XL35 não apresenta similaridade com as lectinas do tipo C, o que levou a criação de uma nova família de lectinas animais (LEE *et al.*, 2004).

Hipotéticas lectinas do tipo X foram identificadas no genoma de vários outros animais, tais como sapo, lampréia, truta e ascídia. Todas essas proteínas putativas além de compartilharem similaridade de estrutura primária, conservam um domínio do tipo fibrinogênio, o qual parece estar envolvido na ligação a carboidratos (LEE *et al.*, 2004).

Homólogos de XL35 foram encontrados também em mamíferos. As intelectinas, como são conhecidas, apresentam cerca de 60% de identidade com XL35 e são expressas no intestino delgado de ratos (VASTA; AHMED, 2008).

Lectinas ligantes de Ramnose

As lectinas ligantes de ramnose (RBL - *L-rhamnose binding lectin*) são uma família de lectinas animais que se ligam especificamente a L-ramnose ou D-galactose (KILPATRICK, 2002). As RBLs têm sido encontradas em peixes ósseos (HOSONO *et al.*,

1993), ouriços (OZEKI *et al.*, 1991), ostras (NAGANUMA *et al.*, 2006) e ascídias (GASPARINI *et al.*, 2008). As RBLs parecem ser um componente importante do sistema imune inato, atuando como PRPs (*Pattern recognition proteins* - Proteínas de reconhecimento de padrões), ou seja, proteínas responsáveis por reconhecer padrões bioquímicos não próprios: PAMPs (*Pathogen-associated molecular pattern* - Padrões moleculares associados à patógenos).

As RBLs são encontradas em diversos tecidos, incluindo brânquias, intestino e baço, mas são realmente conhecidas pela presença em ovos. RBLs são capazes de aglutinar bactérias Gram negativas e Gram positivas por ligarem a LPSs e ácido lipotéico, respectivamente (TATENO *et al.*, 2002).

Muitas RBLs são compostas por dois ou três domínios *tandem* com DRCs repetidos. Cada domínio consiste de aproximadamente 95 resíduos de aminoácidos e compartilham quatro pontes dissulfeto conservadas (SHIRAI *et al.*, 2009).

As RBLs podem ser divididas em cinco classes: I. Possuem três DRCs *tandem*; II. Possuem dois DRCs idênticos e um domínio não relacionado; III e IV possuem dois domínios repetidos que apresentam especificidades distintas; V. Possui apenas um DRC podendo formar homodímeros através de uma ponte dissulfeto (SHIRAI *et al.*, 2009).

Atualmente, somente uma RBL possui estrutura tridimensional resolvida. CSL3, lectina isolada dos ovos do salmão, teve sua estrutura determinada por cristalografia de raios-X (SHIRAI *et al.*, 2009). CSL3 apresenta-se como um homodímero que consiste de duas cadeias polipeptídicas conectadas por *links* inseridos entre os domínios, dois domínios por monômero e os *links* são constituídos pelos pentapeptídeos QQQET de cada lóbulo (FIGURA 10). O DRC N-terminal de uma cadeia polipeptídica está arranjado com o DRC C-terminal da segunda cadeia polipeptídica e vice-versa, assim, a estrutura geral da proteína organiza-se como um pseudo tetrâmero, revelando um arranjo único para lectinas (SHIRAI *et al.*, 2009).

Figura 10 – Estrutura tridimensional da lectina ligante de ramnose, CSL3, complexada com Melobiose.

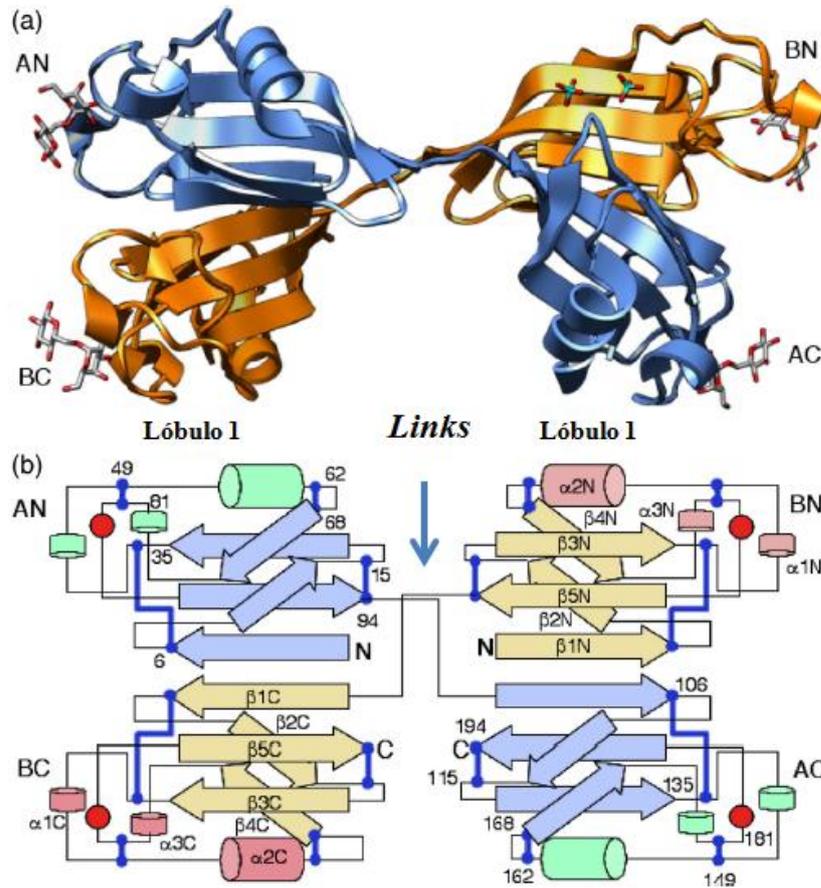


Figura 10. Adaptado de SHIRAI *et al.*, 2009. Estrutura dimérica de CSL3. (a) Subunidades A e B de CSL3, em azul e laranja, respectivamente. O N e C-terminal das unidades A e B são nomeados AN, AC, BN e BC, respectivamente. (b) As hélices e fitas estão representadas por cilindros e setas, respectivamente, estando em destaque somente na subunidade B. As pontes dissulfeto estão mostradas como linhas azuis, os círculos vermelhos indicam a posição dos DRCs.

Pentraxinas

As pentraxinas constituem uma pequena família de lectinas caracterizadas pela presença de uma estrutura anelar que pode ser encontrada em duas classes de proteínas humanas bem conhecidas: as proteínas reativas C (CRP) e os componentes séricos amilóides P (SAP) (STEELE; WHITEHEAD, 1994). As pentraxinas humanas possuem cinco subunidades idênticas arranjadas ciclicamente ao redor de um espaço de 2 nm de diâmetro e a estrutura terciária (FIGURA 11) é a mesma encontrada na maioria das lectinas de leguminosas, o β sanduíche *jelly roll* (GEWURZ *et al.*, 1995).

Figura 11 - Arranjo pentamérico de uma pentraxina humana.



Adaptado de Brinda *et al.*, 2005. Conformação pentamérica característica de todas as pentraxinas.

Análogos de CRP e SAP parecem estar distribuídos em todos os vertebrados e moléculas relacionadas têm sido também identificadas em tunicados (ELOLA *et al.*, 1994) e no caranguejo ferradura (SHRIVE *et al.*, 1999).

CRP e SAP compartilham cerca de 50% de identidade de sequência, cada uma das duas proteínas é codificada por um único gene, presente no cromossomo 1, e secretadas pelo fígado (STEELE; WHITEHEAD, 1994; GEWURZ *et al.*, 1995). Ambas as proteínas são dependentes de Ca^{2+} , apesar de não serem consideradas lectinas do tipo C. Além disso, CRP e SAP podem se ligar ao DNA e a fosfolípidos (DRICKAMER, 2002).

CRP e SAP parecem estar envolvidas no sistema imune inato, atuando no início, bem como na atenuação da resposta inflamatória. CRP reconhece células não próprias, ativa o sistema complemento e induz a liberação de citocinas no processo de inflamação, por outro lado, SAP parece atuar como opsonina (BICKERSTAFF *et al.*, 1999).

Além de CRP e SAP, o homem possui uma terceira classe de pentraxina, PTX3. Essa pentraxina possui similaridade de sequência com CRP e SAP e peso molecular similar, 42 kDa (ALLES *et al.*, 1994). Acredita-se que PTX3 possa reconhecer patógenos específicos como *Aspergillus fumigatus* (GARLANDA *et al.*, 2002).

Tachylectinas

Primariamente descritas no caranguejo *Tachypleus tridentatus*, as tachylectinas são proteínas com seis domínios repetidos contendo de 33 a 38 resíduos cada. As

tachylectinas tem a habilidade de ligar-se a lipopolissacarídeos (LPS), o que sugere sua provável função de defesa (KILPATRICK, 2002).

Tachylectina-1 é composta de 232 resíduos de aminoácidos dispostos em seis domínios repetidos (FIGURA 12), não é glicosilada e possui um átomo de zinco em sua estrutura. Além disso, ela não foi capaz de agutinar eritrócitos humanos, mas apresentou forte ligação a LPS (NAGAI *et al.*, 1999). Tachylectina-1 é idêntica proteína L6 e a tachylectina-P, outras lectinas isoladas de *T. tridentatus*.

Figura 12 - Alinhamento dos domínios da tachylectina-1

```

2-  WTHINGKLSHLTVTPR . FVWGVNNVHDI FRCTR PCTG SN -39
39- WIQIKGGLKHVSASGYGYIWGVNSKDQIFKCPKPCNGE . -76
77- WVNIPGKLGKHISGSGSWEVFGVNCNDQIFRCKKPCSGQ . -114
115- WIKVEGSLKQIDADDH . EVWGVNSNDNIYKR PVDGNGS . -151
152- WELVDGSLKQVDGGRD . LVYGV TQNDEIFRR PVDGSG . . -189
190- WVRLSGYLKQCDASGD . SLLGVNSNDDIFESVPASKSC . -226

```

Alinhamento realizado utilizando o programa ESPrift 2.2.

Na esponja *Suberites domuncula*, uma tachylectina (LEC_SUBDO) também foi identificada. Usando técnicas de biologia molecular, Schroder e colaboradores descreveram uma lectina capaz de ligar-se a GlcNAc e LPS. LEC_SUBDO e assim como tachylectina-1 apresentou três pontes dissulfeto intracadeia e seis domínios repetidos (SCHORODER *et al.*, 2003).

1.1.3.2 Lectinas de Esponja

A presença de lectinas em esponjas foi inicialmente descrita por Dodd e colaboradores nas espécies *Cliona celata* e *Axinella sp.* As lectinas de ambas as espécies, embora capazes de aglutinar hemácias de maneira diferenciada, foram inibidas por galactose (DODD *et al.*, 1966).

Contudo, foi só no ano de 1976 que as primeiras lectinas de esponja foram obtidas de forma pura. Bretting e Kabat trabalhando com a esponja adriática, *Axinella polypoides*, isolaram duas lectinas (lectina I e II) através de cromatografia de afinidade em matriz de Sepharose 4B. A lectina I é uma proteína de 21 kDa e pI de 3,8, enquanto que a lectina II tem 15 kDa e pI de 3,9. Ambas as lectinas foram inibidas por galactose e aglutinaram eritrócitos humanos do tipo B, mas não do tipo A e O (BRETTING; KABAT, 1976).

No mesmo ano, Bretting e Kabat isolaram três lectinas de *Aaptos papilata* (ApL-I, ApL-II e ApL-III). Em SDS PAGE, ApL-I apresentou bandas de 12 kDa e 21 kDa, enquanto que ApL-II e ApL-III apresentaram uma única banda de 16 kDa, sendo consideradas como isolectinas. ApL-I foi específica a glicoproteínas contendo no terminal não redutor resíduos de GlcNAc, ApL-II e ApL-III foram inibidas por ácido siálico e GlcNAc (BRETTEING; KABAT, 1976).

A esta altura foi proposto que os responsáveis pela manutenção da coesão celular de esponjas eram os fatores de agregação dependentes de Ca^{2+} e as lectinas não dependentes de íons metálicos, tais como àquelas isoladas de *Axinella polypoides* e *Aaptos papilata*. Esta teoria ganhou força quando em 1979, Vaith e colaboradores revelaram pela primeira vez o envolvimento de uma lectina na agregação celular. Na ocasião, Vaith e seus colegas isolaram uma galectina da esponja *Geodya cydonium* (VAITH *et al.*, 1979).

Muller e colegas sugerem que a galectina de *Geodya cydonium* (GcG) forma uma ponte entre células da mesoderme e os fatores de agregação, mantendo a coesão de células de *G. cydonium* (MULLER *et al.*, 1979).

Em 1981, Muller e colaboradores isolaram uma lectina da esponja *Halichondria panicea*. A lectina foi inibida por ácido galacturônico, ácido glucurônico e fucose. No mesmo trabalho, uma cepa da bactéria marinha *Pseudomonas insolita* foi isolada da própria esponja *H. panicea*. Curiosamente, a lectina de *H. panicea* não demonstrou efeito agregativo em células de *H. panicea* ou de outras esponjas, no entanto, a lectina induziu o crescimento da bactéria *P. insolita*, enquanto que não afetou cepas bacterianas extraídas de outras seis esponjas. Os autores sugerem que a lectina de *H. panicea* seja a base para o reconhecimento específico de simbioses (MULLER *et al.*, 1981). Pela primeira vez era evidenciada uma atividade endógena para lectinas de esponja, diferente daquela proposta inicialmente por Bretting.

No mesmo, Bretting e colaboradores relataram o potencial mitogênico de GcG. A uma concentração mínima de $5,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$, GcG foi capaz de induzir linfócitos humanos a mitose (BRETTEING *et al.*, 1981). Mais tarde outras lectinas mitogênicas também foram encontradas nas esponjas *Cinachyrella alloclada* (ATTA *et al.*, 1989), *Desmapsana anchorata* (ATTA *et al.*, 1990), *Pellina semitubulosa* (ENGEL *et al.*, 1992), *Crambe crambe* (DOGOVIC *et al.*, 1996) e *Craniella australiensis* (XIONG *et al.*, 2005).

Os trabalhos iniciais com lectinas de esponja atraíram o interesse de alguns pesquisadores, especialmente devido as atividades biológicas disparadas por tais lectinas, tanto de maneira endógena quando exógena.

Em 1981, Bretting e colaboradores fizeram um levantamento da atividade hemaglutinante de extratos aquosos de esponjas coletadas no mar Mediterrâneo. Dentre as 32 esponjas testadas, 21 apresentaram atividade hemaglutinante para algum tipo/tratamento de eritrócito testado (BRETTEING *et al.*, 1981). No mesmo trabalho os autores reportaram a purificação de uma lectina ligante a Gal/GalNAc de *Axinella dissimilis* (BRETTEING *et al.*, 1981).

Em outro trabalho realizado com esponjas coletadas no mar Vermelho, na barreira de corais da Austrália e na Flórida, Mebs e colegas obtiveram resultados semelhantes aos de Bretting. Das 48 esponjas testadas, 20 apresentaram atividade hemaglutinante e duas foram isoladas das espécies *Haliclona* sp.e *Cinachyra tenuifolia*. Ambas as lectinas foram inibidas por lactose (MEBS *et al.*, 1985).

Lectinas ligantes de lactose também foram isoladas de *Disydea herbacea* (KAMIYA *et al.*, 1985^a) e *Phyllospongia foliascens* (KAMIYA *et al.*, 1985^b).

Em outra esponja do gênero, *Halichondria okadai*, três lectinas foram purificadas por cromatografia de afinidade. HoL-I (20 kDa) foi inibida por carboidratos contendo o grupo N-Acetil, enquanto que HoL-II (40 kDa) foi inibida por lactose e LacNAc (KAWAGISHI *et al.*, 1994). HoL-30, a terceira lectina de *H.okadai*, é uma proteína de 30 kDa que reconhece galactose e oligossacarídeos de galactose (KAWSAR *et al.*, 2008). A sequencia de HoL-30 foi parcialmente determinada, porém não houve indícios sobre seu papel fisiológico (KAWSAR *et al.*, 2008).

Já nos anos 2000, Miarrons e Fresno realizaram um levantamento da atividade hemaglutinante em extratos aquosos de esponjas coletadas na costa da Venezuela. Dentre as 22 espécies coletadas, 10 apresentaram atividade hemaglutinante e duas lectinas foram isoladas de espécies do gênero *Aplysina* (*A. archeri* e *A. lawnosa*). Ambas as lectinas, AAL e ALL, são tetrâmeros de 63 kDa formados por subunidades de 16 kDa unidas por interações fracas. AAL e ALL apresentaram pI de 4,1 e 4,5 e teor de carboidratos de 3,5 e 5 %, respectivamente. Ambas as lectinas foram inibidas por EDTA, galactose e dissacarídeos de galactose, além de glicoproteínas, incluindo tiroglobulina e formas desializadas de orosomucóide (MIARRONS; FRESNO, 2000).

Lectinas dependentes de Ca²⁺ também foram isoladas em *Aphrocallistes vastus*. APHRLEC-1 e APHRLEC-2 são glicoproteínas N-ligadas e membros da família de lectinas do tipo C. Gundacker e colegas sugerem que as duas isolectinas desempenhem um papel similar do de GcG, mas de uma maneira dependente de Ca²⁺ (GUNDACKER *et al.*, 2001).

Na esponja dulciaquícola *Lubomirskia baicalensis*, uma lectina ligante de manose, também pertencente à família do tipo C, foi identificada, caracterizada por técnicas de biologia molecular e parece estar envolvida na biomineralização. A MBL de *L. baicalensis*, juntamente com silicateínas e uma proteína *mago nashi*, regula o crescimento de espículas silicosas que estão diretamente relacionadas com o crescimento da esponja. Dessa forma, o nível de expressão da MBL está relacionado com o habitat da esponja, uma vez que foi observado que em pequenas profundidades somente formas incrustantes da esponja são encontradas, enquanto que formas “arbóreas” são encontradas a mais de 5 m de profundidade (WIENS *et al.*, 2006).

Também utilizando técnicas de clonagem, duas tachylectinas foram identificadas nas esponjas *Ephydatia fluviatis* e *Suberites domuncula* (SCHRODER *et al.*, 2003; FUNAYAMA *et al.*, 2005). As duas lectinas, assim como os demais membros da família das tachylectinas, possuem domínios repetidos ao longo de sua estrutura primária.

Uma lectina dependente de Ca^{2+} , mas ligante de galactose foi isolada de *Cliona varians*. CvL-1 (*Cliona varians lectin*) é uma glicoproteína formada por quatro subunidades idênticas de 27 kDa ligadas por pontes dissulfeto. CvL-1 é capaz de aglutinar formas promastigotas de *Leishmania chagasi* e possui efeito citotóxico sobre bactérias gram positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*), sem, contudo, afetar bactérias Gram negativas. Estes dados sugerem que CvL-1 pode estar envolvida na defesa da esponja contra patógenos (MOURA *et al.*, 2006).

Pouco tempo depois do isolamento de CvL-1, Queiroz e colaboradores (2008) avaliaram o efeito da mesma sobre modelos de inflamação *in vitro*. Os autores relataram que CvL-1 possui potente atividade pró-inflamatória em camundongos. Os autores relataram ainda que CvL-1 foi capaz de induzir a migração de neutrófilos pela liberação de citocinas quimotáticas e ativação de macrófagos residentes (QUEIROZ *et al.*, 2008a).

No mesmo ano, Queiroz e colaboradores (2008b) reportaram o efeito citotóxico de CvL-I sobre células de câncer. CvL-I induziu células malignas a apoptose após 72 horas de exposição, apresentando valores de IC50 em torno de $70 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para células leucêmicas K562 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para células JUR-KUT. Além disso, CvL-1 não apresentou efeito citotóxico considerável sobre células saudáveis (QUEIROZ *et al.*, 2008b).

Ainda no mesmo estudo, os autores demonstraram que a protease catépsina B parece mediar a morte celular por uma via caspase independente, além disso, a expressão do fator de necrose tumoral (TNFR1) foi *up* regulada e a expressão da subunidade p65 do fator *kappa* b (NFkB) foi *down* regulada em células tratadas com CvL-1. Como conclusão, os

autores sugerem que a citotoxicidade induzida por CvL-1 depende de uma conexão desconhecida entre a catepsina B e um receptor de membrana não caracterizado envolvido em uma via de morte celular alternativa (QUEIROZ *et al.*, 2008b).

Lectinas de esponja que apresentem citotoxicidade frente a células malignas também foram isoladas de *Haliclona cratera* (PAJIC *et al.*, 2002) e *Cinachyrella appion* (MEDEIROS, 2008). A lectina da última, CaL (*Cinachyrella appion lectin*), é uma proteína de 15 kDa que pode formar estruturas oligoméricas de 120 kDa. CaL é independente de íons metálicos e ligante de lactose, embora seu N-terminal não se assemelhe a família das galectinas (MEDEIROS, 2008).

Em 2005, Dresch e colegas realizaram um novo levantamento da atividade hemaglutinante e hemolítica de esponjas coletadas no litoral do Brasil. Das 20 espécies testadas, 12 apresentaram algum tipo de atividade (DRESCH *et al.*, 2005). Posteriormente, duas lectinas foram isoladas de *Axinella corrugata*. AcL-I é uma glicoproteína de 14 kDa e ligante de GlcNAc (DRESCH *et al.*, 2008). AcL-II possui 80 kDa e afinidade por galactose (DRESCH *et al.*, 2012). AcL-I apresentou atividade mitogênica frente a células humanas mononucleares, citotoxicidade contra náuplios de *Artemia* e efeito quimotático sobre neutrófilos (DRESCH *et al.*, 2008; DRESCH *et al.*, 2012). Testes de imunohistoquímica sugerem que AcL-I é armazenada em vesículas intracelulares e raramente é encontrada na matriz extracelular (DRESCH; 2008).

Recentemente, uma nova galectina foi isolada da esponja *Cinachyrella* sp. CchG (*Cinachyrella galectin*) é uma proteína de 16 kDa que se organiza em dímeros ou tetrâmeros (UEDA *et al.*, 2012). CchG apresentou propriedades modulatórias sobre receptores de glutamato, sem, contudo, causar convulsão em ratos (UEDA *et al.*, 2012). CchG foi cristalizada e pela primeira vez uma estrutura terciária de uma lectina de esponja foi resolvida (FREYMAN *et al.*, 2012).

1.1.3.1.1 Lectinas do gênero *Haliclona*

O gênero *Haliclona* é conhecido pela produção de um alcaloide tóxico denominado halitoxina. Entretanto, lectinas também tem sido alvo de estudos neste gênero.

A primeira detecção de atividade hemaglutinante em esponjas do gênero foi realizada em *Haliclona* sp. A lectina isolada possui massa de 24 kDa e reconhece lactose (MEBS *et al.*, 1985).

Posteriormente, uma nova lectina foi purificada de *H. cratera*. A lectina em questão (HcL) é um dímero formado por duas subunidades idênticas de 14 kDa cada. HcL foi inibida por galactose, GalNAc, lactose, dissacarídeos de galactose e galactomanana. Além disso, HcL mostrou efeito citotóxico sobre as linhagens malignas HeLA e FemX, com valores de IC50 de 9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 11 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (PAJIC *et al.*, 2002).

Recentemente, uma nova lectina foi isolada de *H. caerulea* (H-2) através de combinação de cromatografia de troca catiônica e aniônica (CARNEIRO, 2011). H-2 é uma proteína de 27 kDa formada por duas subunidades de 15 kDa unidas por interações fracas. A lectina foi inibida por glicoproteínas O-ligadas, tais como mucina de estômago de porco (PSM – *porcine stomach mucin*) e orosomucóide. A estrutura primária de H-2 foi parcialmente determinada, mas não apresentou similaridade com nenhuma lectina conhecida (CARNEIRO, 2011).

1.1.3.1.2 Biologia estrutural de lectinas de esponja

Desde o trabalho inicial de Dodd em 1960, lectinas de esponjas marinhas tem sido isoladas, caracterizadas, e ao contrário da maioria das lectinas de invertebrados, seu papel biológico tem sido demonstrado com certa amplitude. Entretanto, características estruturais destas lectinas têm sido pouco estudadas.

Em um estudo pioneiro, duas lectinas de *Axinella polypoides* (lectina I e II) foram sequenciadas por degradação de Edman e espectrometria de massas (MS) (BUCK *et al.*, 1991; BUCK *et al.*, 1998). A lectina I (16.228 Da) possui 145 aminoácidos e uma ponte dissulfeto entre as posições 4 e 46 (BUCK *et al.*, 1998). Inicialmente, a lectina I foi agrupada como uma lectina do tipo (QxW)₃, uma família de lectinas (tipo R) relacionadas a ricina (HASER, 1996). No entanto, a relação entre a lectina I de *Axinella* e as lectinas do tipo R é considerada fraca, pois a lectina I possui apenas uma sequência QxW (BUCK *et al.*, 1998).

A lectina II (15.847 Da) possui 147 aminoácidos, incluindo duas cisteínas envolvidas em uma ponte dissulfeto intracadeia nas mesmas posições em que ocorre na lectina I. Além disso, a lectina II compartilha 65% de identidade com a lectina I e não possui glicosilação (BUCK *et al.*, 1998).

Em outro trabalho, Pfeifer e colaboradores (1993) deduziram, a partir de técnicas de biologia molecular, a estrutura primária de duas isolectinas da esponja *G. cydonium*. GcG-1 e GcG-2 apresentaram uma sequência de 38 aminoácidos conservados que são característicos do DRC das galectinas de vertebrados (PFEIFER *et al.*, 1993).

Inicialmente, foi proposto que GcG desempenhasse um papel biológico extracelular, estando envolvida na agregação celular por interagir com fatores de agregação (WAGNER-HULSMANN *et al.*, 1996). Esta galectina ancestral foi também considerada como uma precursora das galectinas atuais (COOPER; BARONDES, 1999).

A estrutura primária de GcG indica uma relação direta com a galectina-1. Entretanto, GcG compartilha características inerentes a galectinas do tipo quimera, tais como a preferência por terminais relacionados aos carboidratos do epítipo sanguíneo A, em detrimento do reconhecimento a polilactosaminas. Além disso, as funções extracelulares da galectina-3 podem ser mimetizadas pela GcG (STALZ *et al.*, 2006).

Os DRCs de galectinas do tipo quimera apresentam deleções ou substituições nas posições 161 e 162, sendo este fator responsável pela habilidade destes CRDs de acomodarem melhor carboidratos não redutores, adicionalmente, é proposto que Arg¹³⁹ e Ile¹⁴¹ formam uma extensão do DRC que permite as galectinas do tipo quimera acomodarem tetrassacarídeos (LEFFLER *et al.*, 2004). As posições Arg¹³⁹ e Ile¹⁴¹ da galectina-3 correspondem a Ala²⁹ e Ser³¹ em GcG, o que indica que a especificidade de ligação de GcG, semelhante as galectinas-3, pode ter uma base estrutural diferente (STALZ *et al.*, 2006).

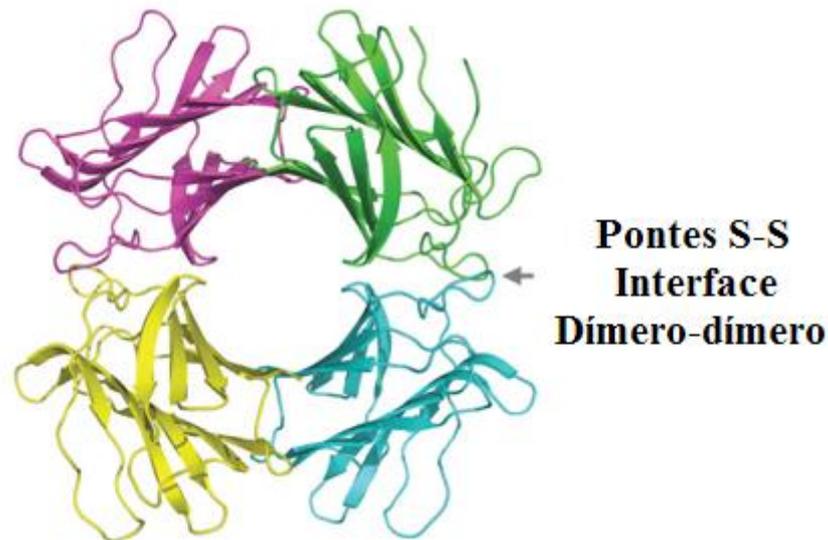
Em *Cinnachyrella* sp., uma nova galectina (CchG) foi isolada por Ueda e colaboradores (2012). CchG teve sua sequência de aminoácidos deduzidas após clonagem do cDNA. CchG possui 147 aminoácidos, incluindo cinco resíduos conservados do DRC de galectinas Arg⁴⁷, Asn⁶⁰, Trp⁶⁸, Glu⁷¹ e Arg⁷³. A estrutura primária de CchG apresentou 16% de identidade com a galectina da enguia europeia *Anguilla anguilla*, 19 % com galectina-1 humana e 23% de identidade com a galectina de *Geodia cydonium*. Os dados obtidos por Ueda e colegas sugerem que CchG é uma galectina do tipo proto (UEDA *et al.*, 2012).

Dados de cristalografia de raio-X revelaram que o monômero de CchG consiste de duas folhas β antiparalelas, compostas por cinco fitas β cada (FIGURA 13). Esta estrutura é característica de outras proto galectinas e a topologia das folhas β é similar aquelas encontradas em outras galectinas. Os monômeros de CchG associam-se formando dímeros canônicos. A estrutura tetramérica (dímero de dímeros) que ocorre em CchG é mediada por uma rara estrutura estabilizada por uma ponte dissulfeto entre cisteínas adjacentes (FREYMAN *et al.*, 2012).

A terceira lectina de *Halichondria okadai*, HoL-30, teve sua sequência parcialmente determinada por digestões proteolíticas e degradação de Edman. HoL-30 não apresentou similaridade com nenhuma lectina com exceção de um peptídeo que mostrou identidade de 46% com uma região da galectina de *G.cydonium* (KAWSAR *et al.*, 2008). O

peso molecular de HoL-30 (30.000 Da) a diferença das galectinas proto, mas é similar ao peso das galectinas do tipo quimera (31.000 Da).

Figura 13 - Estrutura tetramérica de CchG (*Cinachyrella sp. Galectin*).



Adaptado de FREYMAN *et al.*, 2012. Os monômeros de CchG associam-se em dímeros canônicos e a estrutura tetramérica é estabilizada por uma incomum ponte dissulfeto entre cisteínas adjacentes.

Em *Suberites domuncula* e *Ephydatia fluviatilis*, duas lectinas relacionadas às tachylectinas foram identificadas e suas sequências de aminoácidos foram deduzida pelo uso de técnicas de biologia molecular. LEC_SUBDO e a lectina Ef, assim como as lectinas do caranguejo ferradura, possuem um domínio transmembranar e seis domínios repetidos ao longo da estrutura (SCHRODER *et al.*, 2003; FUNAYAMA *et al.*, 2005). As duas lectinas apresentaram 62% de identidade entre si, além de mais de 50% de identidade com as lectinas do caranguejo ferradura *T.tridentatus* (FUNAYAMA *et al.*, 2005).

Dois isolectinas do tipo C foram identificadas em *Aphrocallistes vastus*. APHRLECC-1 e APHRLECC-2 são proteínas de 191 resíduos de aminoácidos que compartilham 87% de identidade. Ambas as lectinas possuem um sítio de N-glicosilação, três pontes dissulfeto intracadeia e um domínio transmembranar. Curiosamente, as lectinas podem ser solubilizadas dos tecidos sem o uso de detergentes, entretanto, o alto grau de hidrofobicidade do domínio N-terminal sugere que as duas sejam proteínas de membrana do tipo II (GUNDAKER *et al.*, 2001).

Cliona varians possui uma lectin dependente de Ca^{2+} , mas estudos recentes sugerem que CvL-1 não seja uma lectina do tipo C. A massa de CvL-1 determinada por

MALDI TOF foi de 19.779 Da para a forma alquilada de CvL-1 e este valor diverge bastante daquele obtido por SDS-PAGE (27 000). Cerca de 80% da estrutura primária de CvL-1 foi determinada por MS, mas nenhuma similaridade foi observada entre os peptídeos encontrados e lectinas do tipo C ou qualquer outra (dados não publicados).

Dentre os peptídeos encontrados em CvL-1, a sequência V[L/I]YP[L/I]PVGNNVET[L/I]R é idêntica a região interna de fatores de crescimento epidermais (*Epidermal Growth Factor* - EGF) dos ouriços *Anthocidaris crassispina* e *Heliocidaris crassispina*. Interessantemente, as selectinas-L, lectinas do tipo C e transmembranares do tipo II, possuem um domínio do tipo EGF em sua estrutura. CvL-1 não parece ser uma proteína de membrana uma vez que pode ser solubilizada a partir de tecidos sem o auxílio de detergentes. A relação entre CvL-1 e selectinas e/ou EGFs ainda não está clara (dados não publicados).

Em suma, os estudos estruturais de lectinas de esponja são ainda bastante escassos, totalizando somente oito lectinas com estrutura primária determinada, incluindo as duas galectinas de *Cinnachyrella* sp. e *Geodia cydonium*, as isolectinas tipo C de *Aphrocallistes vastus*, as lectinas tipo R de *Axinella polypoides*, a MBL de *Lubomirskia baicalensis* e as tachylectinas de *Ephydatia fluviatilis* e *Suberites domuncula*. Até o momento, apenas uma vez uma lectina de esponja foi cristalizada e sua estrutura terciária resolvida (galectina de *Cinnachyrella* sp.). Portanto, os estudos estruturais das lectinas de poríferos fazem-se necessários uma vez que as mesmas têm mostrado importantes atividades biológicas com elevado potencial biotecnológico.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Isolar duas novas lectinas de *Haliclona caerulea* (H-1 e H-3), caracterizar estruturalmente uma delas (H-3), avaliar o efeito citotóxico de H-1, H-2, e H-3 sobre náuplios de *Artemia* e identificar lectinas ortólogas de H-3 no genoma da esponja *Amphimedon queenslandica*.

2.2 Objetivos específicos

Isolar duas novas lectinas presente no extrato aquoso de *H. caerulea*.

Caracterizar físicoquimicamente novas as lectinas isoladas de *H. caerulea* (H-1 e H-3). Estimando massa molecular, efeito da temperatura e pH sobre a atividade, inibição por carboidratos e dependência de íons metálicos.

Avaliar a citotoxicidade de H-1, H-2 e H-3 sobre náuplios de *Artemia*.

Avaliar o potencial antimicrobiano de H-3 contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Caracterizar modificações pós traducionais de H-3 por MS, incluindo glicosilações e pontes dissulfeto.

Determinar a estrutura primária de H-3.

Buscar ortólogas de H-3 em genomas disponíveis, através do uso de ferramentas de bioinformática.

Obter cristais de H-3 passíveis de difração.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta e extração.

Espécimes da esponja marinha *Haliclona caerulea* foram coletados na região entre marés da praia de Paracuru, São Gonçalo, Ceará (3°24'36'' S, 39°01'51'' O). As esponjas foram transportadas até o laboratório onde foram armazenadas a -20 °C. Uma amostra da esponja foi enviada ao Museu Nacional de Ciências Naturais, Rio de Janeiro, RJ, onde foi identificada e está depositada sob o código MNRJ 14623.

Para extração, espécimes congelados foram macerados em almofariz e homogeneizados em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, contendo NaCl 500 mM, à proporção de 1:2 (p/v). A mistura foi filtrada em malha fina (0,2 micra). O filtrado foi centrifugado a 5000 x g por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante, denominado extrato bruto, foi armazenado a -20 °C.

3.2 Preparo dos estromas e montagem da matriz cromatográfica

Os estromas usados na montagem da matriz cromatográfica foram obtidos a partir de ligeiras modificações no método previamente estabelecido por Ochoa e Kristiansen (1978). Eritrócitos humanos do tipo A foram tratados com tripsina (1 µg.mL⁻¹) por 18 horas a 37 °C. As hemácias foram incubadas por 1 hora em ácido acético 0,004% a proporção de 1:9 (v/v). Após o período de incubação, os estromas foram concentrados por centrifugação durante 5 minutos a 1050 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em água destilada. O procedimento de centrifugação foi repetido por 8 vezes até que o sobrenadante estivesse completamente livre de conteúdo celular.

Após remoção da hemólise, os estromas foram fixados com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, contendo NaCl 150 mM e glutaraldeído 1% a proporção de 1:9 (v/v). A reação de fixação foi mantida por 24 horas e então os estromas foram lavados 8 vezes com água destilada. Finalmente, os estromas foram homogeneizados com igual volume de Sephadex G-25.

3.3 Purificação das lectinas

O processo de purificação das Halilectinas está esquematizado no anexo A. Para purificação da Halilectina 1 (H-1), o extrato bruto foi centrifugado e carregado em matriz

cromatográfica de estroma-Sephadex (15,0 x 1,0 cm) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, contendo NaCl 500 mM. A cromatografia foi conduzida a um fluxo de 1 mL.min⁻¹ e frações de 3 mL foram coletadas. Após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio até que a absorbância a 280 nm fosse menor que 0,02. As frações retidas foram eluídas com NH₄OH 0,3%. Ambas as frações, não retidas (PI-Estroma) e retidas (PII-Estroma), apresentaram atividade hemaglutinante.

O PII-Estroma, denominado Halilectina 1, foi dialisado exaustivamente contra água destilada e liofilizado para análises posteriores. O PI-Estroma foi dialisado contra tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5 contendo NaCl 150 mM (ABS) e armazenado até o uso.

Para purificação de Halilectina 2 (H-2), foi usado o método descrito por Carneiro (2011). O PI-Estroma foi centrifugado e aplicado em matriz cromatográfica CM-Celulose (10,0 X 1,0 cm) previamente equilibrada com ABS. A cromatografia foi conduzida a um fluxo de 2 mL.min⁻¹ e frações de 3 mL foram coletadas. Após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com ABS até que a absorbância a 280 nm fosse menor que 0,02. As frações retidas foram eluídas com ABS acrescido de NaCl 1 M. Ambas as frações, não retidas (PI-CM) e retidas (PII-CM), apresentaram atividade hemaglutinante.

O PI-CM foi armazenado para análises futuras. O PII-CM foi dialisado exaustivamente contra tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 e armazenado em freezer até o uso posterior.

Como passo final de purificação de H-2, o PII-CM foi centrifugado e carregado em matriz cromatográfica DEAE-Sephadex (5,0 x 1,0 cm) previamente equilibrada com Tris-HCl 50 mM, pH 7,6. A cromatografia foi conduzida a um fluxo de 2 mL.min⁻¹ e frações de 2 mL foram coletadas. Após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio até que a absorbância a 280 nm fosse menor que 0,02. As frações retidas foram eluídas com tampão de equilíbrio acrescido de 0,25 M de NaCl e 1 M de NaCl. As frações eluídas com 1 M de NaCl, denominadas de H-2, foram reunidas, dialisadas, liofilizadas e armazenadas para análises futuras.

Para purificação de Halilectina 3 (H-3) foi adicionado a fração PI-CM, 500 mM de (NH₄)₂SO₄ e deixado em repouso por 4 horas a 4 °C. A fração foi centrifugada e carregada em matriz cromatográfica fenil-Sepharose 4B (8,0 x 1,0 cm) previamente equilibrada com tampão acetato 50 mM pH 5,5 contendo (NH₄)₂SO₄ 500 mM. A cromatografia foi conduzida a um fluxo de 2 mL.min⁻¹ e frações de 3 mL foram coletadas. Após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio até que a absorbância a 280 nm fosse menor que

0,02. As frações retidas foram eluídas com tampão acetato 50 mM pH 5,5 contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 200 mM e H_2O destilada. As frações eluídas com H_2O destilada, pH₂O-HIC, concentraram a maior parte da atividade hemaglutinante e portanto foram reunidas, dialisadas e armazenadas a -20°C até o uso.

Como passo final de purificação, a fração pH₂O-HIC foi centrifugada e aplicada em matriz cromatográfica DEAE-Sephadex (5,0 x 1,0 cm) previamente equilibrada com Tris-HCl 50 mM pH 7,6. A cromatografia foi realizada a um fluxo de 2 mL.min⁻¹ com o tampão de equilíbrio, sendo coletadas frações de 2 mL até que a absorbância a 280 nm fosse menor que 0,02. Em seguida, as frações retidas foram eluídas com tampão de equilíbrio acrescido de 0,1 M de NaCl e 1 M de NaCl. As frações eluídas com 0,1 M de NaCl, denominadas H-3, foram reunidas, dialisadas, liofilizadas e armazenadas para análises futuras.

Todas as cromatografias foram monitoradas por absorbância a 280 nm utilizando um espectrofotômetro Ultraspec 2100 pro. As cromatografias conduzidas para a purificação de H-3 foram também monitoradas por absorbância a 620 nm.

Todas as frações foram quantificadas quanto à concentração de proteínas totais solúveis segundo o método de Bradford (Bradford, 1977).

3.4 Preparo de eritrócitos, atividade hemaglutinante e inibição por açúcares.

Eritrócitos humanos do sistema ABO foram gentilmente cedidos pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE). Os eritrócitos de coelho foram provenientes de animais adultos saudáveis mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Eritrócitos humanos e de coelho foram suspensos em solução gelada de NaCl 150 mM e lavados 6 vezes mediante centrifugação a 1050 x *g* por 5 minutos. A cada lavagem o sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi novamente adicionado NaCl 150 mM. Ao fim das centrifugações, as hemácias foram suspensas em solução salina a 3% de concentração (v/v).

Para o preparo de eritrócitos tratados enzimaticamente, suspensões de hemácias foram incubadas separadamente com as enzimas proteolíticas tripsina e papaína (10 µg.mL⁻¹) por 60 minutos, a 37 °C, na proporção de 1:3 (enzima/substrato). As células foram novamente lavadas por 8 vezes, como descrito acima, para a completa remoção das enzimas.

Os testes de hemaglutinação foram conduzidos em placas de microtitulação de fundo V, usando o método da dupla diluição seriada. Primeiro 50 µL de solução salina foram

adicionados em cada poço da placa, depois um volume igual de extrato, fração e lectina purificada foi adicionado ao primeiro poço de uma fila e então foi serialmente diluído ao longo da mesma fila. Finalmente, 50 μL de suspensão de hemácias foram adicionados e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora. A atividade hemaglutinante foi expressa em título. Uma unidade de hemaglutinação (UH) foi definida como a menor quantidade de proteína capaz de causar hemaglutinação visível ao olho nu após 1 h de incubação.

O ensaio de inibição da atividade hemaglutinante foi conduzido segundo o método estabelecido por Sampaio e colaboradores (1998). Para tal, foi utilizada a concentração de lectina capaz de causar 4 UH. As soluções de açúcares simples (D-galactose, D-glicose, D-manose, D-frutose, D-arabinose, *N*-acetil-D-glicosamina, *N*-acetil-D-galactosamina, *N*-acetil-D-manosamina, metil- α -D-glicopiranosídeo, metil- α -D-galactopiranosídeo, α -D-lactose e D-sacarose) foram preparadas em solução salina a concentrações de 100 mM. As glicoproteínas (mucina de estômago de porco (PSM), tiroglobulina, ovomucóide e orosomucóide) foram preparadas em solução salina a 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Inicialmente 50 μL de tampão Tris 50 mM pH 7,6 contendo NaCl 150 mM (TBS) foram adicionados a todos os poços da placa, depois 50 μL de carboidratos ou glicoproteínas foram adicionados ao primeiro poço de uma fila e serialmente diluídos em TBS. Posteriormente, 50 μL de solução lectínica foram adicionadas aos poços contendo soluções diluídas de carboidratos e glicoproteínas. A placa foi mantida por 1 hora a temperatura ambiente e por fim, um volume igual de suspensão de hemácias foi adicionado. Após incubação por 1 hora, a placa foi avaliada a olho nu e a mínima concentração de carboidrato ou glicoproteína capaz de inibir hemaglutinação (MIC) foi considerada.

3.5 Caracterização físico química de H-1 e H-3.

O efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante das lectinas foi avaliado da seguinte maneira: H-1 e H-3 foram solubilizadas em NaCl 150 mM e incubadas em soluções tampões de diferentes pH (acetato de sódio 100 mM, pH 4,0-5,0, citrato de sódio 100 mM, pH 6,0, tris-HCl 100 mM, pH 7,0-8,0 e glicina 100 mM, pH 9,0-10,0). Todos os tampões foram suplementados com NaCl 150 mM. Após 1 hora de incubação, os eritrócitos foram adicionados e a atividade hemaglutinante foi determinada.

Para avaliar o efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante das lectinas, H-1 e H-3 foram solubilizadas em TBS e incubadas em diferentes temperaturas (25, 40, 50,

60, 70, 80, 90 e 100 °C). Após 1 hora de incubação, as hemácias foram adicionadas e a atividade hemaglutinante foi determinada.

O efeito de íons divalentes sobre a atividade hemaglutinante das lectinas também foi avaliado. Para tal, H-1 e H-3 foram solubilizadas em NaCl 150 mM e incubado em tampão Tris 50 mM, pH 7,6 contendo EDTA 100 mM (TBS/EDTA). Após 1 hora de incubação, o sangue foi adicionado e a atividade hemaglutinante foi determinada.

O teor de carboidratos de H-1 e H-3 foi quantificado segundo o método do fenol ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), utilizando lactose como padrão. A confirmação da natureza glicoproteica de H-3 foi realizada através da coloração com ácido periódico de Schiff (PAS) (ZACHARIUS *et al.*, 1969) .

O espectro de absorção de H-3 foi determinado entre 400 nm e 700 nm a temperatura ambiente usando um espectrofotômetro Ultrospec 2100. A lectina foi solubilizada (0,5 mg.mL⁻¹) em TBS pH 7,6 e aquecida a 100 °C durante 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos, antes de ter sua absorção determinada. A influência de NaOH, EDTA, e SDS na absorção de luz UV por H-3 também foi avaliada.

3.6 Eletroforese e estimativa da massa molecular de H-1 e H-3.

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi conduzida segundo descrito por Laemmli (1970). O gel de separação foi constituído de acrilamida/bisacrilamida 10, 12 ou 15% em tampão Tris-HCl 330 mM pH 8,8 contendo SDS 1%, TEMED e persulfato de amônia. O gel de empilhamento foi preparado usando acrilamida/bisacrilamida 4% em tampão Tris-HCl 200 mM pH 6,8 contendo SDS 1%, TEMED e persulfato de amônia.

As amostras foram preparadas a concentração de 4 mg.mL⁻¹ em tampão de amostra contendo Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,02% e SDS 1%. Para o preparo de amostras reduzidas, foi adicionado ao tampão de amostra 2-mercaptoetanol 5%. 10 µL de amostras foram aplicados em cada poço após terem sido aquecidos a 100 °C por 10 minutos.

A eletroforese foi conduzida sob uma corrente elétrica de 25 mA e tensão de 150 V durante 1 hora e 20 minutos. A solução da cuba foi constituída de tampão Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%. As proteínas foram detectadas por coloração em Comassie Brilliant Blue R-250 0,1%.

A massa molecular aparente das lectinas foi estimada mediante comparação da migração das lectinas com os seguintes padrões: fosforilase B (97.000 Da), BSA (66.000 Da), ovalbumina (45.000 Da), anidrase carbônica (29.000 Da), ovomucóide (21.000 Da), ribonuclease (13.700 Da) e aprotinina (6.500 Da).

A homogeneidade de H-3 foi estimada por eletroforese em gel de poliacrilamida na ausência de SDS (PAGE nativo). Os géis de separação (15%) e empilhamento foram preparados conforme descrito acima, sem, contudo, levar SDS em suas preparações. As amostras foram preparadas conforme descrito acima, em tampão de amostra nativo (sem SDS e 2-mercaptoetanol), além disso, as amostras não foram aquecidas. Finalmente, a corrida eletroforética foi conduzida como descrito acima, sem que a solução de cuba contivesse SDS. As proteínas foram detectadas como descrito acima.

3.7 Cromatografia de exclusão molecular e estimativa da massa molecular nativa de H-1 e H-3.

Para estimativa da massa molecular nativa de H-1, a lectina foi solubilizada a uma concentração de 1 mg.mL^{-1} em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, contendo NaCl 500 mM, centrifugada e aplicada em coluna TSK G3000SWXL (30,0 x 1,28 cm) acoplada a sistema ÄKTA *purifier*. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, contendo NaCl 500 mM. Após aplicação da amostra, a cromatografia foi conduzida no tampão de equilíbrio e monitorada as absorvâncias de 280 nm e 216 nm. O tempo de eluição de H-1 foi determinado e comparado com os seguintes padrões: conalbumina (74.000 Da), ovalbumina (44.000 Da), anidrase carbônica (29.000 Da) ribonuclease (13.500 Da) e aprotinina (6.500 Da). O V_0 da coluna foi determinado pelo uso do azul de dextrana.

Para estimativa da massa molecular nativa de H-3, a lectina foi solubilizada a uma concentração de 2 mg.mL^{-1} em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, contendo NaCl 500 mM, centrifugada e aplicada em coluna Sephacryl S-200 HR 16/60 acoplada a sistema ÄKTA *Purifier*. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo NaCl 500 mM. Após aplicação da amostra, a cromatografia foi conduzida no tampão de equilíbrio e monitorada as absorvâncias de 280 nm, 216 nm e 620 nm. O tempo de eluição de H-3 foi determinado e comparado com os seguintes padrões: conalbumina (74.000 Da), ovalbumina (44.000 Da), anidrase carbônica (29.000 Da) ribonuclease (13.500 Da) e aprotinina (6.500 Da). O V_0 da coluna foi determinado pelo uso do azul de dextrana.

3.8 Teste de letalidade sobre náuplios de *Artemia*.

O efeito de H-1, H-2 e H-3 sobre náuplios de *Artemia* foi avaliado mediante métodos previamente estabelecidos (MELO, 2011). Cistos de *Artemia* foram eclodidos em água do mar artificial a 28 °C sob iluminação e aeração constante. Os cistos foram incubados em um tubo cilindro cônico de polietileno a uma concentração de 1 g.L⁻¹. Após 24 horas, a aeração foi suspensa e a luz foi direcionada para a parte inferior do tubo. Devido a seu comportamento fototrófico, os náuplios migraram na direção da luz e se acumularam no fundo do tubo, enquanto os cistos que não eclodiram mantiveram-se na superfície. Os náuplios saudáveis, que se aglomeraram no fundo do tubo, foram coletados.

As lectinas foram dissolvidas em água do mar artificial a uma concentração de 200 ug.mL⁻¹. Os testes foram conduzidos usando placas de Limbro® de 24 poços. Cada poço foi preenchido com 10 náuplios, solução lectínica (12,5, 25, 50 ou 100 µg.mL⁻¹) e água do mar artificial totalizando um volume de 2 mL. Os testes foram realizados em triplicata. Como controle negativo foram usados poços de 2 mL contendo somente náuplios de *Artemia*. Após 24 horas de incubação, o número de náuplios mortos em cada poço foi contado e o LC50 foi determinado usando análise Probit, segundo descrito por Finney (1971).

3.9 Ensaio de atividade antimicrobiana e aglutinação de bactérias.

A atividade antimicrobiana de H-3 foi avaliada *in vitro* pela técnica de adsorção em ágar utilizando placas de Petri. *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram crescidos em meio de cultura NB por 24 h. Para os ensaios, as culturas foram diluídas e ajustadas para uma O.D.₆₂₅ de 1,0. Cotonetes esterilizados foram mergulhados nas culturas bacterianas e os inóculos foram espalhados uniformemente sobre a superfície das placas de ágar para produzir um campo de bactérias. Subsequentemente, discos foram embebidos em uma solução contendo H-3 (1mg/mL em TBS) e depositados sobre a placa em triplicata. Como controles foram utilizados discos embebidos em TBS e discos embebidos em ciprofloxacina (5 µg); Laborclin. As placas foram incubadas a 35 °C durante 24 horas. Halos de inibição ≥ 6 mm foram considerados evidência de atividade antibacteriana.

Para os ensaios de aglutinação *E. coli* e *S. aureus* foram crescidas conforme descrito acima. Após 24 horas, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 2000 xg por 10 minutos e lavadas 3 vezes com TBS. A suspensão bacteriana foi fixada com formaldeído 4% durante 16 horas a 4 °C e novamente lavada por mais 3 vezes com TBS. As bactérias

foram diluídas a uma $O.D_{625} = 1,0$ e 50 μL de suspensão foram incubados com igual volume de H-3 (1mg.mL^{-1}). Após 2 horas de incubação, a aglutinação foi avaliada por microscopia óptica. Como controles negativos foram usadas suspensões de bactérias incubadas com TBS. Para controles positivos foram usadas as lectinas CvL-1 (*Cliona varians Lectin 1*) e HGA-2 (*Holothuria grisea Agglutinin 2*) para as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente..

3.10 Cromatografia de fase reversa, determinação da massa molecular por espectrometria de massas e fragmentação *top down*-MS de H-3.

Para as análises de massa intacta de H-3, a lectina foi solubilizada a uma concentração de $0,5\text{ mg.mL}^{-1}$ em solução de ácido fórmico (AF) 0,1% e acetonitrila (ACN) 5%. Após centrifugação, a lectina foi aplicada em matriz Sephasil peptide C-8 ST 10/250 acoplada a sistema ÄKTA Purifier previamente equilibrada com AF 0,1% e ACN 5% (solução A). A cromatografia foi conduzida a um fluxo de 1 mL.min^{-1} e frações de 0,5 mL foram coletadas. Após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com a solução A até que todas as proteínas não retidas fossem removidas. As frações retidas foram eluídas através de gradiente linear de ACN (5-70%) em AF 0,1% a uma linearidade de 2% de ACN.min⁻¹. Após eluição das proteínas, as frações ainda adsorvidas foram recuperadas por eluição com ACN 90% contida em AF 0,1%. A cromatografia foi monitorada por absorvância a 216 nm, 280 nm e 620 nm.

A cromatografia de fase reversa descrita acima promoveu uma separação entre as cadeias α , β e o pigmento que compõe a lectina H-3. As três frações (α , β e λ), foram secas em concentrador de amostras LABCONCO e solubilizadas a uma concentração de $10\text{ }\mu\text{mol.}\mu\text{L}^{-1}$ em AF 0,1% e ACN 50%. Após centrifugação, as frações foram aplicadas separadamente em um espectrômetro de massas híbrido Synapt HDMS (Waters Corp.). O espectrômetro operou a uma voltagem de capilar de 3 kV e 40 V de voltagem de cone. A temperatura da fonte foi mantida em 373 K e nitrogênio foi usado como gás de dessolvatação (fluxo de 150 L.h^{-1}). Os dados foram adquiridos a um fluxo de $0,5\text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$ no intervalo de 500 a 2500 m/z a 2 scan.s^{-1} pelo uso do programa Mass Lynx 4.1. O equipamento foi calibrado com os fragmentos do íon de [Glu1] fibrinopeptídeo B. Os espectros de massas deconvoluídos foram obtidos por maximização da entropia usando a ferramenta Max Ent1.

H-3 teve sua massa molecular determinada, também, através da infusão direta da lectina sem preparo prévio por fase reversa. Para tal, a lectina foi solubilizada a uma

concentração de $10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ em acetato de amônio 25 mM. A aquisição seguiu-se com os parâmetros mantidos como descrito acima, com exceção da voltagem do capilar e temperatura da fonte que foram mantidos em 2,0 kV e 50 °C, respectivamente.

Os experimentos de fragmentação *Top Down-MS* foram conduzidos através da seleção de diversos íons precursores $[M + nH]^{n+}$ pelo quadrupolo e posterior aumento na energia de colisão para 20% utilizando argônio.

3.11 Determinação de grupos SH livres e pontes S-S de H-3, através de espectrometria de massas.

Para determinar o número de resíduos de Cys livres em H-3, a lectina ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi solubilizada em bicarbonato de amônio 25 mM (BA) contendo Iodoacetamida (IAA) 5mM ou 4-vinilpiridina (VP) 5mM e incubada por 45 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após centrifugação, a lectina foi submetida a experimentos de LC/MS. $2 \mu\text{L}$ da solução lectínica foram aplicados em uma nanocoluna cromatográfica C-18 ($0,075 \times 100 \text{ mm}$) acoplada a um sistema nanoAcquity (Waters Corp.). A coluna foi equilibrada com AF 0,1% e eluída com gradiente linear de ACN de 10% a 85%. Os eluatos foram diretamente infundidos numa fonte de *electrospray* de um espectrômetro de massas Synapt HDMS (Waters Corp). O espectrômetro de massas operou em modo positivo com temperatura da fonte de 373 K e voltagem de capilar de 3 kV. Os demais parâmetros do equipamento foram ajustados conforme descritos no item 3.10. O número de Cys livres foi determinado pelo uso da equação 3.1:

$$\text{Equação 1. } N_{\text{SH}} = (M_{\text{IA}} - M_{\text{NAT}})/57,05 \text{ ou } (M_{\text{VP}} - M_{\text{NAT}}/104,14)$$

Onde, M_{IA} é a massa da proteína não reduzida na presença de IAA, M_{VP} é a massa da proteína não reduzida na presença de VP, M_{NAT} é a massa da proteína nativa, 57,05 é o incremento de massa causado pela carboamidometilação de um grupo tiol e 104,14 é o incremento de massa causado pela etilpiridilação de um grupo tiol.

Para determinar o número de resíduos de Cys envolvidos em pontes S-S, H-3 ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) foi solubilizada em BA contendo ditioneitol (DTT) 1 mM e incubada por uma hora a 56 °C. Então, a solução lectínica foi acrescida de IAA 5 mM ou VP 5 mM e mantida ao abrigo da luz por 45 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação, a lectina foi

submetida à LC/MS como descrito acima nesta seção. O número de Cys envolvidas em pontes S-S foi determinado pelo uso da equação 3.2:

$$\text{Equação 2. } N_{\text{Cys}} = [(M_{\text{CM}} - M_{\text{IA}})/58,05] + N_{\text{SH}} \text{ ou } N_{\text{Cys}} = [(M_{\text{P}} - M_{\text{VP}})/105,04] + N_{\text{SH}}$$

Onde, M_{CM} é a massa da proteína reduzida e carbamidometilada e 58,05 é o incremento de massa devido a carbamidometilação de um resíduo de Cys, M_{P} é a massa da proteína reduzida e etilpiridilada, e 105,04 é o incremento de massa devido a etilpiridilação do grupo tiol que estava envolvido na formação da ponte de sulfeto antes da redução. Finalmente, o número de pontes S-S foi determinado pelo uso da equação 3.3:

$$\text{Equação 3. } N_{\text{S-S}} = (N_{\text{Cys}} - N_{\text{SH}})/2$$

Todos os valores foram considerados em Daltons (Da).

3.12 Deglicosilação e determinação da massa molecular de H-3 deglicosilada.

H-3 foi deglicosilada quimicamente pelo uso de NaOH como agente hidrolizante e NaBH_4 como agente redutor. A lectina (1 mg.mL^{-1}) foi solubilizada em solução de NaOH 87 mM contendo NaBH_4 1 M. A reação foi mantida a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h. Após este período, o tubo contendo a proteína deglicosilada foi centrifugado a $8000 \times g$ por 5 min. O pellet foi desprezado e ao sobrenadante foram adicionados 2 volumes de acetona gelada. A mistura foi novamente centrifugada e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi solubilizado em AF 0,1% e submetido a LC-MS como descrito no item 3.10.

3.13 Eletroforese e clivagens proteolíticas de H-3.

Para o sequenciamento de H-3, uma eletroforese em gel de poliacrilamida foi conduzida conforme descrito no item 3.6. No entanto, quando as enzimas Glu-C e Asp-N foram utilizadas, a solução de Bisacrilamida foi substituída por uma mistura contendo Bis e Etileno glicol diacrilato (EDA) a uma concentração final de 0,22% e $4,5 \times 10^{-3}\%$, respectivamente, protocolo adaptado de Bornemann e colaboradores (2010).

Após descoloração do gel, as bandas referentes à H-3 foram excisadas com auxílio de uma ponteira plástica e transferidas para tubos limpos. As bandas foram reduzidas,

alquilados e desidratados conforme descrito por Schevchenko e colaboradores (2006). Primeiro, as bandas foram desidratadas com 200 μL ACN. Após completa remoção da ACN, as bandas foram secas em um concentrador a vácuo (LABCONCO) e embebidos em 100 μL de bicarbonato de amônio 25 mM, contendo DTT 10 mM (BA/DTT). Após incubação por 45 minutos a 56 °C, a solução de BA/DTT foi removida e às bandas foi adicionada uma solução de 100 μL de bicarbonato de amônia 25 mM contendo iodoacetoamida (IAA) 55 mM (BA/IAA). As bandas foram mantidas por 60 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Então, a solução de BA/IAA foi removida e os “spots” foram embebidos em 100 μL bicarbonato de amônio 25 mM, contendo ACN 50 % (BA/ACN). Após 10 minutos sob agitação, o sobrenadante foi removido e uma nova solução de BA/ACN foi adicionada. Este procedimento foi repetido até que os spots tivessem sido completamente descorados. Finalmente, os “spots” foram desidratados com 100 μL de ACN 100 %, secados em concentrador e armazenados até o uso.

Os géis contendo EDA foram submetidos a dois passos adicionais. Primeiro, os spots foram tratados com NH_4OH 5 M por 2 horas a temperatura ambiente. Depois, a solução de NH_4OH 5 M foi removida e os spots foram lavados três vezes com BA/ACN. Por fim, os “spots” foram desidratados e secados como descrito acima.

3.14 Digestão *in situ* e extração de peptídeos de H-3.

Os “spots” de H-3 foram digeridos com as proteases tripsina, quimotripsina, Asp-N, Glu-C e pepsina. Para as digestões com tripsina, quimotripsina, Asp-N e Glu-C, os spots desidratados foram reidratados em solução de bicarbonato de amônio 25 mM (BA). As enzimas tripsina e quimotripsina foram adicionadas a uma proporção de 1:50 (enzima:substrato), já as enzimas Asp-N e Glu-C foram usadas a proporção de 1:100 (enzima:substrato). Quando pepsina foi usada, os spots foram reidratados em HCl 0,1M e a enzima foi adicionada a uma proporção de 1:50 (enzima:substrato). Todas as digestões foram mantidas a 37 °C por 16 horas.

Após o período de incubação, as digestões foram paradas com 2 μL de ácido fórmico 98% (AF). Para extração dos peptídeos, os spots foram embebidos em solução de AF 5% contendo ACN 50% (AF/ACN). Após 10 minutos sob agitação, o sobrenadante foi reservado em tubos limpos e uma nova solução de AF/ACN foi adicionada. Este procedimento foi repetido 4 vezes e então os spots foram desidratados com ACN 100%. Após

10 minutos, o sobrenadante foi reunido às demais extrações. Finalmente, a solução de peptídeos foi secada e solubilizada em AF 0,2%.

3.15 LC-MS/MS e sequenciamento de H-3 por espectrometria de massas sequencial.

As soluções contendo os peptídeos de H-3, gerados por digestão com diferentes proteases, foram injetados em um sistema nanoAcquity (Waters Corp) conectado a uma fonte de nano electrospray de um espectrômetro de massas híbrido (SYNAPT HDMS – Waters Corp). O espectrômetro foi calibrado na faixa de m/z 50 a 1600 com os fragmentos do íon de [Glu1]-fibrinopeptídeo B. O analito foi aplicado em uma coluna de fase reversa C18 (75 μ m x 100 mm) e os peptídeos foram eluídos através gradiente linear de 10% a 85% de ACN contendo AF 0,1%. O espectrômetro de massas 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 90 °C. 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⁺. O *lock mass* utilizado durante a coleta de dados foi o íon de m/z 785,84 de [Glu1]-fibrinopeptídeo B. Os íons selecionados foram fragmentados por CID (*Collision Induced Dissociation*), utilizando argônio como gás de fragmentação. Os espectros foram coletados e processados pelos programas MassLynx v4.1 e ProteinLynx v.2.4 (Waters Corp.). Os espectros de fragmentação CID foram interpretados manualmente pelo uso da ferramenta PepSeq.

3.16 Clonagem da cadeia α de H-3.

3.16.1 Extração de RNA

Espécimes da esponja *H. caerulea* foram coletados na praia do Pacheco, Caucaia, Ceará, e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. O material congelado foi armazenado em gelo seco e transportado até o laboratório.

A extração de RNA foi realizada com o kit para extração de RNA - *RNAspin Mini RNA isolation kit* (GE Healthcare). Toda a vidraria utilizada na extração de RNA foi previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). 30 mg de esponja congelada foram macerados usando pistilo e homogeneizado com 350 μ L do tampão de lise RA1 acrescido de

3,5 μL de β -mercaptoetanol. A mistura foi centrifugada e transferida para uma coluna de oligodT, seguindo o protocolo determinado pelo fabricante.

Ao fim do processo de purificação, o RNA total foi armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A concentração de RNA foi estimada mediante quantificação através de absorvância a 260 nm.

3.16.2 Eletroforese em gel de agarose.

Para análise da integridade do RNA purificado foi realizada uma eletroforese em gel de agarose (SAMBROOK *et al.*, 1989). O gel foi preparado utilizando agarose 2 % (p/v) diluída em solução de Tris-Borato-EDTA (TBE) 1x, a cuba foi preenchida com tampão de corrida e 5 μL de RNA acrescido de 2 μL de tampão de amostra foram aplicados. A corrida eletroforética foi realizada em 40 minutos e a tensão foi mantida constante em 60 V.

Ao fim da corrida eletroforética, o gel foi incubado durante 15 minutos em uma solução de brometo de etídio ($0,5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Após o período de incubação, as bandas foram visualizadas através de exposição do gel à iluminação ultravioleta utilizando um transluminador.

3.16.3 Síntese do DNA complementar

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado mediante reação da transcriptase reversa. A mistura da reação foi constituída de 12 μL de água tratada com DEPC (0,1% v/v); 10 μMol do oligonucleotídeo Qt (5'-CCA GTG AGC AGA GTG ACG AGG ACT CGA GCT CAA GCT T₁₆-3'); e 1 μg de RNA total. A reação foi incubada a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos e posteriormente mantida no gelo durante 5 minutos. Então, foram adicionados 4 μL de tampão 5X (*first strand* Promega), 2 μL de DTT 0,1 M, 1 μL de inibidor de ribonuclease (RNAsin 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Promega), 1 μL de dNTP (10 mM) e 200 unidades de transcriptase reversa (M-MLV RT- Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (RNase H Minus, Promega). O volume final foi ajustado, com H₂O tratada com DEPC, para 20 μL . A reação foi mantida a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1h, seguido por incubação a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos.

3.16.5 Amplificação do produto 3'RACE de H-3

O oligonucleotídeo iniciador (HAL-1) foi desenhado a partir da sequência DGPVET obtida por MS/MS na cadeia α de H-3 e presente na ORF codificadora da lectina putativa da esponja *Amphimedon queenslandica*.

Para a amplificação do cDNA foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR). A fita de cDNA foi usada como fita molde, HAL-1 foi utilizado como iniciador específico senso e Q₁ (GAG GAC TCG AGC TCA AGC) foi utilizado como iniciador antisenso. 1/10 da reação da transcriptase reversa foi utilizado para a reação de amplificação, além de 10 μ M dos iniciadores (HAL_1 e Q₀), uma unidade de Taq polimerase e 1 μ L de dNTPs (10 mM). A PCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação a 94 °C por 4 min, seguido de 30 ciclos de amplificação (94 °C durante 30 s, 50 °C durante 30 s e 72 °C por 30 s) e extensão a 72 °C durante 10 minutos.

O produto da amplificação foi reamplificado em uma *nested* PCR utilizando o primer Q₀ (CCA GTG AGC AGA GTG ACG), nas mesmas condições da PCR descrita acima.

Todos os produtos de PCR foram avaliados quanto ao tamanho e integridade por eletroforese em gel de agarose (1,2%).

3.16.6 Ligação do produto de amplificação ao vetor pGEM-T-easy

O fragmento amplificado, aproximadamente 500 pares de base (pb), foi ligado ao vetor *pGEM-T easy*. A reação de ligação foi preparada contendo 5 unidades da enzima T4 DNA ligase, 5 μ L de tampão de ligação (2x concentrado), 50 ng do vetor *pGEM-T-easy* (PROMEGA) e 12,5 ng de inserto, respeitando a proporção de 1:3 vetor/inserto.

3.16.7 Transformação de células competentes.

Placas de LB ágar contendo DH5 α foram utilizadas para o processo de transformação bacteriana. Uma colônia de DH5 α foi transferida para um tubo contendo 200 μ L de 100 μ M CaCl₂ e 10 μ L da reação de ligação. As células foram incubadas no gelo por 30 min, depois mantidos em banho-maria aquecido a 42 °C por 2 min e novamente mantidos em gelo por mais 2 min. Em seguida, 1 mL de meio SOC foi adicionado as bactérias transformadas e o cultivo foi mantido a 37 °C por 1 h, sob agitação branda de 100 rpm.

Para avaliação da transformação, 200 μL de cultivo foram semeados em meio sólido SOB ágar contendo ampicilina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), 0,5 mM de IPTG e $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de X-Gal e incubada a 37°C por 16 horas.

Os clones positivos (brancos) foram isolados da placa, crescidos em LB broth a 37°C por 16 horas, estocados em glicerol e uma fração foi submetidos a PCR.

3.16.8 Purificação dos plasmídeos recombinantes e análise da sequencia do fragmento.

Os clones que tiveram a presença de inserto confirmada por PCR foram inoculados, a partir do estoque em glicerol, em meio LB líquido contendo ampicilina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e incubados por 16 h a 37°C sob agitação de 100 rpm.

Os plasmídeos contendo o inserto foram extraídos e purificados seguindo as recomendações do fabricante (QIAGEN).

Os plasmídeos foram sequenciados em sequenciador automático MegaBACE (GE Healthcare). Os oligonucleotídeos iniciadores usados foram T7 *promoter* senso e SP6 *promoter* anti senso, que flanqueiam a região de inserção. As *contigs* referentes ao inserto foram analisadas com o auxílio do programa Phred-Phrap-Consed (EWING *et al.*, 1998).

2.17 Análises de bioinformática

Os parâmetros físico químicos de H-3 foram estimados pela ferramenta ProtParam da plataforma Expasy (<http://expasy.org/>). Sequencias em *tandem* dentro da estrutura primária de H-3 foram identificadas pela ferramenta RADAR (HEGER; HOLM, 2000).

Utilizando o tBLASTn, peptídeos sequenciados de H-3 foram comparados com fragmentos do genoma da esponja *Amphimedon queenslandica* ([ACUQ000000000](#)). Os peptídeos de H-3 apresentaram similaridade com o fragmento genômico 7463. Portanto, o fragmento 7463 foi selecionado e foi realizada uma predição gênica utilizando o programa GeneMark (LOMSADZE *et al.*, 2005) e o conjunto de treinamento do genoma de *Caenorhabditis elegans*.

O GeneMark indicou 14 prováveis genes dentro do fragmento 7463. Para selecionar entre os prováveis genes foi montado um banco BLAST local e foram realizadas buscas usando os peptídeos como *query*. Os melhores alinhamentos e valores de *e-value* foram observados para os genes 5 e 6. De posse destes dois possíveis genes, seus respectivos intróns foram removidos e os mRNA 5 e 6 foram preditos. De acordo com os resultados dos

alinhamentos, o mRNA 5 corresponde a cadeia β de H-3 ortóloga em *A. queenslandica* e o mRNA 6 corresponde a cadeia α de H-3 ortóloga em *A. queenslandica*.

O peptídeo sinal da lectina putativa de *A. queenslandica* (pAqL) foi estimado pelo uso do programa SignalP 4.0 Server (PETERSEN *et al.*, 2011). Alinhamentos entre as sequências de aminoácidos de H-3 e pAqL foram realizados pelo uso dos programas MultAlin (CORPET, 1988) e EsPript 2.2 (GOUET *et al.*, 1999).

2.18 Cristalização de H-3.

Para os ensaios preliminares de cristalização, H-3 foi solubilizada a 10 mg.mL^{-1} em H_2O deionizada e em 5 mM de GalNAc sendo empregado o método da matriz esparsa (JANCARIK; KIM, 1991), utilizando os kits de cristalização I e II da Hampton Research.

O *screen* de cristalização para a lectina H-3 foi conduzido mediante a utilização de um robô de cristalização modelo Mosquito®. Gotas de 200 nL foram preparadas a partir da solução de poço e da solução da lectina na proporção de 1:1. As gotas foram montadas sobre uma superfície plástica e esta foi selada sobre uma placa de microtitulação de 96 poços. Cada poço foi preenchido com 200 μL de uma solução de cristalização contida nos kits I e II da Hampton Research. Após montagem, as placas foram mantidas a temperatura de 20 °C.

Após os ensaios de *screen*, foram obtidos cristais em apenas uma condição (condição 17 do kit I). Esta condição foi otimizada, onde leves modificações no pH das soluções e concentração e força iônica dos agentes precipitantes foram realizadas.

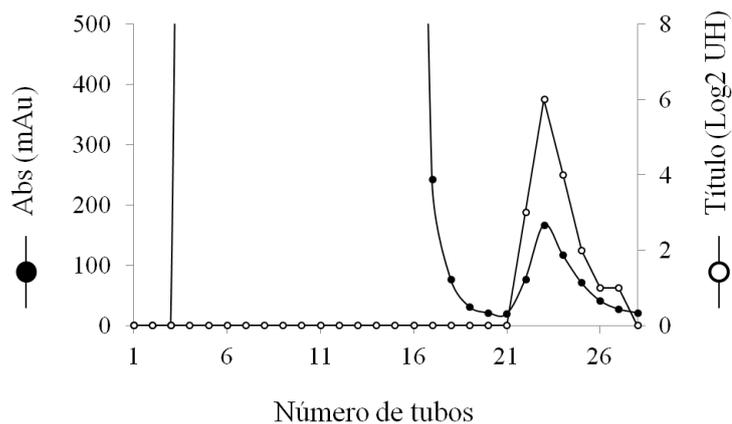
Para os experimentos de otimização foram utilizadas placas de Limbro® (Hampton research, Califórnia, EUA) de 24 poços. Para o preparo das gotas foram utilizados volumes iguais de solução de poço e de solução de proteína (2 uL de cada). As gotas foram montadas sobre lamínulas e vedadas nas placas com graxa de silicone contra 300 uL da solução do poço. Após montagem das placas, as mesmas foram mantidas em repouso à temperatura de 20 °C.

4. RESULTADOS

4.1 Purificação das lectinas

Três lectinas da esponja marinha *H. caerulea* foram purificadas por cromatografia de afinidade em Estroma-Sephadex (H-1), cromatografia de troca catônica e aniônica (H-2), e cromatografia de interação hidrofóbica e troca iônica (H-3). Para purificação de H-1, o extrato bruto foi carregado em matriz de Estroma-Sephadex e a lectina foi recuperada com alto grau de pureza após eluição das proteínas retidas com NH_4OH (FIGURA 14). H-1 foi purificada 242 vezes a partir do extrato bruto, representando 24% da atividade específica total do extrato (TABELA 2).

Figura 14 - Cromatografia de afinidade em Estroma-Sephadex.



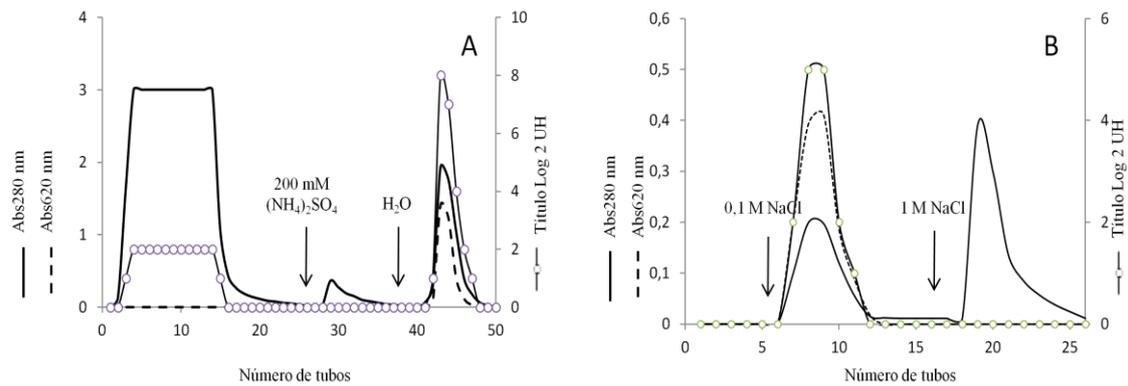
A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,5 contendo NaCl 500 mM. A cromatografia foi conduzida a um fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e frações de 3 mL foram coletadas. As frações retidas foram recuperadas com NH_4OH 0,3 %.

O PI-Estroma, após diálise, apresentou atividade hemaglutinante para eritrócitos de coelho nativo, revelando a presença de uma segunda lectina. H-2 foi purificada conforme descrito por Carneiro (2011). H-2 foi purificada 194 vezes a partir do PI-Estroma e representou 40% da atividade específica total do extrato.

H-1 e H-2 representam juntas 64% da atividade específica total do extrato bruto de *H. caerulea*. Não obstante, o PI-CM apresentou atividade hemaglutinante para eritrócitos humanos do tipo B tratados com tripsina. Após enriquecimento do PI-CM com sulfato de amônio 500 mM, esta fração foi utilizada para purificar H-3 em dois passos cromatográficos. Primeiro, o PI-CM foi submetido à cromatografia de interação hidrofóbica (FIGURA 15 A),

onde as frações retidas eluídas com H₂O destilada concentraram a atividade hemaglutinante, além disso, estas frações apresentaram pigmentação azul, com pico de absorção a 620 nm. O passo seguinte de purificação foi realizado em DEAE-Sephadex (FIGURA 15 B), onde as frações eluídas com 100 mM de NaCl concentraram a atividade hemaglutinante e a absorção a 620 nm.

Figura 15 - Cromatografias de interação hidrofóbica em fenil-Sepharse e troca iônica.



A. Fenil Sepharose 4B. A coluna foi equilibrada e lavada com tampão acetato 50 mM pH 5,5 contendo (NH₄)₂SO₄ 500 mM. A cromatografia foi conduzida a um fluxo de 2 mL.min⁻¹ e frações de 3 mL foram coletadas. As proteínas retidas foram eluídas com tampão acetato 50 mM pH 5,5 contendo (NH₄)₂SO₄ 200 mM e posteriormente com H₂O destilada. **B. DEAE Sephadex.** A coluna foi equilibrada e lavada com Tris-HCl 50 mM pH 7,6. A cromatografia foi conduzida a um fluxo de 2 mL.min⁻¹ e frações de 2 mL foram coletadas. As proteínas retidas foram recuperadas com o tampão de equilíbrio acrescido de 100 mM e 1M de NaCl.

H-3 foi purificada 10 vezes a partir do PI-CM e representou 21% da atividade específica total do extrato bruto (TABELA 2). H-3 foi a lectina mais abundante do extrato, correspondendo a aproximadamente 2% das proteínas totais solúveis, enquanto que H-1 e H-2 representam 0,08% e 0,2% das proteínas totais solúveis, respectivamente (TABELA 2).

4.2 Atividade hemaglutinante e inibição.

A tabela 3 apresenta os resultados da inibição da atividade hemaglutinante de H-1 e H-3. H-1 foi capaz de aglutinar todos os eritrócitos testados apresentando uma leve preferência para eritrócitos humanos tratados com tripsina. Nenhum dos carboidratos e glicoproteínas testados inibiram a atividade hemaglutinante de H-2.

Tabela 2 - Purificação das Halilectinas*.

Fração	Volume (mL)	[Proteína] (mg.mL ⁻¹)	P Total (mg)	Título (UH.mL ⁻¹)	Atividade total (UH)	A.específica (UH.mg ⁻¹)	Rendimento em UH (%)	Rendimento em Prot (%)	Purificação (X)	MAC# (µg.mL ⁻¹)
Extrato bruto	100	1,22	122	8	800	6,6	100	100	1	152,5
PII-Estroma (H-1)	6	0,02	0,12	32	192	1600	24	0,1	242	0,62
PI-Estroma	140	0,63	88,2	4	560	6,3	70	72,3	0,95	157,5
PII-CM	43	0,03	1,3	8	344	266,7	43	1,1	40	3,75
F DEAE (H-2)	5	0,05	0,25	64	320	1280	40	0,1	194	0,78
PI-CM	168	0,45	75,6	2	336	4,4	42	61,9	0,7	250
PI-CM + (NH₄)₂SO₄	160	0,17	27,2	2	320	11,8	40	22,3	1,8	85
PH₂O-HIC	18	0,38	6,8	16	288	42,1	36	5,6	6,4	16,4
P-II DEAE (H-3)	42	0,06	2,5	4	168	66,7	21	2,0	10	15

* Todas as atividades foram realizadas usando sangue humano do tipo A tratado com tripsina.

Mínima concentração capaz de causar hemaglutinação.

H-3 somente apresentou atividade hemaglutinante para eritrócitos humanos do tipo A e B tratados com tripsina. A atividade foi inibida por GalNAc (12,5 mM), carragenana (2,5 mg.mL⁻¹) e PSM (0,165 mg.mL⁻¹) (TABELA 3).

Tabela 3 - Inibição da atividade hemaglutinante de H-1 e H-3.

Carboidratos	H-1 (MIC*)	H-3 (MIC)
Galactose	-	-
Glicose	-	-
Manose	-	-
Fucose	-	-
Metil-Galactopiranosídeo	-	-
Metil-Glicopiranosídeo	-	-
GalNAc	-	12,5 mM
GlcNAc	-	-
Sacarose	-	-
Lactose	-	-
Lactulose	-	-
Frutose	-	-
Carragenana	-	2,5 mg.ml ⁻¹
Fucoídano	-	-
Glicoproteínas		
PSM	-	0,165 mg.ml ⁻¹
Tiroglobulina	-	-
Ovomucóide	-	-
Orosomucóide	-	-

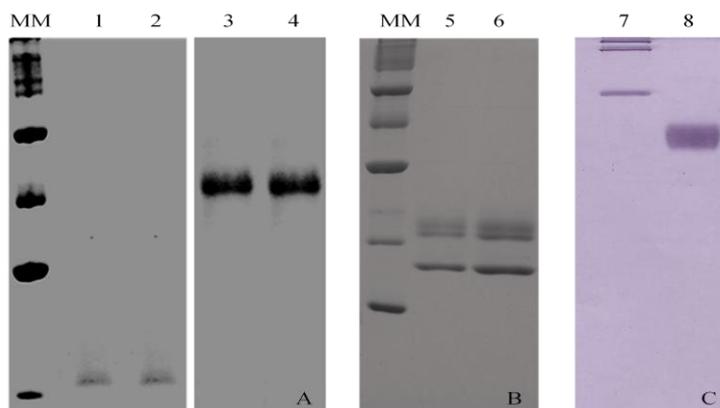
* Mínima concentração capaz de causar inibição.

4.3 Caracterização físicoquímica de H-1 e H-3

A massa molecular relativa das lectinas foi estimada por SDS-PAGE, PAGE nativo e cromatografia de exclusão molecular.

Em SDS-PAGE, H-1 apresenta-se como uma única banda de 40 kDa, na presença e ausência de 2-mercaptoetanol (FIGURA 16 A). Por outro lado, H-3 mostrou-se como uma proteína heterogênea, apresentando três bandas eletroforéticas com massas moleculares relativas de 18, 16 e 9 kDa, na presença e ausência de 2-mercaptoetanol (FIGURA 16 B). Entretanto, em PAGE nativo H-3 apresenta-se como uma única e larga banda de aproximadamente 40 kDa (FIGURA 16 C).

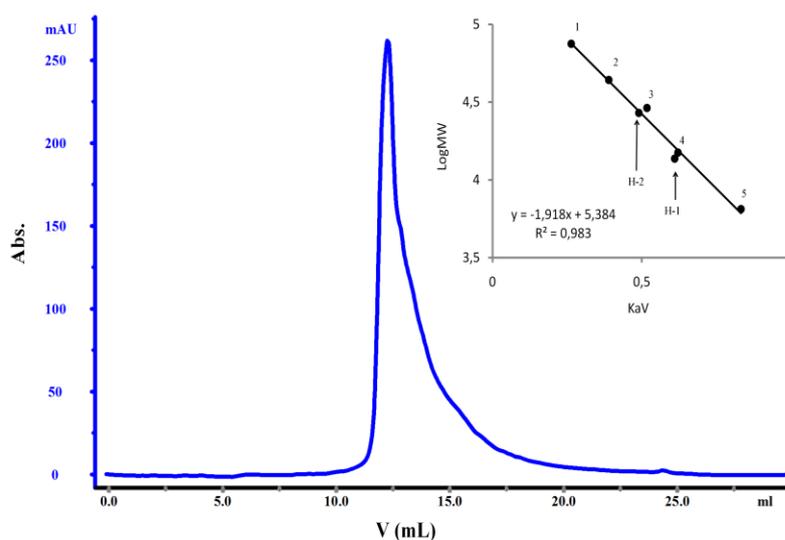
Figura 16 - Eletroforese das Halilectinas purificadas em gel de poliacrilamida.



A. SDS-PAGE 12 %. Foram aplicados 20 μ g de proteína em cada poço. Linha MM, marcadores de massa molecular (fosforilase B 97 000, BSA 66 000, ovoalbumina 45 000, anidrase carbônica 29 000, ovomucóide 21 000, ribonuclease 13 700 e aprotinina 6 500). 1) H-2. 2) H-2 reduzida. 3) H-1. 4) H-1 reduzida. **B. SDS-PAGE 15 %.** Foram aplicados 20 μ g de proteína. Linha MM, marcadores de peso molecular. 5) H-3 reduzida. 6) H-3. **C. PAGE 15%.** Foram aplicados 40 μ g de H-3. 7) BSA 67 000. 8) H-3.

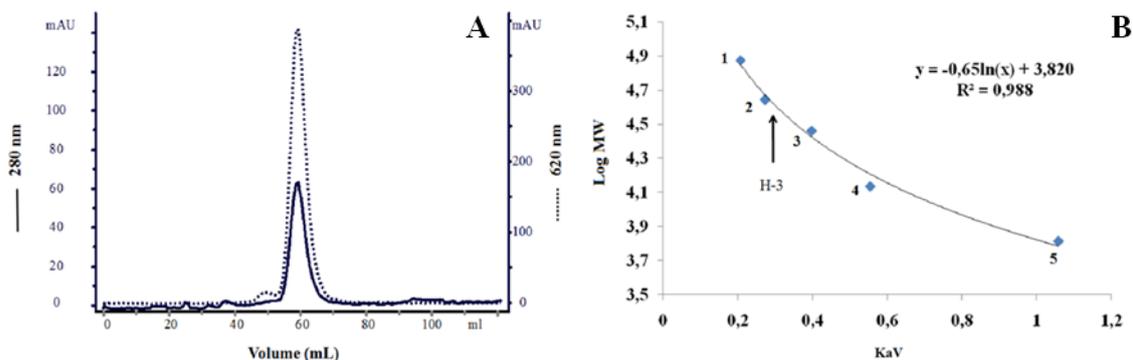
Em cromatografia de exclusão molecular usando matriz TSK G3000SWXL, H-1 se comportou de maneira anômala, apresentando massa estimada de 15 kDa (FIGURA 17). Em matriz Sephacryl S-200 HR 16/60, H-3 apresenta-se como um único pico simétrico de massa molecular estimada em 40 kDa. Nesta cromatografia, o pico de absorção a 280 nm, característico de proteína, é acompanhado pelo pico de absorção a 620 nm, revelando a ligação entre H-3 e uma molécula pigmento (FIGURA 18).

Figura 17 - Cromatografia de exclusão molecular em matriz TSK G3000SWXL.



A matriz foi equilibrada e a cromatografia foi conduzida em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo NaCl 500 mM. Foi aplicado 1 mg de H-1 purificada. **Adendo.** Curva de calibração da coluna TSK G3000SWXL.

Figura 18 - Cromatografia de exclusão molecular em matriz Sephacryl S-200 HR

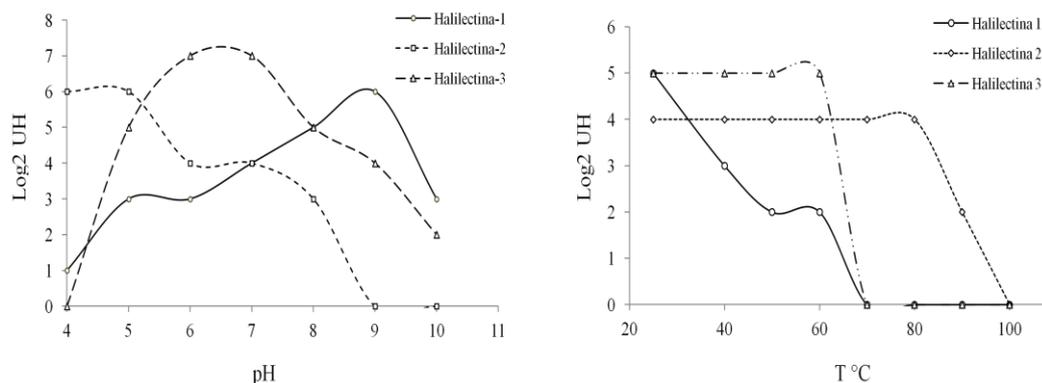


A) Perfil cromatográfico de H-3 em gel filtração. A matriz foi equilibrada e a cromatografia foi conduzida em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, contendo NaCl 500 mM. Foram aplicados 2 mg de H-3 purificada. **B)** Curva de calibração da coluna Sephacryl S-200 HR 16/60.

O efeito do pH sobre a atividade das lectinas foi avaliado mediante incubação das lectinas em diferentes pH e posterior teste de atividade hemaglutinante (FIGURA 19A). A atividade de H-1 foi máxima em pH básico, em pH ácido a atividade é diminuída, sendo mínima a pH 4. Por outro lado, a atividade de H-3 foi estável em pH neutro, fora dessa faixa a atividade cai e é completamente abolida em pH 4.

O efeito da temperatura sobre a atividade das lectinas foi avaliada pela incubação das mesmas em diferentes temperaturas e posterior teste de atividade hemaglutinante (FIGURA 19 B). A atividade de H-1 foi sensível a variações de temperatura, a 40 °C sua atividade foi reduzida a 25% e a 70 °C foi completamente abolida. H-3 mostrou-se um pouco menos sensível, mantendo sua atividade inalterada a 60 °C, no entanto, a atividade de H-3 foi também abolida a 70 °C.

Figura 19 - Efeito do pH e temperatura sobre a atividade das Halilectinas.

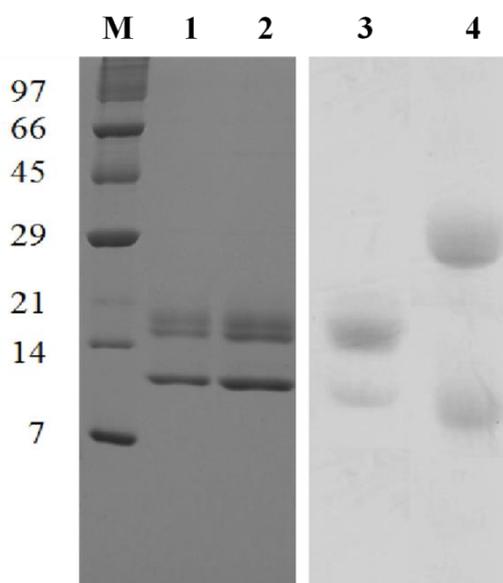


A. As lectinas foram incubadas em diferentes pH e a atividade hemaglutinante foi mensurada. **B.** As lectinas foram incubadas em diferentes temperaturas por 1 hora e a atividade foi mensurada.

A atividade hemaglutinante de ambas as lectinas não foi afetada pela presença de EDTA, Ca^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} , sugerindo que H-1 e H-3 não dependem de íons divalentes para efetivar suas atividades.

O método do fenol-ácido sulfúrico apontou que ambas as lectinas são glicoproteínas, revelando um teor de 8,2% de carboidratos neutros para H-1 e 2,3% para H-3. A natureza glicoprotéica de H-3 foi atestada ainda pela coloração com o ácido periódico de Schiff (FIGURA 20).

Figura 20 - SDS-PAGE de H-3 corada com ácido periódico de Schiff.

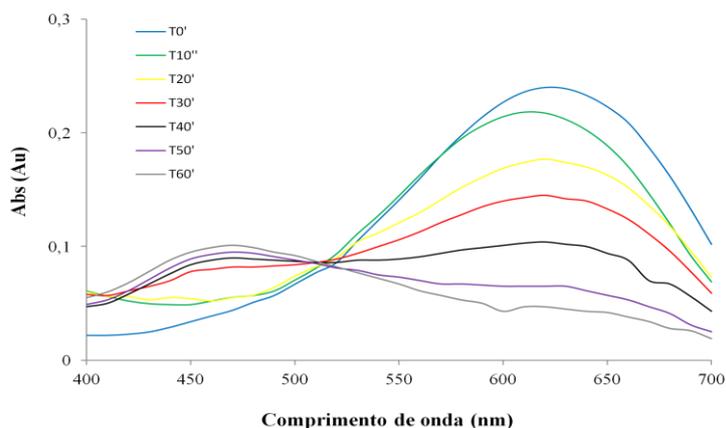


Linha MM. Marcador de massa molecular. 1) H-3 corada com Coomassie Blue Brillant. 2) H-3 na presença de β Mercaptoetanol. 3) H-3 corada com PAS 4) Lectina de *Lutzalburgia auriculata*.

O ensaio para determinação da absorção máxima de H-3 revelou um comportamento incomum. Na faixa de luz visível, H-3 apresentou absorção máxima a 620 nm, o que indica que esta lectina é uma proteína pigmento de coloração azul. Após aquecimento de H-3 a 100 °C por tempo variado notou-se que a pigmentação variou de azul para vermelho e a absorção máxima, antes fixa em 620 nm, chegou a 460 nm (FIGURA 21).

O efeito de SDS, EDTA, cloridrato de guanidina, NaOH e 2-mercaptoetanol sobre a absorção de H-3 também foi avaliado. Dentre os agentes citados, somente NaOH, a uma concentração de 100 mM, teve efeito semelhante ao aquecimento da lectina a 100 °C por 60 minutos. Os demais agentes não afetaram a absorção de H-3.

Figura 21 - Espectro de absorção de H-3 na faixa do visível.



A lectina foi incubada a 100 °C por tempo variando de 0 a 60 minutos e a absorção máxima foi determinada.

4.4 Toxicidade de Halilectinas contra náuplios de *Artemia*

Os valores de LC_{50} das lectinas apresentaram diferenças significativas, sugerindo níveis distintos de toxicidade para as três lectinas. Os náuplios tratados com H-1 apresentaram elevados níveis de mortalidade em todas as concentrações testadas (70, 80, 97 e 97% para 12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente). Os náuplios tratados com H-2 exibiram mortalidade moderada (10, 23, 20 e 37% para 12,5, 25, 50, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente). Os náuplios tratados com H-3 mostraram-se pouco afetados pelas concentrações usadas, apresentando baixos níveis de mortalidade (7, 10, 10 e 13% para 12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente). Os valores de LC_{50} foram de 6,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\pm 4,9$) para H-1, 142,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\pm 15,8$) para H-2 e 414,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\pm 42,5$) para H-3.

4.5 Atividade antimicrobiana e aglutinação de bactérias

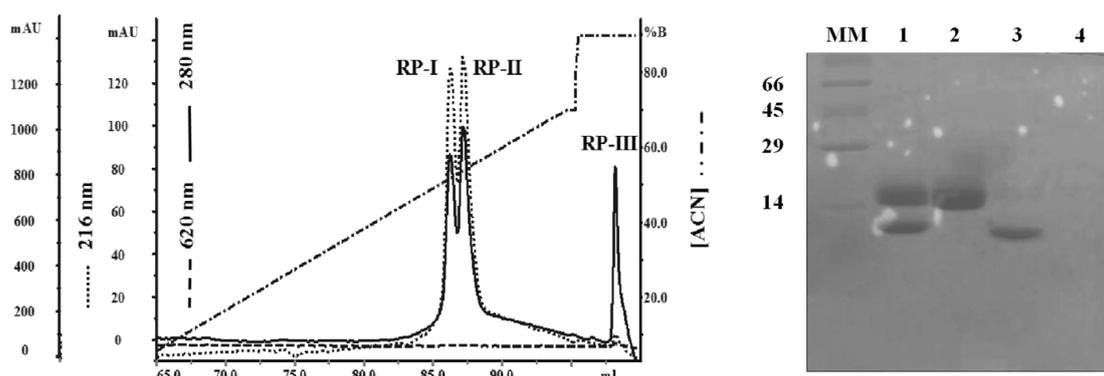
H-3 não apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias testadas (*E. coli* e *S. aureus*), uma vez que não foram observados halos de inibição nos discos incubados com H-3. H-3 não foi capaz de aglutinar nenhuma das bactérias testadas (dados não mostrados).

4.6 Cromatografia de fase reversa, determinação da massa molecular por espectrometria de massas e fragmentação top down de H-3.

A cromatografia de fase reversa em coluna Sephasil C-8 promoveu separação parcial entre as cadeias de H-3 e a porção pigmento (FIGURA 22). Como resultados desta separação foram obtidos três frações (RP-PI, RP-P-II, RP-P-III) com diferentes tempos de retenção.

A avaliação das frações da fase reversa por SDS PAGE (FIGURA 22) revelou que a fração RP-PI corresponde a cadeia de 9 kDa, denominada cadeia β , a fração RP-P-II corresponde a mistura entre as cadeias de 16 e 18 kDa, cadeias α e α' respectivamente, e a fração RP-P-III não pôde ser observada, sugerindo o baixo peso molecular e/ou a constituição não proteica desta fração.

Figura 22 - Cromatografia de fase reversa em coluna Sephasil C-8.

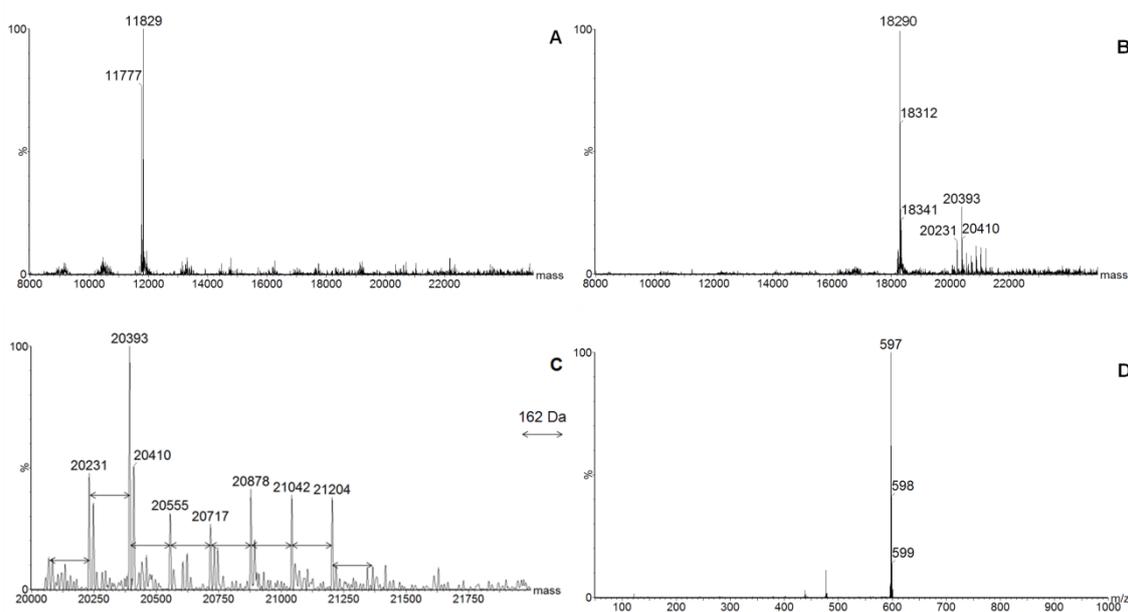


A coluna foi equilibrada com AF 0,1% e ACN 5%. A eluição deu-se por gradiente linear de ACN. 1mg de H-3 purificada foi aplicado. SDS-PAGE 15%. Linhas: 1) H-3. 2) RP-P-II, cadeias α e α' . 3) RP-PI, cadeia β . 4) RP-P-III.

A avaliação das frações por MS revelou que a cadeia β é composta por uma mistura de isoformas, destacando-se os íons de massas moleculares 11.755 ± 2 Da e 11.828 ± 2 Da (FIGURA 23 A). Por outro lado, a fração RP-P-II (FIGURA 23 B) apresentou dois íons principais de massas bem distintas: a cadeia α , o íon mais intenso, apresentou massa molecular de 18.290 ± 2 Da, com pequenas flutuações em torno desse valor devido à presença de isoformas e/ou aductos, e a cadeia α' com massa molecular de 20.393 ± 2 Da, com vários íons posteriores com acréscimos de massa de 162 Da (um resíduo de hexose), sugerindo a presença de glicofomas nesta cadeia (FIGURA 23 C).

Foram observados ainda na cadeia α' íons adjacentes com acréscimos de massa de 17 Da, sendo estes íons característicos de perdas neutras por parte de carboidratos. Além disso, o RP-PIII também foi avaliado. Esta fração, composta por uma molécula de caráter não proteico, pois não apresentou absorção a 216 nm, apresentou massa molecular de 597 ± 2 Da (FIGURA 23 D).

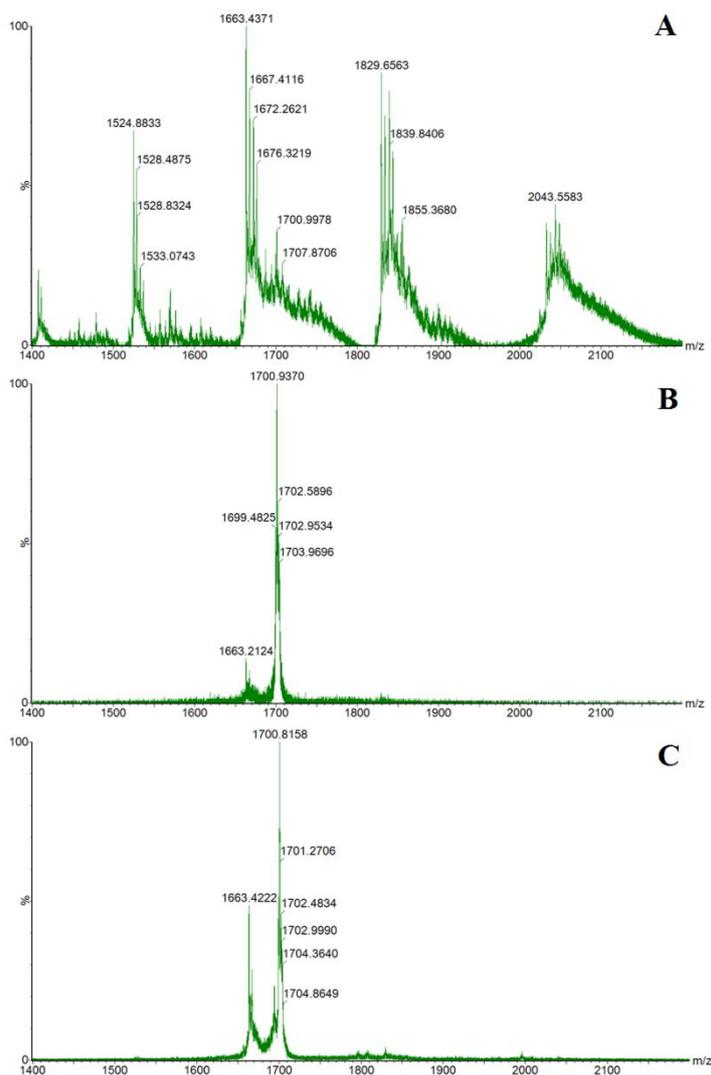
Figura 23 – ESI/MS das frações da cromatografia de fase reversa em Sephasil C8.



As frações foram separadas em coluna Sephasil e infundidas separadamente em um espectrômetro de massas Synapt HDMS. **A)** Espectro deconvoluído da fração RP-PI. **B)** Espectro deconvoluído da fração RP-PII. **C)** Cadeia α' em detalhe. **D)** Espectro monocarregado da fração RP-PIII.

A fim de avaliar o caráter glicoproteico da cadeia α' e visando determinar a massa e a possível constituição do glicano, o íon precursor $[M + 12H]^{12+}$ de m/z 1700,9219 da cadeia α' , foi selecionado e fragmentado. Interessantemente, o íon resultante de m/z 1663,4371, corresponde ao $[M + 12H]^{12+}$ da cadeia α . Esse resultado sugere que a cadeia α' é a forma glicosilada da cadeia α , revelando um acréscimo de 2.098 Da + 17 Da de uma possível perda neutra (FIGURA 24). Quando o íon precursor $[M + 12H]^{12+}$ de m/z 1663,4371, da cadeia α foi selecionado e fragmentado não foi observada formação de íons de massa menor, exceto a perda de sinal do precursor devido à desestabilização do mesmo.

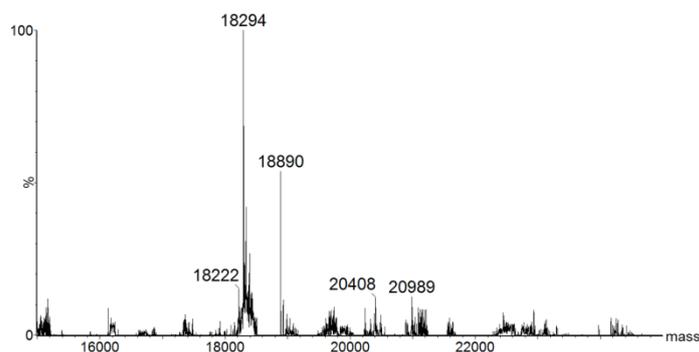
Figura 24 - Fragmentação-Top Down-MS da cadeia α '.



A) Espectro de massa da fração RP-PII. B) $[M + 12H]^{12+}$ de m/z 1700, 9219 filtrado. C) Íon $[M + 12H]^{12+}$ de m/z 1700,9219 fragmentado com gás argônio.

Quando H-3 foi infundida diretamente no espectrômetro de massas, sem preparo prévio por cromatografia de fase reversa, a cadeia α suprimiu as demais cadeias (FIGURA 25). Assim só foi possível determinar a massa molecular da própria cadeia α . Entretanto, além da cadeia α (18.293 ± 2 Da), foi possível notar um segundo íon de massa molecular superior (18.891 ± 2 Da).

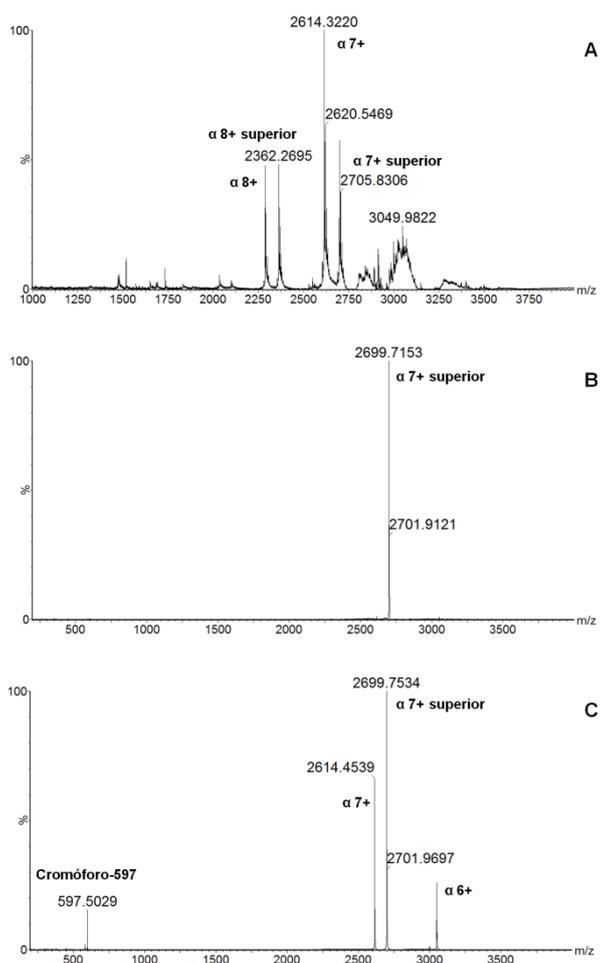
Figura 25 - Espectro de massas deconvolvido da cadeia α .



H-3 foi solubilizada em acetato de amônio 25 mM a uma concentração de 10 pmol. μL^{-1} . Após centrifugação, a solução foi infundida diretamente no espectrômetro de massas.

Objetivando identificar o que seria o íon de massa 18.890 \pm 2 Da, o mesmo foi submetido a experimentos de *Top Down* (FIGURA 26).

Figura 26 - Top Down do íon 18.890 \pm 2 Da.



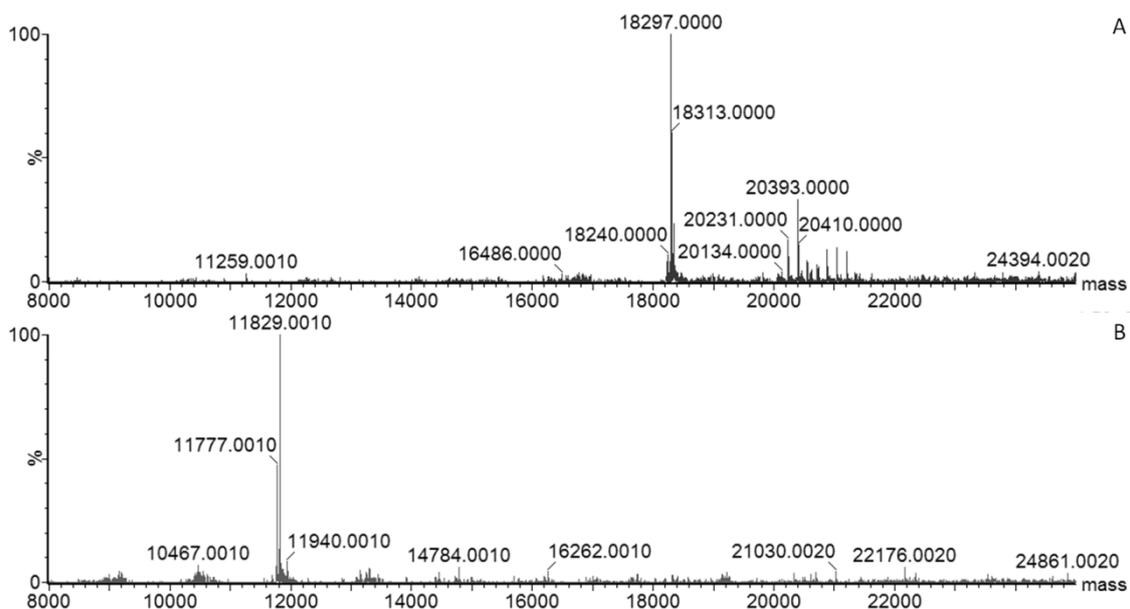
A) Espectro multicarregado de H-3. B) Íon $[\text{M} + 7\text{H}]^{7+}$ de m/z 2699.7725 filtrado. B) Íon $[\text{M} + 7\text{H}]^{7+}$ de m/z 2699.7725 fragmentado com gás argônio.

Para tal, o íon precursor $[M + 7H]^{7+}$ de m/z 2699,7153, correspondente á molécula de 18891 ± 2 Da, foi filtrado e fragmentado. Curiosamente, os íons resultantes, de m/z 2614,4539 e de m/z 597,5029 Da, correspondem a $[M + 7H]^{7+}_{z=7}$ da cadeia α e $[M + 1H]^{1+}$ da molécula de pigmento, denominado cromóforo-597. Sendo assim, os resultados de *Top Down* sugerem que o cromóforo-597 interage com a cadeia α para formar um complexo de massa molecular 18.891 ± 2 Da.

4.7 Determinação de grupos SH livres e pontes dissulfeto de H-3

A incubação de H-3 com os agentes alquilantes (IAA e VP), sem utilização prévia de agentes redutores, e posterior avaliação por MS não resultou em acréscimo de massa, indicando a ausência de Cys livres em H-3 (FIGURA 27 A, 27 B).

Figura 27 - Espectro de massa das cadeias de H-3 após tratamento com IAA.



H-3 foi alquilada sob condições desnaturantes, porém não redutoras. **A.** Cadeias α e α' após alquilação com IAA sem preparo prévio com agentes redutores. **B.** Cadeia β após alquilação com IAA sem preparo prévio com agentes redutores.

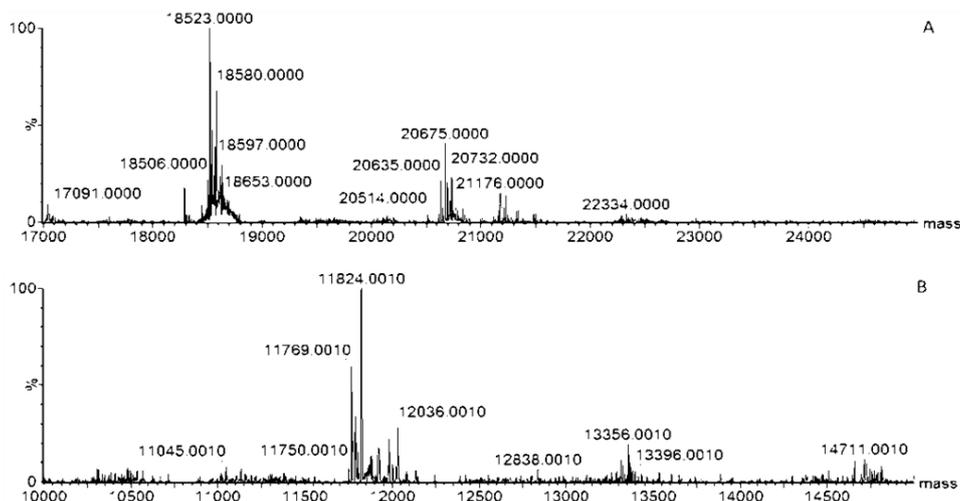
A incubação de H-3 com os agentes alquilantes após preparo prévio da amostra com DTT e posterior análise por LC/MS, revelou a presença de Cys envolvidas em pontes S-S.

As cadeias α e α' após tratamento com DTT e IAA apresentaram massas moleculares de 18.523 ± 2 Da e 20.635 ± 2 Da, respectivamente. O incremento de massa

para a cadeia α foi de 233 Da, equivalente aproximado de 4 resíduos de Cys carboxiamidometilados ($4 \times 57 = 228$ Da). O incremento de massa da cadeia α' foi de 243 Da, revelando que, além de 4 Cys carboxiamidometiladas (228 Da), houve a oxidação de uma Metionina (incremento de 16 Da) devido a redução e alquilação da amostra (FIGURA 28 A). As cadeias α e α' , após tratamento com DTT e VP, apresentaram incrementos de massa que confirmam a presença de 4 Cys em ambas as cadeias (dados não mostrados).

A cadeia β após tratamento com DTT e VP apresentou massa molecular de 12.036 ± 2 Da. O incremento de massa foi de 208 Da, equivalente aproximado de 2 resíduos de Cys piridiletilados (2×105 Da) (FIGURA 28 B).

Figura 28 - Cadeias de H-3 reduzidas e alquiladas.



A. Espectro de massa das cadeias α e α' após redução e alquilação. A lectina foi reduzida com DTT, alquilada com IAA e submetida a LC-MS. **B.** Espectro de massa da cadeia β após redução e alquilação. A lectina foi reduzida com DTT, alquilada com VP e submetida a LC-MS

Os resultados supracitados indicam que todos os resíduos de Cys presentes em H-3 estão envolvidos em pontes de sulfeto intracadeia. As cadeias α e α' apresentam 2 pontes S-S (4 Cys) e a cadeia β apresenta 1 ponte S-S (2 Cys).

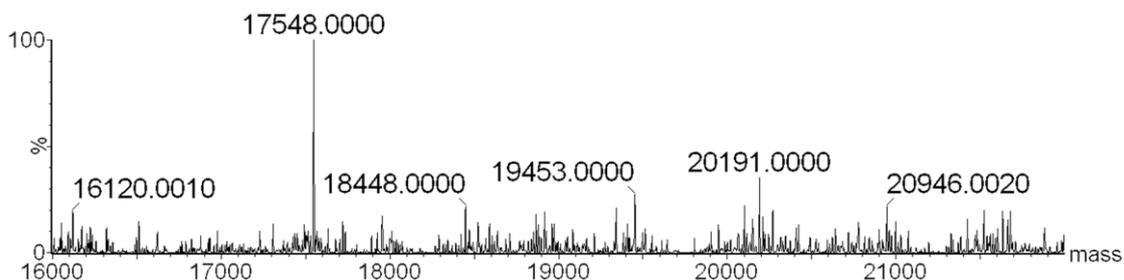
4.8 Deglicosilação e determinação da massa molecular de α H-3 deglicosilada

A cadeia α' de H-3 foi eficientemente deglicosilada pelo uso de NaOH e NaBH₄. No entanto, a proteína deglicosilada não apresentou massa de 18.291 ± 2 Da como previsto no ensaio de *Top Down*. α H-3 em sua forma deglicosilada apresentou massa de 17.548 ± 2 Da, cerca de 740 Da menor que a cadeia α , sugerindo que a massa

de 18.291 ± 2 Da, referente a própria cadeia α , trata-se de uma forma ainda glicosilada (FIGURA 29).

Após a deglicosilação química, as formas resultantes são, na verdade, uma mistura de proteínas completamente deglicosiladas e proteínas parcialmente glicosiladas. A identificação destas formas e a diferença de massa entre elas permitem a determinação, ou pelo menos, a estimativa da composição e sequencia do glicano. Valendo-se disso, a composição do glicano de α H-3 foi determinada.

Figura 29- Espectro de massas da cadeia α deglicosilada.



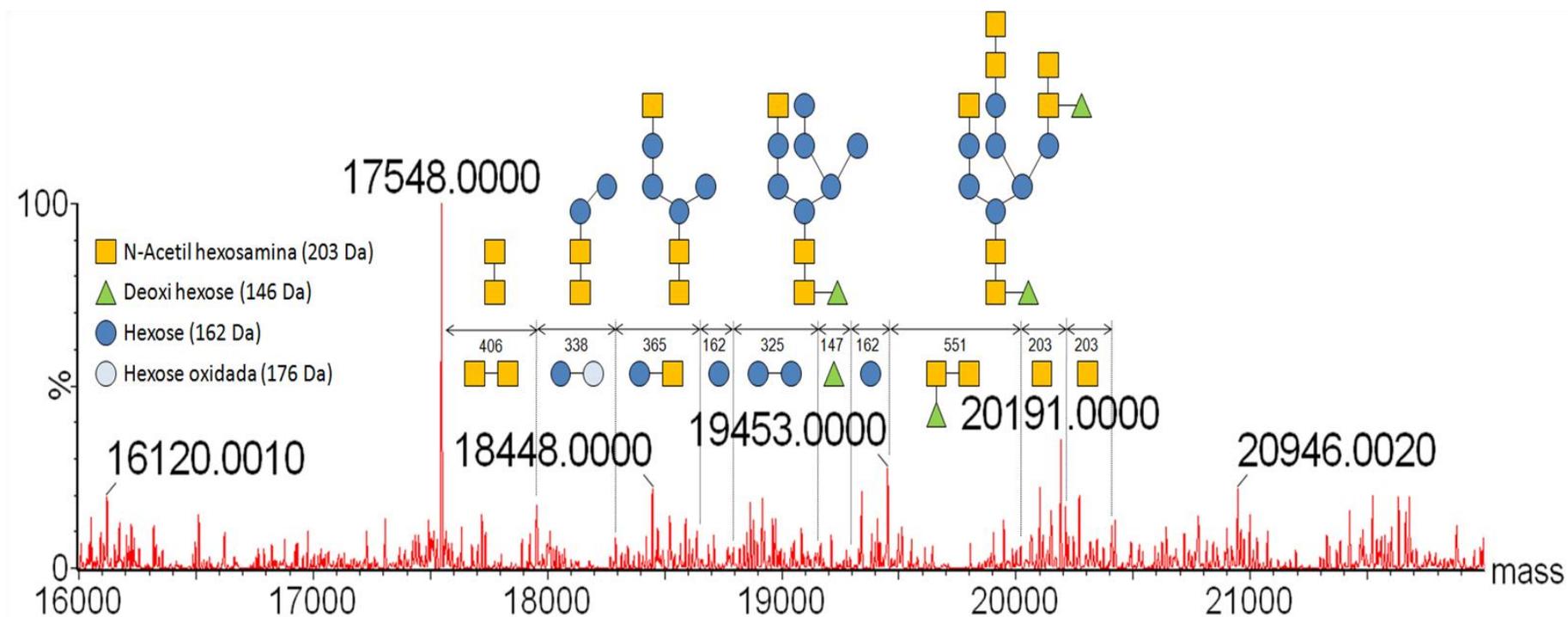
A lectina foi deglicosilada utilizando NaOH e BH_4 e submetida a LC-MS. O espectro foi deconvolvido usando a ferramenta MaxEnt 1.

A cadeia α' foi considerada a forma glicosilada máxima de H3, a partir do íon 20.410 ± 2 Da ($20.343 + 17$ Da) a sequencia de carboidratos foi predita pela redução dessa massa com resíduos de monossacarídeos até o encontro do íon 17.548 ± 2 Da, considerado a forma deglicosilada de α H-3 (FIGURA 30).

Entre a cadeia α (18.292 ± 2 Da) e a forma deglicosilada (17.548 ± 2 Da) a diferença foi de 744 Da, equivalente a dois resíduos de *N*-AcetilHexosamina (203 Da cada), um resíduo de Hexose (162 Da) e um resíduo de hexose oxidado ou um ácido hexurônico (176 Da), totalizando 744 Da. Os intermediários formados sugerem que a sequência seja: $HexNAc_2-Hex-Hex^{ox}$.

Entre o íon 18.292 ± 2 Da e o íon 19.453 ± 2 Da, a diferença de massa foi de 1.161 Da, os íons intermediários sugerem que a composição do glicano para essa região seja: $Hex_5DeoxiHex_1NAcHex_1$, totalizando 1.159 Da. Entre o íon 20.410 ± 2 Da e o íon 19.453 ± 2 Da, a diferença de massa foi de 957 Da equivalente a soma dos glicanos $LacdiNAc$ e $Lacdi Le^x$ análogo (carboidratos comuns em glicanos *N*-ligados). O $LacdiNAc$ é um dissacarídeo composto por duas unidades de *N*-Acetilhexosamina (406 Da). O $Lacdi Le^x$ é um trissacarídeo composto por duas unidades de *N*-AcetilHexosamina e uma unidade de deoxihexose (146 Da).

Figura 30 - Espectro de massas de α H3 deglicosilada e predição do glicano.



Considerando as diferenças de massas entre a proteína glicosilada e suas formas deglicosilada e parcialmente glicosilada foi possível determinar a composição do glicano e estimar a sequência do mesmo. A configuração do glicano foi estimada tomando por base os dados disponíveis na literatura.

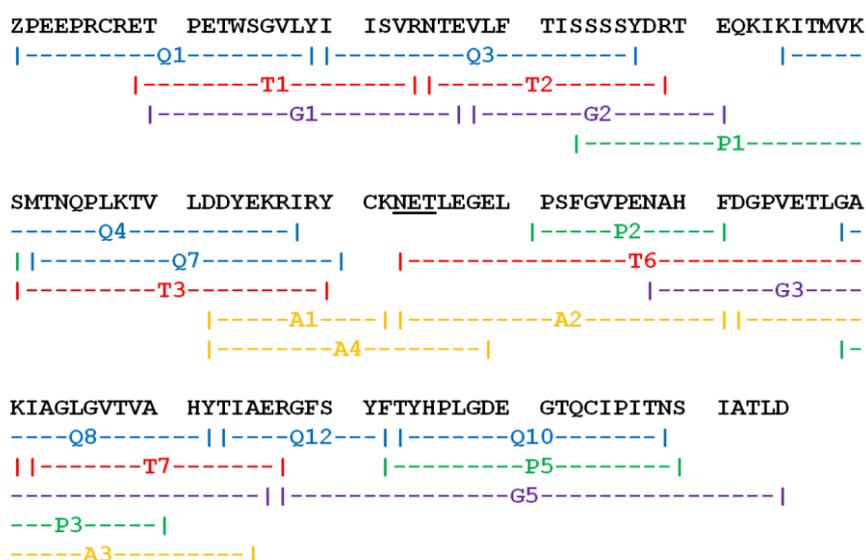
Sendo assim, a diferença de massa entre a forma deglicosilada e glicosilada, que foi de 2.862 ± 2 Da, está de bom acordo com a composição glicídica $\text{Hex}_6\text{Hex}^{\text{OX}}_1\text{NAcHex}_7\text{DeoxiHex}_2$, que somada totalizou 2.861 Da.

4.9 Determinação da estrutura primária de H-3

A estrutura primária de H-3 foi parcialmente determinada pela sobreposição de peptídeos oriundos de digestões proteolíticas e sequenciamento manual dos mesmos. Uma vez que seria impossível discriminar leucina (L) de isoleucina (I) por MS, os resíduos de L e I foram assinados conforme aqueles presentes na lectina putativa de *A. queenslandica* (ver a diante).

Da cadeia α foram identificados 145 aminoácidos, dos quais todos foram determinados por sequenciamento manual (FIGURA 31). A soma da massa dos 145 aminoácidos totalizou 16.242 Da considerando que as três cisteínas identificadas estão envolvidas em pontes dissulfeto intracadeia. Sendo assim, o valor de 16.242 Da está 1.302 Da abaixo do valor de 17.548 ± 2 Da (proteína deglicosilada).

Figura 31 - Mapa peptídico da cadeia α de H-3.



A sequência foi obtida por sobreposição de peptídeos oriundos da digestão com diferentes proteases. (--T--) Tripsina, (--Q--) Quimotripsina, (--A--) Asp-N, (--G--) Glu-C, (--P--) Pepsina. * Microheterogeneidades. (___) Sítio de N-glicosilação.

Foram observadas microheterogeneidades nas posições 28 (A/V), 35 (G/S) e 38 (S/D), sugerindo a existência de isoformas na cadeia α . Além disso, na posição 1 o

aminoácido glutamina (Q) encontrou-se modificado, revelando a presença de um resíduo de ácido piroglutâmico (Z).

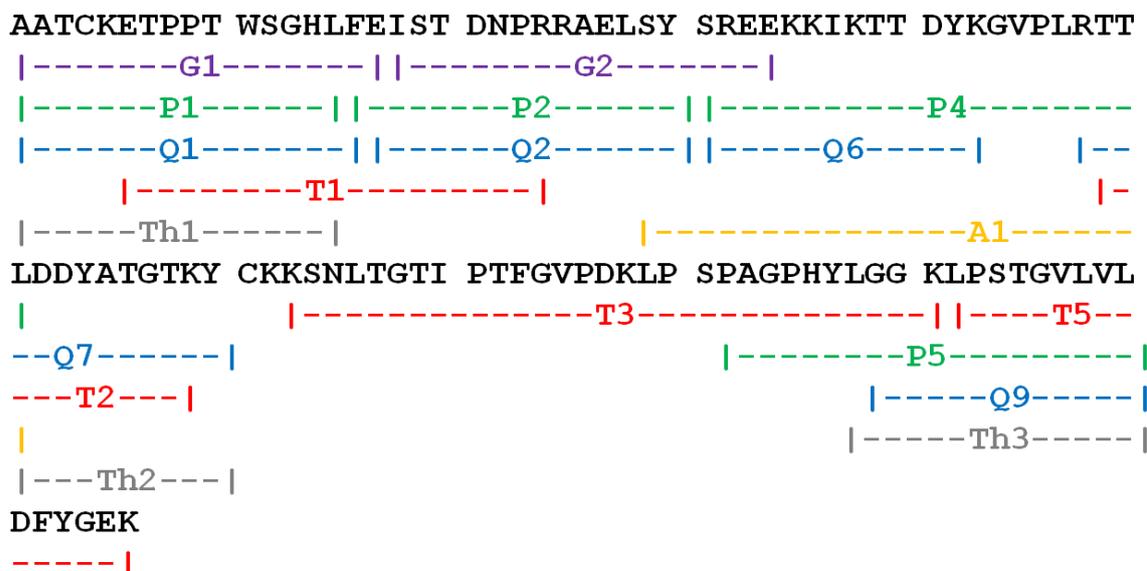
Na posição 73 a Asparagina (N) é seguida de dois resíduos (ET) que caracterizam um sítio de *N*-glicosilação. Os peptídeos que sobrepõem esta região (T6 e A4) apresentaram diferenças entre suas massas observadas e calculadas, revelando acréscimos de massa de 203 Da para o peptídeo T6 e 406 Da para o peptídeo A4, sendo estas massas referentes a um e dois resíduos de *N*-Acetil Hexosamina, respectivamente, estando de bom acordo com a sequência do glicano de H-3 descrito anteriormente na seção 3.6. Todos os peptídeos de α H-3 tiveram sua sequência determinada por sequenciamento manual e estão dispostos na tabela 4.

Tabela 4 - Peptídeos sequenciados de α H-3.

Peptídeo	<i>m/z</i>	Sequencia de aminoácidos	Massa		Δ (Da)
			Observada	Calculada	
A1	515.9137	DDYEKRLRYCK	1544.9137	1544.7406	0.02
A2	815.3198	EGELPSFGVPENAHF	1628.6240	1628.7471	0.12
A3	1177.1179	DGPVETLGAKIAGLGVTVAHYTIA	2352.2202	2352.2688	0.05
A4	1362.6230	DDYEKRLRYCKNETLEGE	2723.2305	2317.0645	-406.17
G1	869.4430	TWSGVLYIISVRNTE	1736.8704	1736.9097	0.04
G2	773.8785	VLFTLSSGSYSRTE	1545.7413	1545.7675	0.03
G2.1	759.8625	ALFTLSSGSYSRTE	1517.6689	1517.7362	0.07
G3	738.6140	NAHFDGVPVETLGAKLAGLGVTAVHYTLAE	2950.4248	2950.5188	0.09
G4	993.0277	TLGAKLAGLGVTVAHYTLAE	1984.0398	1984.0992	0.06
G5	1092.1846	RGFSYFTYHPLGDEGTQCIPITNSIATVE	3273.5288	3273.5303	0.00
P1	697.0016	SSSYSRTEQKIKITM ^{ox} VKS	2087.9818	2088.0884	0.08
P2	601.2461	PSFGVPENAHF	1200.4766	1200.5564	0.08
P3	528.8003	GAKIAGLGVTVA	1055.5850	1055.6339	0.05
P4	580.7927	GVTVAHYTLAE	1159.5698	1159.573	0.02
P5	1075.9316	FTYHPLGDEGTQCIPITNS	2149.8477	2149.9626	0.11
Q1	1158.9783	ZPEEPRCRETPETWSGVLY	2315.9409	2316.0481	0.11
Q2	799.3617	CRETPETWSGVLY	1597.7056	1597.7083	0.00
Q3	979.5105	IISVRTNEALFTLSSGSY	1957.0054	1957.0156	0.01
Q4	548.4797	KITMVKSMTNQPLKTVLDDYEKR	2737.3591	2737.4507	0.09
Q5	566.9248	KTVLDDYEKRIY	1697.7510	1697.9100	0.16
Q6	490.5850	VLDDYEYKRLR	1468.7314	1468.7675	0.04
Q7	563.7155	TNQPLKTVLDDYEQRLRY	2250.0833	2251.2324	0.11
Q8	678.7721	GAKLAGLGVTVAHY	1355.5286	1355.7561	0.23
Q9	550.7633	LAGLGVTVAHY	1099.5110	1099.6025	0.09
Q10	958.3896	TYHPLGDEGTQCIPITN	1914.7635	1914.9033	0.14
Q11	645.76	EPSEDELLVLF	1289.5088	1289.6390	0.13
T1	925.4397	ETPETWSGVLYLLSVR	1848.8636	1848.9410	0.08
T2	817.8423	NTEAIFTLSSGSYSR	1631.6689	1631.7791	0.11
T2.1	830.8634	NTEAIFTLSSGSYDR	1659.7112	1659.7740	0.06
T3	941.4423	SMTNQPLKTVLDDYEK	1880.8690	1880.9189	0.05
T4	685.3188	SM ^{ox} TNQPLKTVLDDYEKR	2052.9329	2053.0149	0.08
T5	569.7465	TVLDDYEKR	1137.4773	1137.5302	0.05
T6	1086.4829	NETLEGELPSFGVPENAHFDGVPVETLGAK	3256.4253	3053.4617	-202.95
T7	835.9249	LAGLGVTVAHYTLAER	1669.8342	1669.9152	0.08

Já a cadeia β apresentou 106 aminoácidos (FIGURA 32), dos quais todos, com exceção do dipeptídeo $^{61}\text{CK}^{62}$ foram determinados por sequenciamento manual. Os dois aminoácidos $^{61}\text{CK}^{62}$ foram determinados pela similaridade existente entre H-3 e pAqL.

Figura 32. Mapa peptídico da cadeia β de H-3.



A sequência foi obtida por sobreposição de peptídeos oriundos da digestão com diferentes proteases. (--T--) Tripsina, (--Q--) Quimotripsina, (--A--) Asp-N, (--G--) Glu-C, (--P--) Pepsina, (--Th--) Termolisina. * Microheterogeneidades. (___) Sítio de O-glicosilação.

Foram observadas variações de seqüências em cinco diferentes posições: 27 (D/E), 49 (T/L), 59 (K/R), 94 (S/D) e 100 (L/Y). Na posição 65 a asparagina é sucedida de dois aminoácidos (LT) que caracterizam um sítio de *N*-glicosilação. O peptídeo T3, que sobrepõe essa região, apresentou divergência em sua massa medida e calculada, sendo esta diferença de massa (203 Da) atribuída a um resíduo de *N*-acetilhexosamina.

Os 106 aminoácidos somados totalizaram 11.622 Da, considerando as duas cisteínas envolvidas em pontes dissulfeto, estando este valor 206 Da abaixo do valor determinada por ESI-MS para a cadeia β : $11\ 828 \pm 2$ Da. Os 206 Da de diferença podem ser explicados pela presença de um resíduo de HexNAc (203 Da) encontrado nos peptídeos T3 e T4.

Todos os peptídeos de β H-3 tiveram sua sequência determinada por sequenciamento manual e estão dispostos na tabela 5.

Tabela 5 - Peptídeos sequenciados de β H-3.

Peptídeo	<i>m/z</i>	Sequencia de aminoácidos	Massa		Δ (Da)
			Observada	Calculada	
A1	739.4434	DISYSREEKKIKTTDYKGVPLRLTL	2952.7422	2952.5759	-0.17
A2	637.8750	DYKGVPLRLTL	1273.7344	1273.7394	0.01
A3	631.8644	DYKGVPLRRTL	1261.7131	1261.7030	-0.01
G1	644.6511	AATCKETPPTWSGHLFE	1930.9299	1930.8883	-0.04
G2	670.2854	ISTDNPRRADLSYSREE	2007.8328	2007.9609	0.13
P1	552.5763	AATCKETPPTWSGHL	1654.7054	1654.7773	0.07
P2	644.6139	AATCKETPPTWSGHLFE	1930.8182	1930.8883	0.07
P3	595.2496	FEISTDNPRRADISY	1782.7252	1782.8536	0.13
P4	619.5898	SREEKKIKTTDYKGVPLRLTL	2474.3279	2474.4221	0.09
P5	625.9926	PAGPHYLGKLPSTGVLVL	1874.9543	1874.0618	0.11
Q1	601.9313	AATCKETPPTWSGHLF	1802.7704	1802.8297	0.06
Q2	546.2439	EISTDNPRRADISY	1635.7083	1635.7853	0.08
Q3	632.9644	LFEISTDNPRRADISY	1895.8698	1895.9377	0.07
Q4	550.9186	ELSTDNPRRAEISY	1649.7323	1649.8009	0.07
Q5	637.6429	LFEISTDNPRRAEISY	1909.9052	1909.9534	0.05
Q6	499.9263	SREEKKIKTTDY	1496.7554	1496.7834	0.03
Q7	758.8496	RTLDDYATGTKY	1515.6836	1515.7570	0.07
Q8	511.5732	RTTLDDYATGTRY	1531.6962	1531.7267	0.03
Q9	609.8207	GGKLPDTGVLVY	1217.6257	1217.6655	0.04
T1	728.5095	ETPPTWSGHLFELSTDNPR	2182.7183	2182.0283	0.31
T2	607.1368	TTLDDYATGTR	1212.2579	1212.5623	0.30
T3	1008.6561	SNLTGTIPTFGVPDKLPSPAGPHYLGK	3022.9448	2820.4810	-202.46
T4	788.7761	KSNLTGTIPTFGVPDKLPSPAGPHYLGK	3151.0732	2948.5759	-202.50
T5	858.4125	LPDTGVLVYDFYGEK	1714.8093	1714.8453	0.04
Th1	528.8848	ATCKETPPTWSGHL	1583.6310	1583.7402	0.11
Th2	587.7137	LDDYATGTRY	1173.4117	1173.5302	0.12
Th3	723.8344	LGGKLPDTGVLVYD	1445.6532	1445.7766	0.12

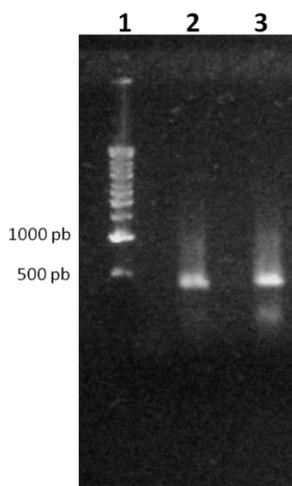
4.10 Clonagem da cadeia α

O RNA total extraído a partir de um grama de esponja utilizando o kit *RNAspin Mini RNA isolation kit* (GE Healthcare) apresentou rendimento de 80 ng/ μ L.

A partir da extração de RNA foi possível, através da reação da transcriptase reversa e mediante utilização do primer Qt, sintetizar fitas de cDNA.

Utilizando o oligonucleotídeo específico (HAL-1) em associação com o primer Qi foi obtido um fragmento de DNA de aproximadamente 500 pb de comprimento (FIGURA 33). Após a reamplificação do produto 3'RACE usando oligonucleotídeo Q0, o novo produto foi submetido a clonagem em pGEM-T-*easy*.

Figura 33. Eletroforese em gel de agarose. Produto 3'RACE.



1. Marcador Kilobase; 2. Amplificação na presença de Qi; 3. Reamplificação na presença de Q₀.

Com o objetivo de confirmar a presença do inserto, uma PCR foi realizada utilizando os 20 clones obtidos após transformação. Destes clones foram confirmados 16 com a presença do fragmento de interesse.

O sequenciamento do produto 3'RACE revelou a presença de uma região codificadora de 246 nucleotídeos, terminada por um códon de parada, uma região 3' não codificadora e a cauda poliA.

A tradução do produto de 3'RACE revelou uma sequência de 82 aminoácidos, dos quais 54 estão de acordo com a sequência determinada por MS/MS (FIGURA 34). Entretanto, 28 aminoácidos representam uma extensão no C-terminal não observada nos dados obtidos por MS.

Figura 34. Alinhamento entre as sequências obtidas por MSMS x RACE.



Alinhamento realizado pelo programa ESPrict 2.1

A combinação das técnicas de espectrometria de massas e biologia molecular apontou uma estrutura primária para α H-3 composta de 173 resíduos. Contudo, a massa molecular somada destes aminoácidos (19.099 Da) é superior àquela massa determinada para a lectina deglicosilada (17.548 Da).

Sendo assim, é proposto um processamento proteolítico pós-traducional de α H-3 reduzindo o número de aminoácidos para 158. Este processamento leva a formação de uma cadeia madura com massa molecular de 17.548 Da (FIGURA 35), valor que está de acordo com a massa determinada por MS.

Figura 35. Estrutura primária de α H-3.

```

1  ZPEEPRCRET  PETWSGVLYI  ISVRNTEVLF  TISSSSYDRT  EQKIKITMVK
51  SMTNQPLKTV  LDDYEKRIRY  CKNETLEGEL  PSFGVPENAH  FDGPVETLGA
101 KIAGLGVTVA  HYTIAERGFS  YFTYHPLGDE  GTQCIPITNS  IATLDPPGED
151  IIQYAGCG

```

Sequência obtida através da combinação das técnicas de MS/MS e 3'RACE.

4.11 Análise de bioinformática

H-3 teve seus parâmetros físico químicos estimados utilizando a ferramenta ProtParam do pacote ExPasy (disponível em <http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>). De acordo com o programa, a cadeia α possui um pI de 4,87 e coeficiente de extinção molar de 1,066, assumindo que todas as cisteínas estão engajadas na formação de cistinas. A cadeia β , por sua vez, apresentou pI de 7,98 e coeficiente de extinção molar de 1,248, assumindo que todas as cisteínas estão engajadas na formação de cistinas.

A ferramenta RADAR identificou um possível domínio repetido dentro da sequência da cadeia α de H-3 (FIGURA 36). A região em questão compreende as sequências ⁷⁴ ETLEGELPSFGVPENAHF⁹¹ e ⁹⁶ETLGAKIAGLGVTVAHY¹¹² que apresenta similaridade de 52% e identidade de 47%.

Utilizando a ferramenta BLAST, a sequência de H-3 foi comparada com proteínas depositadas no banco de dados do NCBI. Ambas as cadeias de H-3 (α e β) não apresentaram similaridade com lectinas conhecidas. Entretanto, quando os parâmetros

da busca foram ajustados para buscar por sequencias de nucleotídeos traduzidas usando como *query* peptídeos da própria H-3 (tBLASTn), foram observadas regiões conservadas entre H-3 e o genoma da esponja *Amphimedon queenslandica*.

Figura 36 - Alinhamento entre os domínios repetidos de α H-3.

	1	10
74 - 91	ETLEGELPSFGVPENAHF	
96 - 112	ETLGAKIAGLGVTV.AHY	

Alinhamento realizado pelo programa ESPrift 2.1

O “contig” 7463 do genoma de *A. queenslandica* foi tratado com o programa GenMark utilizando como conjunto de treinamento os dados de *C. elegans*. Os resultados revelaram a presença de 14 genes no fragmento 7463, dentre estes, dois foram identificados através de um BLAST local. Os dois genes foram traduzidos e duas proteínas putativas foram identificadas em *A. queenslandica*: α pAqL e β pAqL (FIGURA 37).

Figura 37 - Sequencia da lectina putativa de *Amphimedon queenslandica*.

pAqL – Cadeia α

1	MILALVVAA	LFINTGTAQP	DEPRCRETPE	TWSGYLYIIS	VRSTEARFTI	SLGSYSRTAQ
61	KIKITDVKSM	TNEPLRTVLE	DYEKRIRYTS	VSGSCRNETL	EGEFPSYGVP	EDAHFDGPEVE
121	TLGAKIAGLG	VTVAHYTIAE	RGFSYYTYHP	LGDEGTQCIP	ITNSIATLEP	LGEDI IQYAN
181	VTTVLPTDAF	SLPPGCG				

pAqL – Cadeia β

1	MKCLLMIVAA	AALLGIASAA	ATCLESPPIW	SGHLFEISTD	NPRRAVISYS	RDEKKIKTTD
61	YKGVPLRRTL	DDYTTGTRYV	SENGECRKS	LTGTIPTFGV	PEGSLPNPVG	PHYLGKLPD
121	TGVLVYDFYG	ENTRDGIYFL	TYAPVGEETV	CVPLYFTFLA	KPPLLQEFTE	LVTTVPPGAF
181	SIPPGCE					

O contig 7463 foi tratado com a ferramenta GenMark e dois genes foram identificados através de alinhamentos BLAST locais. Os dois genes foram traduzidos e as sequencias da lectina putativa estão apresentadas.

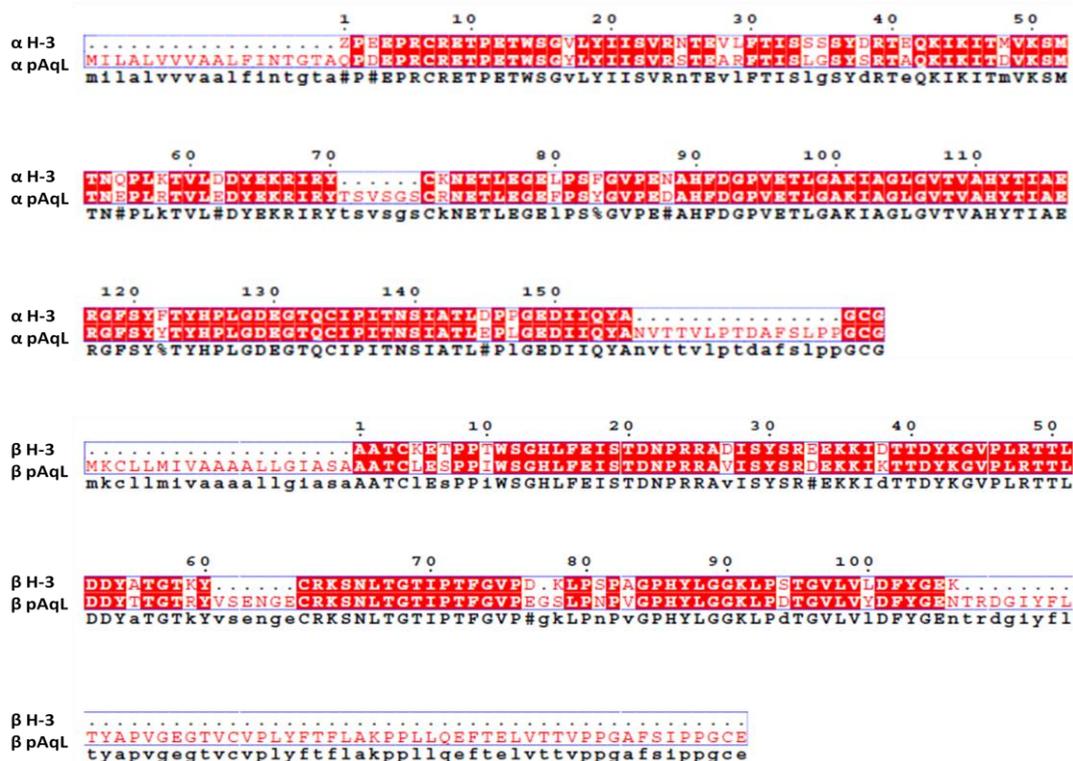
De posse das sequências das cadeias α e β de pAqL foram realizados alinhamentos entre estas cadeias polipeptídicas e as cadeias de H-3, utilizando o programa EsPrift (FIGURA 38). As cadeias α de H-3 e pAqL apresentaram

similaridade de 91% e identidade de 85%, as cadeias β , por sua vez, apresentaram similaridade de 90% e identidade de 85%.

No entanto, uma longa região de N-terminal presente em ambas as cadeias de pAqL não foi observada em H-3. Utilizando a ferramenta SignalP (disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), foi comprovado que as cadeias de pAqL possuem potenciais peptídeos sinais em seus N-terminais, sendo estes peptídeos de 18 resíduos na cadeia α e 19 resíduos na cadeia β (dados não mostrados).

Além disso, ambas as cadeias de pAqL apresentaram uma extensão em seus C-terminais não observada na lectina madura H-3. Ambas as cadeias de pAqL apresentaram também uma sequência interna não presente em H-3. Na cadeia α , a sequência interna em questão possui seis resíduos: ⁸⁹TSVSGS⁹⁴. Na cadeia β a sequência interna também possui seis resíduos: ⁸⁰VSENGE⁸⁵. Curiosamente, em ambos os casos a sequência interna ausente em H-3 ocorre flanqueando os sítios de *N*-glicosilação.

Figura 38 - Alinhamentos entre as cadeias α de pAqL e H-3.



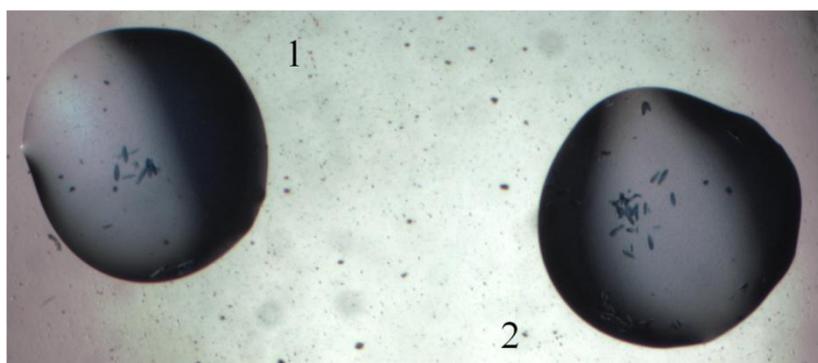
Os alinhamentos foram realizados entre as cadeias β , utilizando a ferramenta EsPript.

4.12 Cristalização da lectina H-3

Para os ensaios de cristalização, H-3 purificada ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi utilizada de forma nativa e complexada com GalNAc. Ambas as preparações foram submetidas ao *screen* inicial com os kits de cristalização da Hampton Research (Crystal Screen I e IITM). Após uma semana da montagem das microplacas foram observados microcristais para ambas as preparações (nativa e complexada) somente na condição 17 do Crystal Screen I (FIGURA 39).

Após obtenção dos primeiros cristais, foram realizadas pequenas modificações na composição da condição 17.

Figura 39 - Microcristais de H-3.

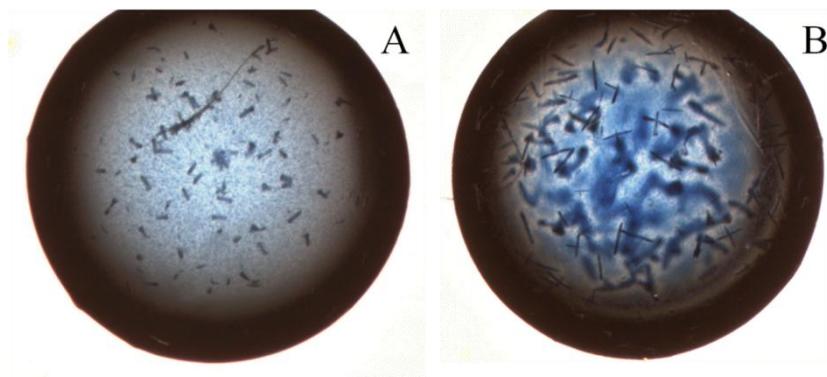


A lectina nativa (1) e complexada com GalNAc (2) foi submetida a *screen* de cristalização utilizando os kits de cristalização da Hampton research. As gotas (200 nL) foram preparadas por um robô de cristalização, montadas sobre uma superfície plástica e seladas sobre uma placa de microtitulação.

H-3 ($12,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi cristalizada em quatro condições otimizadas a partir da condição 17. Cristais foram obtidos 15 dias após a montagem das placas, tanto quando se utilizou H-3 complexada quanto quando se utilizou H-3 nativa.

Quando complexada com GalNAc, cristais (FIGURA 40A). foram observados nas seguintes condições: (1) Li_2SO_4 0,2 M, PEG 8000 30 % e Tris 0,1 M pH 7,3; (2) Li_2SO_4 0,2 M, PEG 8000 30 % e Tris 0,1 M pH 7,6; (3) Li_2SO_4 0,2 M, PEG 6000 30 % e Tris 0,1 M pH 7,3 e (4) Li_2SO_4 0,2 M, PEG 6000 30 % e Tris 0,1 M pH 7,6. Quando nativa H-3 (FIGURA 40B) foi cristalizada somente em duas condições: 2 e 4.

Figura 40 - Cristais de H-3



A lectina nativa, condição 2 (A) e complexada com GalNAc (B) foi submetida a otimização de cristalização utilizando a condição 17 como composição de partida. As gotas (2 μ L) foram preparadas, montadas sobre uma lamínula e seladas sobre uma placa de Limbro.

5. DISCUSSÃO

Espunjas marinhas são consideradas excelentes fontes naturais de biomoléculas. O efeito biológico da aplicação direta de biomoléculas isoladas de poríferos tem sido bastante discutido nos últimos 50 anos. Entretanto, a imensa maioria de biomoléculas isoladas de esponjas consiste de metabólitos secundários, incluindo nucleosídeos, esteroides, ácidos graxos e peróxidos (SIPKMA, 2005).

Em se tratando de lectinas, dezenas de trabalhos têm sido publicadas relatando a purificação, caracterização físico-química e propriedades biológicas destas proteínas em poríferos. Neste trabalho, duas novas lectinas da esponja *Haliclona caerulea* foram isoladas, caracterizadas parcialmente e informações estruturais (sequencia de aminoácidos e modificações pós-traducionais) foram obtidas de uma delas.

H-1 foi isolada em um único passo de purificação usando cromatografia de afinidade em matriz de estroma de eritrócitos humanos do tipo A. Desde que Agrawal e Goldstein (1965) implantaram a cromatografia de afinidade para a purificação de lectinas, esta tem sido a técnica mais empregada para o isolamento destas proteínas. O uso de matrizes contendo estroma de eritrócitos foi empregado para a purificação das lectinas da esponja *Axinella corrugata* (DRESCH *et al.*, 2008) e do polvo *Octopus maia* (ALPUCHE *et al.*, 2010).

A outra lectina isolada neste trabalho (H-3) foi obtida de forma pura pela combinação de cromatografias de interação hidrofóbica e troca iônica. Muitas lectinas de organismos marinhos têm sido purificadas usando métodos alternativos que não incluem cromatografia de afinidade, tais como as lectinas isoladas da esponja *Craniella australiensis* (XIONG *et al.*, 2005) e do pepino-do-mar *Holothuria grisea* (MOURA *et al.*, 2012).

Os métodos alternativos para a purificação têm sido bastante empregados especialmente para lectinas com afinidades por carboidratos complexos, dentre estes métodos destaca-se a cromatografia de interação hidrofóbica, utilizada para o isolamento das lectinas do pepino-do-mar *Holothuria scabra* (GOWDA *et al.*, 2008) e das algas *Tichocarpus crinitus* (MOLCHANOVA *et al.*, 2010) e *Codium barbatum* (PRASEPTIANGGA *et al.*, 2102).

Além de H-1 e H-3, *H. caerulea* possui outra lectina, H-2, que foi previamente isolada por combinação de cromatografias de troca aniônica e catiônica

(CARNEIRO, 2011). Juntas as três lectinas totalizam 85% da atividade hemaglutinante total do extrato bruto de *H. caerulea*.

A presença de mais de uma lectina em extratos aquosos de esponjas não é rara, já tendo sido observada em *Axinella polypoides* (BRETTEING; KABAT, 1976^a), *Aaptos papilata* (BRETTEING; KABAT, 1976b), *Halichondria okadai* (KAWAGASHI *et al.*, 1994) e *Axinella corrugata* (DRESCH *et al.*, 2008).

H-1 representou apenas 0,1% das proteínas totais solúveis de *H. caerulea*. Valores igualmente baixos foram observados nas lectinas isoladas de *Haliclona cratera* (0,04%) (PAJIC *et al.*, 2002) e *Phyllospongia foliascens* (0,075%) (KAMIYA *et al.*, 1986b).

Por outro lado, H-3 correspondeu a 2% das proteínas de *H. caerulea*, este valor é considerado alto tendo em vista que das lectinas isoladas de esponjas, somente aquelas presentes em *Halichondria okadai* superam esse valor: HOL-I = 2,7% e HoL-II = 2,9% (KAWAGISHI *et al.*, 1994).

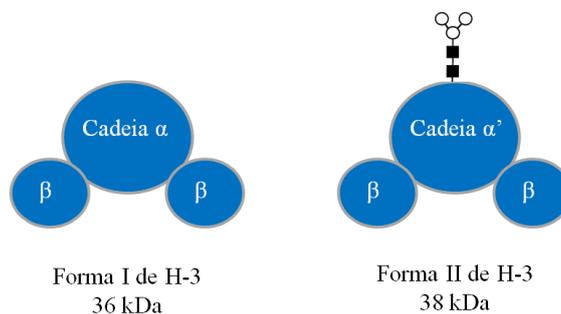
A massa molecular de H-1 e H-3 foi estimada por SDS PAGE e exclusão molecular e determinada por MS. Por SDS PAGE, H-1 é uma proteína de 40 kDa na presença e ausência de agentes redutores, em exclusão molecular H-1 comporta-se de maneira anômala apresentando 15 kDa.

Divergências entre massas moleculares estimadas por SDS PAGE e gel filtração não são raras e já foram descritas em algumas proteínas isoladas de organismos marinhos (OKAMOTO *et al.*, 1990; BENEVIDES *et al.*, 1996; COSTA *et al.*, 1999). É sabido que a conformação é um fator a ser considerado durante a migração de proteínas, tanto em SDS PAGE quanto em gel filtração. Proteínas globulares e muito compactas podem sofrer atraso em sua migração durante uma cromatografia de gel filtração, além disso, o caráter ácido e/ou glicoprotéico gera uma migração lenta em SDS PAGE e, portanto, o peso molecular de uma proteína pode apresentar-se diferente da realidade quando estimado por eletroforese.

Em contraste a H-1, H-3 apresentou-se como uma proteína heterogênea. Em SDS PAGE foram observadas três bandas na ausência e presença de agentes redutores (9, 16 e 18 kDa), sendo necessária a preparação de um gel nativo para confirmar a pureza da lectina. Tanto em PAGE quanto em gel filtração, H-3 foi homogênea e apresentou massa de 40 kDa.

Uma vez confirmado que a banda de 18 kDa (α') corresponde a forma superglicosilada da banda de 16 kDa (α) (*Ver adiante*), é especulada uma possível organização oligomérica de H-3. Para totalizar os 40 kDa da massa nativa estimada, podem ocorrer duas formações distintas (FIGURA 41): $2\beta + \alpha$ ($2 \times 9 \text{ kDa} + 16 \text{ kDa} = 34 \text{ kDa}$); e $2\beta + \alpha'$ ($2 \times 9 \text{ kDa} + 18 \text{ kDa} = 36 \text{ kDa}$). A diferença de 2 kDa existente entre as duas formas seria difícil de detectar por PAGE ou gel filtração, o que justifica o comportamento homogêneo de H-3 nas duas técnicas.

Figura 41 - Possíveis formações oligoméricas de H-3.



H-3 parece ocorrer de duas formas nativas distintas: a forma I, que corresponde a forma parcialmente glicosilada de H-3, e a forma II, que corresponde a forma superglicosilada de H-3.

Dentre as lectinas isoladas de esponja, somente a lectina I de *Axinella polypoides* apresentou padrão heterogêneo em SDS PAGE. Na ocasião a lectina não teve sua massa avaliada de forma nativa (BRETTING; KABAT, 1976a). No geral, as lectinas de esponjas apresentam-se como oligômeros, incluindo formações diméricas (PAJIC *et al.*, 2002), triméricas (XIONG *et al.*, 2006) e tetraméricas (MOURA *et al.*, 2005) unidas por interações fracas (MEDEIROS *et al.*, 2008) ou pontes dissulfeto (MIARRONS; FRESNO *et al.*, 2000). Sendo raras as formações monoméricas (KAWAGISHI *et al.*, 1994).

Por MS, a cadeia β de H-3 apresentou massa de $11.828 \pm 2 \text{ Da}$, estando levemente acima da massa estimada por SDS PAGE (9 kDa). As cadeias α e α' também apresentaram massas moleculares acima daquelas estimadas por SDS PAGE: 16 e 18 kDa por eletroforese; $18.291 \pm 2 \text{ Da}$ e $20.393 \pm 2 \text{ Da}$ por MS.

Divergências entre massa molecular relativa (M_r) e massa molecular determinada também foram observadas nas lectinas das algas *Hypnea musciformis* (HML) e *H. cervicornis* (HCA) (NAGANO *et al.*, 2005).

Como dito anteriormente, a migração em eletroforese pode ser influenciada pela conformação e hidrodinamicidade da molécula. Em HML e HCA, as pontes

dissulfeto (sete em cada) tornam essas proteínas mais compactas, levando a uma migração mais rápida em eletroforese. Por SDS PAGE, a massa das lectinas foi estimada em 3,5 kDa enquanto que por MS as lectinas apresentaram massas moleculares em torno de 9 kDa (NAGANO *et al.*, 2005).

Análises por MS revelaram que H-3 possui seis Cys, duas na cadeia β e quatro na cadeia α , todas envolvidas em pontes dissulfeto, não havendo nenhuma Cys livre. Portanto, a migração anômala de H-3 em eletroforese pode ser justificada pela presença de pontes dissulfeto intracadeia.

A presença de pontes dissulfeto é uma característica comum as lectinas de esponjas. A lectina Ef (*Ephydaia fluviatis*) possui oito Cys, todas envolvidas em pontes dissulfeto intracadeia (WIENS *et al.*, 2005). Já a tachylectina LEC_SUBDO (*Suberites domuncula*) possui nove Cys, quatro pontes dissulfeto intracadeia e uma Cys livre (SCHRODER *et al.*, 2003). As lectinas do tipo C, APHRLECC_1 e _2 (*Aphrocallistes vastus*), possuem seis Cys envolvidas em três pontes dissulfeto intracadeia (GUNDACKER *et al.*, 2001). As lectinas de *Axinella polypoides* possuem uma ponte dissulfeto cada (BUCK *et al.*, 1991; BUCK *et al.*, 1998).

Por outro lado, GcG (*Geodia cydonium*) possui uma Cys que não está envolvida na formação de pontes dissulfeto, podendo esta única Cys ser alvo de oxidação causando inativação da lectina (PFEIFER *et al.*, 1993).

Das três lectinas isoladas de *H. caerulea*, H-1 mostrou-se como a mais específica a eritrócitos humanos, causando hemaglutinação a uma concentração mínima de $0,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto que H-3 é a menos específica (MAC = $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Diferentemente de H-2 que aglutina preferencialmente eritrócitos nativos de coelho, H-1 aglutinou todos os eritrócitos testados com uma leve preferência para hemácias humanas tratadas com tripsina e H-3 foi específica a eritrócitos humanos do tipo A e B, somente quando estes receberam tratamento enzimático.

Lectinas com preferência por eritrócitos que receberam tratamentos enzimáticos também foram observadas nas esponjas *Cliona varianus* (MOURA *et al.*, 2005) e *Axinella dissimilis* (BRETTING; KABAT, 1976).

A atividade hemaglutinante de H-1 não foi inibida por nenhum dos carboidratos testados, enquanto que H-3 foi inibida por GalNAc e PSM. A ligação de H-3 a GalNAc e o não reconhecimento de galactose, sugerem que o grupamento *N*-Acetil é essencial para a interação.

Muitas lectinas de esponjas são capazes de reconhecer GalNAc, incluindo as galectinas isoladas de *Geodia cydonium* (VAITH *et al.*, 1979) e *Cinnachyrella sp.* (UEDA *et al.*, 2012), mas poucas são específicas a GalNAc em detrimento de galactose, tendo sido relatada uma única lectina desse tipo em *Halichondria okadai* (HoL I). Ainda assim, HoL-I é capaz de reconhecer dissacarídeos de galactose (KAWAGISHI *et al.*, 1994).

Por outro lado, a afinidade por carboidratos complexos e glicoproteínas tem sido reportada em diversas lectinas de esponjas. H-2 pode ser inibida por PSM e orosomucóide (CARNEIRO, 2011), as lectinas de *Aplysina archeri* e *A. lawnosa* são inibidas por Fetuína, glicoproteínas ácidas e tiroglobulina (MIARRONS; FRESNO, 2000), HoL-30 de *Halichondria okadai* apresentou afinidade por Asialofetuína (KAWASAR *et al.*, 2008) e em *Craniella australiensis* uma lectina específica a PSM foi isolada (XIONG *et al.*, 2006).

A atividade de H-1 foi mais efetiva em pH alcalino (9), enquanto que a atividade de H-3 foi estável em pH neutro e levemente ácido (6-7). H-2 apresentou atividade máxima em pH ácido (CARNEIRO *et al.*, 2011) o que justifica o fato de o extrato bruto de *H.caerulea* apresentar forte atividade hemaglutinante em todos os pH testados (dados não mostrados).

Reconhecidamente, a água do mar é levemente alcalina o que leva a maioria das lectinas de organismos marinhos a apresentarem ótimo de atividade em pH neutro ou levemente básico (KAWAGISHI *et al.*, 1994; PAJIC *et al.*, 2002; MOURA *et al.*, 2005; DRESCH *et al.*, 2008). Notoriamente, especula-se que as lectinas podem desempenhar funções tanto de maneira intra quanto extracelular (VASTA *et al.*, 2004). A presença de lectinas com atividade ótima em pH diferente daquele do meio circundante pode sugerir que tais lectinas se localizem em frações subcelulares onde o pH predominante é diferente daquele do meio.

H-1 mostrou-se pouco resistente a desnaturação térmica, uma vez que sua atividade hemaglutinante foi reduzida a 25% após 1 hora de incubação a 40°C. A atividade de H-3 foi estável mesmo após aquecimento a 60°C por 1 hora.

Das lectinas de esponjas já descritas: CvL-I manteve sua conformação nativa após aquecimento a 60 °C (MOURA *et al.*, 2005); as lectinas de *Axinella corrugata* apresentaram boa estabilidade térmica, AcL-I e AcL-II são estáveis a 60 °C e só perdem completamente a atividade após aquecimento a 95°C por 1 hora (DRESCH *et al.*, 2008; DRESCH *et al.*, 2012); CaL, a lectina isolada de *Craniella australiensis*,

manteve-se estável a 70 °C e mostrou atividade residual mesmo exposta a temperatura de 95 °C por 1 hora (XIONG *et al.*, 2006), mas nenhuma destas lectinas foi termicamente mais estável que H-2, que possui conformação nativa mesmo aquecida a 80°C por 1 hora (CARNEIRO *et al.*, 2011).

As três lectinas de *H.caerulea* são independentes de íons divalentes. Lectinas de esponjas independentes de íons foram isoladas de *Axinella polypoides* (BRETTING; KABAT, 1976), *Halichondria okadai* (KAWAGISHI *et al.*, 1994), *Haliclona cratera* (PAJIC *et al.*, 2002), *Cinnachyrella apion* (MEDEIROS *et al.*, 2008) e *Cinnachyrella sp.* (UEDA *et al.*, 2012).

Por outro lado, lectinas dependentes de Ca^{2+} foram observadas em *Aplysina archeri*, *Aplysina lawnosa* (MIARRONS; FRESNO, 2000), *Aphrocallistes vastus* (GUNDACKER *et al.*, 2001) e *Cliona varians* (MOURA *et al.*, 2005).

As lectinas de *H. caerulea* apresentaram níveis diferentes de toxicidade contra náuplios de *Artemia*. H-1 foi a mais tóxica ($\text{LC}_{50} = 6,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$), seguida por H-2 ($142,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e H-3 ($414,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Para as três lectinas a mortalidade parece aumentar com o aumento da dose, indicando que a toxicidade de H-1, H-2 e H-3 é dose-dependente.

O teste de letalidade em *Artemia* é amplamente utilizado como indicador de citotoxicidade de compostos bioativos. Tal toxicidade está diretamente relacionada a diversas propriedades biológicas, incluindo atividade anti HIV, atividade inseticida, pesticida e antitumoral (CARBALHO *et al.*, 2002; NUNES *et al.*, 2006).

Contudo, poucas lectinas de invertebrados marinhos foram avaliadas quanto à toxicidade sobre náuplios. A lectina de *Axinella corrugata*, AcL-I, foi extremamente letal a náuplios, com LC_{50} de $0,951 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (DRESCH *et a.*, 2012). As lectinas de *Cliona varians* (CvL-I e CvL-II), assim como as de *H.caerulea*, apresentaram níveis diferentes de toxicidade. Enquanto CvL-I mostrou LC_{50} de $5,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$, CvL-II teve LC_{50} de apenas $850 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (dados não publicados). HgL, a lectina hemolítica isolada de *Holothuria grisea*, mostrou elevados níveis de toxicidade para náuplios de *Artemia*, apresentando valor de LC_{50} de $9,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (MOURA, 2010). A lectina isolada dos órgãos internos de *Holothuria scabra*, também mostrou elevada toxicidade para náuplios com LC_{50} de $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (MOJICA; MERCA, 2005).

Além destas lectinas, as lectinas isoladas do molusco *Aplysia kurodai* (AkL) e do poliqueta *Perinereis nuntia* (PnL) também foram avaliadas quanto a sua toxicidade

sobre náuplios. AKL foi considerada tóxica causando 63 % de mortalidade a uma concentração de 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto que PnL foi considerada pouco tóxica levando a morte de apenas 33 % dos náuplios a uma concentração de 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (KAWSAR *et al.*, 2010).

Não parece haver relação entre a afinidade da lectina e o grau de toxicidade que a mesma apresenta contra náuplios. As lectinas de *C. varians*, por exemplo, possuem afinidades muito similares e efeitos sobre náuplios muito distintos (dados não publicados). AkL e PnL também são específicas aos mesmos ligantes e apresentam toxicidade bastante distintas (KAWSAR *et al.*, 2010).

Entretanto, o efeito sobre náuplio parece estar diretamente relacionado com a toxicidade contra células malignas e com o efeito pró-inflamatório. CvL-I é tóxica a náuplios e letal para células malignas da linhagem K562 (QUEIROZ *et al.*, 2008b), além de promover efeito quimotático sobre linfócitos (QUEIROZ *et al.*, 2008^a). HgL também é tóxica para náuplios e possui $\text{LC}_{50} < 0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para células da linhagem HeLa (dados não publicados). AcL-1, outra lectina letal à náuplios, também tem efeito pró inflamatório por promover migração de neutrófilos (DRESCH *et al.*, 2008).

Sendo assim, é possível estimar que H-1 e H-2 podem possuir efeito tóxico sobre células malignas ou mesmo efeito pró-inflamatório, ao contrário de H-3 que possivelmente não apresentará nenhuma destas propriedades.

De fato, a lectina isolada de *Haliclona cratera*, HcL, possui efeito letal sobre as linhagens HeLa e Femx, com valores de LC_{50} de 9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 11 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (PAJIC *et al.*, 2002). Em uma comparação físicoquímica, HcL conserva propriedades de H-2 (CARNEIRO, 2011).

H-3 não apresentou toxicidade contra bactérias gram negativas ou gram positivas e nem mesmo foi capaz de aglutinar *E.coli* e *S.aureos*.

A lectina isolada de *Halichondria panicea* também não foi tóxica a sete cepas de bactérias marinhas, mas foi capaz de induzir o crescimento da bactéria *P. insolita* isolada da própria *H. panicea* (MULLER *et al.*, 1981). Por outro lado, CvL-I apresentou toxicidade para bactérias gram positivas, enquanto que não demonstrou efeito tóxico para bactérias gram negativas, além disso, CvL-I foi capaz de aglutinar bactérias gram positivas, em detrimento de bactérias gram negativas (MOURA *et al.*, 2005).

Lectinas que apresentam toxicidade ou efeito aglutinante sobre bactérias parecem estar envolvidas no sistema imune inato de invertebrados, podendo atuar como

opsoninas ou como sinalizadores induzindo a migração de células especializadas (KILPATRICK *et al.*, 2002). Em contraste, lectinas que induzem o crescimento de bactérias podem estar envolvidas na simbiose entre bactérias e hospedeiros (MULLER *et al.*, 1981).

Uma vez que H-3 não aglutinou, não induziu ao crescimento e nem demonstrou toxicidade para bactérias, é provável que esta lectina não esteja envolvida no processo de seleção e manutenção de simbiontes nem mesmo na defesa de *H.caerulea*.

H-3 é uma proteína azul com máxima absorção a 620 nm. Proteínas azuis têm sido purificadas e caracterizadas a partir de diferentes organismos, incluindo sapos (OKE *et al.*, 2008), algas (TEALE; DALE, 1970) e plantas vasculares. Contudo, o mecanismo de emissão de luz é estruturalmente diferente em todos os casos.

Nos ovos do sapo *Polypedates leucomystax*, Ranasmurfina foi isolada e caracterizada estruturalmente. Ranasmurfina é uma proteína verde-azul de 26 kDa, cujo pigmento está ligado covalentemente a estrutura protéica. Ranasmurfina tem absorção máxima a 680-700 nm. A coloração de Ranasmurfina é estável mesmo após desnaturação protéica, proteólise e tratamento com NaBH₄, borohidrato de ciano, hidroxilamina e ascorbato (OKE *et al.*, 2008).

A resolução da estrutura cristalina de Ranasmurfina revelou que a modificação covalente na sequência de aminoácidos Lys-Tyr-N-Tyr-Lys, conhecida como bis(LTQ), é responsável pela coloração verde azulada e têm propriedades similares ao indofenol (OKE *et al.*, 2008).

Diferentemente de Rasparmufina, H-3 perde a coloração azul quando desnaturada. EDTA, 2-mercaptoetanol, cloridrato de guanidina e SDS não causam mudança na absorção de H-3. Por outro lado, exposição ao calor, tratamento ácido e básico causam um salto na absorção de H-3, 620 nm para 400 nm, indo de azul para vermelho-laranja.

A molécula responsável pela pigmentação de H-3, denominada cromóforo-597, foi isolada por RPC e parcialmente caracterizada por MS.

A fração RP-PIII apresentou, por MS, massa molecular de 597 Da, não podendo ser observada por eletroforese devido a sua baixa massa.

O cromóforo-597 não possui absorção a 216 nm revelando seu caráter não protéico, mas absorve a 280 nm o que indica a presença de anéis aromáticos em sua estrutura. O cromóforo purificado emite coloração vermelha-laranja. Interessantemente,

quando a RPC foi acompanhada por absorção a 620 nm não foi observado o pico característico de H-3, o que corrobora com os resultados das varreduras de absorção, indicando que quando H-3 é desnaturada a pigmentação azul é perdida e a coloração muda para vermelho.

Não foi possível determinar que tipo de molécula é o cromóforo-597, uma vez que os experimentos de Top Down desestabilizaram o íon $[M + 1H]1+$ de m/z 597,5029 tornando impossível a interpretação dos espectros (dados não mostrados), mas a presença de anéis aromáticos leva a inferência de uma estrutura similar as porfirinas, moléculas acessórias responsáveis pela pigmentação de diversos compostos.

Proteínas pigmentos que apresentam moléculas acessórias são extensivamente estudadas em algas. As ficobiliproteínas, como são conhecidas, são proteínas encontradas nos estromas de células de algas e estão envolvidas na captação de luz para fotossíntese (GLAZER, 1982; MACCOOL, 1998).

As moléculas responsáveis diretas pela captação de luz, bem como pela emissão de coloração, são denominadas ficobilinas. As ficobilinas são derivados tetrapirrólicos lineares ligadas a apoproteínas por ligações do tipo tiol éster (WEDEMAYER, 1992)

A ficobilicianina (PBC), de coloração azul, e a ficobilieritrina (PBE), de coloração vermelha, são isômeros, diferenciando-se somente no padrão de suas ligações duplas (EOCHA, 1965).

Assim como H-3, as PBCs apresentam máxima absorção em torno de 630 nm e sofrem alterações na pigmentação após tratamentos agressivos. As PBCs sofrem branqueamento na presença de agentes redutores, uma vez que a ligação entre o tetrapirrol e a apoproteína é uma ponte tioléster (WEDEMAYER, 1992).

A massa molecular das PBCs também se assemelha a do cromóforo-597 de H-3. O pigmento de H-3 possui 597 Da por MS, a massa molecular das PCBs, assim como das porfirinas, é de aproximadamente 620 Da.

Em meio às semelhanças entre o cromóforo-597 e PCBs, é sugerido que a molécula pigmento de H-3 seja estruturalmente similar as PCBs. Além disso, a mudança de coloração após tratamentos agressivos sugere o envolvimento de reações redox que podem resultar na modificação do padrão de ligações duplas do cromóforo, o que explicaria a mudança de coloração.

Entretanto, H-3 e o cromóforo parecem não serem unidas por ligações covalentes, diferente do que acontece com PCBs e a apoproteína correspondente.

Quando H-3 foi infundida diretamente no espectrômetro, usando acetato de amônio e baixa temperatura de fonte, não pôde ser observada a forma oligomérica da lectina, indicando que a interface entre as subunidades α e β é frágil, sendo esta interface desfeita mesmo sob condições brandas de ionização. Entretanto, a tentativa de ionização nativa resultou na ionização de uma forma complexada de α H3. Experimentos de *Top Down* revelaram que a cadeia α de H-3 interage com o cromóforo-597.

Uma vez que a cadeia α pode ser separada do cromóforo pela simples desnaturação proteica, é de se entender que a união entre α H3 e o pigmento é mediada por interações fracas. Contudo, a interação entre α H3 e o cromóforo é mais forte que a interação que mantém a forma oligomérica unida, desde que a interação α -597 não foi desfeita pela ionização.

O outro grupo de proteínas azuis, encontrado em plantas vasculares e em alguns fungos, compreende as proteínas ligantes de cobre. Tais proteínas apresentam até quatro átomos de cobre em sua estrutura, sendo estes responsáveis pela coloração azul, e possuem absorção máxima a 600 nm (SOLOMON *et al.*, 1996).

Ambas as lectinas aqui isoladas foram consideradas glicoproteínas. H-1 apresentou 8,2 % e H-3 2,7 % de carboidratos neutros. Além disso, a natureza glicoproteica de H-3 foi confirmada por MS.

Além de H-1 e H-3, as lectinas isoladas das esponjas *Aphrocallistes vastus* (GUNDACKER *et al.*, 2001), *Aplysna lawnosa* e *Aplysina archeri* (MIARRON; FRESNO, 2000), *Axinella corrugata* (DRESCH *et al.*, 2008), *Cliona varians* (MOURA *et al.*, 2006), *Haliclona cratera* (PAJIC *et al.*, 2002), *Crambe crambe* (DOGOVIC *et al.*, 1996), *Phyllospongia foliascens* (KAMIYA *et al.*, 1986b) e *Craniella australiensis* (XIONG *et al.*, 2005) são glicoproteínas.

O grau de glicosilação varia dentre as lectinas de esponjas, desde 2,1% em *Crambe crambe* (DOGOVIC *et al.*, 1996) até 29 % em *Aphrocallistes vastus* (GUNDACKER *et al.*, 2001). Entre todas as glicoproteínas supracitadas, somente a lectina de *Aphrocallistes vastus* teve sua porção glicídica parcialmente caracterizada. APHRLECC possui um glicano *N*-ligado de composição desconhecida com aproximadamente 10 kDa (GUNDACKER *et al.*, 2001).

Experimentos de *top down* revelaram que as cadeias α e α' de H-3 são, na verdade, a mesma espécie molecular, com a presença de uma porção glicídica maior na cadeia α' . O *top down* da cadeia α não resultou em nenhum decréscimo de massa, sugerindo que α seria uma forma completamente deglicosilada.

Entretanto, a coloração com PAS foi positiva para as três cadeias de H-3, o que indica que α não é a forma completamente deglicosilada. De fato, quando H-3 foi deglicosilada por métodos químicos o íon resultante apresentou massa de 17.548 ± 2 Da, sendo esta massa considerada livre de carboidratos.

Portanto, a cadeia α é a soma da porção proteica (17.548 ± 2 Da) com o core HexNAc₂Hex₂. A cadeia α' é a soma da porção proteica (17.548 ± 2 Da) com o core Hex₇HexNAc₇DeoxiHex₂. Além disso, foram observadas formas de α H3 com adição de 1 a 6 resíduos de Hexose na porção terminal, chegando a glicosilação máxima de Hex₁₃HexNAc₇DeoxiHex₂.

A técnica empregada para a determinação da composição glicídica de H-3 não permite precisar a estrutura do glicano, nem mesmo a identificação de formas isoméricas, tais como os monossacarídeos glicose, manose e galactose. Entretanto, dados disponíveis na literatura permitem que a predição da estrutura e composição do glicano sejam feitas.

Por exemplo, a base Man α 3(Man α 6)Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc é comum a todas as glicoproteínas *N*-ligadas e pode-se inferir que esteja presente em α H-3. Além disso, em animais é também comum a presença de fucose ligada (α 1-6) ao GlcNAc mais interno (WILSON, 2002). Duas deoxihexoses foram encontradas no espectro de H-3 deglicosilada, portanto, é sugerido que uma destas deoxihexoses esteja na posição supracitada.

A presença de *N*-acetil lactosamina também é comum em glicoproteínas *N*-ligadas de origem animal. A enzima que cataliza a reação de transferência, β -1,3-*N*-Acetilglicosaminiltransferase, é mais específica a porção Man α 6Man β do core pentassacarídeo (van den EIJDEN *et al.*, 1988). Assim, nesta posição do glicano (antena I) de H-3 foi predito um resíduo de *N*-acetilactosamina.

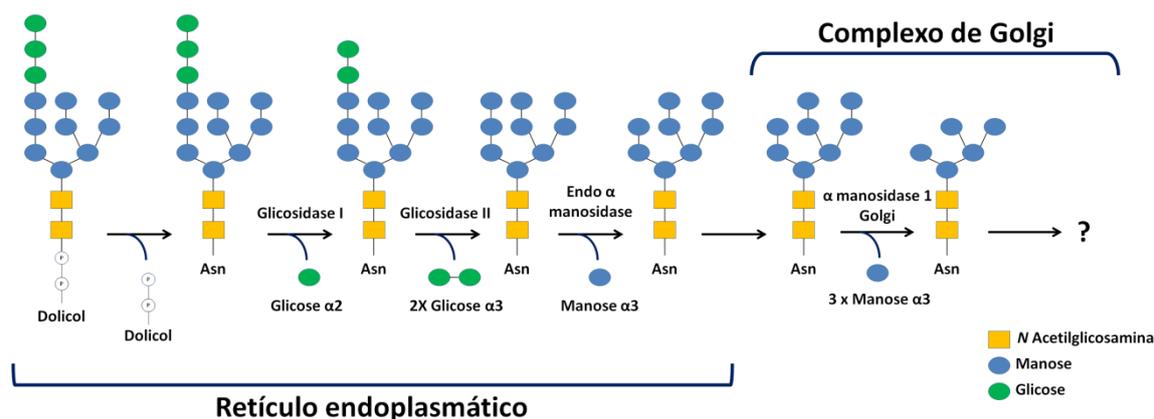
Durante a síntese de uma glicoproteína no R.E. (FIGURA 42), o precursor dolicol funciona como doador do oligossacarídeo a ele ancorado (Glc₃Man₉GlcNAc₂). Ainda no retículo endoplasmático o oligossacarídeo, agora ligado à proteína, é processado. Inicialmente, o primeiro resíduo de glicose (α 1-2) é removido pela glicosidase I (KILKER *et al.*, 1981), depois dois resíduos de glicose (α 1-3) são removidos pela glicosidase II (SAUNIER *et al.*, 1982), restando agora somente o core Man₉GlcNAc₂.

Posteriormente, a manose (α 1-2) é removida. Em mamíferos, a base Man₈GlcNAc₂ é o precursor para a formação de *N*-glicanos complexos e do tipo *High*

mannose. Entretanto, a maturação da glicoproteína pode continuar no complexo de Golgi, onde mais resíduos de manose podem ser removidos. Por exemplo, uma manosidase presente no complexo de Golgi pode transformar oligossacarídeos do tipo $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_{6-9}$ em $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_5$ (BISCHOFF *et al.*, 1986).

No complexo de Golgi a cadeia do oligossacarídeo pode ser alongada pela adição de outros monossacarídeos (galactose, GlcNAc, ácido siálico fucose e etc.)

Figura 42 - Biossíntese e processamento eucarioto de glicoproteínas N-ligadas.



Adaptado de Kukuruzinska; Lennon, 1998. O precursor dolicol doa o oligossacarídeo para a Asn da glicoproteína recém sintetizada. Após remoção de três resíduos de glicose e um resíduo de manose, a glicoproteína é secretada para o complexo de Golgi, onde pode ocorrer a remoção de três resíduos de manose e o direcionamento da glicoproteína para a montagem de estruturas complexas, *high mannose* ou glicanos híbridos.

Com base nestas informações, é proposto que o oligossacarídeo de H-3 seja maturado pela via alternativa de formação de oligossacarídeos complexos que ocorre no complexo de Golgi. Sendo assim, o oligossacarídeo de H-3 pode conservar, a partir do precursor dolicol, o core $\text{Man}\alpha3(\text{Man}\alpha6)\text{Man}\beta4\text{GlcNAc}\beta4\text{GlcNAc}$, além de outras três manoses ($\text{Man}\alpha3$ e $\text{Man}\alpha2\text{Man}\alpha6$) ligadas no braço II ($\text{Man}\alpha3\text{Man}\beta$), formando uma estrutura triantênaria de composição $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_6$.

Em mamíferos, as antenas do precursor $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ são geralmente alongadas por adições alternadas de galactose e GlcNAc, formando o “bloco de construção” LacNAc ($\text{Gal}\beta4\text{GlcNAc}$). A antena pode receber grandes quantidades de LacNAc para formar estruturas conhecidas como polilactosaminas (DELL; MORRIS, 2001).

Em invertebrados, o β -GalNAc é adicionado em substituição a galactose presente em mamíferos, resultando em uma estrutura conhecida como LacDiNAc ($\text{GalNAc}\beta4\text{GlcNAc}$) (DELL *et al.*, 1999).

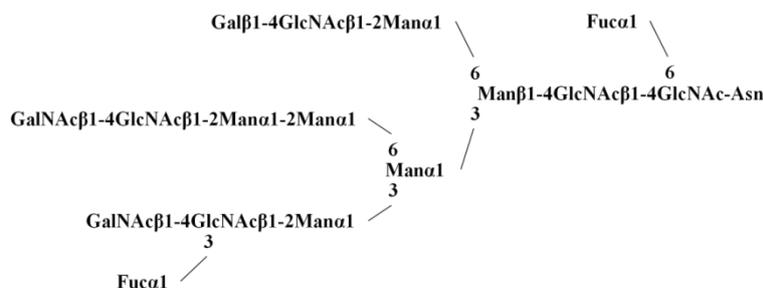
Em H-3 foi observada a presença de dois pares de *N*-acetil Hexosaminas, podendo estes serem considerados como dois LacDiNAc. Entretanto, um dos resíduos de LacNAc foi encontrado com a adição de uma deoxihexose.

A biossíntese de oligossacarídeos complexos é finalizada pela adição de uma variedade de “tampas” ou “decorações”, incluindo a adição de ácido siálico e fucose (DELL; MORRIS, 2001).

Dois resíduos de deoxihexose foram observados em H-3, um deles está ligado ao GlcNAc mais interno da estrutura oligosacarídica. O outro resíduo parece ter sido adicionado a um dos LacDiNAc encontrados, uma vez que não é possível fazer distinção, no espectro, das massas separadas da deoxihexose e do LacDiNAc. Portanto, é proposto que um dos LacDiNAc encontrados tenha sido “decorada” para formar um análogo do antígeno Le^x (GalNAcβ4(Fucα3)GlcNAcβ).

Assumindo que o oligossacarídeo de αH-3 seja um triantenário é impossível precisar a qual das antenas está presente cada sacarídeo descrito aqui. Por convenção, a antena I foi considerada como LacNAc, a antena II foi considerada contendo a estrutura LacDiNAc e a antena III foi considerada como possuidora do LacDiNAc decorado com uma fucose (FIGURA 43).

Figura 43. Possível oligossacarídeo presente em H-3.



O oligossacarídeo complexo de H-3 foi predito com base nas informações literárias, especialmente em DELL; MORRIS, 2001; WILSON, 2002 e KUKURUZINSKA; LENNON 1998.

A cadeia α teve sua estrutura primária parcialmente determinada (90%) por MS². Uma vez que o aminoácido 1 (Q) fora modificado para ácido piroglutâmico (Z), ficou óbvio que este, de fato, era o N-terminal da cadeia polipeptídica e que a diferença de massa entre a soma dos peptídeos sequenciados por MS² e a massa intacta de αH-3, obtida por ESI-MS, residia no C-terminal. Portanto, a técnica de biologia molecular 3'RACE foi empregada para a determinação da extremidade C-Terminal de αH-3.

O fragemento obtido por 3'RACE consistiu numa sequência de aproximadamente 500 pb, responsável pela codificação de 82 aminoácidos, além de um códon de parada e uma região não codificante.

Destes 82 aminoácidos, 54 foram complementares a sequência obtida por MS², servindo apenas para confirmação do sequenciamento por MS/MS, enquanto que 28 aminoácidos representaram uma extensão da região C-terminal, totalizando 173 resíduos de aminoácidos, o que equivale a uma massa de 19.099 Da, valor muito superior aos 17.548 ±2 Da determinados por ESI-MS.

Essa divergência de valores pode indicar o possível processamento proteolítico sofrido pela cadeia α .

A sequência de α H-3 obtida pela sobreposição das duas técnicas (MS² e RACE) revelou, na posição 156, uma Asn seguida por dois resíduos (VT) que caracterizam um sítio de *N*-glicosilação. Sítios de *N*-glicosilação em alguns casos podem funcionar como marcadores que indicam como ou onde deva ocorrer o processamento proteolítico de tais proteínas.

Sendo assim, é proposto que o C-terminal da cadeia α de H-3 seja processado pela clivagem no carboxi terminal da ¹⁵⁵Ala, havendo a remoção do peptídeo ¹⁵⁶NVTTVLPPDAFSLPP¹⁷⁰ e posterior ligação das cadeias peptídicas resultantes (¹Z-A¹⁵⁵ e ¹⁷¹GCG¹⁷³).

Visto que fora observado a presença de quatro resíduos de cisteína em α H-3 e que somente três foram identificados através de MSMS, o quarto resíduo (encontrado somente na sequência deduzida por RACE) deve existir na proteína madura. Curiosamente, o resíduo 4 de Cys reside na posição 172, sugerindo que deve haver um processamento proteolítico seguido de uma ligação peptídica entre os resíduos Ala¹⁵⁵ e Gly¹⁷¹. Eventualmente, a ponte S-S entre a Cys172 e a cadeia polipeptídica ¹Z-A¹⁵⁵ mantêm as extremidades ligadas até que haja a formação da nova ligação peptídica.

Além do processamento proteolítico no C-terminal, a cadeia α de H-3 parece sofrer a remoção de uma sequência interna que está presente na lectina putativa de *A. queenslandica*. Curiosamente, o hexapeptídeo em questão flanqueia a região do *N*-glicano, diferentemente do que ocorre com o C-terminal, onde o glicano, se existe, é removido por proteólise juntamente com o peptídeo. Em ambos os casos, as cadeias peptídicas originadas por proteólise são religadas.

O processamento proteolítico é um fator crucial para a maturação de diversas moléculas de caráter proteico, incluindo alguns hormônios (CHRETIEN; LI,

1967). Por vezes, a clivagem específica por parte das proproteínas convertases (PC), um grupo de proteases envolvidas na maturação de proproteínas, envolve o reconhecimento da sequência (K/R)-X_n-(K/R), onde X é qualquer aminoácido com exceção de Cys, e n = 0, 2, 4 ou 6 resíduos (SEIDAH; CHRETIEN, 1998).

Uma sequência similar àquele reconhecido pelas PCs fora observado em α H-3 e α pAqL: ⁶⁶KRIRY⁶⁹. Este pentapeptídeo antecede o possível sítio de clivagem encontrado em α pAqL, indicando o provável envolvimento de PCs no processamento pós traducional das cadeias α das lectinas de *H. caerulea* e *A. queenslandica*.

Os dados apresentados juntamente com as discussões aqui levantadas levam a proposição de um mecanismo de modificação pós traducional para as cadeias α das lectinas de *H. caerulea* e *A. queenslandica* (FIGURA 44).

Hipoteticamente, a cadeia α é traduzida como uma proproteína de 197 resíduos de aminoácidos e dois sítios de *N*-glicosilação. Após ou durante a síntese, o *N*-glicano é montado no sítio NET ou em ambos os sítios de glicosilação.

Em seguida, duas regiões da proproteína são removidas via processamento proteolítico originando um precursor de 177 resíduos de aminoácidos e um sítio de *N*-glicosilação (NET).

Finalmente, a proteína é direcionada para a secreção, uma vez que análises do peptídeo sinal de α pAqL indicam a função extracelular da proteína, e o peptídeo sinal é removido.

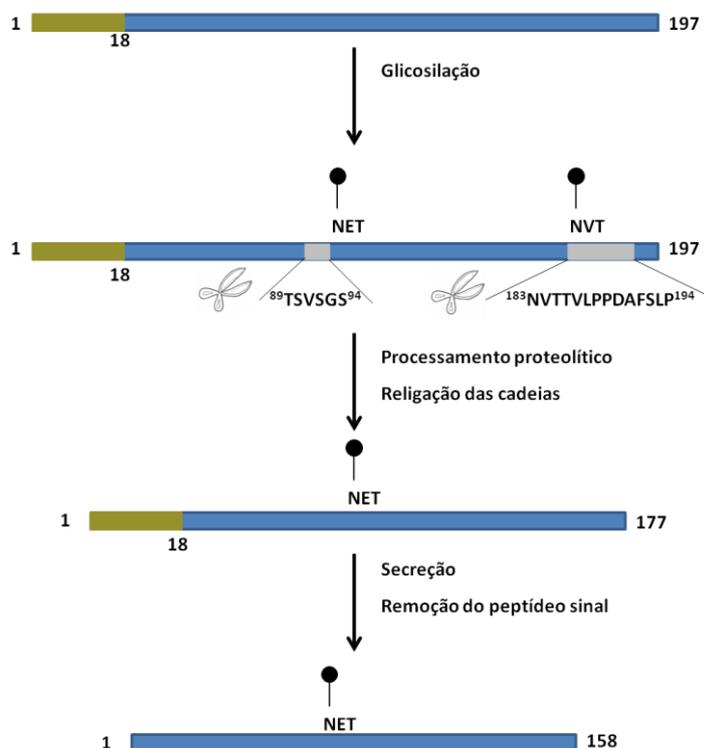
Outro ponto interessante sobre a estrutura primária de α H-3 é a presença de uma sequência repetida. Estes domínios *tandem* podem estar relacionados com o ancoramento de β H-3 em α H-3. Visto que a provável organização oligomérica de H-3 seja: 2 β e 1 α /1 α' , é de se esperar que haja pontos específicos de ancoramento para as cadeias β . Deve haver pelo menos dois sítios de ligação em α H-3. A presença destes domínios repetidos sugere que estes pontos sejam os sítios de ancoramento de β H-3.

Sendo assim, é possível estimar que as cadeias β sejam os DRCs de H-3 e que α seja uma proteína de ancoramento. Vale ressaltar que α é o carreador do cromóforo e é uma proteína extracelular, assim como β . Visto que H-3 não parece estar envolvida na defesa ou manutenção de simbiontes é de se especular o envolvimento do cromóforo na proteção da esponja contra fotooxidação.

Neste contexto, β pode fornecer o suporte mecânico para α , através da fixação da estrutura proteica por interação lectínica com carboidratos da matriz ou

mesmo da membrana. α , por sua vez, usa o cromóforo para preservar a esponja de danos causados pela luz.

Figura 44 - Processamento pós traducional hipotético das cadeias α de H-3 e pAqL.



A cadeia α é traduzida em um propeptídeo de 197 aminoácidos e convertida por processamento proteolítico em uma cadeia polipeptídica de 178 aminoácidos, contendo um único sítio de *N*-glicosilação. Finalmente, a cadeia α é secretada e o peptídeo sinal removido.

A cadeia β de H-3 teve sua estrutura primária completamente determinada por MS/MS. A massa dos peptídeos (11.622 Da), obtidos por digestões proteolíticas, somada a um resíduo de HexNAc (203 Da) está de bom acordo com a massa de β H-3 determinada por ESI-MS. A presença do sítio de *N*-glicosilação em β H-3 indica que a HexNAc encontrada no peptídeo T-3 corresponde a um resíduo de GlcNAc.

Na sequência de aminoácidos de β H-3 foram observados cinco pontos de microheterogeneidade, o que caracteriza a presença de isoformas em β H-3. Isoformas, em geral, surgem a partir de eventos pós traducionais como a adição de grupos prostéticos a certos sítios, ou mesmo por eventos pós transcricionais como o *splicing* alternativo. As isoformas podem, ainda, serem provenientes de genes distintos.

Não há dados disponíveis sobre a presença de isoformas em lectinas de esponjas, mas microheterogeneidades são comuns em lectinas de algas marinhas

vermelhas (CALVETE *et al.*, 2001; MEDINA-RAMIREZ *et al.*, 2006; NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012).

A estrutura de β H-3 não foi similar a nenhuma lectina conhecida. Entretanto, a cadeia β da lectina putativa de *A. queenslandica* apresentou alto grau de identidade com β H-3 e ofereceu suporte para a resolução da estrutura primária de β H-3.

Todos os aminoácidos de β H-3 foram determinados por MS/MS, exceto o dipeptídeo $^{61}\text{CK}^{62}$, que foi identificado pela identidade com $p\beta\text{AqL}$. A presença da ^{61}Lys foi atestada pelo peptídeo T3, que por ser um peptídeo tríptico só existiria caso o aminoácido que o antecede fosse Arg ou Lys. O resíduo de ^{62}Cys foi confirmado pela medição da massa de H-3 reduzida e alquilada. Tal experimento revelou que β H-3 possui duas Cys, uma vez que um dos resíduos de Cys estava na posição 4, o outro resíduo foi considerado como estando na posição 61. Foi também considerado que estes dois resíduos formam uma ponte dissulfeto intracadeia.

Assim como α H-3, a cadeia β apresenta três deleções em comparação a $p\beta\text{AqL}$. Além do peptídeo sinal de 19 resíduos presente em $p\beta\text{AqL}$, β H-3 carece de uma região interna de seis resíduos de aminoácidos ($^{80}\text{VSENGE}^{85}$) e uma região C-terminal de 55 aminoácidos, ambas presentes em $p\beta\text{AqL}$.

Curiosamente, tal qual em α H-3, a região de seis aminoácidos deletada em β H-3 ocorre flanqueando o sítio de *N*-glicosilação. Contudo, não é possível inferir que tipo de mecanismo é responsável pela remoção da sequência interna em questão.

Além dos resultados discutidos até aqui, neste trabalho fomos capazes de obter cristais da lectina H-3.

Os primeiros cristais foram obtidos em micro escala através da utilização de um robô. Infelizmente, as linhas de luz para difração de raios X existentes no Brasil não permitem a utilização de micro cristais.

Para obter cristais passíveis de difração, foram realizados experimentos de cristalização em placas de Limbro. Após 15 dias da montagem das placas foram observados cristais de H-3 nativa e complexada com GalNAc. Estes cristais foram transportados para a linha de luz MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, SP. No LNLS os cristais foram submetidos à difração.

Infelizmente, a formação dos cristais não fora adequada e o padrão de difração foi fraco, a resolução de apenas 5 Å e portanto, um conjunto de dados de

qualidade que permita a resolução da estrutura da lectina não pôde ser coletado (dados não mostrados).

Dentre as lectinas de esponja, somente uma foi cristalizada e teve sua estrutura tridimensional resolvida. A lectina de *Cinachyrella* sp., CchG foi cristalizada em três condições distintas: (1) tampão Tris 100 mM, pH 8,5 contendo CaCl₂ 200 mM e PEG 4000 20%; (2) tampão MES 100 mM, pH 6,5, contendo sulfato de amônio 200 mM e PEG 5000 MME 30%; (3) tampão Tris 100 mM, pH 8,5, contendo sulfato de lítio 200 mM e PEG 3000 30 % (FREYMAN *et al.*, 2012). Curiosamente, a condição de cristalização 3 para CchG conhece com uma condição de cristalização de H-3.

Para a resolução da estrutura da galectina CchG, o problema das fases foi resolvido por substituição molecular utilizando a estrutura da congerina, uma galectina isolada da enguia *Anguilla anguilla* (FREYMAN *et al.*, 2012).

Visando resolver a estrutura tridimensional de H-3, novos experimentos de difração serão conduzidos para obtenção de cristais de qualidade passíveis de difração. Infelizmente, o problema das fases não poderá ser resolvido por substituição molecular, uma vez que não existem lectinas similares a H-3 com estrutura tridimensional resolvida, na verdade, sequer existem lectinas similares a H-3.

O caminho para a resolução da estrutura cristalográfica de H-3 deve mesmo ser o emprego das técnicas de MIR (*Multiple Isomorphous Replacement*) ou MAD (*Multiwavelength Anomalous Diffraction*), o que faz necessário a obtenção de co-cristais complexados com metais pesados.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.

Duas novas lectinas foram isoladas da esponja *Haliclona caerulea*. As duas novas lectinas (H-1 e H-3) foram caracterizadas e suas propriedades físico-químicas e biológicas foram avaliadas. H-1 apresentou elevado grau de toxicidade contra náuplios de *Artemia*, enquanto que H-3 foi considerada não tóxica. H-3 teve sua sequência de aminoácidos determinada e não compartilha características com nenhuma lectina conhecida não podendo, portanto, ser classificada como pertencente a alguma das famílias de lectinas animais conhecidas. Entretanto, uma proteína putativa codificada no genoma de *Amphimedon queenslandica* foi identificada e mostrou alto grau de identidade com H-3. As duas proteínas podem integrar uma nova família de lectinas, desde que sua estrutura tridimensional seja conhecida e confirmada ser única. Para tal, cristais de H-3 foram obtidos, mas não foi possível obter um padrão de difração de boa qualidade neste trabalho. H-3 é uma proteína azul, pois interage com um cromóforo. É a primeira vez que é evidenciada a interação entre uma lectina e um cromóforo natural. Foi também a primeira vez que uma lectina de esponja teve sua composição glicídica confirmada. Além disso, foi também observado que H-3 sofre um processamento pós-traducional complexo que não foi completamente esclarecido neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ACKERMAN S.J.; CORRETTE S.E.; ROSENBERG, H.F.; BENNETT, J.C.; MASTRIANNI, D.M.; NICHOLSON-WELLER, A.; WELLER, P.F.; CHIN, D.T.; TENEN D.G. Molecular cloning and characterization of human eosinophil Charcot – Leyden crystal protein (lysophospholipase), *J. Immunol.*, v.150, p.456– 468, 1993.
- ALLES, V.V.; BOTAZZI, B.; PERI, G.; GOLAY, J.; INTRONA, M.; MANTOVANI, A. Inducible expression of PTX3, a new member of pentraxins family, in humans mononuclear phagocytes. *Blood*, v.84, p.3483-3493, 1994.
- ANGATA, T.; VARKI, A. Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: An evolutionary perspective. *Chem Rev*, v.102, p.439, 2002.
- ASHWELL, G.; HARFORD, J. Carbohydrate specific receptors of the liver. *Ann Rev Biochem*, v.51, p.531–554, 1982.
- ATTA, A.M.; BARRAL-NETO, M.; PEIXINHO, S.; SOUSA-ATTA, M.L.B. Isolation and functional characterization of a mitogenic lectin from the marine sponge *Cinachyrella alloclada*. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, v.22, n.3, p.379-385, 1989.
- ATTA, A.M.; MENEZES, E.P.; PEIXINHO, S.; SOUSA-ATTA, M.L.B. Isolation of a lectin from the marine sponge *Desmapsama anchorata* by affinity chromatography on raffinose-Sepharose 6B. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, v.23, p.191-194, 1990.
- AUB, J.C.; SANFORD, B.H.; COTE, M.N. Studies on reactivity of tumor and normal cell to a wheat germ agglutinin. *Proceedings of the National Academy of Science*, v.54 p.396-399, 1965.
- BARONDES, S.H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends in Biochemical Sciences*. v.13, p.480-482, 1988.
- BARONDES, S.H.; CASTRONOVO, V.; COOPER, D.N.; CUMMINGS, R.D.; DRICKAMER, K.; FEIZI, T.; GITT, M.A.; HIRABAYASHI, J.; HUGHES, C.; KASAI, K. Galectins: A family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*, v.76, n.4, p.597–598, 1994.
- BARONDES, S.H.; COOPER, D.N.; GITT, M.A.; LEFFLER, H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*, v.269, n.33, p.20807–20810, 1994.
- BIANCHET, M. A.; ODOM, E. W.; VASTA, G.R.; AMZEL, L.M. A novel fucose recognition fold involved in innate immunity. *Nat Struct Biol*, v.9, p.628–634, 2002.
- BICKERSTAFF, M.C.M.; BOTTO, M.; HUTCHINSON, W.L.; HERBERT, J.; TENNET, G.A.; BYBEE, A.; MITCHELL, D.A.; COOK, H.T.; BUTLER, P.J.G.; WALPORT, M.J.; PEPYS, M.B. Serum amyloid P component controls chromatin

degradation and prevents antinuclear autoimmunity. *Nature Medicine*, v.5, p.448-454, 1999.

BISCHOFF, J.; KORNFELD, R. The soluble form of a rat liver α -mannosidase is immunologically related to the endoplasmic reticulum membrane α -mannosidase. *J Biol Chem*, v.261, p.4758-476, 1986.

BORNEMANN, S.; RIETSCHEL, B.; BALTRUSCHAT, S.; KARAS, M.; MEYER, B. A novel polyacrylamide gel system for proteomic use offering controllable pore expansion by crosslinker cleavage. *Electrophoresis* v.31, p.585-592, 2010.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E.. Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, v.119, p.419, 1954.

BRETTING, H.; DONADEY, C.; VACELET, J.; JACOBS, G. Investigations on the occurrence of lectins in marine sponges with special regard to some species of the family Axinellidae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, v.70, p.69-76, 1981.

BRETTING, H.; KABAT, E.A. Purification and characterization of the agglutinins from the sponge *Axinella polypoides* and a study of their combining sites. *Biochemistry*, v.15, p.3228-3236, 1976.

BRETTING, H.; PHILLIPS, S.G.; KLUMPART, H.J.; KABAT, E.A. A mitogenic lactose-binding lectin from the sponge *Geodia cydonium*. *The Journal of Immunology*, v.127, n.4, p.1652-1658, 1981.

BRINDA, K. V.; SUROLIA, A.; VISHVESHWARA, S. Insights into the quaternary association of proteins through structure graphs: a case study of lectins. *Biochem J.*, v.1; n.391, v.1-15, 2005.

BUCK, F.; LUTH, C.I.; BRETTING, H. Comparative investigations on the amino acid sequences of different isolectins from the sponge *Axinella polypoides*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1159, p.1-8, 1992.

BUCK, F.; SCHULZE, C.; BRELOER, M.; STRUPAT, K.; BRETTING, H. Amino acid sequence of the D galactose binding lectin II from the sponge *Axinella polypoides* and identification of the carbohydrate binding site in lectin II and related lectin I. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.121, p.153-160.

CALVETE, J.J.; SAKER-SAMPAIO, S.; MURCIANO, M.P.; NAGANO, C.S.; GRANGEIRO, T.B.; RAMOS, M.V.; BLOCH, C.JR.; SILVEIRA, S.B.; FREITAS, B.T.; SAMPAIO, A.H. The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. *Cell Mol Life Sci*, v.57, p.343-350, 2000.

CARBALLO, J.L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z.L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M.D. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol.* v.2, p.17-21, 2002.

- CARNEIRO, R.F. Purificação, caracterização parcial e análise por espectrometria de massa de uma lectina da esponja marinha *Haliclona (Soestella) caerulea*. 2011. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, FORTALEZA 2011.
- CASH, H.L.; WHITHAM, C.V.; BEHRENDT, C.L.; HOOPER, L.V. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*, v.313, n.5790, p.1126–1130, 2006.
- CHRBTIEN M.; LI, C.H. Isolation, purification and characterization of lipotropic hormone from sheep pituitary glands. *Can J Biochem*, v.45, p.1163-1174, 1967.
- CONSORTIUM. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. The *C. elegans* Sequencing Consortium. *Science*, v.282, p.2012–2018, 1998.
- COOPER, D.; BUTCHER, C.M.; BERNDT, M.C.; VADAS, M.A. P-selectin interacts with a beta 2-integrin to enhance phagocytosis. *J Immunol*, v.153, p.3199–3209, 1994.
- cryptophycean algae. Occurrence of dihydrobiliverdin and mesobiliverdin in cryptomonad biliproteins. *J. Biol. Chem.* v.267, p.7315–7331, 1992.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids*, v. 16, n. 22, p. 10881-90, 1988.
- DELL, A.; MORRIS, H.R.; Glycoprotein structure determination by mass spectrometry *Mass Spectrometry*. *Science*, v.291, p.2351-2355, 2001.
- DELL, A; HASLAM, S.M.; MORRIS, H.R.; KHOO, K. Immunogenic glycoconjugates implicated in parasitic nematode diseases. *Biochim Biophys Acta*, v.1455, p.353-362, 1999.
- DODD, R.Y.; MACLENNA, A.P.; HAWKINS, D.C. Haemagglutinins from marine sponges. *Vox Sanguis*, v.15, n.5, p.386, 1968.
- DOEGE, K.; SASAKI, M.; HORIGAN, E.; HASSELL, J.R.; YAMADA, Y. Complete primary structure of the rat cartilage proteoglycan core protein deduced from cDNA clones. *J Biol Chem*, v.262(36), p.17757–17767, 1987.
- DOGOVIC, N.; SLADIC, D.; KLJAJIC, Z.; POZNOVIC, S.; GASIC, M.L. Isolation and partial characterization of a lectin from the marine sponge *Crambe crambe*. *Journal Serbian Chemical Society*, v.60, n.2, p.83-88, 1996.
- DRESCH, R.R.; HAESER, A.S.; LERNER, C.; MOTHEs, B.; VOZARI-HAMPE, M.M.; HENRIQUES, A.A. Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porifera) nativas da costa atlântica do Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.15(1); p.16-22, 2005.
- DRESCH, R.R.; ZANETTI, G.D.; LERNER, C.B.; MOTHEs, B.; TRINDADE, V.M.T.; HENRIQUES, A.T.; VOZARI-HAMPE, M.M. ACL-I, a lectin from the marine sponge *Axinella corrugata*: Isolation, characterization and chemotactic activity. *Comp. Biochem. Phys. C* v.148: p.23-30, 2008.

DRESCH, R.R. Purificação e caracterização das lectinas ACL-I e ACL-II da esponja marinha *Axinella corrugata*, imunolocalização da ACL-I e avaliação do seu potencial como marcador de transformação celular. Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas da faculdade de farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 222p, 2008.

DRESCH, R.R.; LERNER, C.B.; MOTHE, B.; TRINDADE, V.M.T.; HENRIQUES, A.T.; VOZARI-HAMPE, M.M. Biological activities of ACL-I and physicochemical properties of ACL-II, lectins isolated from the marine sponge *Axinella corrugata*. *Comp. Biochem. Phys. B* v.161, p.365-370, 2012.

DRICKAMER, K. Evolution of Ca²⁺-dependent animal lectins. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, v.45, p.207–232, 1993.

DRICKAMER, K. A genomics resource for animal lectins. London, 2006. Disponível em <<http://www.imperial.ac.uk/research/animalletcins/>>. Acessado entre em: 02 e 10 de jan.2013

DRICKAMER, K. C-type lectin-like domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v.9, p.585–590, 1999.

DRICKAMER, K. Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. *Nature*, v.360, p.183–186, 1992.

DRICKAMER, K.; TAYLOR, E.M. Biology of animal lectins. *Annu. Rev. Cell Biol.*, v.9, p.237-264, 1993.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, v.28, p.350-356, 1956.

ELLGAARD, L.; RIEK, R.; HERRMANN, T.; GUNTERT, P.; BRAUN, D.; HELENIUS, A.; WUTHRICH, K. NMR structure of the calreticulin P-domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.98, p.3133-3138, 2001.

ELOLA, M.T; VASTA, G.R. Lectins from the colonial tunicate *Clavelina picta* are structurally related to acute phase reactants from vertebrates. *Annals of the New York Academy Science*, v.712, p.321-323, 1994.

ENDO, Y.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. *Int J Biochem Cell Biol*, v.43, n.5, p.705-712, 2011.

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

FINNEY, D.. Probit Analysis. University press, Cambridge, UK , v.18, p. 37-77, 1971.

FREYMANN, D.M.; NAKAMURA, Y.; FOCIA, P.J.; SAKAI, R.; SWANSON, G.T. Structure of a tetrameric galectin from *Cinachyrella* sp. (ball sponge). *Acta Crystallography*, v.68, p.1163-1674, 2012.

FUJITA, T. Evolution of the lectin–complement pathway and its role in innate immunity. *Nature publishing groups*, v.2, p.346-353, 2002.

FUNAYAMA, N.; NAKATSUKASA, M.; KURAKU, S.; TAKECHI, K.; DOHI, M.; IWABE, N.; MIYATA, T.; AGATA, K. Isolation of Ef silicatein and Ef lectin as molecular markers for sclerocytes and cells involved in innate immunity in the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis*. *Zoological Science*, v.22, p.1113-1122, 2005.

FU-TONG, L.; RABINOVICH, A. Galectins as modulators of tumor progression. *Natural Reviews Cancer*, v.5, p.29-41, 2005.

GALILU, U. Interaction of natural anti-Gal antibody with alpha galactosyl epitopes; a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunology Today*, v.14, p.480-482, 1993.

GARLANDA, C.; HIRSCH, E.; BOZZA, S.; SALUSTRIK, A.; ACETIS, M.; NOTA, R.; MACCAGNOK, A.; RIVA, F.; BOTTAZZI, B.; PERI, G.; DONI, A.; VAGO, L.; BOTTO, M.; SANTISQ, R.; CARMINATI, R.; SIRACUSAK, G.; ALTRUDA, F.; VECCHI, A.; ROMANI, L.; MANTOVANI, A. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature*, v.420, p.182-186. 2002.

GASPARINI, F.; FRANCHI, N.; SPOLAORE, B.; BALLARIN, L. Novel rhamnose-binding lectins from the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Dev. Comp. Immunol.*, v.16, p.944–953, 2008.

GEWURZ, H.; ZHANG, X.H.; LINT, T.F. Structure and function of the pentraxins. *Current Opinion in Immunology*, v.7, p.54-64, 1995.

GIGA, Y.; IKAI, A.; TAKAHASHI, K. The complete amino acid sequence of echinoidin, a lectin from coelomic fluid of the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. *J.Biol. Chem.*, v.262, p.6197-6203, 1987.

GLAZER, A.N. Phycobilisomes: structure and dynamics. *Annu. Rev. Microbiol.* v.36, p.173–198, 1992.

GOKUDAN, S.; MUTA, T.; TSUDA, R.; KOORI, K.; KAWAHARA T.; SEKI, N.; MIZUNOE, Y.; WAI, S.N.; IWANAGA, S.; KAWABATA, S. Horseshoe crab acetyl-group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen. *Proc. Natl Acad. Sci.*, v.96, p.10086–10091, 1999.

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

GOUET, P.; COURCELLE, E.; STUART, D.I.; METOZ, F. ESPript: multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics*, v. 15, p. 305-8, 1999.

GUNDAKER, D.; LEYS, S.P.; SCHRÖDER, H.C.; MÜLLER, I.M.; MÜLLER, W.E.G. Isolation and cloning of a C-type lectin from the hexactinellid sponge *Aphrocallistes vastus* a putative aggregation factor. *Glycobiology*, v.11, p. 21-29, 2001.

HAMMARSTRON, S.; MURPHY, L.; GOLDSTEIN, I.; ETZLER, M. Carbohydrate binding specificity of four N-acetyl-D-galactosamine specific lectins : Helix pomatia agglutinin, soybean agglutinin, lima bean lectin and dolichus biflorus lectin. *Biochemistry*, v.16, p.2750-2755, 1997.

HATAKEYAMA, T.; FURUKAWA, M.; NAGATOMO, H.; YAMASAKI, N.; MORI, T. Oligomerization of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* induced by the binding of carbohydrate ligands. *J. Biol. Chem.*, v.271, p.16915-16920, 1996.

HATAKEYAMA, T.; KOHZAKI, H.; NAGATOMO, H.; YAMASAKI, N. Purification and characterization of four Ca dependent lectins from the marine invertebrate, *Cucumaria echinata*, *J. Biochem.* v.116, p.209-214, 1994.

HATAKEYAMA, T.; NAGATOMO, H.; YAMASAKI, N. Interaction of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* with the erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.*, v.270, p.3560,1995.

HAZES, B. The (QxW)₃ domain: a flexible lectin scaffold. *Protein Sci*, v.8, p.1490–501, 1996.

HEGER A.; HOLM L. Rapid automatic detection and alignment of repeats in protein sequences. *Proteins*. v. 41, n. 2, p. 224-237, 2000.

HERRMANN, J.; TURCK, C.W.; ATCHISON, R.E.; HUFLEJT, M.E.; POULTER, L.; GITT, M.A.; BURLINGAME, A.L.; BARONDES, S.H.; LEFFLER, H. Primary structure of the soluble lactose binding lectin L-29 from rat and dog and interaction of its non-collagenous proline-, glycine-, tyrosine-rich sequence with bacterial and tissue collagenase. *J Biol Chem.*, v.268, n.35, p.26704–26711, 1993.

HINEK, A.; WRENN, D.S.; MECHAM, R.P.; BARONDES S.H. The elastin receptor a galactoside-binding protein. *Science*, v.239, p.1539–1540, 1998.

HIRABAYASHI, J.; HASHIDATE, T.; ARATA, Y.; NISHI, N.; NAKAMURA, T.; HIRASHIMA, M.; URASHIMA, T.; OKA, T.; FUTAI, M.; MULLER, W.E.; YAGI, F.; KASAI, K. Oligosaccharide specificity of galectins: A search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta*, v.1572, p.232–254, 2002.

HOSONO, M.; KAWAUCHI, H.; NITTA, K.; TAKATANAGI, Y.; SHIOKAWA, H.; MINEKI, R.; MURAMOTO, K. Three rhamnose-binding lectins from *Osmerus eperlanus mordax* (Olive rainbow smelt) roe. *Biol. Pharm. Bull*, v.16, p.239–24, 1993.

HUGHES, R.C. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, v.1473, n.1, p.172–185, 1993.

IOBST, S. T.; DRICKAMER, K. Binding of sugar ligands to Ca dependent animal lectins. Generation of high affinity galactose binding by site directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, v.269, p.15512–15519, 1994.

- IOBST, S.T.; DRICKAMER, K. Binding of sugar ligands to Ca dependent animal lectins. II Generation of high affinity galactose binding site direct mutagenesis. *J Biol Chem*, v.269, p.15512-15519, 1994.
- ISHITSUKA, R.; KOJIMA, K.; UTSUMI, H.; OGAWA, H.; MATSUMOTO, I. Glycosaminoglycan binding properties of annexin IV, V e VI. *The Journal of Biological chemistry*, v.273, n.16, p.9935-9941, 1998.
- ITIN, C.; ROCHE, A.C.; MONSIGNY, M.; HAURI, H.P. ERGIC-53 is a functional mannose-selective and calcium-dependent human homologue of leguminous lectins. *Mol Biol Cell*, v.7, p.483-493, 1996.
- JANCARIK, J, KIM, S.-H. Sparse-matrix sampling - A screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* 24, 409-411, 1991.
- JIMBO, M.; YANOHARA, T.; KOIKE K.; KOIKE, K.; SAKAI, R.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. The D-galactose-binding lectin of the octocoral *Sinularia lochmodes*: Characterization and possible relationship to the symbiotic dinoflagellates. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.125, n.2, P.227-236, 2000.
- KAKIUCHI, M.; OKINO, N.; SUEYOSHI, N.; ICHINOSE, S.; OMORI, A.; KAWABATA, S.; YAMAGUCHI, K.; ITO, M. Purification, characterization, and cDNA cloning of a N-acetylgalactosamine-specific lectin from starfish, *Asterina pectinifera*. *Glycobiology*, v.12, p.85-94, 2002.
- KAMIYA, H.; MURAMOTO, K.; HOSHINO, T.; RAJ, U. Isolation and characterization of hemagglutinins from the sponge *Dysidea herbacea*. *Experientia*, v.41, p.1201-1202, 1985.
- KAMIYA, H.; MURAMOTO, K.; HOSHINO, T.; YAMAZAKI, M.; RAJ, U. A hemagglutinin in the sponge *Phyllospongia foliascens*: isolation and characterization. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, v.52, n.1, p.2205, 1986.
- KAWAGISHI, H.; YAMAWAKI, M.; ISOLE, S.; USUI, T.; KIMURA, A.; CHIBA, S. Two lectins from the marine sponge *Halichondria okadai*; an N-acetyl-sugar specific lectin (HOL-I) and an N-acetyllactosamine specific lectin (HOLII). *J. Biol. Chem*, v.269, p.1375-1379, 1994.
- KAWASAKI, N.; KAWASAKI, T.; YAMASHINA, I. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum. *J Biochem*, v.94, p.937-947, 1983.
- KAWSAR, S.M.A.; AFTABUDDIN, S.; YASUMITSU, H.; OZEKI, Y. the cytotoxic activity of two D-galactose-binding lectins purified from marine invertebrates. *Aech. Biol. Sci.*, v.62(4), 1027-1034, 2010.
- KAWSAR, S.M.A.; FUJII, Y.; MATSUMOTO, R.; ICHIKAWA, T.; TATENO, H.; HIRABAYASHI, J.; YASUMITSU, H.; DOGASAKI, C.; HOSONO, M.; NITTA, K.; HAMAKO, J.; MATSUI, T.; OZEKI, Y. Isolation, purification, characterization and glycan-binding profile of a D-galactoside specific lectin from the marine sponge,

Halichondria okadai. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, v.150, p.349-357, 2008.

KILKER, R.D.; SAUNIER, B.; TKACZ, J.S.; HERSCOVICS, A. Partial purification from *Saccharomyces cerevisiae* of a soluble glucosidase which removed the terminal glucose from the oligosaccharide glc3man9GlcNAc2 . J Biol Chem, v.256, p.5299-5303, 1981.

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

KOLATKAR, A.R.; WEIS, W.I. Structural basis of galactose recognition by C-type animal lectins. Journal of Biological Chemistry., v.271 (22), p.6679-6685, 1996.

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

LASKY, L.A. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. Science, v.258, p.964-969, 1992.

LEE, J.K.; BAUM, L.G.; MOREMEN, K.; PIERCE, M. The X-lectins: A new family with homology to the *Xenopus laevis* oocyte lectin XL-35. Glycoconj J, v.21, p.443-450, 2004.

LEE, J.K.; BUCKHAULTS, P.; WILKES, C.; TEILHET, M.; KING, M.L.; MOREMEN, K.W.; PIERCE, M. Cloning and expression of a *Xenopus laevis* oocyte lectin and characterization of its mRNA levels during early development. Glycobiology, v.7, p.367-372, 1997.

LEE, R. T.; ICHIKAWA, Y.; FAY, M.; DRICKAMER, K.; SHAO, M.C.; LEE, Y. C. Ligand binding characteristics of a rat serum type mannose binding protein (MBP-A). Homology of binding site architecture with mammalian and chicken hepatic lectins. J. Biol. Chem., v.266, p.4810-4815, 1991.

LEFFLER, H.; CARLSSON, S.; HEDLUND, M.; QIAN, Y.; POIRIER, F. Introduction to galectins. Glycoconj. J., v.19, p.433-440, 2004.

LEHMANN, S.; KUCHLER, S.; THEVENIAU, M.; VINCENDON, G.; ZANETTA, J.P. An endogenous lectin and one of its neuronal glycoprotein ligands are involved in contact guidance of neuron migration. Proc Natl Acad Sci, v. 87(16), p.6455-6459, 1990.

LONSADZE, A.; TER-HOVHANNISYAN, V.; CHERNOFF, Y.; BORODOVSKY, M. Gene identification in novel eukaryotic genomes by self-training algorithm. Nucleic Acids Res v.33(20), p.6494-6506, 2005.

MACCOLL, R. Cyanobacterial phycobilisomes. J. Struct. Biol. v.124, p.311-334, 1998.

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*, v.23, n.6, p. 955-962, 1985.

MEDEIROS, D.S. Uma lectina D-lactose específica da esponja marinha *Cinachyrella apion*: Purificação, caracterização e interação com *Leishmania chagasi*. Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 75p, 2008.

MEDINA-RAMIREZ, G.; GIBBS, R.V.; CALVETE, J.J. Micro-heterogeneity and molecular assembly of the haemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *B. triquetrum* from the Caribbean Sea. *European Journal of Phycology*, v.42 (1), p.105-112, 2006.

MELO, A.A. Isolamento e caracterização parcial de uma lectina do zoantídeo marinho *Palythoa caribbaeorum* (duchassaing & michelotti, 1860). 39p. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, 2011.

MIARRONS, P.B.; FRESNO, M. Lectins from Tropical Sponges: Purification and characterization of lectins from genus *Aplysina*. *The Journal of Biological Chemistry*, v.275, p.29283-29289, 2000.

MITCHELL, S.W. Researches upon the venom of the rattlesnake. *Smithson. Contrib. Knowl.* p.89-90, 1860.

MOJICA, E.R.E.; MERCA, F.E. biological properties of lectin from sea cucumber (*Holothuria scabra* Jaeger). *Journal of Biological Sciences*, v.5(4), p.472-477, 2005.

MOURA, R.M.; Purificação, caracterização e propriedades biológicas de lectinas do equinodermo *Holothuria grisea*. 2011. 105 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, 2011.

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

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

MULLER, W.E.G.; CONDRAD, J.; SCHRODER, C.; ZAHN, R.K.; KURELEC, B.; DREESBACH, K. UHLENBRUCK, G. Characterization of the trimeric, self recognition *Geodia cydonium* lectin 1. *FEBS Journal*, v.133, p.263-267, 1979.

MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. The amino acid sequence of a lectin of the acorn barnacle *Megabalanus rosa*. *Biochim Biophys Acta*, v.874, p.285-295, 1987.

NAGAI, T.; KAWABATA, S.; SHISHIKURA, F.; SUGITA, H. Purification, characterization, and amino acid sequence of an embryonic lectin in perivitelline fluid of the horseshoe crab. *Journal of Biological Chemistry* v.274(53), p.37673-37678, 1999.

NAGANUMA, T.; OGAWA, T.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.; KAMIYA, H.; MURAMOTO, K. Isolation, characterization and molecular evolution of a novel pearl shell lectin from a marine bivalve, *Pteria penguin*. *Mol.Divers.*, v.10, p.607–618, 2006.

NAKAHARA, S.; HOGAN, V.; INOHARA, H.; RAZ, A. Importin-mediated nuclear translocation of galectin-3. *J Biol Chem*, v.281, n.51, p.39649–39659, 2003.

NAKANO, M.; TABATA, S.; SUGIHARA, K.; KOUZUMA, Y.; KIMURA, M.; YAMASAKI, N. Primary structure of hemolytic lectin CEL-III from marine invertebrate *Cucumaria echinata* and its cDNA: Structural similarity to the B-chain from plant lectin, ricin. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1435, p.167-176, 1999.

NASCIMENTO-NETO, L.G.; CARNEIRO, R.F.; SILVA, S.R.; SILVA, B.R.; ARRUDA, F.V.S.; CARNEIRO, V.A.; NASCIMENTO, K.S.; SAKER-SAMPAIO, S.; SILVA, V.A.; PORTO, A.L.F.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, A.H.; TEIXEIRA, E.H.; NAGANO, C.S. Characterization of Isoforms of the Lectin Isolated from the Red Algae *Bryothamnion seaforthii* and Its Pro-Healing Effect. *Mar Drugs*, v.10(9), p.1936-1954, 2012.

NOWELL, P.C. Phytohemagglutinin - Initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Research*, v.20, p.462-466, 1960.

NUNES, B.S.; CARVALHO, F.D.; GUILHERMINO, L.M.; STAPPEN, G.V. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environ. Pollut.* v.144(2), p.453-462, 2006.

ODA, T.; TSURU, M.; HATAKEYAMA, T.; NAGATOMO, H.; MURAMATSU, T.; YAMASAKI, N. Temperature and pH-dependent cytotoxic effect of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* on various cell lines. *J. Biochem.*, v.121, p.560-567, 1997.

ODOM, E. W. 2004. F-Type Lectins: Biochemical, Genetic and Structural Characterization of a Novel Lectin Family in Lower Vertebrates. PhD thesis. University of Maryland College Park, MD.

OKE, M.; CHING, R.T.Y.; CARTER, L.G.; JOHNSON, K.A.; LIU, H.; MCMAHON, S.A.; WHITE, M.F.; BLOCH, C.; BOTTING, C.H.; WALSH, M.; LATIFF, A.A.; KENNEDY, M.W.; NAISMITH, J. Unusual Chromophore and Cross-Links in Ranasmurfin: A Blue Protein from the Foam Nests of a Tropical Frog. *Angewandte Chemie*, v.47, p.7853-7856, 2008.

OZEKI, Y.; MATSUI, T.; SUZUKI, M.; TITANI, K. Amino acid sequence and molecular characterization of a D-galactoside-specific lectin purified from sea urchin (*Anthocidaris crassispina*) eggs. *Biochemistry*, v.30, p.2391–2394, 1993. p.2563±2605, 1996.

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

PERILLO, N.L.; PACE, K.E.; SEILHAMER, J.J.; BAUM, L.G. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*, v.378, p.73-739, 1995.

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

PFEIFER, K.; HAASEMANN, M.; GAMULIN, V.; BRETTING, H.; FAHRENHOLZ, F.; MÜLLER, W.E.G. (1993) S-type lectins occur also in invertebrates: high conservation of the carbohydrate recognition domain in the lectin genes from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Glycobiology*, v.3, p.179-184.

QUEIROZ A.F.; SILVA, R.A.; MOURA, R.M.; DREYFUSS, J.L.; PAREDES-GAMERO, E.J.; SOUSA, A.C.; TERSARIOL, I.L.; SANTOS, E.A.; NADER, H.B.; JUSTO, G.Z.; DE SALES, M.P. Growth inhibitory activity of a novel lectin from *Cliona varians* against K562 human erythroleukemia cells. *Cancer Chemother Pharmacol.*, v.63, p.1023-1033, 2008.

QUEIROZ, F.S.A.; MOURA, R.M., RIBERIO, J.K.C.; LYRA, I.L.; CUNHA, D.C.S.; SANTOS, E.A.; SALES, M.P. Pro-inflammatory effect in mice of CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 147, I.2, p. 216-221, 2008.

RAYNAL, P; POLLARD, H.B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, v.1197(1), p.63-93, 1994.

ROSEN, S.D. Cell surface lectins in the immune system. *Sem Immunol*, v.5, p.237-247, 1993.

ROSEN, S.D. Lymphocyte homing: Progress and prospects. *Curr Opin Cell Biol*, v.1, p.913-919, 1989.

SAUNIER, B.; KILKER, R.D.; TKACA, J.S.; QUARONI, A.; HERSCOVICS, A. Inhibition of a N-linked complex oligosaccharide formation by 1-deoxynojirimycin, an inhibitor of processing glucosidases. *J Biol Chem*, v.257, p.14155-14161, 1982.

SCHMITZ, F.J.; HOLLENBEAK, K.H.; CAMPBELL, D.C. Marine natural products: Halitoxin, toxic complex of several marine sponges of the genus *Haliclona*. *J.Org.Chem*, v.43, n.21, p.3916-3922, 1978.

SCHRAG, J. D.; BERGERON, J. J.; LI, Y.; BORISOVA, S.; HAHN, M.; THOMAS, D. Y.; CYGLER, M. The structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol. Cell*, v.8, p.633-644, 2001.

SCHRODER, H.C.; USHIJIMA, H.; KRASKO, A.; GAMULIN, V.; THAKUR, N.L.; DIEHL-SEIFERT, B.; MULLER, I.M.; MULLER, W.E.G. Emergence and

disappearance of an immune molecule, an antimicrobial lectin, in basal metazoa. A tachylectin-related protein in the sponge *Suberites domuncula*. The Journal of Biological Chemistry, v.278, n.35, p.32810-32817, 2003.

SEIDAH, N.G.; DAY R.; MARCINKIEWICZ, M.; CHRBTIEN, M. Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. Ann NY Acad Sci USA, v.15, v.839, p.9-24, 1998.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. Science. v246, p.949-959, 1972.

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

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J.V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nature protocols v.1(6), p.2856-2861, 2006.

SHIRAI, T.; WATANABE, Y.; LEE, M.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K. Structure of rhamnose binding lectin CSL3: Unique pseudo-tetrameric architecture of a pattern recognition protein. J.Mol.Biol., v.391, p.390-403, 2009.

SHRIVE, A.K.; METCALFE, A.M.; CARTWRIGHT, J.R.; GREENHOUGH, T.J. C-reactive protein and SAP-like pentraxin are both present in *Limulus polyphemus* haemolymph crystal structure of Limulus SAP. Journal of Molecular Biology, v.290, p.997-1008, 1999.

SIPKEMA, D.; FRANSSEN, M.C.R.; OSINGA, R.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R.H. Marine Sponges as Pharmacy. Marine Biotechnology, v.7, p.142-162, 2005.

SOLOMON, E. I.; SUNDARAM, U. M.; MACHONKIN, T. E. Chem. Rev. v.96,

SPIRO, R. G.; ZHU, Q.; BHOYROO, V.; SOLING, H. D. Definition of the lectin like properties of the molecular chaperone, calreticulin, and demonstration of its copurification with endomannosidase from rat liver Golgi. J. Biol. Chem., v.271, p.11588-11594, 1996.

STALZ, H., ROTH, U.; SCHLEUDER, D.; MACHT, M.; HAEBEL, S.; STRUPAT, K.; PETER-KATALINIC, J.; HANISCH, F.G. The *Geodia cydonium* galectin exhibits prototype and chimera-type characteristics and a unique sequence polymorphism within its carbohydrate recognition domain. Glycobiology, v.16, n.5, p.402-414, 2006.

STEELE, D.M.; WHITEHEAD, A.S. The major acute phase reactants: C-reactive proteins serum amyloid P component and serum amyloid A protein. Immunology Today, v.15, p.81-88, 1994.

STILLMARK, H. Uber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus comm. L. und einigen anderen Euphorbiaceen. Thesis, Dorpat, 1888.

SUPER, M.; THIEL, S.; LU, J.; LEVINSKY, R.J.; TURNER, M.W. Association of low levels of mannan-binding proteins with a common defect of opsonisation. *Lancet*, v.2, n.8764, p.1236-1239, 1986.

SUZUKI, T., TAKAGI, T., FURUKOHRI, T., KAWAMURA K., NAKAUCHI, M. A calcium-dependent galactose binding lectin from the tunicate *Polyandrocarpa misakiensis*. *J.Biol.Chem.*, v.265, p.1274-1281, 1990.

SWAIRJO, M.A.; SEATON, B.A. Annexin structure and membrane interactions: a molecular perspective. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, v.23, p.193-213, 1994.

TABONA P.; MELLOR A.; SUMMERFIELD J.A. Mannose binding protein is involved in first-line host defence: evidence from transgenic mice. *Immunology*, v.5, p.153-159, 1995.

TATENO, H.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H.; SANEYOSHI, M. Rhamnose-binding lectins from steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs recognize bacterial lipopolysaccharides and lipoteichoic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v.66, p.604-612, 2002.

TSUTAUI, S.; OKAMOTO, M.; ONO, M.; SUETAKE, H.; KIKUCHI, K.; NAKAMURA, O.; SUZUKI, Y.; WATANABE, T. A new type of lectin discovered in a fish, flathead (*Platycephalus indicus*), suggests an alternative functional role for mammalian plasma kallikrein. *Glycobiology*, v.21 (12), p.1580-1587, 2011.

UCHIDA, T.; YAMASAKI, T.; ETO, S.; SUGAWARA, H.; KURISU, G.; NAKAGAWA, A.; KUSUNOKI, M.; HATAKEYAMA, T. Crystal structure of the hemolytic lectin CEL-III isolated from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*: Implications of domain structure for its membrane pore-formation mechanism. *J. Biol. Chem.*, v.135, p.37133-37141, 2004.

UEDA, T.; NAKAMURA, Y.; SMITH, C.; COPITS, B.A.; INOUE, A.; OJIMA, T.; MATSUNAGA, S.; SWANSON, G.T.; SAKAI, R. Isolation of novel prototype galectins from the marine ball sponge *Cinachyrella* sp. guided by their modulatory activity on mammalian glutamate gated ion channels. *Glycobiology*, v.4, p.412-425.

VAITH, P.; UHLENBRUCK, G.; MULLER, W.E.G.; HOLZ, G. Sponge aggregation factor and sponge hemagglutinin: Possible relationships between two different molecules. *Developmenta Comparative Immunology*, v.3, p.399-416, 1979.

VAN DEN EIJNDEN, D.H.; KOENDERMAN, A.H.L.; SCHIPHORST, W.E.C.M. Biosynthesis of blood group i-active polylectosaminoglycans. Partial purification and properties of an UDP-GlcNac:N-acetyllactosaminide $\beta 1 \rightarrow 3$ -N-acetylglucosaminyltransferase from Novikoff tumor cell ascites fluid. *Journal of Biological Chemistry*, v.262, p.12461-12471, 1988.

VANDEKERCKHOVE, J.; VAN DAMME, J.; VAN WOENSEL, P.A.; NAUWYNCK, H.J. Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J Virol*, v.77, p.8207, 2003.

VANDEKERCKHOVE, J.; VANDAMME, J.; WOENSEL, P.A.; NAUWYNK, H.J. Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J Virol*, 77, 8207, 2003.

VARKI, A.; ANGATA, T. Siglecs-the major subfamily of I-type lectins. *Glycobiology*, v.16, n.1, p.1-27, 2006.

VASSILAKOS, A.; MICHALAK, M.; LEHRMAN, M. A.; WILLIAMS, D. B. Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry*, v.37, p.3480-3490, 1998.

VASTA G.; AHMED H. *Animal lectins: A functional View*. New York: CRC Press, 2008. 596 p.

VASTA, G.R.; QUESENBERRY, M.; AHMED, H.; O'LEARY, N. C-type lectins and galectins mediate innate and adaptative immune functions: their roles in the complement activation pathway. *Dev. Comp. Immunol.*, v.23, p.401-420, 1999.

VIMR, E.R.; KALIVODA, K.A.; DESZO, E.L.; STEENBERGEN, S.M. Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiol Mol Biol Rev*, v.68, p.132, 2004.

VYAKARMAN, A.; DAGHER, S.F.; WANG, J.L.; PATTERSON R.J. Evidence for a hole of galectin-1 in pre mRNA splicing. *Molecular and Cellular Biology*, v.17, p.4730-4737, 1997

WAGNER-HULSMANN; C.; BACHINSKI, N.; DIEHL-SELFERT, B.; BLUMBACH, B.; STEFFENS, R.; PANCER, Z.; MULLER, W.E.G. A galectin links the aggregation factor to cells in the sponge (*Geodia cydonium*) system. *Glycobiology*, v.6(8), p.785-793, 1996.

WARE, F. E.; VASSILAKOS, A.; PETERSON, P. A.; JACKSON, M. R.; LEHRMAN, M. A.; WILLIAMS, D.B. The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, v.270, p.4697-4704, 1995.

WEDEMAYER, G.J.; KIDD, D.G.; WEMMER, D.E.; GLAZER, A.N. Phycobilins of

WEIS, W.I.; KAHN, R.; FOURME, R.; DRICKAMER, K.; HENDRICKSON, W.A. Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. *Science*, v.254, p.1608-1615, 1991.

WENDLAND, M.; VON FIGURA, K.; POHLMANN, R. Mutational analysis of disulfide bridges in the Mr 46,000 mannose 6-phosphate receptor. Localization and role for ligand binding. *J. Biol. Chem.*, v.266, p.7132-7136, 1991.

WIENS, M.; BELIKOV, S.I.; KALUZHAYAYA, O.V.; KRASKO, A.; SCHRODER, H.C.; OTTSATADT, S.P.; MULLER, W.E.G. Molecular control of serial module formation along the apical-basal axis in the sponge *Lubomirskia baicalensis*: silicateins mannose-binding lectin and mago nasshi. *Dev. Genes Evol*, v.216, p 229-242, 2006.

WILLIAMS, D.B. Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science*, v.119, p.615-623, 2006.

WILSON, I.B.H.; Glycosylation of proteins in plants and invertebrates. *Current Opinion in Structural Biology*, v.12, p.569-577, 2002.

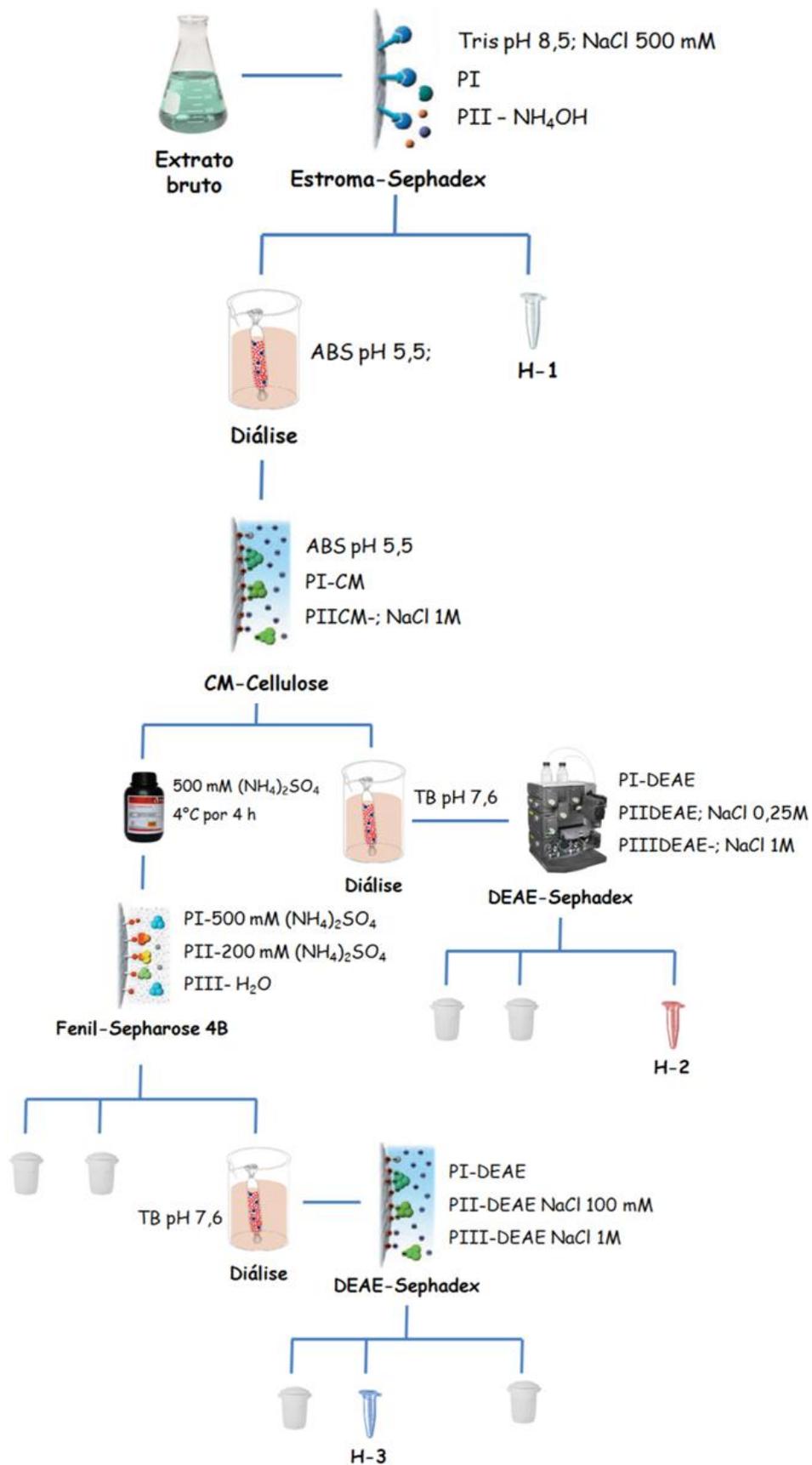
XIONG, C.; LI, W.; LIU, H.; ZHANG, W.; DOU, J.; BAI, X.; DU, Y.; MA, X. A normal mucin-binding lectin from the sponge *Craniella australiensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v.143, p.9-16, 2006.

YUEN, C.T.; LAWSON, A.M.; CHAI, W.; LARKIN, M.; STOLL, M.M. Novel ligands for the cell adhesion molecule E-selectin revealed by the neoglycolipid technology among O-linked oligosaccharides on an ovarian cystadenoma glycoprotein. *Biochemistry*, v.31, p.9126-9131, 1992.

ZACHARIUS, R.M.; ZELL, T.E.; MORRISON, J.H.; WOODLOCK, J.J. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal Biochem*, v.30, p.148-152, 1969.

ZELENSKY, A.N.; GREASY, J.E. The C-type lectin-like superfamily. *FEBS Journal*, v.272, p.6179-61217, 2005.

ANEXO A – Representação esquemática do processo de purificação das Halilectinas.



ANEXO B - Halilectin 1 (H-1) and Halilectin 2 (H-2): two new lectins isolated from the marine sponge *Haliclona caerulea*

Research Article



Received: 26 June 2012,

Revised: 13 September 2012,

Accepted: 18 September 2012,

Published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/jmr.2243

Halilectin 1 (H-1) and Halilectin 2 (H-2): two new lectins isolated from the marine sponge *Haliclona caerulea*

Rômulo Farias Carneiro^a, Arthur Alves de Melo^b,
Fernando Edson Pessoa do Nascimento^b, Clareane Avelino Simplicio^b,
Kyria Santiago do Nascimento^a, Bruno Anderson Matias da Rocha^a,
Silvana Saker-Sampaio^b, Raniera da Mata Moura^a, Sula Salani Mota^c,
Benildo Sousa Cavada^a, Celso Shiniti Nagano^b and
Alexandre Holanda Sampaio^{b*}

Two new lectins named Halilectin 1 (H-1) and Halilectin 2 (H-2) were isolated from the marine sponge *Haliclona caerulea* using a combination of affinity chromatography on stroma fixed onto Sephadex G-25 and cation and anion exchange chromatography. H-1 is a monomeric protein with a molecular mass of 40 kDa estimated using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and 15 kDa estimated using a TSK gel. Conversely, H-2 is a homodimeric protein with 15 kDa monomers linked via weak interactions. H-1 more effectively agglutinates trypsinized rabbit erythrocytes, whereas H-2 more effectively agglutinates native rabbit erythrocytes. The hemagglutinating activity of H-1 could be not inhibited by any tested sugars, but H-2 was inhibited by orosomucoid and porcine stomach mucin. Neither lectin was dependent on divalent ions. H-1 was stable at basic pH range and temperatures up to 50 °C, whereas H-2 was stable at acid pH range and temperatures up to 80 °C. The *H. caerulea* lectins exhibited dose-dependent toxicity against *Artemia nauplii*. Additionally, 76% of the primary structure of H-2 was determined using tandem mass spectrometry to contain a unique amino acid sequence with no similarity to any members of the animal lectin family. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: lectin; sponge; *Haliclona caerulea*; orosomucoid; nauplii

INTRODUCTION

Lectins are proteins/glycoproteins that bind reversibly to carbohydrates, agglutinate cells and/or precipitate polysaccharides and glycoproteins. Lectins are widely distributed in nature and can be found in plants, algae, fungi, animals (vertebrates and invertebrates), microorganisms, and viruses (Sampaio *et al.*, 2002).

Because of their unusual ability to decipher the glycode, lectins can be employed in a range of biotechnological studies including cancer and immunological research (Sharon and Lis, 2004), the isolation and characterization of glycoconjugates and blood typing (Luo *et al.*, 2011).

Marine sponges represent a rich source of new lectins; and in recent decades, members of the phylum Porifera have been screened for the presence and distribution of these proteins (Miarons and Fresno, 2000; Dresch *et al.*, 2005). Although only a few sponge lectins have been purified and characterized, some of these proteins have exhibited important biological activities, such as the inhibition of tumor cell growth (Pajic *et al.*, 2002) and mitogenesis in immune cells (Bretting *et al.*, 1981). Furthermore, there is a lack of information regarding the structural details and physiological functions of sponge lectins. However, there are increasing amounts of data that suggest that sponge lectins are involved in the processes of Porifera cell aggregation (Gundacker *et al.*, 2001), in the defense system, where these

proteins serve as molecules of self/non-self recognition (Schroder *et al.*, 2003) and in symbiosis (Kamiya *et al.*, 1990).

Artemia is an invertebrate that inhabits regions of high salinity and marine environments. This organism is commonly used in bioassays of a large variety of bioactive molecules and chemical compounds, including heavy metals (Martinez *et al.*, 1998) metabolites (Hassan *et al.*, 2004), and proteins (Dos Santos *et al.*, 2011). A variety of features make *Artemia* a suitable species for bioassays,

* Correspondence to: Alexandre H. Sampaio, Laboratório de Biotecnologia Marinha – BioMar-Lab, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, s/n bloco 825, 60440-970, Fortaleza, Ceará, Brazil. Email: alexholandasampaio@gmail.com

a R.F. Carneiro, K.S. Nascimento, B.A.M. Rocha, R.M. Moura, B.S. Cavada Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas – BioMol-Lab, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, s/n bloco 907, 60440-970, Fortaleza, Ceará, Brazil

b A.A. Melo, F.E.P. Nascimento, C.A. Simplicio, S. Saker-Sampaio, C.S. Nagano, A.H. Sampaio Laboratório de Biotecnologia Marinha – BioMar-Lab, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, s/n bloco 871, 60440-970, Fortaleza, Ceará, Brazil

c S.S. Mota Museu Nacional do Rio de Janeiro – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Quinta da Boa Vista, s/n, São Cristóvão, 20940-040, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ANEXO C- H-3, a new lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*: Purification and mass spectrometric characterization.

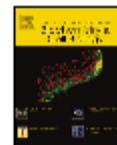
The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 45 (2013) 2864–2873



Contents lists available at ScienceDirect

The International Journal of Biochemistry
& Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biociel



H-3, a new lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*: Purification and mass spectrometric characterization



Rômulo Farias Carneiro^a, Arthur Alves de Melo^b, Alexandra Sampaio de Almeida^b,
Raniere da Mata Moura^c, Renata Pinheiro Chaves^b, Bruno Lopes de Sousa^a,
Kyria Santiago do Nascimento^a, Silvana Saker Sampaio^b, João Paulo Matos Santos Lima^d,
Benildo Sousa Cavada^a, Celso Shiniti Nagano^b, Alexandre Holanda Sampaio^{b,*}

^a Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas – BioMol-Lab, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, s/n bloco 907, 60440-970 Fortaleza, Ceará, Brazil¹

^b Laboratório de Biotecnologia Marinha – BioMar-Lab, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici s/n, bloco 871, 60440-970 Fortaleza, Ceará, Brazil²

^c Curso de Medicina, Universidade Potiguar, Av. Sen. Salgado Filho 1670, Lagoa Nova, 59054-0 Natal, Rio Grande do Norte, Brazil³

^d Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Av. Salgado Filho s/n, Lagoa Nova, 59078-970 Natal, Rio Grande do Norte, Brazil⁴

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 August 2013

Received in revised form

19 September 2013

Accepted 10 October 2013

Available online 19 October 2013

Keywords:

Primary structure

Chromophore

Sponge

Lectin

Glycosylation

ABSTRACT

A new lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea* (H-3) was isolated using a combination of hydrophobic interaction chromatography and ion-exchange chromatography. H-3 is a protein with three distinct bands on SDS-PAGE: 9 kDa, 16 kDa and 18 kDa. Nevertheless, on gel filtration and N-PAGE, H-3 showed a symmetrical peak and a unique band, respectively. Hemagglutinating activity of H-3 was stable at neutral pH and temperatures up to 60 °C. *N*-Acetylgalactosamine and porcine stomach mucin were the most potent inhibitors of H-3. Primary structure of the lectin was determined using tandem mass spectrometry, and it showed no similarity to any members of the animal lectin families. Top down fragmentation revealed some posttranslational modifications in H-3, including glycosylation. The glycan composition of H-3 was determined, and its structure was predicted. Furthermore, H-3 is a blue protein, binding to a chromophore(-597) by weak interactions, and this is the first time that the interaction between one lectin and a natural chromophore has been shown.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Since the original work of Dodd et al. (1968), lectins from marine sponges have been isolated, characterized, and, to some extent, their biological roles have been established, in contrast to other marine invertebrate lectins. For instance, a galectin isolated from *Geodia cydonium* interacted with aggregation factors and precipitates of the reaggregation process (Muller, 1997). Two lectins isolated from *Apphrocallistus vastus* are also involved in the reaggregation process (Gundacker et al., 2001), and in *Halichondria panicea*,

a D-galacturonic acid binding-lectin seems to be involved in the maintenance of symbiosis (Muller et al., 1981).

In recent years, lectins isolated from sponges have attracted extensive attention because of their biological properties, such as toxic effects against malignant cells (Rabelo et al., 2012), modulatory activity in the mammalian nervous system (Ueda et al., 2012) and proinflammatory effects (Queiroz et al., 2008).

However, structural features of those lectins are understudied. In a pioneering work, two lectins from *Axtinella polypoides* (lectin I and II) were sequenced by Edman degradation and mass spectrometry (Buck et al., 1991, 1998). *Axtinella* lectins shared 65% of identity among themselves, but show no identity with other lectins (Buck et al., 1991).

In another study, Pfeifer and coworkers deduced the amino acid sequence of two isolectins from the siliceous sponge *G. cydonium* by cDNA cloning. LECT-1 and LECT-2 showed a sequence of 38 conserved amino acids, which is characteristic of the carbohydrate-binding site of vertebrate galectins (Pfeifer et al., 1993). Then, the amino acid sequence of two isolectins from *A. vastus* was

* Corresponding author at: BioMar-Lab, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Av. Mister Hull, 60440-970, Box 6043, Fortaleza, Ceará, Brazil. Tel.: +55 85 33669728; fax: +55 85 33669728.

E-mail address: alexholandasampaio@gmail.com (A.H. Sampaio).

¹ Tel.: +55 85 33669818.

² Tel.: +55 85 33669728.

³ Tel.: +55 84 32151290.

⁴ Tel.: +55 84 32153416.