



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR – LABOMAR
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

TALLITA CRUZ LOPES TAVARES

**PROTEÍNAS DE TINTAS DE MOLUSCOS MARINHOS:
COMPOSIÇÃO, FUNÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO**

Fortaleza – CE

2010

TALLITA CRUZ LOPES TAVARES

**PROTEÍNAS DE TINTAS DE MOLUSCOS MARINHOS:
COMPOSIÇÃO, FUNÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Vânia Maria Maciel Melo

Fortaleza – CE

2010

AGRADECIMENTOS

À Profª Vânia Maria Maciel Melo, por me inspirar com seu talento e com sua competência e dedicação sem limites e por me incentivar com sua disciplina e entusiasmo sem tamanho. Seu amor pela ciência é fiel e dos mais dignos que já vi.

À Profª Helena Matthews Cascon, possuidora de grandes disposição e energia na incessante busca pelo saber, agradeço pela participação na minha formação como bióloga (com certeza, aprendi mais do que todos aqueles filós de invertebrados nas aulas de Zoo 1) e por aceitar participar da avaliação de minha dissertação de mestrado.

À Profª Ilka Maria Vasconcelos, pelas colaborações concedidas e por aceitar participar da avaliação de minha dissertação de mestrado.

À Vanessa Lúcia Rodrigues Nogueira, que mesmo em sua correria diária, achou tempo para me ajudar. Quero dizer que a considero em alta conta e que sempre estarei a seu dispor quando precisar. Obrigada por tudo e por sua presença em todas as fases desse trabalho.

Aos demais professores do programa de Pós graduação em Ciências Marinhas Tropicais e do Departamento de Biologia, que muito contribuíram para a minha formação. Em especial, à Profª Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho, pelo exemplo que é de discernimento e pelas inspiradoras aulas de Fisiologia Animal.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À grande família do LEMBIOTECH - Alysson Angelim, Bárbara Cibelle, Denise Hissa, Elis Alencar, Geórgia Barguil, Glauber Melo, Júlio Ximenes, Kizeane Fajardo, Laís Feitosa, Lidianne Leal, Lilian Pâmela, Lucas Macêdo, Luína Benevides, Natália Falcão, Raphaela Barrêto, Técia Carvalho, Vanessa Câmara, Vanessa Nogueira e Walderly Melgaço – muito unida e ouriçada. Muito obrigada pela colaboração, amizade e convivência agradável. Vocês ajudaram a tornar minha rotina mais leve, alegre e agradável, mesmo com todas as correrias para marcar horário no fluxo laminar e com todos os decibéis produzidos! Fico feliz quando olho ao meu redor e me vejo cercada de pessoas que, além de competentes, são tão especiais para mim.

Agradeço também ao Sr. Valdenor, funcionário de grande dedicação, parte essencial do nosso laboratório. Obrigada por ser sempre prestativo e por nunca reclamar, mesmo quando, pela décima quinta vez, mais uma vidraria era quebrada...

À minha família

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Animal, agradeço pela convivência agradável e pela ajuda prestada sempre que necessária.

Ao pessoal do Laboratório de Invertebrados (LINCE) pela convivência muitíssimo agradável.

Aos colegas do Instituto de Ciências do Mar, especialmente Elthon Ferreira e Geórgia Barguil, pelo convívio agradável durante as disciplinas e aulas de campo.

Aos meus amigos do curso de Ciências Biológicas. Dentre chegados, próximos e distantes, todos foram importantes no meu crescimento, seja por meio da ajuda imediatamente prestada, seja pela discussão acalorada... Todos são especiais de alguma forma. Espero sinceramente que consigamos perseverar e encontrar nosso lugar ao sol, onde quer que este esteja.

Aos meus amigos do Colégio GEO e especiais agregados, Bruna Mendes, Carolina Gress, Diego Maia, Igor Vieira, Juliana Brilhante, Kassiane Costa, Romário Fernandes e Rodrigo Faria, agradeço por serem meu recanto de loucura e diversão, meus consultores das ciências da vida pública e privada e dos direitos certos e errados. Quando penso no tempo que passou e olho para todos nós, compreendo o porquê de amizade tão duradoura e sem arestas.

À minha amiga Maria Lina Carvalho, pela nossa amizade “à distância sempre próxima” apesar do passar dos anos. Ontem compartilhávamos o sonho de brilhar nos palcos, hoje dividimos a luta para achar nosso lugar. Boa sorte para nós!

A Leonardo Normando, minha contraparte fiel. Agradeço por viver comigo este complexo mutualismo.

À minha família e especialmente a minha avó Marieta – uma das pessoas mais lindas que conheço.

A minha mãe, Lúcia de Fátima Tavares, e a minhas irmãs Thaís Tavares e Tainan Tavares. São vocês que dividem seu dia a dia comigo, com tudo dando certo ou errado. Obrigada por respeitarem essa minha escolha de querer saber... Espero recompensá-las o mais breve possível!

A meu pai, João Eudes Tavares, que continue olhando por mim daí de cima. Eu, aqui embaixo, não te esqueço um só instante.

Ao grande Deus, sopro de Vida. Que tudo que surja de mim seja digno de Sua divina expressão.

“Se podes olhar, vê. Se podes ver, repara.”

José Saramago

RESUMO

Nos moluscos sem concha ou naqueles em que a mesma está presente na forma vestigial, como cefalópodes e gastrópodes opistobrânquios, a falta dessa proteção externa conduziu à evolução de mecanismos de defesa dominados pela secreção ou incorporação de substâncias químicas bioativas. Proteínas sintetizadas *de novo* são bons exemplos dessas moléculas, tendo sido encontradas nas tintas de várias espécies de lesmas do mar, particularmente do gênero *Aplysia*. Muitas já revelaram pertencer a famílias de proteínas com atividade oxidásica de L-aminoácidos (LAAOs), grupo do qual fazem parte também proteínas bioativas encontradas nos venenos de serpentes. A caracterização, portanto, das atividades biológicas e do perfil bioquímico dessas proteínas é muito útil para que possamos entender como se dão os mecanismos defensivos desses animais e quão difundidos esses são, além de proporcionar subsídios para sua aplicação biomédica. Esse estudo visou a elucidação dos mecanismos de ação da dactilomelina-P, proteína antibacteriana purificada da tinta de *Aplysia dactylomela*, e a comparação da composição protéica e das atividades antimicrobianas das tintas liberadas por dois gastrópodes, *A. dactylomela* e *Bursatella leachii*, e por um cefalópode, *Octopus* sp.. O estudo revelou que a dactilomelina-P é uma L-aminoácido oxidase capaz de oxidar L-lisina e L-arginina, com maior afinidade por L-arginina, com K_m de $0,22 \pm 0,16$ mM/L para a L-lys e de $0,015 \pm 0,01$ Mm/L para a L-arg. Demonstrou também que sua atividade antibacteriana é mediada por esta propriedade, tendo o peróxido de hidrogênio, gerado na oxidação enzimática, grande participação na inibição bacteriana. A proteína se comporta de maneira bacteriostática quando em meio não suplementado com L-lisina e L-arginina, sendo bactericida na presença destes. Além disso, a atividade antibacteriana mostrou ser dependente da concentração de aminoácidos disponibilizados para oxidação pela proteína. A atividade contra *Staphylococcus aureus* deve ocorrer por meio de mecanismos que não induzam danos na morfologia celular, uma vez que não foi observada qualquer alteração morfológica por microscopia de força atômica. Já a análise das três tintas por PAGE-SDS revelou a presença, em todas elas, de bandas protéicas de cerca de 60 kDa, além de bandas de pesos moleculares mais baixos. Por *Western blot* pôde-se observar a existência de identidade imunológica entre proteínas das três tintas, visto que anticorpos policlonais produzidos contra a dactilomelina-P reconheceram proteína(s) de cerca de 60 kDa na tinta de *B. leachii* e de cerca de 30 kDa na tinta de *Octopus* sp. Dentre as três tintas, somente a tinta de *A. dactylomela* apresentou atividades antibacteriana e antifúngica.

Palavras chave: *Aplysia dactylomela*, *Bursatella leachii*, *Octopus* sp., tinta, atividade antimicrobiana, defesa química, LAAO.

ABSTRACT

On shell-less or vestigial shelled molluscs, like cephalopods and opisthobranchs, the absence of the shell has led to the evolution of defense mechanisms dominated by the secretion or incorporation of bioactive molecules that act in the protection of those animals. *De novo* synthesized proteins are excellent exemplars of these molecules, and are encountered on the ink of several sea hare species, particularly on the genus *Aplysia*. Many of those proteins belong to the L-amino acid oxidizers family of proteins, similarly to some well studied proteins found on snake venoms. In the sense of understanding the functionality and irradiation of these proteins on the defenses mechanisms is very important the description of their biological activities and biochemical profiles, providing also subsidies for biomedical applications. This study aimed the elucidation of its mechanisms of action and the comparison of the protein composition and the antimicrobial activity of the inks released by two gastropods, *A. dactylomela* and *Bursatella leachii*, and by a cephalopod, *Octopus* sp.. The study revealed that dactylomelin-P is an L-amino acid oxidase able of oxidizing L-lysine and L-arginine, with greater affinity to L-arginine, with K_m of $0,22 \pm 0,16$ mM/L for L-lys and $0,015 \pm 0,01$ Mm/L for L-arg. It demonstrated also that its antibacterial activity is mediated by the hydrogen peroxide generated in the enzymatic oxidation. The protein can be both bacteriostatic, when in a L-lysine and L-arginine non-supplemented medium, or bactericide in the presence of such amino acids. Moreover, the antibacterial activity showed being dependent on the amino acid concentration. The activity against *Staphylococcus aureus* must occur by some mechanisms that not induce cell morphological injuries as no morphological alteration have been observed by atomic force microscopy. The analysis of the three inks by SDS-PAGE revealed the presence on all inks of protein bands of c.a. 60 kDa, along with bands of lower molecular weight. By Western blot the existence of immunological identity between proteins of all inks could be observed, as polyclonal antibodies produced against dactylomelin-P recognized proteins of about 60 kDa on *B. leachii* ink and of c.a. 30 kDa on *Octopus* sp. ink. However, only the ink of *A. dactylomela* exhibited antibacterial and antifungal activities.

Keywords: *Aplysia dactylomela*, *Bursatella leachii*, *Octopus* sp., ink, antimicrobial activity, chemical defense, LAAO

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Lesmas do mar. A. *A. californica*; B. *Bursatella leachii*; C. *Dolabella auricularia*; D. *Aplysia brasiliana*; E. *Aplysia kurodai*; F. *Aplysia punctata* (<http://www.seaslugforum.net/>, acessado em 8 de janeiro de 2010)..... 19
- FIGURA 2** - Fotografias de *Aplysia dactylomela*. A. Liberação da tinta púrpura (<http://www.seaslugforum.net/>); B. Aspecto morfológico geral (fotografia de Tallita Tavares).28
- FIGURA 3**– Atividade L-aminoácido oxidásica das tintas de *A. dactylomela*, *B. leachii* e do polvo *Octopus* sp. e do extrato da desova e da glândula opalina de *A. dactylomela*. O controle negativo consistiu da mistura reacional não acrescida da fonte de L-aminoácido oxidase testada. Os valores representam médias de três experimentos independentes. Os asteriscos indicam que a diferença entre os valores indicados não é significativa ($\alpha > 0,05$).47
- FIGURA 4** – PAGE-tricina-SDS das tintas de *A. dactylomela*, *B. leachii* e *Octopus* sp. e da dactilomelina-P. Legenda: MM – marcador molecular; A_L – tinta de *A. dactylomela* liofilizada; B_L – tinta de *B. leachii* liofilizada; D – dactilomelina-P; P – tinta bruta de *Octopus* sp.. O marcador de massa molecular consistiu de fosforilase B (97,4 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), aldolase (39,2 kDa), triose fosfato isomerase (26,6 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa). Concentração de proteínas/poço: gel 1 – 10 µgP/poço (A_L), 10 µgP/poço (B_L), 30 µgP/poço (P), 10 µgP/poço (D). As setas indicam as regiões de cerca de 60 e de 30 kDa.48
- FIGURA 5** – Western blot das tintas das lesmas *A. dactylomela* e *B. leachii* e do polvo *Octopus* sp. Legenda: A – tinta de *A. dactylomela*; B – tinta de *B. leachii*; D – dactilomelina-P; P – tinta de *Octopus* sp.. As setas indicam as regiões de cerca de 60 e de 30 kDa que reagiram com o anticorpo anti-dactilomelina-P..... 48
- FIGURA 6** – Atividade antifúngica das tintas contra o fungo filamentosso *Mucor* sp. Legenda: A – tinta de *A. dactylomela*; B – tinta de *B. leachii*; P – tinta de *Octopus* sp.; D – dactilomelina-P.....49

FIGURA 7 - Efeito antibacteriano da dactilomelina-P em meio suplementado com L-aminoácidos após 24 horas de incubação a 37° C. Legenda: cont+ - controle positivo, prot+lys - proteína (100 µg/mL) acrescida de L-lys (100 mM), prot+arg - proteína (100 µg/mL) acrescida de L-arg (100 mM), prot - proteína (100 µg/mL). Os valores representam médias de três experimentos independentes. O controle positivo consistiu do crescimento da cultura em caldo LB sem a adição de dactilomelina-P e/ou aminoácidos. Os asteriscos indicam que a diferença entre os valores indicados não é significativa ($\alpha > 0,05$).....52

FIGURA 8 – Curva de crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 obtida a partir de sua absorbância a 620nm sob diferentes condições, evidenciando a inibição do crescimento quando da incubação da bactéria com a dactilomelina-P na presença ou ausência dos aminoácidos L-lisina e L-arginina. (♦) Controle positivo; (■) grupo adicionado de dactilomelina-P após 10 h de crescimento; (▲) grupo adicionado de dactilomelina-P e L-lisina após 10 h; (○) grupo adicionado de dactilomelina-P e L-arginina após 10 h; (●) controle negativo (caldo LB). O controle positivo consistiu do crescimento da cultura em caldo LB sem a adição de dactilomelina-P e/ou aminoácidos. A seta indica o momento em que foram adicionados os tratamentos testados, após a cultura ter atingido a fase exponencial de crescimento.....52

FIGURA 9 – Curva de crescimento da bactéria *S. aureus* ATCC 25923 crescida em meios acrescidos ou não da dactilomelina-P e dos aminoácidos L-lisina e L-arginina, evidenciando os efeitos bacteriostáticos e bactericidas da dactilomelina-P. (♦) controle positivo; (○) grupo adicionado de dactilomelina-P e L-lisina após 10 h de crescimento; (▲) grupo adicionado de dactilomelina-P e L-arginina após 10 h; (x) grupo adicionado somente de dactilomelina-P após 10 h. O controle positivo consistiu do crescimento da cultura em caldo LB sem a adição de dactilomelina-P e/ou aminoácidos. A seta indica o momento em que foram adicionados os tratamentos testados, após a cultura ter atingido a fase exponencial de crescimento.53

FIGURA 10 – Efeito concentração-dependente dos aminoácidos L-lisina e L-arginina na atividade antibacteriana da dactilomelina-P. Os valores representam médias de três experimentos independentes. Legenda: cont+ - controle positivo, prot+lys - proteína (100 µg/mL) acrescida de L-lys (100 mM), prot+arg - proteína (100 µg/mL) acrescida de L-arg (100 mM).....53

FIGURA 11 – Efeito da peroxidase na atividade antibacteriana da dactilomelina-P. Legenda: p – proteína (100 µg/mL), p+px – proteína e peroxidase (100 µg/mL, ambas), aa – L-lys e L-arg (100 mM), cont+ - controle positivo. O controle positivo consistiu do crescimento da cultura somente em caldo LB tratado com dactilomelina-P e peroxidase. Os valores representam médias de três experimentos independentes. Os asteriscos indicam que a diferença entre os valores indicados não é significativa ($\alpha > 0,05$).....54

FIGURA 12 – Aspecto morfológico das colônias de *S. aureus* verificado por microscopia de força atômica (AFM) (A) Controle positivo, em destaque o diâmetro celular de 947,04 nm. (B) Grupo tratado com dactilomelina-P e L-lisina, diâmetro celular de 1,035 µm...54

FIGURA 13 - Atividade L-aminoácido oxidásica da dactilomelina-P. O controle negativo consistiu da mistura reacional não acrescida da potencial L-aminoácido oxidase, dactilomelina-P. Os valores representam médias de três experimentos independentes...55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Caracterização bioquímica e atividades biológicas das proteínas isoladas de lesmas do mar (NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2010).....	32
TABELA 2 – Concentração de proteínas das tintas pelo método de Bradford (1976).....	46
TABELA 3 – Atividades antimicrobianas das tintas.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM – Microscopia de Força Atômica (do inglês *Atomic Force Microscopy*)

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATGE – Ágar Triptona, Glucose e Extrato de Levedura

BSA – Albumina Sérica Bovina (do inglês *Bovine Serum Albumin*)

K_m – Constante de Michaelis-Menten

Caldo LB – Caldo Luria Bertani

NBT/BCIP – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato p-toluidina / Cloreto de 4-nitro-azul de tetrazólio (do inglês (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyphosphate p-Toluidine / Nitro-Blue Tetrazolium Chloride)

PAGE-SDS – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de SDS

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulphate*)

ufc – Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. LESMAS DO MAR E O ESTUDO DA ECOLOGIA QUÍMICA	18
2.2. A TINTA PÚRPURA	19
2.3. A DEFESA QUÍMICA EM MOLUSCOS	22
2.4. <i>APLYSIA DACTYLOMELA</i>	27
2.5. PROTEÍNAS DE LESMAS DO MAR	29
2.6. L-AMINOÁCIDO OXIDASES	33
2.7. A DACTILOMELINA-P	34
2.8. RELEVÂNCIA	35
3. OBJETIVOS	37
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1. COLETA DOS MATERIAIS BIOLÓGICOS	38
4.2. PURIFICAÇÃO DA DACTILOMELINA-P	38
4.3. COMPOSIÇÃO E FUNÇÃO DAS PROTEÍNAS DAS TINTAS DE <i>A. DACTYLOMELA</i> , <i>B. LEACHII</i> E <i>OCTOPUS SP.</i>	39
4.3.1. <i>Tratamento das tintas</i>	39
4.3.2. <i>Determinação da concentração de proteínas</i>	39
4.3.3. <i>Atividade L-aminoácido oxidásica</i>	39
4.3.4. <i>Caracterização das tintas por PAGE-SDS</i>	40

4.3.5. <i>Semelhança entre proteínas relacionadas à dactilomelina-P nas tintas</i> ...	40
4.3.5.1. Produção de anticorpos policlonais e determinação dos títulos	40
4.3.5.2. Western blot.....	41
4.3.6. <i>Atividade Antimicrobiana</i>	41
4.4. DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIBACTERIANA DA DACTILOMELINA-P	42
4.4.1. <i>Atividade antibacteriana em meio suplementado com L-aminoácidos</i>	42
4.4.2. <i>Microscopia de força atômica (AFM)</i>	44
4.4.3. <i>Atividade L-aminoácido oxidásica da dactilomelina-P</i>	44
5. RESULTADOS	46
5.1. COMPOSIÇÃO E FUNÇÃO DAS PROTEÍNAS DAS TINTAS DE <i>A. DACTYLOMELA</i> , <i>B. LEACHII</i> E <i>OCTOPUS SP.</i>	46
5.1.1. <i>Determinação da concentração de proteínas</i>	46
5.1.2. <i>Atividade L-aminoácido oxidásica das tintas</i>	46
5.1.3. <i>Caracterização das tintas por PAGE-SDS</i>	47
5.1.4. <i>Atividade Antimicrobiana</i>	49
5.2. DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIBACTERIANA DA DACTILOMELINA-P	50
5.2.1. <i>Atividade antibacteriana em meio suplementado com L-aminoácidos</i>	50
5.2.2. <i>Microscopia de força atômica (AFM)</i>	54
5.2.3. <i>Atividade L-aminoácido oxidásica da dactilomelina-P</i>	55
6. DISCUSSÃO	56

7.	CONCLUSÕES	63
8.	REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos esforços de caracterização das atividades biológicas de proteínas presentes em secreções e tecidos de lesmas do mar, pouco se sabe a respeito de seu papel ecológico-evolutivo para os organismos possuidores ou mesmo sobre seu modo de ação. Que semelhanças possuem essas proteínas que as permitiram continuar existindo em meio a pressões ecológicas tão duras como as existentes em ambientes intertidais e em animais a quem falta a defesa mecânica da concha? Perguntas desse tipo ainda permanecem sem respostas completas, mas alguns passos já foram dados nessa direção.

Os animais se utilizam de uma gama de defesas contra predadores e patógenos, dentre essas, as defesas químicas. Muitos desses são moluscos, incluindo lesmas do mar, polvos e sépias, os quais exibem um interessante comportamento de liberação de tinta quando atacados. Esse comportamento e as secreções liberadas, mesmo não refletindo homologies, têm grande importância na sobrevivência desses animais.

Muitas das principais proteínas encontradas em fluidos, secreções e partes do corpo de lesmas do mar já tiveram suas seqüências de aminoácidos e, em alguns casos, os genes responsáveis pela sua expressão elucidados. Além desses, outros estudos revelam a natureza dessas proteínas, ajudando na elucidação de seus mecanismos de ação, tanto para o proveito biotecnológico dessas moléculas como para o clareamento dos possíveis efeitos que exercem sobre os outros componentes da comunidade intertidal.

Dessa forma, a comparação de como atuam na sua defesa e dos componentes envolvidos nesses mecanismos é de grande utilidade para determinar se animais de linhagens diferentes, com mecanismos de proteção semelhantes, possuem moléculas com perfis também próximos. A realização desses estudos e a tentativa de resolução dos questionamentos acima propostos para a espécie *Aplysia dactylomela* é, portanto, muito importante, estando também bem localizada em um contexto internacional já que, no mundo, as pesquisas com proteínas de lesmas do mar são pontuadas e pouco difundidas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Lesmas do mar e o estudo da Ecologia Química

Lesmas do mar são moluscos marinhos bentônicos pertencentes à classe Gastropoda, subclasse Opisthobranchia, ordem Anaspidae, família Aplysiidae. Essa família possui nove gêneros com 80 espécies atualmente conhecidas, tendo distribuição mundial, principalmente sobre regiões intertidais e subtidais (CAREFOOT, 1987). Essas lesmas possuem somente conchas vestigiais em sua cavidade do manto, expondo seu corpo mole para o meio ambiente (Figura 1). Apesar disso, possuem poucos predadores, fato que vem atraindo o interesse de muitos pesquisadores ao redor do mundo há muito tempo. Até hoje, muitos compostos bioativos foram isolados de várias secreções e tecidos de lesmas do mar, principalmente de sua glândula digestiva. São compostos lipofílicos e de baixo peso molecular derivados de sua dieta algal, possivelmente relacionados à defesa química desses animais contra predadores e microorganismos patogênicos. Além desses, essas lesmas também possuem potentes proteínas citotóxicas em vários tecidos e secreções (TAKAMATSU *et al.*, 1995). Esses compostos possivelmente fazem parte da mais antiga forma de comunicação existente no planeta: a comunicação química.

A comunicação química tem papel central na história evolucionária de vários táxons, se apresentando como moléculas que contêm informações, como biorreguladores, receptores, transdutores, efetores e mensageiros secundários – todos universalmente presentes (STOKA, 1999).

O uso da perspectiva filogenética para reconstruir a história evolucionária se tornou de grande importância e proporciona soluções para questões básicas na área da comunicação química já que os biorreguladores, as células secretoras e os tecidos-alvos não deixam registros fósseis. Assim, podemos explorar essa importante área através do estudo comparativo dos organismos vivos atuais, pois as células de hoje guardam informações importantes acerca de seu passado na forma de seqüências de aminoácidos nas proteínas ou mesmo na composição dos ácidos nucléicos (DNA e RNA) (STOKA, 1999). O entendimento, portanto, dos princípios básicos e das variações dos mecanismos de defesa química requer uma abordagem comparativa e uma perspectiva evolucionária, considerando a diversidade de animais relacionados filogeneticamente e fenotipicamente em relação a determinadas características das defesas químicas (DERBY, 2007).

Segundo Derby (2007), esse tipo de investigação, assim como os estudos de ecologia química em geral, são particularmente fáceis de serem realizados em lesmas do mar, pois elas, como animais de regiões inter e submareais, são bem acessíveis para coleta ou estudos no campo. Uma espécie de lesma do mar – *Aplysia californica* Cooper 1863 – é até mesmo criada e vendida comercialmente nos Estados Unidos, estando disponível em vários estágios de crescimento durante todo o ano (National Source for *Aplysia* – endereço eletrônico: <http://aplysia.miami.edu>. Acessado em 14 de dezembro de 2009).

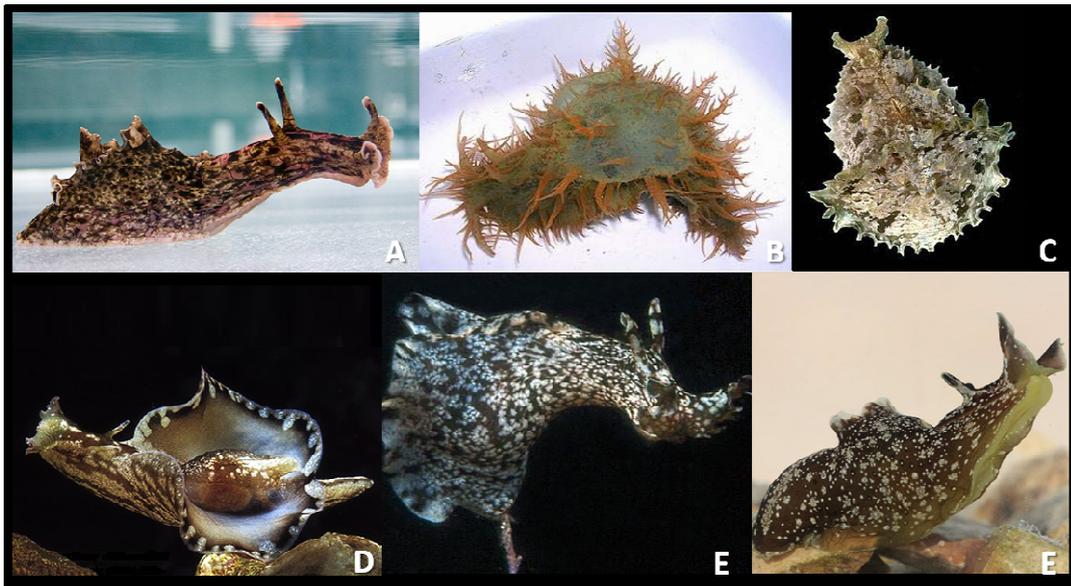


Figura 1 – Lesmas do mar. **A.** *A. californica*; **B.** *Bursatella leachii*; **C.** *Dolabella auricularia*; **D.** *Aplysia brasiliana*; **E.** *Aplysia kurodai*; **F.** *Aplysia punctata* (<http://www.seaslugforum.net/>, acessado em 8 de janeiro de 2010).

2.2. A tinta púrpura

A maioria das lesmas do mar (especialmente *Aplysia* Linnaeus 1767, mas também outros gêneros da família, como *Dolabella* Lamarck 1801 e *Stylocheilus* Gould 1852) produz uma tinta especial em uma glândula na cavidade do manto – a glândula de tinta – uma característica muito distintiva desses animais. O componente orgânico principal da tinta é a aplisioviolina, um éster de coloração violeta derivado da ficoeritrobilina – pigmento ingerido juntamente com as algas vermelhas das quais as lesmas se alimentam (CAREFOOT; PENNING; DANKO, 1999).

Os componentes algais são muito importantes para a formação da tinta, tendo sido demonstrado que quando as algas vermelhas são excluídas de sua dieta, as lesmas deixam de

produzi-la. Em *A. californica* a tinta consiste, basicamente, de água e algumas substâncias voláteis, com menos de 2% de substâncias orgânicas e 5% de minerais (COELHO; PRINCE; NOLEN, 1998). Bezerra e colaboradores (2004) relatam que a tinta da espécie *Aplysia dactylomela* Rang 1828 é composta de 99,5% de água, sendo sua massa seca composta de mais de 60% de proteínas, e o restante de carboidratos, lipídios e cinzas. Essa composição da tinta mostrou ser independente da dieta visto que animais oriundos de locais onde consumiam algas verdes em maior abundância apresentaram tinta semelhante à obtida de animais consumidores majoritariamente de algas vermelhas. Isso ocorre porque mesmo quantidades mínimas de algas vermelhas podem levar a produção de tinta. Em laboratório, a tinta só não foi produzida quando os animais foram totalmente privados da ingestão de algas vermelhas (BEZERRA *et al.*, 2004).

Com relação à composição de aminoácidos presentes na tinta, Bezerra e colaboradores (2004) encontraram altos níveis de aminoácidos ácidos, principalmente ácido aspártico e ácido glutâmico, e baixas quantidades de aminoácidos sulfurados. Esses dados são bem interessantes, pois a análise da composição de aminoácidos da dactilomelina-P, principal proteína presente na tinta liberada por *A. dactylomela*, mostra igualmente uma predominância dos aminoácidos ácidos, além de prolina, serina e tirosina. Outro aminoácido abundante na proteína é a metionina. Trata-se de um aminoácido sulfurado que, juntamente com a cisteína, são essenciais para a estrutura secundária da proteína (NOGUEIRA, 2005).

Derby *et al.* (2007), estudando a composição química de diversas secreções de defesa de nove moluscos marinhos, dentre eles *A. dactylomela* e *A. californica* também encontrou altos níveis dos aminoácidos ácido glutâmico e ácido aspártico. Os autores sugerem que esses aminoácidos livres encontrados nas tintas atuam na defesa química dessas lesmas por meio de impedimento químico do ato alimentar, disrupção sensorial ou fagomímica – todos esses mecanismos resultando na interrupção do ato predatório.

Segundo Carew e Kandel (1977), a liberação da tinta tem um limiar de excitação muito alto, com uma típica resposta de “tudo ou nada”, ou seja, a tinta somente será liberada após um limiar excitatório mínimo ser alcançado. Em laboratório a liberação da tinta é comum, podendo ser causada por manuseio inadequado ou grosseiro e pela separação de indivíduos copulando, por exemplo. Já no campo, foi Willan (1979) quem primeiro relatou a liberação de tinta por *A. dactylomela*, quando esta estava sob o ataque da estrela-do-mar *Coscinasterias calamaria* Gray 1840 (CAREFOOT; PENNINGS; DANKO, 1999).

Muitas hipóteses foram propostas para a função da tinta para *Aplysia* e outras lesmas relacionadas, desde quando pouco se sabia acerca da composição da tinta até hoje:

- Eliminação de pigmentos indesejáveis da dieta (CHAPMAN; FOX, 1967);
- Formação de uma cortina de fumaça, protegendo visualmente o animal de predadores (CAREW; KANDEL, 1977);
- Advertência aos predadores da presença de compostos tóxicos (AMBROSE *et al.*, 1979);
- Ação de sinal de alarme intraespecífico (GILLY, LUCERO, 1992);
- Presença de compostos impalatáveis, proporcionando gosto ruim às lesmas (PENNING, 1994);
- Irritação quimicossensorial (CAREFOOT; PENNING; DANKO, 1999);
- Ação anti predatória por fagomímica ou interrupção sensorial (KICKLIGHTER *et al.*, 2005);
- Ações antipredatórias múltiplas contra diferentes predadores juntamente com a secreção opalina (KICKLIGHTER; DERBY, 2006);

Assim, é proposto que as tintas de lesmas do mar atuem por meio de efeitos químicos e visuais. Por um lado, em analogia com o comportamento de liberação da tinta por cefalópodes, a tinta deve agir como um “mímico visual” ou mesmo um distrator contra predadores, dando às lesmas uma oportunidade de fuga enquanto o predador enfoca visualmente na tinta. O problema desta hipótese é que, diferentemente da maioria dos cefalópodes, as lesmas movem-se lentamente. Assim, o efeito puramente visual parece ter pouca finalidade para esses moluscos, sendo acoplado a mecanismos químicos, para os quais não faltam evidências de comprovação (DERBY, 2007).

Mesmo para os cefalópodes, rápidos em sua fuga, efeitos meramente visuais parecem não ser suficientes. MacGinitie e MacGinitie (1968) sugeriram que a real ação da tinta do polvo *Octopus* sp. seria a de anestesiá-los as habilidades quimicossensoriais de peixes predadores, um claro exemplo do uso de estratégias químicas. Entretanto, estudos sobre a tinta de cefalópodes ocorreram enfocando basicamente a busca por novas drogas, tendo sido relatada sua toxicidade contra microorganismos, retrovírus e linhagens celulares cancerosas. Dentre os compostos estudados, a tirosinase, presente na tinta de lulas e sépias, parece ser a responsável por suas propriedades tóxicas (DERBY, 2007). Uma tirosinase presente na tinta de *Sepia officinalis* Linnaeus 1758, por exemplo, mostrou ser tóxica a várias linhagens celulares, atuando provavelmente por indução de apoptose (RUSSO *et al.*, 2003).

Cefalópodes são famosos por suas defesas já que possuem fuga rápida, mudam sua coloração de críptica a aversiva rapidamente, realizam a autotomia de braços e possuem secreções venenosas em seu bico, além de liberarem a tinta. Particularmente suas tintas são secreções químicas produzidas e liberadas do saco de tinta, estrutura oriunda da modificação de outro órgão - a glândula hipobranquial (DERBY, 2007).

2.3. A defesa química em moluscos

Existem muitos exemplos de como a tinta e outras secreções são usadas para a proteção contra a predação dentre os moluscos, muitos desses apreciados como comida por alguns dos maiores predadores do mar, como peixes, crustáceos, estrelas do mar e anêmonas. Em contrapartida, de sua parte na corrida evolucionária, os moluscos adotaram uma gama impressionante de estratégias de defesa para evitarem ser detectados ou capturados. Nesse sistema, em geral, alguns são protegidos por conchas; outros, não. Esses últimos desenvolveram defesas químicas muito efetivas, objetos de estudo da ecologia química, da neuroecologia e da química de produtos naturais (DERBY, 2007).

A concha tem um papel muito importante para os moluscos conchíferos (portadores de conchas), já que é dentro dela que eles se retraem, protegendo-se tanto de predadores como da dessecação durante o período de maré baixa (MARIN *et al.*, 1999). Contrariamente, moluscos com conchas vestigiais ou mesmo sem conchas se encontram, aparentemente, menos protegidos, sendo, possivelmente, menos resistentes às pressões de predação existentes na natureza.

Dentre os opistobrânquios, a presença de uma concha externa é um estado plesiomórfico ou primitivo, sendo sua internalização visível na maioria dos componentes da família Aplisiidae. Nesse caso, tanto a internalização como a redução ou perda da concha representam processos evolucionários graduais e aparentemente únicos (KLUSSMAN-KOLB, 2004), tratando-se de uma das maiores tendências evolucionárias dentre os opistobrânquios. Foi este processo que permitiu que muitas partes do corpo, como a cabeça, o pé ou o manto, se tornassem mais elaboradas. Tal redução e posterior perda da proteção física externa foram acompanhadas da evolução de outras estratégias de defesa, como a aquisição de glândulas repugnatórias e de colorações aposemáticas (GRANDE *et al.*, 2004).

O estudo da perda ou da manutenção da concha isoladamente, contudo, pode levar ao estabelecimento de muitas homoplasias, resultantes de convergência evolutiva, que podem

dificultar ou levar a erros no entendimento das relações filogenéticas entre esses moluscos. Muitos caracteres foram reduzidos ou perdidos durante a evolução desses grupos, como a concha, o opérculo, o ctenídio, a rádula e os dentes ou as placas da moela. Assim, se faz necessária a utilização de outras características como evidências na elucidação das relações filogenéticas entre os opistobrânquios. Nesse sentido, a utilização de marcadores moleculares, como regiões-chave do DNA mitocondrial e ribossomal ou compostos orgânicos conservados, pode ter um papel acessório muito importante nesse tipo de estudo (MARIN *et al.*, 1999; MEDINA, WALSH, 2000).

Os gastrópodes são relativamente bem estudados em termos de suas defesas químicas. O muco de muitas espécies é rico em compostos impalatáveis e inibidores que podem deter ataques predatórios de muitas naturezas. Muitos desses compostos são derivados da dieta; outros são sintetizados *de novo* pelo próprio animal – uma condição provavelmente mais derivada evolutivamente (WÄGELE, KLUSSMAN-KOLB, 2005).

Também o sistema imune proporciona proteção contra uma variedade de patógenos. Um componente da imunidade, a imunidade inata, é filogeneticamente antiga e é amplamente encontrado em plantas e animais. Esta confere proteção ampla contra patógenos, sendo parte essencial do sistema de proteção da maioria dos organismos multicelulares contra infecções (FROY, GUREVITZ, 2003).

Contudo, é de conhecimento geral que existem diferenças entre as defesas de vertebrados e invertebrados, a principal sendo a presença de mecanismos dependentes de anticorpos nos vertebrados, e sua ausência nos invertebrados. A imunidade dependente de anticorpos é de grande importância para o reconhecimento ou rejeição do que é próprio ou do que não é próprio do organismo. Dessa forma, é esperado que invertebrados possuam um mecanismo alternativo para esta importante função. Em invertebrados, muitas lectinas e proteínas antibacterianas e antifúngicas encontradas são tidas como responsáveis pelas funções de reconhecimento e rejeição na defesa desses animais (IIJIMA, KISUGI, YAMAZAKI, 1995).

Algumas proteínas que parecem desempenhar tais funções foram descritas para lesmas do mar. Em *A. kurodai*, proteínas com atividades antibacterianas, antifúngicas e antineoplásicas (KAMIYA; MURAMOTO; YAMAZAKI, 1986; YAMAZAKI *et al.*, 1990; KISUGI *et al.*, 1992) foram relacionadas à defesa dessas lesmas, já que fatores contra organismos infecciosos, assim como fatores com propriedades antiproliferativas, são essenciais em qualquer fase da vida de um organismo.

Nas últimas décadas, várias moléculas foram investigadas bioquimicamente, tendo sido avaliadas quanto a suas atividades biológicas e/ou estruturas moleculares e unidades

constituintes. Esses recentes avanços tornaram possíveis várias discussões acerca da evolução e filogenia dessas moléculas em nível molecular, assim como a comparação com moléculas originadas em vertebrados.

No tocante à defesa química, muitos animais, especialmente invertebrados, secretam produtos secundários de plantas, algas e animais ingeridos ou compostos de fabricação própria como uma defesa contra patógenos e predadores, a qual pode ocorrer de forma passiva ou ativa.

Nas espécies que acumulam compostos secundários não palatáveis oriundos de sua dieta, os distribuindo ao longo do corpo, pode ser observada a defesa química passiva. Esta não se limita, contudo, ao muco e à pele, pois alguns gastrópodes possuem compostos inibitórios em suas massas de ovos e cápsulas de modo a prevenir sua ingestão por outros animais.

Dentre os compostos produzidos pelos próprios organismos como parte de sua defesa ativa, podem ser destacadas moléculas com funções antimicrobianas que impedem a infecção da desova por patógenos. Enzimas oxidativas presentes na glândula de albúmen e na massa de ovos da lesma *Aplysia kurodai* Baba 1937 são bons exemplos desses antimicrobianos. Outros organismos podem ainda utilizarem-se desses compostos numa defesa química tão efetiva que, como resultado, podem chegar a alocar somente pequena parcela de sua energia para se esconderem, se utilizando de colorações aposemáticas como advertência para seus mecanismos de defesa (COELHO; PRINCE; NOLEN, 1998). Algumas glândulas presentes na superfície da pele de alguns moluscos liberam ácido sulfúrico em resposta a perturbações, tendo efeitos inibitórios diretos sobre predadores e atuando também como parte de uma alça de retro-alimentação positiva que reforça o comportamento aversivo ou outros tipos de defesas (DERBY, 2007).

As lesmas do mar do gênero *Aplysia*, particularmente, possuem um arsenal químico muito rico. Como resultado, a exemplo de outras espécies quimicamente defendidas, possuem poucos predadores. Na defesa passiva, compostos halogenados encontrados em algas vermelhas, mas não em verdes, se acumulam na pele e em alguns órgãos das lesmas, tornando-as impalatáveis para peixes e outros predadores (PENNINGS; NASTISCH, PAUL, 1990). Complementando a defesa passiva, a defesa ativa age através da secreção da tinta púrpura e da secreção opalina, secreções complexas capazes de gerar subprodutos ricos em mecanismos de ação variados contra uma gama de predadores (KICKLIGHTER *et al.*, 2007; DERBY, 2007).

Das 37 espécies descritas para o gênero *Aplysia*, por exemplo, 30 liberam a tinta quando importunadas ou ameaçadas (NOLEN *et al.*, 1995). A tinta é liberada, muitas vezes,

juntamente com outra secreção produzida pela glândula opalina, de aparência leitosa, que se torna altamente viscosa em contato com a água. Quando simultaneamente liberadas, essas secreções se misturam na cavidade do manto, sendo então expelidas por um sifão na direção da origem do ataque (KICKLIGHTER *et al.*, 2005). É importante ressaltar que, embora a tinta seja constituída principalmente de ficoeritrobilina, ela também contém algumas proteínas de alta massa molecular associadas à ficoeritrina (MACCOLL *et al.*, 1990). Durante o processamento do pigmento ficoeritrina, derivado de algas vermelhas da dieta do animal, células especializadas na glândula digestiva fagocitam os cloroplastos das algas vermelhas (rodoplastos) e os digerem, liberando o pigmento. Seu cromóforo é, então, separado de seus componentes protéicos, e os pigmentos modificados seguem pela hemolinfa, circulando por todo o corpo do animal até a glândula de tinta, onde são armazenados em células especializadas. Quando do estímulo, são liberados juntamente com os demais componentes da tinta (COELHO; PRINCE; NOLEN, 1998).

Ao contrário dos pigmentos, as proteínas presentes na tinta não são derivadas das algas (MACCOLL *et al.*, 1990; BEZERRA *et al.*, 2004), sendo o modo de ligação dessas proteínas ao pigmento ou mesmo sua importância para a sobrevivência do animal pontos pouco conhecidos (COELHO; PRINCE; NOLEN, 1998). Bezerra *et al.* (2004) observaram a inexistência de reações imunológicas entre extratos de algas comumente ingeridas pela espécie *A. dactylomela* e o anticorpo policlonal produzido contra a tinta bruta, demonstrando que as proteínas presentes na tinta não são oriundas da dieta do animal. Essas proteínas são provavelmente sintetizadas *de novo*, evidenciando possivelmente a inexistência de variações geográficas relacionadas a sua dieta na defesa química desses moluscos (MARIN *et al.*, 1999). Nogueira (2005) demonstrou que a dactilomelina-P, principal proteína presente na tinta de *A. dactylomela*, era encontrada somente na glândula de tinta do animal, confirmando a inexistência de relações entre a principal proteína da tinta com proteínas algais e indicando a glândula de tinta como um sítio de síntese de proteínas bioativas. A proposta de que o animal produz as proteínas da tinta e que essas não são obtidas diretamente da dieta, como é o caso dos pigmentos, está de acordo com o observado por Coelho, Prince e Nolen (1998) para *A. californica*.

A histologia da glândula de tinta é muito singular, apresentando dois tipos principais de células, além de três tipos de vesículas envolvidas com o comportamento de liberação de tinta (KLUSSMAN-KOLB, 2004). Os tipos celulares principais são as células ricas em retículo endoplasmático rugoso (RER) e as células granulosas. Essas últimas, segundo Prince e Johnson (2006), atuam no armazenamento do excesso de produtos algais transferidos a partir

da glândula digestiva para a glândula de tinta em períodos de grande disponibilidade alimentar. Já as células ricas em RER atuam na síntese protéica. Quanto às vesículas, podem ser do tipo âmbar, vermelho-púrpura e vazias. Johnson e colaboradores (2006), estudando a espécie *A. californica*, evidenciaram através do uso de anticorpos policlonais contra a escapina, principal proteína da tinta de *A. californica*, que é nas vesículas âmbar que a escapina é encontrada, estando ausente nas vesículas vermelho-púrpura.

Além da glândula de tinta, as lesmas possuem as glândulas opalina e digestiva, que secretam substâncias tóxicas. A glândula opalina está situada na parte anterior da cavidade paleal e secreta um fluido leitoso que, em algumas espécies, possui um odor nauseante. A glândula digestiva, ou hepatopâncreas, elimina suas secreções diretamente no estômago e, além da função digestiva, parece armazenar metabólitos de defesa obtidos a partir da dieta (ROGERS; STEINBERG; DE NYS, 1995).

As atividades da tinta e da secreção da glândula opalina foram testadas frente a potenciais predadores, como a lagosta *Panulirus interruptus* Randall 1842 e a anêmona do mar *Anthopleura sola* Brandt 1835. Os compostos químicos presentes nessas secreções parecem “manipular” os sistemas quimicossensoriais desses predadores, induzindo comportamentos anti-predatórios, como de inibição da ingestão, fagomímica e disrupção funcional dos sensores químicos dos predadores, impedindo-os de realizar o comportamento alimentar (KICKLIGHTER *et al.*, 2005, KICKLIGHTER, DERBY, 2006). O interessante é que para a lagosta tanto a tinta como a secreção opalina resultam em respostas aversivas, enquanto a anêmona responde somente à tinta. Isso indica que uma gama de mecanismos está presente, defendendo esses animais de uma complexa rede de predadores (DERBY, 2007).

Os compostos inibitórios da ingestão, tipicamente impalatáveis ou tóxicos, atuam inibindo o comportamento alimentar por predadores enquanto os disruptores sensoriais estimulam massivamente seu sistema quimicossensorial, prevenindo que funcionem normalmente e levando à confusão e à interrupção do ataque. Já na fagomímica, os predadores são atraídos para a secreção liberada uma vez que esta simula a composição da presa, atraindo-o para ela enquanto o animal que a liberou fica livre para escapar.

Os compostos envolvidos na disrupção sensorial e na fagomímica incluem aminoácidos livres e amônio, os quais se encontram altamente concentrados na tinta e na secreção opalina da lesma *A. californica*, atuando como poderosos estimulantes dos neurônios sensoriais e do comportamento alimentar da lagosta *P. interruptus* (DERBY *et al.*, 2007). Além disso, as formas jovens também se mostraram protegidas. Juvenis de *A. californica* se mostraram sensíveis ao estímulo das tintas de outras espécies de lesmas (*Aplysia juliana*

Quoy e Gaimard 1832 e *A. dactylomela*) e de outros grupos relacionados (a lula *Lolliguncula brevis* de Blainville 1823 e o polvo *Octopus vulgaris* Cuvier 1797), exibindo comportamentos aversivos em resposta (KICKLIGHTER *et al.*, 2007).

Foi demonstrado recentemente que muitas proteínas de lesmas do mar têm a capacidade de oxidar L-aminoácidos, liberando peróxido de hidrogênio como um de seus produtos (DERBY, 2007). Essa atividade, conhecida como L-aminoácido oxidásica, parece ser importante na maior parte dos comportamentos aversivos. Escapina, por exemplo, isolada da tinta de *A. californica*, gera peróxido de hidrogênio a partir de sua atividade oxidásica, e este por sua vez já foi comprovado isoladamente como inibidor dose-dependente do comportamento alimentar de *P. interruptus* (AGGIO, DERBY, 2008).

2.4. *Aplysia dactylomela*

A espécie *A. dactylomela* Rang 1828 (Figura 2) pertence ao Filo Mollusca, Classe Gastropoda, Subclasse Opisthobranchia, Ordem Anaspidae, Família Aplisiidae, Subfamília Aplisiinae, Gênero *Aplysia*. Pode ser encontrada no mundo inteiro, especialmente em regiões tropicais, sendo uma das três espécies cosmopolitas do gênero, além de *A. parvula* e *A. juliana* (CAREFOOT, 1987). Na América do Norte, ocorre no sul da Flórida e no Caribe; no Brasil, é encontrada desde o Maranhão até São Paulo, juntamente com as espécies *A. brasiliiana*, *A. parvula* e *A. juliana* (RIOS, 1994).

As aplísias são herbívoras, alimentando-se de macroalgas verdes e vermelhas. Geralmente são encontradas enterradas em poças durante a maré baixa e são mais ativas no período noturno (CAREFOOT, 1989). No litoral cearense, a espécie *A. dactylomela* é encontrada, em geral, nas regiões intertidal e sublitoral, onde macroalgas do gênero *Ulva*, das quais se alimenta, ocorrem abundantemente. Entretanto, alimentam-se também de macroalgas vermelhas, dependendo da disponibilidade no ambiente (BEZERRA *et al.*, 2004).

O sistema nervoso dos aplisídeos é muito utilizado em experimentos de neurofisiologia, pelo fato de seus neurônios serem muito grandes, o que facilita a experimentação. São hermafroditas simultâneos ou protândricos, podendo ocorrer cópula com dois ou mais indivíduos. A fertilização e a postura de ovos ocorrem na forma de uma fita mucilagínosa larga (RUPPERT, BARNES, FOX, 2005).

O ciclo de vida de *Aplysia* tem início com a fertilização dos ovos, seguido do período de desenvolvimento embrionário, eclosão dos ovos, desenvolvimento da larva véliger, metamorfose larval e fase juvenil, chegando, enfim, à fase adulta (KANDEL, 1979).

Essas lesmas não possuem estruturas de proteção mecânica externa e, além disso, possuem estruturas semelhantes a nadadeiras, os parapódios, originadas de projeções laterais amplas de seu corpo frequentemente colorido, tornando-se muito visíveis a potenciais predadores. Todavia, esses animais, aparentemente desprotegidos e apetitosos, possuem poucos predadores. Tal fato desperta o interesse em se desvendar suas estratégias de defesa (NOLEN *et al.*, 1995), resultando no achado de uma rica variedade de substâncias químicas utilizadas para a defesa contra predadores e para a comunicação intra e interespecífica (CUMMINS *et al.*, 2004; KICKLIGHTER *et al.*, 2005; BARSBY, 2006).

A lesma *A. dactylomela* foi utilizada em vários estudos investigando o papel ecológico e o potencial biotecnológico de sua tinta. Melo e colaboradores (1998) descreveram as atividades tóxica, antimicrobiana e hemaglutinante desta secreção, além de sugerir a natureza protéica da(s) molécula(s) responsável(is) por tais propriedades. Posteriormente, da mesma tinta, foi purificada uma proteína com potente atividade antibacteriana e hemaglutinante, a dactilomelina-P (MELO *et al.*, 2000). Esses estudos foram de grande importância no entendimento do papel da tinta e de seus componentes para o animal já que as atividades biológicas encontradas nessa tinta puderam ser relacionadas à defesa química do animal.

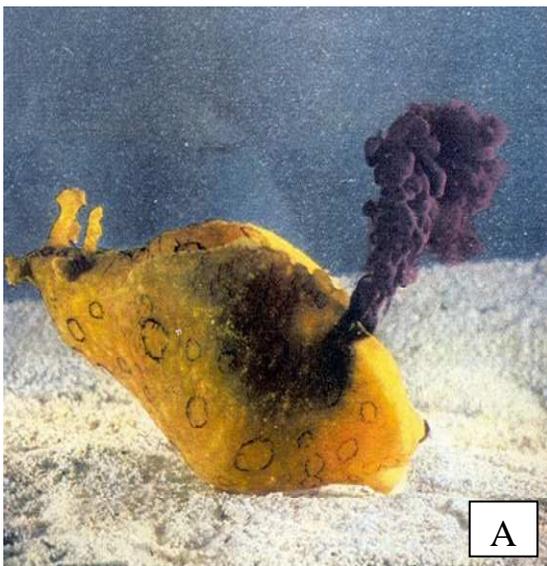


Figura 2 - Fotografias de *Aplysia dactylomela*. A. Liberação da tinta púrpura (<http://www.seaslugforum.net/>); B. Aspecto morfológico geral (fotografia de Tallita Tavares).

2.5. Proteínas de lesmas do mar

Várias proteínas têm sido isoladas de lesmas do mar, de diferentes órgãos e secreções, exibindo uma variedade de atividades biológicas, destacando-se, dentre elas, as atividades: antitumoral, citotóxica, antiviral, antibacteriana, antifúngica e hemaglutinante, listadas na Tabela 1.

Inicialmente, Kamiya e Shimizu (1981) isolaram uma lectina, proteína que se liga a carboidratos, específica para o ácido D-galacturônico e D-galactose, a partir da massa de ovos de algumas espécies de *Aplysia*. Esta foi uma das primeiras proteínas bioativas a ser purificada desses moluscos, constituindo o começo do isolamento e caracterização de uma série de proteínas antimicrobianas e citotóxicas, com possível papel primário na defesa química dessas lesmas.

Em 1984, Kamiya, Muramoto e Ogata, pesquisando atividades antibacterianas ou hemaglutinantes em extratos salinos de vários órgãos de *A. kurodai*, espécie de lesma comum no Japão, China e Coréia, encontraram nos extratos da massa de ovos e da glândula de albúmen potente atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Essas observações desencadearam uma série de pesquisas que culminaram com a descoberta de novas proteínas antitumorais e antimicrobianas. Dessa forma, as lesmas do mar passaram a ser reconhecidas como uma fonte rica, não somente de metabólitos secundários, mas também de proteínas com novas atividades biológicas (KAMIYA; SAKAI; JIMBO, 2006).

Em *A. kurodai*, de sua massa de ovos, foi isolada uma glicoproteína de 250 kDa, composta de 3 subunidades, denominada aplisianina E. Essa proteína possui atividade contra *Escherichia coli* e contra as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. Além disso, possui atividade contra várias linhagens de células tumorais murinas e humanas relacionadas a leucemias e a carcinomas mamários (KAMIYA; MURAMOTO; OGATA, 1984; KISUJI; KAMIYA; YAMAZAKI, 1987; IJIMA; KISUGI; YAMAZAKI, 1995).

A partir da glândula de albúmen da lesma *Dolabella auricularia* Lightfoot 1786, habitante dos oceanos Pacífico e Índico, e de *A. kurodai* foram isoladas as proteínas dolabelanina A e aplisianina A, respectivamente. Oriundas do mesmo tipo de glândula, essas proteínas compartilham algumas características. Dolabelanina A é uma glicoproteína de 250 kDa com 3 subunidades, que apresenta atividade citolítica contra uma variedade de tumores, muitos resistentes ao Fator de Necrose Tumoral (YAMAZAKI; KISUGI; KAMIYA, 1989a), além de atividade fungicida (IJIMA; KISUGI; YAMAZAKI, 1994) e bacteriostática (KISUJI *et al.*, 1992). Já a aplisianina A, também uma glicoproteína, possui uma massa molecular de 320

kDa distribuída em quatro subunidades, apresentando igualmente atividades antibacteriana e citolítica (KAMIYA; MURAMOTO; YAMAZAKI, 1986).

Devido às atividades apresentadas por tais proteínas, essas passaram a ser vistas como potenciais candidatos ao desenvolvimento de novos fármacos. A ciplasina, *e.g.*, proteína com atividade tumoral isolada da glândula de albúmen de *Aplysia punctata* Cuvier 1803, está atualmente passando por testes pré clínicos avaliando seu potencial de utilização como droga antitumoral. A atividade citotóxica da ciplasina é irreversível, levando à morte celular irreparavelmente. Ela age sobre as redes de actina, despolimerizando-as e levando a seu completo desaparecimento após 30 minutos de incubação (PETZELT *et al.*, 2002).

Merecem destaque as proteínas isoladas da tinta de lesmas do mar: aplisianina P, isolada de *A. kurodai* (YAMAZAKI *et al.*, 1989b), APIT de *A. punctata* (BUTZKE *et al.*, 2005), escapina de *A. californica* (YANG *et al.*, 2005), dactilomelina-P de *A. dactylomela* (MELO *et al.*, 2000), dolabelanina-P, de *D. auricularia* (YAMAZAKI *et al.*, 1989c) e bursatelanina-P, de *Bursatella leachii* de Blainville 1817 (RAJAGANAPATHI; KATHIRESAN; SINGH, 2002).

Comparando essas proteínas percebe-se que compartilham algumas propriedades, como produção e/ou armazenamento na glândula de tinta, massa molecular em torno de 60 kDa, número de subunidades, estabilidade a variações de pH, resistência a proteases e desnaturação entre 55 e 70 °C. Entretanto, diferem quanto a composição de aminoácidos, grau de glicosilação e tipos de atividade biológica. Dactilomelina-P e escapina, por exemplo, não são consideradas glicoproteínas, pois possuem menos de 0,05% e 0,03% de açúcar em suas moléculas, respectivamente, enquanto aplisianina-P, e dolabelanina-P são consideradas glicoproteínas, com teores de carboidratos de 18% e 0,8%, respectivamente. Esses resultados demonstram que, possivelmente, a glicosilação não é um fator essencial para atividade biológica dessas proteínas.

Essas proteínas apresentam atividade citotóxica de amplo espectro, com ação antibacteriana contra patógenos, como *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *C. albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *S. cerevisiae*, e/ou citolítica contra células tumorais, como células cancerosas murinas e linhagens Jurkat e HeLa, por exemplo. Adicionalmente, bursatelanina-P e dactilomelina-P apresentam atividades antiretroviral contra a polimerase reversa do HIV tipo I e hemaglutinante, respectivamente.

Como a interação primária entre proteínas e células alvo ocorre ainda não é entendido. Estudos recentes proporcionaram evidências de que tais interações se dão por meio da produção de peróxido de hidrogênio a partir da oxidação de L-aminoácidos pelas proteínas

(BUTZKE *et al.*, 2004). Subsequentemente, o sequenciamento de algumas dessas proteínas pôde caracterizá-las como membros da família das L-aminoácido oxidases (LAAOs) (JIMBO *et al.*, 2003; IJIMA; KISUGI; YAMAZAKI, 2003b; BUTZKE *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2005).

Algumas das proteínas isoladas de lesmas do mar tiveram suas seqüências de aminoácidos determinadas e seus graus de similaridade identificados. Aplisianina A (TAKAMATSU *et al.*, 1995) foi a primeira proteína a ter a seqüência completa de aminoácidos determinada, sendo seguida da ciplasina (PETZELT *et al.*, 2002), escapina (YANG *et al.*, 2005) e APIT (BUTZKE *et al.*, 2005). Com as seqüências determinadas foi possível traçar o grau de similaridade entre elas e especular o papel das mesmas na defesa desses animais.

Foi verificada uma similaridade de 93% entre escapina e APIT, refletindo sua origem semelhante, assim como suas características bioquímicas e de ação (YANG *et al.*, 2005). Estudos de homologies entre escapina e as proteínas ciplasina L, aplisianina A (de *A. kurodai*) e a homóloga desta última de *A. californica*, mostraram identidades em torno de 60%. Também foram encontrados 48% de identidade entre as seqüências da escapina e a da LAAO da lesma gigante africana *Achatina fulica* Férussac 1821, a achatina. É interessante destacar que a escapina possui 21% de identidade com a apoxina I, uma LAAO isolada da glândula de veneno da cobra *Crotalus acrox* Baird e Girard 1853 (YANG *et al.*, 2005).

Vallon (2000) e Yang e colaboradores (2005) sugeriram que aplisianina A e escapina pertencem à família das flavoproteínas, pois possuem os motivos GG altamente conservado (RxGGRxxS/T) e $\beta\alpha\beta$ ligante de dinucleotídeo em suas seqüências de aminoácidos. Proteínas com esses motivos estruturais são freqüentemente descritas como L-aminoácido oxidases. As propriedades bioquímicas e filogenéticas dessas proteínas reforçam a idéia de que elas pertencem a uma mesma família, ressaltando a conservação dessas seqüências ao longo da evolução.

É, portanto, de grande interesse determinar, de um ponto de vista comparativo, se as proteínas antibacterianas de lesmas do mar possuem seqüências em comum com outros fatores antibacterianos presentes em invertebrados. Além disso, entender como as aplisianinas (grupo de proteínas presentes em *Aplysia*, segundo Kamiya, Sakai e Jimbo (2006)), achatina e outras proteínas antibacterianas estão distribuídas na natureza pode ser muito importante para o esclarecimento da evolução dessas moléculas de defesa em gastrópodes especificamente (TAKAMATSU *et al.*, 1995). A obtenção da estrutura primária dessas proteínas, assim como o sequenciamento dos cDNAs responsáveis por sua expressão, se fazem, portanto, muito

necessários para que se possa inferir sobre a distribuição dessas proteínas antibacterianas de invertebrados e para o entendimento da evolução de tais moléculas de defesa.

Tabela 1 – Caracterização bioquímica e atividades biológicas das proteínas isoladas de lesmas do mar (NOGUEIRA *et al.*, 2010).

Espécies	kDa	Subunidades	Carboidratos (%)	Atividades	Referências
<i>Aplysia kurodai</i>					
aplisianina E	250	3	8	antibacteriana antifúngica citolítica	Kamiya <i>et al.</i> , 1984; Kisuji <i>et al.</i> , 1987; Iijima <i>et al.</i> , 1995
aplisianina A	320	4	9,8	antibacteriana citolítica /LAAO	Kamiya <i>et al.</i> , 1986; Jimbo <i>et al.</i> , 2003
aplisianina P	60	1	18	antibacteriana citolítica	Yamazaki <i>et al.</i> , 1986
<i>Aplysia juliana</i>					
julianina E-1	375	4	15,9	antibacteriana citolítica	Kamiya <i>et al.</i> , 1988
julianina G-1	375	4	9,9	antibacteriana citolítica	Kamiya <i>et al.</i> , 1988
julianina S	67	1	nd ^a	antibacteriana citolítica	Kamiya <i>et al.</i> , 1989
<i>Aplysia punctata</i>					
ciplasina	nd ^a	?	nd ^a	citotoxicidade	Petzelt <i>et al.</i> , 2002
APIT	60	1	nd ^a	citotoxicidade /LAAO	Butzke <i>et al.</i> , 2005
<i>Aplysia californica</i>					
escapina	60	1	0,03	antibacteriana antifúngica /LAAO	Yang <i>et al.</i> , 2005
<i>Aplysia dactylomela</i>					
dactilomelina-P	60	1	0,05	antibacteriana hemaglutinante /LAAO	Melo <i>et al.</i> , 2000
<i>Bursatella leachii</i>					
bursatelanina-P	60	1	nd ^a	antibacteriana antiviral	Rajaganapathi <i>et al.</i> , 2002
<i>Dolabella auricularia</i>					
dolabelanina A	250	4	10,9	antibacteriana antifúngica citolítica /LAAO	Yamazaki <i>et al.</i> , 1989a, Kisuji <i>et al.</i> , 1992; Iijima <i>et al.</i> , 1994, 2003
dolabelanina P	60	1	0,8	citolítica	Yamazaki <i>et al.</i> , 1989b
dolabelanina C	215	3	10,9	citolítica	Kisugi <i>et al.</i> , 1989

Legenda: E – massa de ovos, G – massa genital, S – superfície corporal, P – tinta, A – glândula de albúmen, C – celoma, nd^a – não determinado.

2.6. L-aminoácido oxidases

L-aminoácido oxidases (LAAOs) são flavoenzimas que catalisam a desaminação estereoespecífica de L-aminoácidos, na presença de oxigênio, produzindo cetoácidos, amônia e peróxido de hidrogênio (EHARA *et al.*, 2002; IJIMA; KISUGI; YAMAZAKI, 2003b), dentre outros produtos tóxicos ainda pouco conhecidos.

As LAAOs ocorrem em muitos organismos diferentes, como bactérias (do gênero *Corynebacterium* e *Proteus*), fungos (da espécie *Neurospora crassa*), cianobactérias (do gênero *Synechococcus*), algas verdes (*Chlamydomonas reinhardtii*) e animais, principalmente serpentes venenosas. As LAAOs de cobras são particularmente bem estudadas e estão presentes em crotalídeos, elapídeos e viperídeos, sendo conhecidas como SV-LAAOs, i.e., LAAOs de serpentes venenosas – as proteínas mais bem estudadas deste grupo (MACHEROUX *et al.*, 2001; DU, CLEMETSON, 2002).

Apesar de suas estruturas, especificidade quanto ao substrato e funções mostrarem importantes variações, todas as LAAOs apresentam algumas propriedades em comum. Dentre estas, destacam-se as atividades citotóxicas e antibacterianas devido à formação de peróxido de hidrogênio.

O peróxido de hidrogênio é sabidamente um mensageiro intracelular e está envolvido na lise oxidativa de fagócitos, levando à eliminação de microorganismos invasores. Além disso, apresenta vários efeitos sobre o metabolismo celular, incluindo inibição do crescimento, apoptose e necrose. As LAAOs são bastante promissoras, pois, enquanto o peróxido de hidrogênio sozinho é instável e tende a se difundir rapidamente, enzimas que o produzem proporcionam seu suplemento contínuo (BUTZKE *et al.*, 2005).

Até os anos 90, tais enzimas eram utilizadas principalmente para a produção de α -cetoácidos, sendo a especificidade de substrato, estabilidade e outras características físico-químicas os principais focos de pesquisa. Desde o fim do século passado, têm se tornado interessantes objetos de estudo para a bioquímica, fisiologia e medicina devido a seus efeitos sobre vários tipos de células, como células cancerosas, plaquetas e microorganismos (TÕNISMÄGI *et al.*, 2006).

Das proteínas de lesmas do mar, várias já foram confirmadas como LAAOs, incluindo aplisianina A (JIMBO *et al.*, 2003), APIT (BUTZKE *et al.*, 2005), dolabelanina A (IJIMA; KISUGI, YAMAZAKI, 2003b) e escapina (YANG *et al.*, 2005). Essas proteínas possuem seqüências de aminoácidos bastante similares as de LAAOs de organismos terrestres, como a

glicoproteína antibacteriana isolada da lesma *A. fulica* (EHARA *et al.*, 2002). Além disso, foi demonstrado que tais proteínas são possuidoras de atividade biológicas comprovadamente influenciadas pelas propriedades oxidásicas (DERBY, 2007).

Muitas LAAOs preferem como substratos aminoácidos hidrofóbicos e neutros ou mesmo aromáticos, como a L-leucina, L-fenilalanina e L-isoleucina, exibindo uma afinidade muito baixa para aminoácidos básicos. Entretanto, algumas dessas enzimas apresentam altas afinidades para aminoácidos básicos, como L-lisina e L-arginina (YANG *et al.*, 2005; JOHNSON *et al.*, 2006; GOMEZ *et al.*, 2006). Este é o caso das LAAOs de lesmas do mar, cuja afinidade por lisina e arginina foi previamente demonstrada pelo aumento da atividade biológica dessas proteínas na presença especificamente desses aminoácidos (JIMBO *et al.*, 2003, BUTZKE *et al.*, 2005, IJIMA, KISUGI, YAMAZAKI, 2003b, YANG *et al.*, 2005).

De fato, LAAOs são encontradas largamente na natureza, geralmente com papéis defensivos ou ofensivos já que seus produtos causam danos a células ou a tecidos. São utilizadas por um grande número de organismos de vários filos como defesa contra patógenos ou potenciais atacantes; ou ainda como moléculas de ataque presentes em venenos de serpentes e aracnídeos (EHARA *et al.*, 2002).

O interessante é que todas essas proteínas, como já mencionado, possuem atividades antibacterianas ou citolíticas, e, em alguns casos, ambas as atividades. Várias pesquisas recentes indicam que, possivelmente, a defesa química baseada em LAAOs é comum, independente da classificação do organismo. Dessa forma, proteínas com atividade oxidásica de L-aminoácidos, ubíquas na natureza e, particularmente, dentre os gastrópodes, desempenhando papéis importantes na sua defesa química (JIMBO *et al.*, 2003), caracterizam interessantes objetos de estudo, podendo serem utilizadas também como marcadores quimiotaxonômicos (MARIN *et al.*, 1999).

As estruturas moleculares de uma grande quantidade de LAAOs já foram caracterizadas, permitindo comparações de suas seqüências. Em geral, contudo, sua função ecológica permanece pouco conhecida, já que a maioria dos estudos é dirigida por interesses puramente biomédicinas, desacoplados da ecologia química (DERBY, 2007).

2.7. A dactilomelina-P

A dactilomelina-P é a proteína mais abundante presente na tinta liberada pela lesma do mar *A. dactylomela*. É uma molécula monomérica de 59,8 kDa, com pI 5.0, que

possui alto teor de metionina e menos de 1% de carboidratos. Quando aquecida a 60 °C por 10 minutos ou quando submetida a pHs menores que 2, perde sua atividade antibacteriana, apesar de resistir bem a pHs entre 3-12. Foi capaz de aglutinar eritrócitos de coelho, de ratos e de camundongos, mas não apresentou atividades anticoagulante, hemolítica e citotóxica. Apresenta uma DL50 em camundongos entre 60-100 mg/Kg, sendo considerada como moderadamente tóxica (NOGUEIRA, 2005).

Essa proteína possui um amplo espectro de ação antibacteriano, inibindo eficientemente o crescimento de várias espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas, patogênicas ou não ao homem. Merece destaque a ação da dactilomelina-P sobre *S. aureus*, contra o qual apresenta um efeito bacteriostático com Concentração Inibitória Mínima de 0,2 µg/mL (NOGUEIRA, 2005). Batista (2004) testou a ação da dactilomelina-P frente a 100 cepas de *S. aureus* resistentes a vários antibióticos, isoladas de diferentes casos clínicos de hospitais de Fortaleza. Os resultados mostraram que 100% das cepas foram sensíveis à dactilomelina-P. Esse resultado se reveste de grande importância quando comparado àqueles produzidos por antibióticos comercializados, como a eritromicina e a nitrofurantoína, para os quais mais de 50% das cepas se mostraram resistentes. Os isolados foram 100% sensíveis à vancomicina e aos antibióticos de última geração quinupristina/dalfopristina e linezulida. A eficácia da dactilomelina, portanto, é comparável a desses antibióticos.

A avaliação de seu potencial alergênico mostrou que a mesma possui moderado potencial alergênico quando inoculada por via subcutânea em camundongos, sendo este potencial inexistente por via oral, indicando esta via como uma possível rota de veiculação da proteína (TAVARES, 2007).

A dactilomelina-P possui suas atividades biológicas bem descritas, mas, apesar disso, ainda não é conhecido o mecanismo pelo qual atua, nem seu grau de relacionamento com as demais proteínas de lesmas do mar e de outros moluscos. A elucidação dessas questões seria muito útil para o entendimento do papel ecológico que essa proteína desempenha para o animal.

2.8. Relevância

A defesa química e seus componentes constituem agentes que unificam muitos animais, apesar de sua distância filogenética. Assim, o estudo comparativo de suas secreções de defesa pode ser muito útil no entendimento dos principais mecanismos e constituintes de suas

defesas químicas.

Além disso, no caso de moléculas tão interessantes como as proteínas de lesmas do mar, o entendimento dos mecanismos pelos quais se dão suas atividades biológicas pode ser útil tanto para auxiliar no esclarecimento das funções ecológicas de tais compostos como também no descobrimento de novas estruturas e arcabouços biológicos passíveis de serem utilizados biotecnologicamente.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo estudar a proteína dactilomelina-P no que diz respeito a seu mecanismo de ação e comparar a composição protéica e função da tinta de *Aplysia dactylomela* (Gastropoda, Opisthobranchia) com as tintas de outros dois moluscos, a lesma do mar *Bursatella leachii* (Gastropoda, Opisthobranchia) e o polvo *Octopus* sp. (Cephalopoda, Coleoidea).

3.1. Objetivos específicos

1. Avaliar a atividade L-aminoácido oxidásica nas tintas de *A. dactylomela*, *B. leachii* e *Octopus* sp.;
2. Comparar a composição protéica das tintas de *A. dactylomela*, *B. leachii* e *Octopus* sp.;
3. Comparar as atividades antimicrobianas das tintas de *A. dactylomela*, *B. leachii* e *Octopus* sp.;
4. Estudar o mecanismo de ação antibacteriana da dactilomelina-P;
5. Observar a ação da dactilomelina-P sobre *Staphylococcus aureus* por microscopia de força atômica;
6. Avaliar a atividade L-aminoácido oxidásica da dactilomelina-P.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta dos materiais biológicos

A tinta púrpura e os exemplares de *A. dactylomela* (Mollusca; Gastropoda; Orthogastropoda; Apogastropoda; Heterobranchia; Euthyneura; Opisthobranchia; Aplysiomorpha; Aplysioidea; Aplysiidae) utilizados no trabalho foram coletados durante marés de sizígia de 0,0 – 0,2, na Praia de Paracuru, no município de São Gonçalo do Amarante (Ceará, Brasil), conforme descrito por Melo *et al.* (2000). A tinta foi coletada por manipulação do animal até a liberação da secreção, a qual foi acondicionada em recipientes esterilizados por autoclavação a 121 °C por 15 minutos. A tinta de *B. leachii* (Mollusca; Gastropoda; Orthogastropoda; Apogastropoda; Heterobranchia; Euthyneura; Opisthobranchia; Aplysiomorpha; Aplysioidea; Aplysiidae) foi coletada de forma semelhante à utilizada para a coleta da tinta de *A. dactylomela*, na Lagoa da Tabuba, município de Caucaia (Ceará, Brasil). A tinta do polvo *Octopus* sp. (Mollusca; Cephalopoda; Coleoidea; Neocoleoidea; Octopodiformes; Octopoda; Incirrata; Octopodidae) foi coletada de animais capturados em alto-mar, por meio de sua dissecação, retirada dos sacos de tinta e coleta da tinta presente nessas estruturas.

4.2. Purificação da dactilomelina-P

A dactilomelina-P foi purificada a partir do *pool* de tinta bruta como descrito por Nogueira (2005). A tinta bruta foi dialisada exaustivamente contra água destilada em membrana de diálise com poros de 12 kDa de abertura a 4°C e submetida à centrifugação a 18000 g por 30 minutos para retirada de impurezas e areia oriundas da coleta. Em seguida, essa tinta pré-tratada foi submetida à precipitação com sulfato de amônio para obtenção da fração 30/60% de saturação. Essa fração passou, em seguida, por uma cromatografia de troca iônica em coluna DE 52 dietilaminoetil cellulose (15,5 x 3,5 cm), tendo o tampão Tris-HCl com gradiente de concentração de cloreto de sódio como eluente, para obtenção do pico com atividade antibacteriana. O pico obtido, após ser dialisado contra água destilada para retirada do tampão de eluição, foi liofilizado. O material resultante da liofilização foi caracterizado como constituído majoritariamente de dactilomelina-P, tendo sido utilizado em todos os ensaios.

4.3. Composição e Função das Proteínas das tintas de *A. dactylomela*, *B. leachii* e *Octopus* sp.

4.3.1. Tratamento das tintas

As tintas dos moluscos *A. dactylomela*, *B. leachii* e *Octopus* sp. foram inicialmente centrifugadas a 10000 g por 30 minutos. Em seguida, para retirar sais e pigmentos das amostras e concentrá-las, foram dialisadas exaustivamente em membranas de diálise com 12 kDa de *cut off* e liofilizadas. Somente a tinta de polvo não foi liofilizada devido a sua baixa disponibilidade.

4.3.2. Determinação da concentração de proteínas

As determinações de proteínas solúveis foram realizadas pelo método proposto por Bradford (1976), utilizando-se a albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

4.3.3. Atividade L-aminoácido oxidásica

A atividade L-aminoácido oxidásica foi determinada em tampão Tris fosfato 0,1 M, pH 7,8 a 25° C utilizando um ensaio enzimático acoplado (MACHEROUX *et al.*, 2001). Nesse ensaio, o peróxido de hidrogênio gerado pela atividade oxidásica foi utilizado pela peroxidase (Horseradish Peroxidase Tipo 1, Sigma) para oxidar a o-dianisidina ao seu radical cátion, o qual foi monitorado por absorvância a 450 nm. Uma quantidade de 1 mL de mistura reacional continha 10 µL de peroxidase (1 mg/mL em tampão Tris fosfato 0,1 M pH 7,8), 50 µL de uma solução de o-dianisidina (8mM em Triton X-100 a 20%) e 10 µL da solução de aminoácidos a 100 mM também em tampão Tris fosfato. As misturas reacionais foram mantidas em banho de gelo até a leitura das absorvâncias.

A reação foi iniciada pela adição de 10 µL da solução possivelmente contendo a LAAO e foi imediatamente monitorada a cada 5 minutos durante 60 minutos. Foram testados como fontes de oxidases as tintas de *A. dactylomela*, de *B. leachii* e de *Octopus* sp., e o extrato da glândula opalina e da desova de *A. dactylomela*. Já os aminoácidos L-lisina e L-arginina foram utilizados como substratos para a ação enzimática. Também o extrato da glândula opalina foi utilizado como possível fonte de aminoácidos e, portanto, substrato para

a ação enzimática. Cada dado foi representado como o resultado da média \pm desvio padrão de três replicatas.

4.3.4. Caracterização das tintas por PAGE-SDS

As tintas brutas e liofilizadas foram submetidas eletroforese em gel de poliacrilamida de três fases, em presença de tricina (SDS-Tricina-PAGE) para determinação do perfil unidimensional das proteínas presentes, segundo o método de Schagger e Jagow (1987). O gel de três fases (separação, 16,5% T e 3,0% C, pH 8,9; espaçamento, 9,9% T e 3,0% C, pH 8,9; concentração, 5,12% T e 2,6% C, pH 6,8) foi desenvolvido com tampão do catodo contendo Tris-base 0,1 M, Tricina 0,1 M e SDS 0,1 % (pH 8,25), e do anodo contendo Tris-base 0,2 M (pH 8,9). As amostras foram dissolvidas em Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, contendo 1% de SDS, glicerol, azul de bromofenol e β -mercaptoetanol, aquecidos a 40°C, durante 30 minutos, e centrifugados a 10000 x g durante 5 minutos, a 4°C. Foram aplicados cerca de 10 a 30 μ g de proteínas totais em cada poço, e a corrida foi conduzida a uma corrente inicial de 10 mA/placa, seguida de 20 mA/placa após a entrada das amostras no gel de espaçamento, durante 3,5 hora. Após a corrida, os géis foram revelados por Coomassie Brilliant Blue R 250. Foi utilizado um marcador de massa molecular protéico (Mid/Low Range, AMRESCO) contendo fosforilase B (97,4 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), aldolase (39,2 kDa), triose fosfato isomerase (26,6 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa).

4.3.5. Semelhança entre proteínas relacionadas à dactilomelina-P nas tintas

4.3.5.1. Produção de anticorpos policlonais e determinação dos títulos

As tintas foram analisadas quanto à presença de proteínas relacionadas à dactilomelina-P por *Western blot*. Para tanto, foram utilizados anticorpos policlonais de coelho albino de três meses de idade da raça Nova Zelândia, segundo descrito por Nogueira (2005).

O animal foi imunizado, por via intramuscular, com a proteína, na concentração de 1 mgP/mL (0,5 mL de NaCl 0,15 M + 0,5 mL de adjuvante completo de Freund). Após 14 dias da imunização, foi aplicado um reforço por via subcutânea sem adjuvante. A partir do

primeiro reforço, foram aplicadas doses semanais nas mesmas condições. O coelho foi sangrado nos dias 21, 28, 35 e 42, e os soros imunes foram obtidos a partir da sangria e posterior clarificação do soro por centrifugação. Os títulos foram determinados por *Dot blot* em membranas de PVDF utilizando várias diluições dos antissoros obtidos em diferentes dias e observação de seu poder de reagir contra a dactilomelina-P. O título foi determinado como sendo a maior diluição de um antissoro capaz de reconhecer a dactilomelina-P.

4.3.5.2. Western blot

A presença de proteínas relacionadas à dactilomelina-P foi estudada pela técnica de *Western blot* de acordo com a metodologia descrita por Towbin, Staehelin e Gordon (1979). Após a eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF em uma unidade de transferência do tipo *tank system* (omniPAGE VS10, Caere Corporation) por 1 hora a 100 V e 400 mA.

A membrana foi bloqueada por 1 hora, à temperatura ambiente, com tampão Tris HCl 0,05 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M e leite em pó desnatado 5 % (m/v) (tampão bloqueador). Em seguida, foi incubada com o anticorpo anti-dactilomelina-P (35 dias) diluído 1:250 em tampão bloqueador por 2 horas, sob agitação, à temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi lavada 4x, a intervalos de 3 minutos com o mesmo tampão. A membrana foi então incubada por 2 horas com o anticorpo secundário (IgG de cabra, anti-IgG de coelho, conjugado com fosfatase alcalina, SIGMA) diluído 1:10000 no tampão bloqueador, sob agitação, à temperatura ambiente. Foi então lavada 2x com o tampão bloqueador e, em seguida, mais 2x com água grau milli-Q. A reação foi visualizada após a adição da solução reveladora contendo o substrato da fosfatase alcalina (pastilhas de NBT/BCIP, SIGMA), preparada de acordo com as instruções do fabricante. Após a reação, a membrana foi lavada com água grau milli-Q para retirada de toda a solução reveladora, secada e guardada ao abrigo da luz até ser fotografada.

4.3.6. Atividade Antimicrobiana

As tintas foram caracterizadas quanto a sua atividade antimicrobiana utilizando dois microorganismos, a bactéria gram-positiva *S. aureus* e o fungo filamentosso *Mucor* sp.

A atividade antibacteriana foi realizada conforme descrito por Bauer *et al* (1966). Culturas de *S. aureus* cultivadas em ágar nutritivo por aproximadamente 18 horas foram ajustadas em salina fisiológica estéril para uma absorvância de 0,08 – 0,10 (10^7 ufc/mL) a 600 nm. Placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton foram, então, semeadas com a suspensão de bactérias em salina com auxílio de *swabs* estéreis. Em seguida, discos de papel de filtro esterilizados de 6 mm de diâmetro foram embebidos totalmente com 30 μ L das tintas de *A. dactylomela*, *B. leachii* e de *Octopus* sp. contendo 41.7, 12.3 e 358.2 μ g de proteína, respectivamente, e foram dispostos sobre o ágar. Essas culturas foram incubadas a 37°C *overnight* e, em seguida, examinadas para observação da formação de halos de inibição em torno de cada disco. Discos contendo o antibiótico tetraciclina foram utilizados com controle positivo; e discos com 30 μ L de salina fisiológica, como controle negativo.

Para o ensaio com o fungo filamentososo *Mucor* sp., segundo Roberts & Selitrennikoff (1990), a cultura do fungo foi inoculada como um fragmento de 8 mm no centro de placas de Ágar Batata. As placas foram, em seguida, incubadas em temperatura ambiente por 48 horas. Após o crescimento inicial, discos de papel de filtro embebidos com 30 μ L das amostras foram colocados sobre o meio, a aproximadamente 5 mm da borda. As placas foram novamente incubadas à temperatura ambiente até o crescimento restante do fungo em presença das tintas. O impedimento do crescimento ao redor dos discos foi utilizado como indicativo de inibição do crescimento fúngico.

4.4. Determinação do mecanismo de ação antibacteriana da dactilomelina-P

4.4.1. Atividade antibacteriana em meio suplementado com L-aminoácidos

Para avaliar a participação da atividade L-aminoácido oxidásica da dactilomelina-P em sua ação antibacteriana, foi utilizada uma combinação de três ensaios. No primeiro, foi avaliado o efeito de suplementação do meio de cultura com L-lisina e com L-arginina; no segundo, o efeito concentração-dependente dos aminoácidos sobre a atividade antibacteriana da dactilomelina-P; e no terceiro, o efeito da peroxidase sobre tal atividade.

Todos os ensaios consistiram do mesmo procedimento geral. Três a cinco colônias de uma cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, previamente crescida por 18 horas a 37° C em meio ATGE, foram suspensas em caldo LB e tiveram sua absorvância a 600 nm ajustada para 0.01 em um espectrofotômetro. Em seguida, foram seriamente diluídas 1000

vezes, atingindo cerca de 10^5 ufc/mL. Essa suspensão final foi então aliqüotada em uma microplaca de 96 poços e incubada a 37° C.

Previamente, a curva de crescimento de *S. aureus* em caldo LB foi obtida ao longo de 24 horas, a partir da contagem de viáveis a cada duas horas, para determinar o momento de entrada da cultura em fase exponencial. Este momento ($t = 10$ h) foi utilizado para adição dos tratamentos testados.

No primeiro ensaio, a cultura foi coincubada com as seguintes soluções logo após atingirem a fase exponencial de sua curva de crescimento:

- 100 μ g/mL de dactilomelina-P;
- 100 μ g/mL de dactilomelina-P acrescida de L-arginina ou de L-lisina na concentração de 100 mM.

Após 24 horas do inóculo inicial, os dois tratamentos foram avaliados a partir da mensuração da turbidimetria a 650 nm em uma leitora de microplacas (TP Reader, Thermoplate) ou por contagem do número de viáveis pela técnica da microgota (Romeiro, 2001).

No segundo ensaio, os aminoácidos L-arginina e L-lisina foram seriadamente diluídos em soluções de dactilomelina-P (100 μ g/mL) a concentrações de 50, 25, 12.5, 6.25 e 3.125 mM e adicionados às culturas na fase exponencial. O efeito concentração-dependente foi avaliado como descrito anteriormente para o primeiro experimento.

Adicionalmente, o terceiro tipo de experimentos avaliou o efeito da peroxidase na atividade antibacteriana da dactilomelina-P. Para tanto, o meio de cultura foi tratado inicialmente com dactilomelina-P e peroxidase (Horseradish peroxidase type I, Sigma), nas concentrações de 100 μ g/mL, cada. O meio foi tratado por, pelo menos, 18 horas a 8° C e, então, foi aquecido a 100° C para inativar a proteína e a peroxidase. Em seguida, o meio tratado foi inoculado com 10^5 ufc/mL de *S. aureus* e suplementado separadamente com:

- 100 μ g/mL de dactilomelina-P;
- 100 μ g/mL de dactilomelina-P e de peroxidase;
- L-lisina e L-arginina em concentração de 100 mM.

Após 24 horas do inóculo inicial, os tratamentos foram avaliados por contagem do número de viáveis, como descrito acima.

Todos os controles positivos consistiram de culturas de *S. aureus* crescidas normalmente em caldo LB a 37° C concomitantemente aos tratamentos testados.

4.4.2. Microscopia de força atômica (AFM)

A microscopia de força atômica foi realizada no Laboratório de Microscopia Avançada do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará, tendo sido utilizada para avaliar a ocorrência de alterações morfológicas nas células tratadas. As amostras foram preparadas como descrito anteriormente para os ensaios antibacterianos. Após 24 horas de incubação na presença de dactilomelina-P e dos aminoácidos L-lys e L-arg (100 mM), as células foram lavadas 5 vezes com salina 0,15 M esterilizada para remover o meio de cultura. As amostras foram, então, gotejadas sobre lamínulas de vidro circulares de 13 mm de diâmetro e deixadas secar naturalmente à temperatura ambiente anteriormente à observação no microscópio de força atômica. Todas as imagens de topografia das amostras foram obtidas em um microscópio Nanoscope IIIa com software Nanoscope (Digital Instruments, EUA), à temperatura ambiente. O modo *tapping* (TM[®]) ou intermitente foi utilizado para evitar forças laterais que podem danificar as amostras. Um escaner de 12 µm de cobertura *xy* com frequência de 5 Hz e resolução de 512 x 512 foi utilizado para obter-se imagens de alta resolução.

4.4.3. Atividade L-aminoácido oxidásica da dactilomelina-P

A atividade L-aminoácido oxidásica da dactilomelina-P foi determinada como descrita anteriormente para as tintas analisadas, utilizando um ensaio enzimático acoplado (MACHEROUX *et al.*, 2001). A reação foi iniciada pela adição de 10 µL de uma solução de dactilomelina-P (1 mg/mL) à mistura reacional, tendo os aminoácidos L-lisina, L-arginina, L-histidina (aminoácidos básicos), L-ácido aspártico e L-ácido glutâmico (aminoácidos ácidos) sido utilizados como possíveis substratos para a ação enzimática da proteína. Para determinação da Constante de Michaelis-Menten, inicialmente foram construídos gráficos de absorbância ao longo do tempo para as seguintes concentrações de substrato, mantendo fixa a concentração da enzima dactilomelina-P (100 µg /mL): 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 5.0 e 10.0 mM. A partir das inclinações das curvas obtidas nesses gráficos, foram obtidos os valores de velocidade máxima inicial, utilizados para construção do gráfico de

Lineweaver-Burk ($1/V_0$ versus $1/[S]$). Os valores da Constante de Michaelis-Menten (K_m) foram, então, determinados utilizando o gráfico de Lineweaver-Burk obtido. Cada dado foi representado como o resultado da média \pm desvio padrão de três replicatas

5. RESULTADOS

5.1. Composição e Função das Proteínas das tintas de *A. dactylomela*, *B. leachii* e *Octopus* sp.

5.1.1. Determinação da concentração de proteínas

As concentrações de proteínas das tintas brutas são apresentadas na tabela 2. As tintas das lesmas *A. dactylomela* e *B. leachii* foram, posteriormente, dialisadas e liofilizadas para retirada de sais e obtenção de concentrações mais elevadas de proteínas, facilitando sua caracterização.

Tabela 2 – Concentração de proteínas das tintas pelo método de Bradford (1976).

Amostras	Concentração de proteínas (mg/mL)
<i>Aplysia dactylomela</i>	1,39
<i>Bursatella leachii</i>	0,41
<i>Octopus</i> sp.	11,94

5.1.2. Atividade L-aminoácido oxidásica das tintas

A tinta de *A. dactylomela* exibiu atividade L-aminoácido oxidásica, catalisando a oxidação dos aminoácidos básicos testados, L-lisina e L-arginina (Figura 3).

O extrato da desova de *A. dactylomela* também exibiu atividade LAAO enquanto o extrato da glândula opalina não o fez. Para avaliar a possibilidade de a glândula opalina funcionar como fonte de aminoácidos para a tinta e para a dactilomelina-P, estes foram substituídos no ensaio pelo extrato dessa glândula. A atividade oxidásica, entretanto, não foi observada (Figura 3).

As tintas de *B. leachii* e de *Octopus* sp. também não exibiram atividades L-aminoácido oxidásicas contra os aminoácidos testados, L-lisina e -arginina.

Dentre as amostras portadoras de atividade L-aminoácido oxidásica, pode-se observar a preferência pelo aminoácido L-arginina, pois, em geral, os valores de absorbância

encontrados quando este aminoácido foi utilizado como substrato foram maiores que os encontrados com L-lisina.

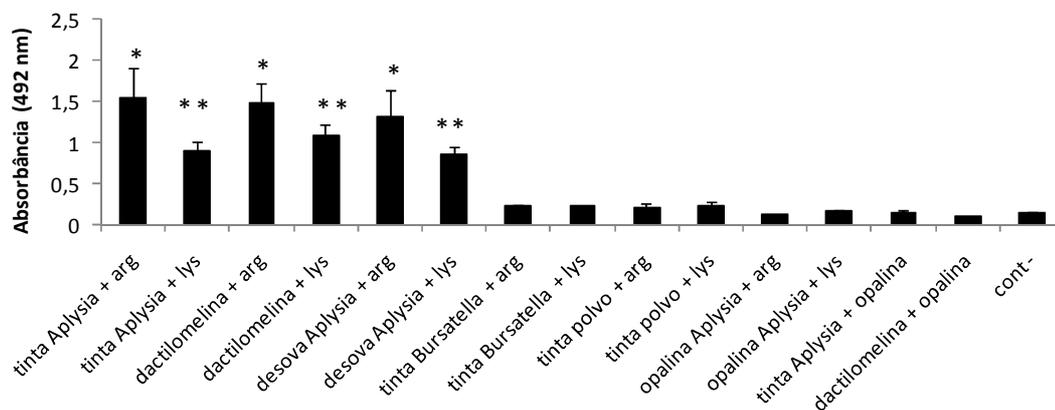


Figura 3– Atividade L-aminoácido oxidásica das tintas de *A. dactylomela*, *B. leachii* e do polvo *Octopus* sp. e do extrato da desova e da glândula opalina de *A. dactylomela*. O controle negativo consistiu da mistura reacional não acrescida da fonte de L-aminoácido oxidase testada. Os valores representam médias de três experimentos independentes. Os asteriscos indicam que a diferença entre os valores indicados não é significativa ($\alpha > 0,05$).

5.1.3. Caracterização das tintas por PAGE-SDS

O estudo do perfil eletroforético das tintas de *A. dactylomela*, *B. leachii* e de *Octopus* sp. revelou um rico conjunto de proteínas com pesos moleculares variando de cerca de 70 kDa a menos de 14 kDa. Dentre essas, destacam-se bandas na faixa de 60 kDa presentes nas três tintas. Uma dessas bandas foi previamente descrita para a tinta de *A. dactylomela* como a dactilomelina-P. Além dessas, podem ser observadas bandas de cerca de 30 kDa, também nas três tintas (Figura 4).

O estudo dessas tintas por *Western Blot* utilizando anticorpos produzidos contra a dactilomelina-P mostrou a existência de identidades com as bandas de 60 kDa presentes nas tintas de *A. dactylomela* e de *B. leachii*. Uma banda de cerca de 30 kDa também foi reconhecida na tinta de *Octopus* sp., indicando uma possível relação da proteína de estudo com algum fator de menor peso presente na tinta do polvo estudado, provavelmente um precursor ou uma subunidade protéica (Figura 5).

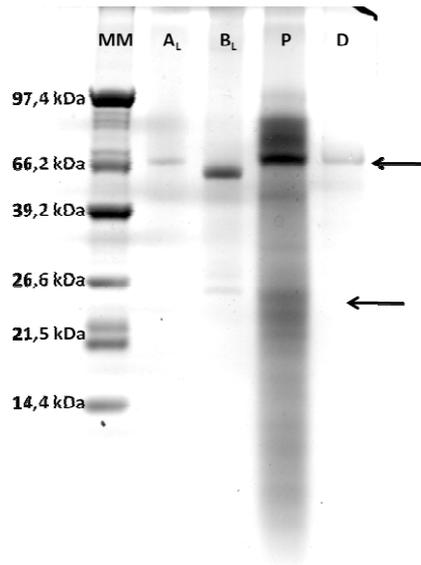


Figura 4 – PAGE-tricina-SDS das tintas de *A. dactylomela*, *B. leachii* e *Octopus* sp. e da dactilomelina-P. **Legenda:** MM – marcador molecular; A_L – tinta de *A. dactylomela* liofilizada; B_L – tinta de *B. leachii* liofilizada; D – dactilomelina-P; P – tinta bruta de *Octopus* sp.. O marcador de massa molecular consistiu de fosforilase B (97,4 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), aldolase (39,2 kDa), triose fosfato isomerase (26,6 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa). Concentração de proteínas/poço: *gel 1* – 10 μ gP/poço (A_L), 10 μ gP/poço (B_L), 30 μ gP/poço (P), 10 μ gP/poço (D). As setas indicam as regiões de cerca de 60 e de 30 kDa.

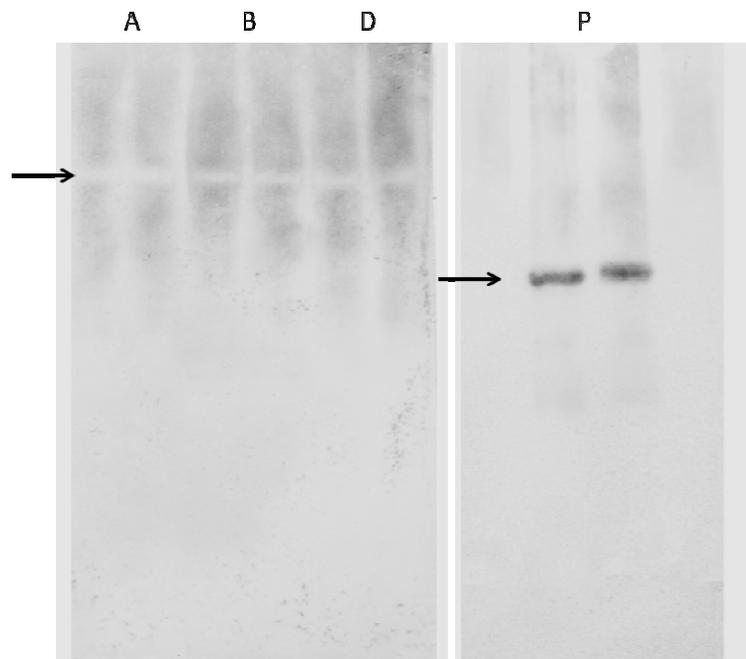


Figura 5 – *Western blot* das tintas das lesmas *A. dactylomela* e *B. leachii* e do polvo *Octopus* sp. **Legenda:** A – tinta de *A. dactylomela*; B – tinta de *B. leachii*; D – dactilomelina-P; P – tinta de *Octopus* sp.. As setas indicam as regiões de cerca de 60 e de 30 kDa que reagiram com o anticorpo anti-dactilomelina-P.

5.1.4. Atividade Antimicrobiana

As tintas de *B. leachii* e de *Octopus* sp. não exibiram atividades antibacteriana nem antifúngica. Estas ficaram restritas, no caso da atividade antibacteriana, à tinta de *A. dactylomela* e à dactilomelina-P, e, no caso da atividade antifúngica (Figura 6), à tinta de *A. dactylomela*.

Tabela 3 – Atividades antimicrobianas das tintas.

Amostras	Atividade antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (Halo em mm)	Atividade antifúngica contra <i>Mucor</i> sp.
<i>Aplysia dactylomela</i>	16,6 ± 4,2	+
<i>Bursatella leachii</i>	0	0
<i>Octopus</i> sp.	0	0
Dactilomelina-P	21 ± 1,3	0

Legenda: + (inibição) / 0 (ausência de inibição).

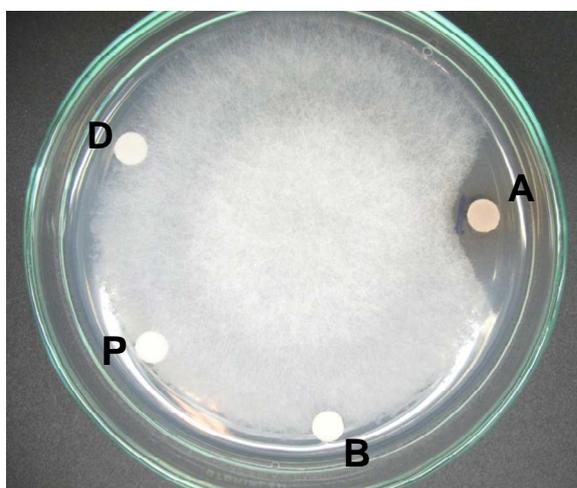


Figura 6 – Atividade antifúngica das tintas contra o fungo filamentoso *Mucor* sp. **Legenda:** A – tinta de *A. dactylomela*; B – tinta de *B. leachii*; P – tinta de *Octopus* sp.; D – dactilomelina-P.

5.2. Determinação do mecanismo de ação antibacteriana da dactilomelina-P

5.2.1. Atividade antibacteriana em meio suplementado com L-aminoácidos

A adição dos aminoácidos L-lisina e L-arginina resultou em um incremento na atividade antibacteriana da dactilomelina-P, expresso pela diminuição de uma unidade logarítmica (10 vezes) no número de colônias viáveis de *S. aureus* em relação ao grupo tratado somente com a proteína. Esta diminuição foi estatisticamente semelhante nos grupos tratados com os dois aminoácidos diferentes, L-lisina e L-arginina, como pode ser observado na figura 7. Todos os tratamentos também se mostraram significativamente diferentes do controle positivo, as diminuições chegando a duas unidades logarítmicas (100 vezes) para os meios suplementados com a dactilomelina-P e L-lisina ou L-arginina, e uma unidade para o meio adicionado somente de proteína.

Esse efeito também foi observado na curva de crescimento de *S. aureus* obtida ao longo de 48 h. Com a adição da proteína e dos aminoácidos após a entrada da cultura em fase exponencial (indicado por uma seta), é observada uma redução na absorbância para os grupos tratados com a dactilomelina-P sozinha e com esta acrescida de L-lisina e L-arginina. Enquanto o controle positivo continua a crescer até 24 horas, no grupo tratado com proteína observou-se uma inibição duradoura do crescimento, mantida até as 48 horas (Figura 8).

Quando comparados o número de células encontradas no grupo tratado apenas com dactilomelina-P ($t = 24$ h) com o encontrado imediatamente antes da adição dos tratamentos ($t = 10$ h), é observada uma inibição no crescimento da cultura com manutenção do número de células. Trata-se de um perfil característico de uma inibição causada por um agente bacteriostático, confirmando o observado por Melo *et al.* (2000). Já nas culturas tratadas com a proteína acrescida de L-lisina ou de L-arginina, foi observada uma diminuição no número de células em relação ao momento do inóculo ($t = 10$ h). Neste caso, é observado um efeito bactericida especificamente quando o meio é acrescido de qualquer um dos aminoácidos testados (Figura 9).

A atividade mostrou um efeito dose-dependente (Figura 10), evidenciado pelo aumento no número de colônias viáveis juntamente com a diminuição da concentração tanto de lisina como de arginina adicionados ao meio.

Para verificar se a atividade antibacteriana da dactilomelina-P é mediada pelo peróxido de hidrogênio, foi determinado o efeito da peroxidase sobre a atividade da proteína

(Figura 11). A adição da peroxidase inibiu a ação antibacteriana da dactilomelina-P, confirmando ser o peróxido de hidrogênio responsável por esta atividade.

Quando dactilomelina-P, aminoácidos e peroxidase foram dissolvidos em caldo LB e adicionados separadamente às culturas em crescimento no meio previamente tratado com dactilomelina-P e peroxidase, houve inibição do crescimento bacteriano apenas no grupo que recebeu a dactilomelina-P. Isso é devido à ação da proteína sobre os aminoácidos presentes no caldo LB, gerando peróxido de hidrogênio, que é o responsável pela inibição. Quando se adicionou a dactilomelina-P juntamente com a peroxidase, o crescimento observado foi comparável a cultura controle, comprovando que o produto da oxidação dos aminoácidos, isto é, peróxido de hidrogênio, foi degradado pela peroxidase. Consequentemente, a atividade antibacteriana da dactilomelina-P não foi observada.

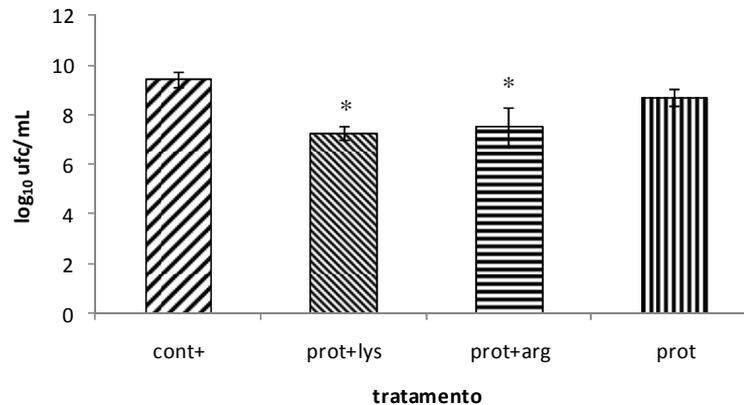


Figura 7 - Efeito antibacteriano da dactilomelina-P em meio suplementado com L-aminoácidos após 24 horas de incubação a 37° C. **Legenda:** cont+ - controle positivo, prot+lys - proteína (100 µg/mL) acrescida de L-lys (100 mM), prot+arg - proteína (100 µg/mL) acrescida de L-arg (100 mM), prot - proteína (100 µg/mL). Os valores representam médias de três experimentos independentes. O controle positivo consistiu do crescimento da cultura em caldo LB sem a adição de dactilomelina-P e/ou aminoácidos. Os asteriscos indicam que a diferença entre os valores indicados não é significativa ($\alpha > 0,05$).

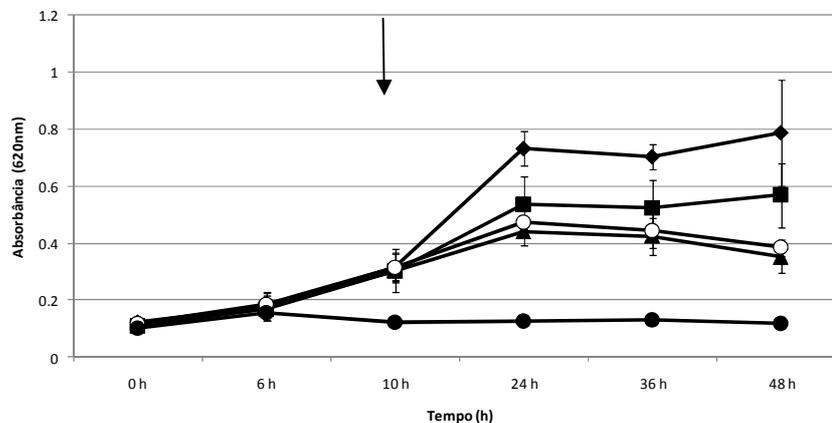


Figura 8 – Curva de crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 obtida a partir de sua absorbância a 620nm sob diferentes condições, evidenciando a inibição do crescimento quando da incubação da bactéria com a dactilomelina-P na presença ou ausência dos aminoácidos L-lisina e L-arginina. (♦) Controle positivo; (■) grupo adicionado de dactilomelina-P após 10 h de crescimento; (▲) grupo adicionado de dactilomelina-P e L-lisina após 10 h; (○) grupo adicionado de dactilomelina-P e L-arginina após 10 h; (●) controle negativo (caldo LB). O controle positivo consistiu do crescimento da cultura em caldo LB sem a adição de dactilomelina-P e/ou aminoácidos. A seta indica o momento em que foram adicionados os tratamentos testados, após a cultura ter atingido a fase exponencial de crescimento.

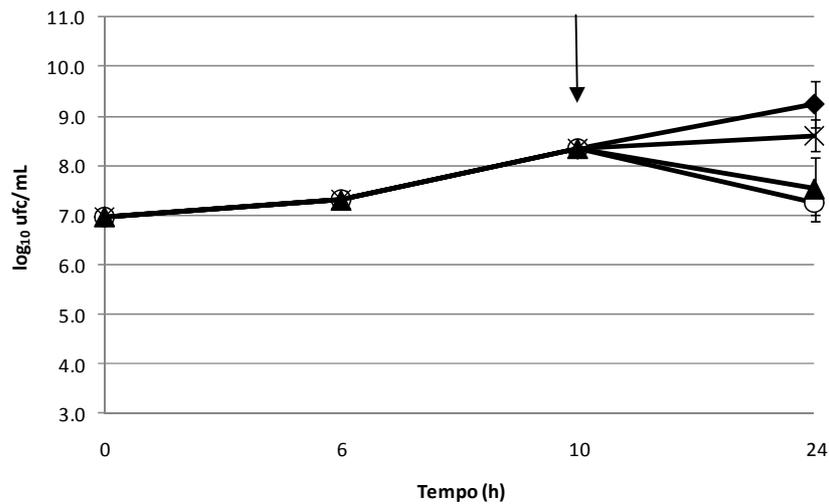


Figura 9 – Curva de crescimento da bactéria *S. aureus* ATCC 25923 crescida em meios acrescidos ou não da dactilomelina-P e dos aminoácidos L-lisina e L-arginina, evidenciando os efeitos bacteriostáticos e bactericidas da dactilomelina-P. (♦) controle positivo; (○) grupo adicionado de dactilomelina-P e L-lisina após 10 h de crescimento; (▲) grupo adicionado de dactilomelina-P e L-arginina após 10 h; (x) grupo adicionado somente de dactilomelina-P após 10 h. O controle positivo consistiu do crescimento da cultura em caldo LB sem a adição de dactilomelina-P e/ou aminoácidos. A seta indica o momento em que foram adicionados os tratamentos testados, após a cultura ter atingido a fase exponencial de crescimento.

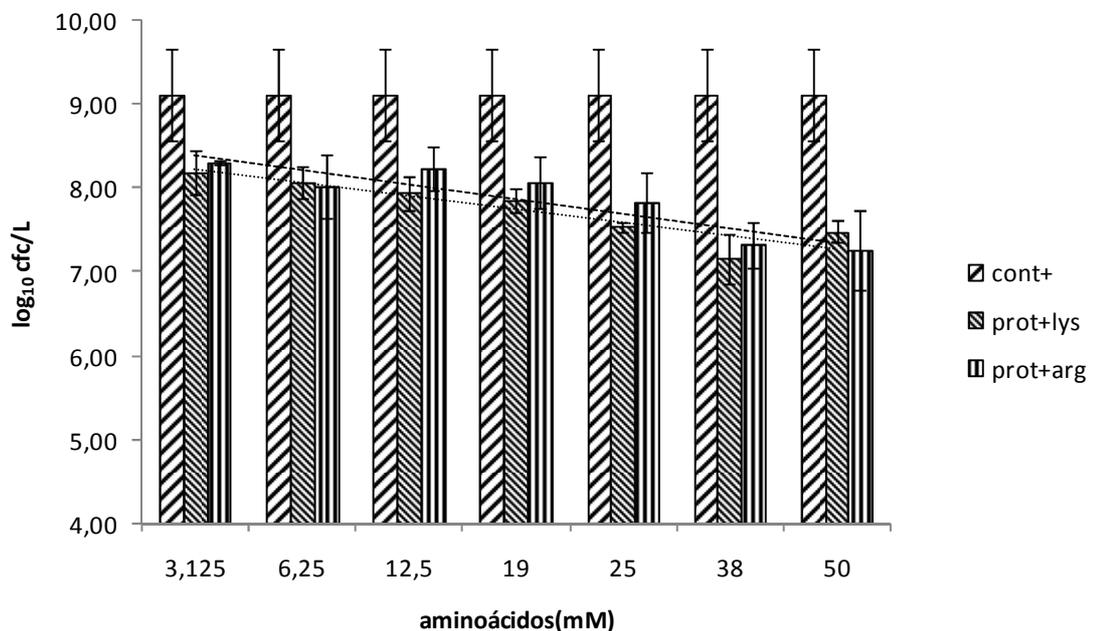


Figura 10 – Efeito concentração-dependente dos aminoácidos L-lisina e L-arginina na atividade antibacteriana da dactilomelina-P. Os valores representam médias de três experimentos independentes. **Legenda:** cont+ - controle positivo, prot+lys - proteína (100 µg/mL) acrescida de L-lys (100 mM), prot+arg - proteína (100 µg/mL) acrescida de L-arg (100 mM).

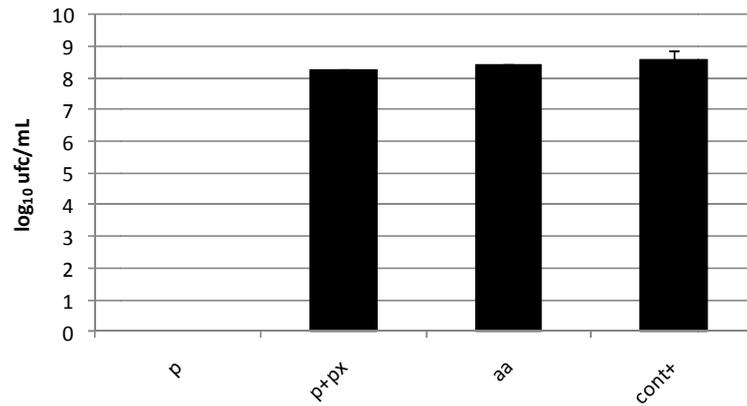


Figura 11 – Efeito da peroxidase na atividade antibacteriana da dactilomelina-P. **Legenda:** p – proteína (100 µg/mL), p+px – proteína e peroxidase (100 µg/mL, ambas), aa – L-lys e L-arg (100 mM), cont+ - controle positivo. O controle positivo consistiu do crescimento da cultura somente em caldo LB tratado com dactilomelina-P e peroxidase. Os valores representam médias de três experimentos independentes. Os asteriscos indicam que a diferença entre os valores indicados não é significativa ($\alpha > 0,05$).

5.2.2. Microscopia de força atômica (AFM)

Por microscopia de força atômica, não foi evidenciada nenhuma alteração morfológica nas células tratadas com a dactilomelina-P, sozinha ou adicionada dos aminoácidos. Exceto pela diminuição no número de células, a morfologia esférica e o tamanho das colônias e de suas células foram mantidos em todos os tratamentos (Figura 12).

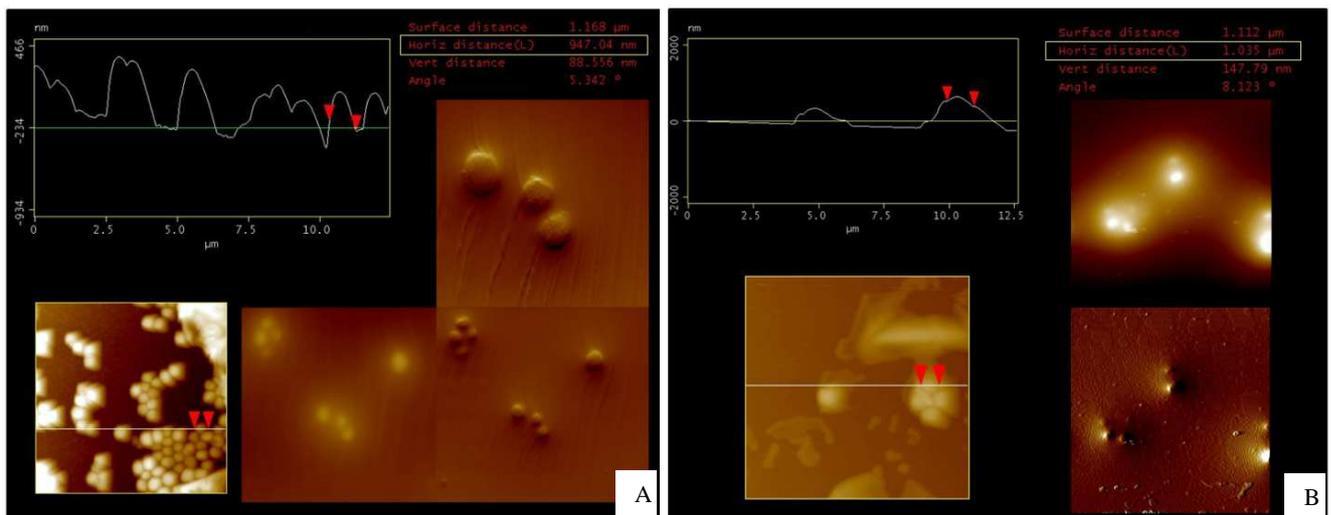


Figura 12 – Aspecto morfológico das colônias de *S. aureus* verificado por microscopia de força atômica (AFM) (A) Controle positivo, em destaque o diâmetro celular de 947,04 nm. (B) Grupo tratado com dactilomelina-P e L-lisina, diâmetro celular de 1,035 µm.

5.2.3. Atividade L-aminoácido oxidásica da dactilomelina-P

A dactilomelina-P exibiu atividade L-aminoácido oxidásica, catalisando a oxidação dos aminoácidos básicos testados, L-lisina e L-arginina (Figura 13).

O cálculo das constantes de Michaelis-Menten para a atividade da dactilomelina-P contra L-lisina e L-arginina revelou que esta proteína tem maior afinidade com a arginina, exibindo um Km dez vezes menor: $0,015 \pm 0,01$ mM/L para a arginina, e $0,22 \pm 0,16$ mM/L para a lisina.

A proteína dactilomelina-P também foi testada contra os aminoácidos L-histidina, aminoácido básico, e L-ácido aspártico e L-ácido glutâmico, não tendo sido encontrada atividade enzimática nestas situações.

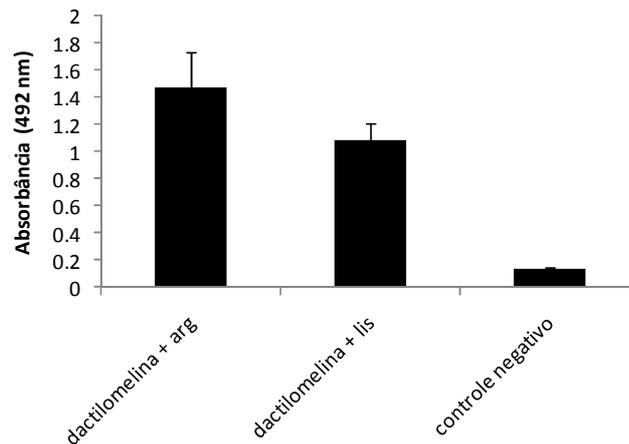


Figura 13 - Atividade L-aminoácido oxidásica da dactilomelina-P. O controle negativo consistiu da mistura reacional não acrescida da potencial L-aminoácido oxidase, dactilomelina-P. Os valores representam médias de três experimentos independentes.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho foi realizado com o intuito de trazer mais informações acerca da composição das tintas de organismos relacionados à *A. dactylomela* e de seus papéis ecológicos, além de avançar na elucidação do mecanismo de ação antibacteriana da dactilomelina-P.

O aumento na atividade antibacteriana resultante da adição dos aminoácidos L-lisina e L-arginina proporcionou boas provas de que esses aminoácidos estavam atuando de alguma forma sobre a atividade da proteína, potencializando-a.

A atividade enzimática confirmou a dactilomelina-P como uma LAAO, e, portanto, seu modo de ação antibacteriano pôde começar a ser inferido. Como uma LAAO, a dactilomelina-P pode atuar indiretamente sobre as células de *S. aureus* através da liberação de peróxido de hidrogênio e amônia, os principais produtos da oxidação. Esses produtos tóxicos podem influenciar diretamente no crescimento da bactéria, podendo haver efeitos sobre o metabolismo celular, incluindo inibição do crescimento, apoptose e necrose. Nesse sentido, são muito promissores, pois enquanto o peróxido de hidrogênio sozinho é instável e tende a se dissipar rapidamente, as LAAOs proporcionam um suplemento ininterrupto de peróxido de hidrogênio diretamente no local de ação (BUTZKE *et al.*, 2005).

Yang e colaboradores (2005) atribuíram as ações bacteriostáticas e bactericidas da escapina contra *E. coli* e *S. aureus* como resultante da produção de H₂O₂ no meio de cultura suplementado com L-lisina e L-arginina. Posteriormente, Ko e colaboradores (2008) demonstraram que a interação entre o peróxido produzido e outros intermediários reacionais gera compostos instáveis com forte efeito bactericida. A ação antibacteriana dessas proteínas, portanto, parece ser indireta, com o peróxido e outros compostos resultantes de sua atividade L-aminoácido oxidásica atuando diretamente sobre as células. Outro mecanismo de ação citotóxica de LAAOs é o de consumo de aminoácidos específicos e sua conseqüente depleção do meio de cultura, já reportado para oxidases de peixe e de lesmas do mar (MURAKAWA *et al.*, 2001).

É interessante destacar que, apesar de L-arginina ter menor Km e levar, provavelmente, à produção de mais peróxido de hidrogênio que L-lisina, isto pareceu não influenciar na atividade antimicrobiana da proteína nos meios suplementados com os aminoácidos. Neste caso, tanto quando adicionado de lisina como de arginina, a redução no crescimento observada foi a mesma. Yang *et al.* (2005), trabalhando com a escapina, observaram que sua reação com a L-arginina produzia uma mistura com pouca atividade

bactericida, apesar da maior quantidade de H₂O₂ produzida em comparação com a L-lisina. Como afirmado por Ko *et al.* (2008), isto demonstra que outros compostos que não o H₂O₂ são também responsáveis pelos efeitos antibacterianos dessas proteínas. É possível, portanto, que a menor produção de peróxido a partir da lisina seja compensada pela produção de compostos com maior poder inibitório.

Com a suplementação dos meios de cultivo com os aminoácidos L-lisina e L-arginina, pôde-se demonstrar o efeito bactericida proporcionado pela dactilomelina-P. Esse novo dado foi muito importante, pois antes somente a atividade bacteriostática havia sido observada para a dactilomelina-P. O efeito da suplementação do meio de cultivo com os substratos da enzima ou mesmo da utilização de meios mais ricos sobre a atividade antibacteriana das proteínas estudadas já havia sido descrito anteriormente por Yang e colaboradores (2005). Eles observaram que a escapina se comportava como bacteriostática na maioria das condições básicas de crescimento, apresentando um pequeno efeito bactericida quando em extrato de levedura suplementado com L-arginina e uma forte ação bactericida quando em presença de triptona, peptona e L-lisina.

A atividade antibacteriana da dactilomelina-P foi reduzida com a diminuição da concentração de aminoácidos disponíveis, parecendo depender da quantidade de peróxido de hidrogênio gerado. Assim, quando a concentração de aminoácidos (substratos da ação enzimática) foi alta, como nos meios suplementados com L-arginina e L-lisina em quantidades superiores a 25 mM, foi observada uma maior inibição bacteriana devido à maior quantidade de peróxido produzido. É possível que em concentrações mais baixas de aminoácidos, a quantidade de produtos gerados seja insuficiente para causar uma inibição diferente da causada pela proteína sozinha em caldo LB não adicionado dos aminoácidos. Nesse caso, duas situações são possíveis: ou a proteína é capaz de atuar diretamente sobre as células por meio de mecanismos independentes da atividade oxidásica, ou os aminoácidos presentes naturalmente no meio de cultivo podem atuar como suplemento básico para a oxidação pela proteína em quantidades comparáveis às menores concentrações de aminoácido utilizadas nos experimentos.

Quando o meio de cultivo foi pré-tratado com a dactilomelina-P e a peroxidase, pode-se observar o efeito da peroxidase sobre a atividade antibacteriana da dactilomelina-P. Jimbo *et al.* (2003) e Yang *et al.* (2005) observaram igualmente que a adição de peroxidase ao meio de cultivo contendo também sua proteína de estudo resultou em crescimento próximo ao do controle positivo, ou seja, numa inibição da ação antibacteriana das proteínas testadas, possivelmente, pela neutralização do peróxido de hidrogênio pela peroxidase. Também Ehara

et al. (2002) atribuíram a atividade antibacteriana da achatina ao peróxido de hidrogênio gerado pela atividade de LAAO dessa proteína. Nesse caso, a ligação da achatina à célula alvo mostrou ser essencial para que o peróxido atingisse concentrações aumentadas somente junto ao alvo, exibindo uma citotoxicidade sítio-específica.

Assim como observado neste estudo, Petzelt *et al.* (2002), estudando as ações citotóxicas da ciplasina, não observaram nenhuma alteração morfológica nas células alvo. Nas células tratadas, os primeiros sinais de toxicidade se deram na membrana celular externa, com a morfologia interna inalterada. Os autores sugeriram que a ciplasina se liga à membrana externa, iniciando uma série de eventos em cascata que levam à morte celular. Nogueira (2005) também observou por microscopia eletrônica de transmissão que células da bactéria *S. aureus* permanecem com morfologia inalterada após incubadas com a dactilomelina-P. A proteína, por sua vez, permanece localizada nos envoltórios da célula, causando seus efeitos inibitórios, possivelmente, no metabolismo celular por meio da entrada de peróxido de hidrogênio ou de outros produtos gerados por sua ação oxidásica.

A dactilomelina-P é a proteína mais abundante presente na tinta liberada pela lesma de mar *A. dactylomela*. Como já demonstrado por Melo *et al.* (2000), possui uma massa molecular em torno de 60 kDa, característica compartilhada por outras proteínas isoladas das tintas de várias espécies de lesmas do mar. Todas essas proteínas de lesmas compartilham alguma característica além da massa molecular, produção e armazenamento na glândula de tinta, número de subunidades, estabilidade ao pH, resistência à protease e desnaturação térmica entre 55 e 70° C. Contudo, é quanto a composição de aminoácidos, grau de glicosilação e tipo de atividade biológica que elas diferem, mostrando que, de fato, se tratam de moléculas distintas, possivelmente desempenhando papéis importantes na defesa de espécies diferentes. A semelhança entre essas proteínas também é evidenciada pelo alinhamento de suas sequências protéicas (TAKAMATSU *et al.*, 1995; EHARA *et al.*, 2002; PETZELT *et al.*, 2002; JIMBO *et al.*, 2003; BUTZKE *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2005).

Considerando o intrigante comportamento de liberação da tinta, pode-se vê-lo presente em outros táxons, como em polvos e sépias, pertencentes à classe Cephalopoda. Nessa classe, apesar de suas pouco entendidas habilidades quimicossensoriais, existem evidências da atuação da defesa química (BOAL, GOLDEN, 1999), podendo inclusive causar interrupção dos sistemas sensoriais de predadores (MACGINITIE, MACGINITIE, 1968). Gilly e Lucero (1992) demonstraram que a lula *Loligo opalescens* respondia à presença de tinta de outros coespecíficos com uma escapada a jato. Resposta semelhante foi observada por Boal e Marsh (1998), tendo havido um aumento na taxa de ventilação após espécimes de *S.*

officinalis terem sido expostas à tinta da mesma espécie. Esses trabalhos demonstram bem a presença de defesas de natureza química mediadas pela tinta em Cephalopoda, além de confirmarem a capacidade de esses animais detectarem a presença de sinais químicos na água.

Kicklighter *et al.* (2007) observaram que não somente a tinta e a secreção opalina produzidas por animais da mesma espécie eram capazes de elicitar uma resposta em juvenis de *A. californica*. Também as tintas de lesmas de outras espécies, *A. juliana* e *A. dactylomela*, e as dos cefalópodes *Lollingucula brevis* e *Octopus bimaculoides* foram capazes de induzir respostas de alarme, tendo sido comprovada a presença das mesmas moléculas de alarme. Essa resposta de espécies relacionadas às moléculas de alarme umas das outras pode indicar a presença de moléculas semelhantes filogeneticamente conservadas ou mesmo idênticas, tratando-se de mais um indício de que certas moléculas podem ser comuns entre moluscos secretores de tinta. Derby *et al.* (2007) demonstraram a presença na tinta de cefalópodes (*O. vulgaris*, *S. officinalis*, *Dosidicus gigas* e *Loligo pealei*) de concentrações milimolares de estimulantes alimentares, similares às encontradas para *A. californica*, *A. dactylomela* e *A. juliana*, indicando uma convergência de defesas antipredatórias baseadas em mecanismos químicos de disrupção sensorial e fagomímica.

A natureza molecular dos compostos atuantes em Cephalopoda ainda é pouco entendida, porém a observação da presença de uma grande quantidade de proteínas na tinta de *Octopus* sp. no presente trabalho sugere a participação dessas proteínas, não previamente descritas, na defesa proporcionada pela tinta. O achado de proteínas com massa molecular semelhante ao da dactilomelina-P, além de um fator de menor massa molecular com identidade imunológica com essa, constitui um excelente indicativo de que, a exemplo das proteínas de lesmas do mar, essas podem se comportar de modo semelhante na defesa contra patógenos e predadores. Além disso, mostra que o táxon Cephalopoda pode ser explorado biotecnologicamente.

Um importante questionamento pode ser feito: esses moluscos evoluíram independentemente a habilidade de se utilizarem de compostos químicos similares em sua defesa?

A atividade enzimática da dactilomelina-P, isolada da tinta de *A. dactylomela*, é específica contra os aminoácidos básicos L-lisina e L-arginina, sendo inexistente contra o aminoácido L-histidina, também básico. Isto deve ocorrer devido à incapacidade da enzima de quebrar o grupamento imidazol, um radical aromático heterocíclico, presente na histidina. A proteína também foi incapaz de atuar sobre L-aspartato e L-glutamato como substratos.

Derby *et al.* (2007), analisando a composição química das tintas e da secreção opalina de vários moluscos, encontrou uma média de 100 mM de L-lys e 425 μ M de L-arg na secreção opalina de *A. californica*, com concentrações muito baixas de ambos na tinta. Já em *A. dactylomela* observou cerca de 120 mM de L-lys e 212 μ M de L-arg em sua secreção opalina, e 110 μ M de L-lys e praticamente nada de L-arg na tinta. Essas quantidades são compatíveis com a hipótese de que a opalina pode funcionar como uma fonte de aminoácidos para as LAAOs presentes nas tintas. Além disso, quando consideradas as concentrações de aminoácidos encontradas pelos autores para *A. dactylomela*, a menor afinidade da enzima com a L-lys parece estar sendo compensada pela presença desse aminoácido em maior quantidade. Já a arginina, presente em menor quantidade, é o aminoácido pelo qual a enzima tem maior afinidade.

O fato de não ter sido detectada atividade enzimática da dactilomelina-P usando o extrato da glândula opalina como fonte de aminoácidos, pode ser devido à baixa concentração desses compostos na composição do extrato bruto. A atividade poderia ser detectada se fosse utilizada como substrato a própria secreção opalina, onde provavelmente a concentração de L-lisina e L-arginina estariam maiores.

É sabido que as LAAOs possuem diferentes especificidades de substrato. Algumas, como a dactilomelina-P, preferem aminoácidos básicos (JIMBO *et al.*, 2003; BUTZKE *et al.*, 2004, 2005; YANG *et al.*, 2005), outras têm requerimentos diferentes ou mesmo mais amplos, oxidando L-leucina, L-metionina ou L-tirosina (TORII *et al.*, 2000; MACHEROUX *et al.*, 2001; DU, CLEMETSON, 2002; EHARA *et al.*, 2002). Dentre as LAAOs de lesmas do mar, é frequente a preferência por L-lisina ou L-arginina.

Quando as especificidades e constantes enzimáticas das LAAOs descritas para lesmas do mar são comparadas, observa-se que, em geral, L-lisina e L-arginina servem de substrato, com proteínas, como a escapina e a APIT, preferindo a lisina, e outras, como dactilomelina-P e aplisianina A, optando pela arginina. O menor valor de K_m (constante de Michaelis-Menten) encontrado até hoje para essas proteínas foi o da aplisianina A para a L-arginina – 0.0034 mM. Se considerada a hipótese de Derby (2007), de que a proteína originada na glândula de albúmen deu origem às demais e desempenha a função primordial dessas proteínas, este fato poderia explicar esta alta atividade L-aminoácido oxidásica. Além disso, espera-se que, quanto mais escasso o substrato alvo da enzima, maior será sua atividade de LAAO, como observado para a dactilomelina-P, cuja afinidade é maior para arginina, presente em quantidades bem mais baixas na tinta de *A. dactylomela* (DERBY *et al.*, 2007).

Essa variedade de atividades é possivelmente um reflexo de suas diversas especificidades de substrato e, conseqüentemente, dos produtos de oxidação gerados. Apesar de o peróxido de hidrogênio ser descrito como o produto principal, outras moléculas são produzidas. Kamio *et al.* (2009) obtiveram uma complexa mistura resultante da oxidação da lisina pela escapina. Foi gerada uma mistura de componentes onde reações não enzimáticas começaram a ocorrer entre o peróxido de hidrogênio e outros recém formados produtos. Quando a mistura foi testada quanto a sua atividade antimicrobiana, o H₂O₂ mostrou contribuir principalmente para o efeito bacteriostático, enquanto a maior parte do efeito bactericida era devido à interação química entre o peróxido e o ácido α -ceto- ϵ -aminocapróico, um intermediário de reação. Dessa forma, foram encontradas outras moléculas geradas por reações entre produtos das LAAOs cuja ação antimicrobiana é bem mais potente (KO *et al.*, 2008).

Derby (2007) previu a existência de uma LAAO na tinta de *B. leachii* com base nas atividades biológicas descritas por Rajaganapathi, Kathiresan e Singh (2002). Essa atividade não foi comprovada no presente trabalho, pelo menos, contra os aminoácidos testados, apesar da ocorrência de, no mínimo, uma proteína similar à dactilomelina-P. Outra razão para a ausência de ação enzimática pode ser a baixa concentração de proteínas na tinta de *B. leachii*. Assim, durante o ensaio enzimático, a LAAO hipotética poderia estar presente em baixa quantidade, resultando em um resultado negativo.

A tinta de *Octopus* sp. também não exibiu atividade L-aminoácido oxidásica apesar das semelhanças com o perfil protéico da tinta de *A. dactylomela* e da alta concentração de proteínas observada. É possível que a tinta deste cefalópode tomado como modelo possua funções diferentes das previstas para as tintas de lesmas do mar. Entretanto, esta tinta pode atuar por meio de outros compostos químicos tão efetivos quanto as LAAOs. Para a tinta do cefalópode *S. officinalis* foi descrita a presença da enzima tirosinase, com efeitos citotóxicos sobre várias linhagens celulares. Esse efeito se dá pela ação catalítica da proteína sobre a tirosina, produzindo dopaquinona e, eventualmente, dopa; este último podendo causar dano oxidativo ao DNA, lipídeos e proteínas (DERBY, 2007). Trata-se, portanto, de um mecanismo muito similar ao apresentado pelas L-aminoácido oxidases.

Derby (2007) propôs, como um dos princípios das defesas químicas de lesmas do mar, que compostos e mecanismos similares podem ocorrer entre organismos próximos relacionados, mas também entre espécies distantes. Neste estudo, podemos observar a presença de proteínas similares e relacionadas imunologicamente nas três tintas analisadas. Dessas, duas eram mais próximas filogeneticamente, *A. dactylomela* e *B. leachii* (ambos

Gastropoda, Opisthobranchia), e duas mais distantes, *A. dactylomela* (Gastropoda, Opisthobranchia) e *Octopus* sp. (Cephalopoda, Coleoidea). Esses três animais estão reunidos em torno de uma questão: serem moluscos sem concha e liberadores de tinta.

A ampla distribuição dessas proteínas dentre moluscos e “não moluscos” é um provável reflexo de sua importância, seja como potencial defensivo contra patógenos, seja contra predadores, seja em alguma função de ataque, a exemplo das LAAOs descritas em venenos de cobras.

A ação antibacteriana da tinta de *A. dactylomela* e da dactilomelina-P agora pode ser entendida como um reflexo indireto da presença da atividade L-aminoácido oxidásica, ausente nas outras duas tintas analisadas. Isso levanta questões acerca da função ecológica dessas secreções e de seus componentes. As diferenças encontradas com respeito às atividades dessas proteínas refletem possivelmente as diferentes dietas apresentadas por seus possuidores ou mesmo os variados predadores e patógenos contra os quais são obrigados a se defender (DERBY, 2007). Enquanto as lesmas do mar analisadas neste estudo são organismos herbívoros, se alimentando de macroalgas verdes e vermelhas (*A. dactylomela*) e de cianobactérias (*B. leachii*), o polvo é carnívoro. Neste caso, apesar da principal proteína analisada não ser oriunda da dieta, sabe-se que esta pode influenciar os compostos produzidos por um animal na medida em que fornece os componentes básicos necessários para a síntese de biomoléculas

Na natureza, existem muitos casos bem estudados de grupos de proteínas cuja distribuição sugere interessantes casos de homoplasia. As LAAOs são bons exemplos disto, pois sua distribuição entre bactérias, cobras e lesmas do mar, além de outros organismos, ilustra bem esse tipo de processo evolucionário – uma convergência de um importante caractere de defesa.

7. CONCLUSÕES

Os animais estudados, pertencentes a gêneros ou a classes diferentes, compartilham a presença de fatores protéicos semelhantes à dactilomelina-P, mostrando que essas potenciais moléculas de defesa podem ser comuns dentre moluscos sem concha.

As tintas de *B. leachii* e de *Octopus* sp. não possuem atividade L-aminoácido oxidásica, fato este que deve ser confirmado por testes com outros aminoácidos, de modo a ratificar se realmente não compartilham esta característica com *A. dactylomela* ou se são capazes de oxidar aminoácidos diferentes dos utilizados, refletindo a grande diversidade e versatilidade de LAAOs existentes na natureza.

A dactilomelina-P foi comprovada como uma L-aminoácido oxidase, a exemplo de outras proteínas de lesmas do mar. Essa atividade L-aminoácido oxidásica tem influências sobre sua atividade antibacteriana contra *S. aureus*, devido à produção de peróxido de hidrogênio. Essa ação não induz danos morfológicos e é dependente da concentração de aminoácidos presentes no meio, podendo ser bacteriostático em meio não suplementado com L-lisina e L-arginina, ou bactericida na presença de concentrações mais elevadas desses aminoácidos.

8. REFERÊNCIAS

AGGIO, J. F.; DERBY, C. D. Hydrogen peroxide and other components in the ink of sea hares are chemical defenses against predatory spiny lobsters acting through non-antennular chemoreceptors. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 363, p. 28 – 34, 2008.

AMBROSE, III H. W.; GIVENS, R. P.; CHEN, R.; AMBROSE, K. P. Distastefulness as a defense mechanism in *Aplysia brasiliana* (Mollusca: Gastropoda). **Marine Behavior & Physiology**, v. 6, p. 57 – 64, 1979.

BARSBY, T. Drug discovery and sea hares: bigger is better. **Trends in Biotechnology**, v. 24 (1), p. 1 – 3, 2006.

BATISTA, M. G. L. **Susceptibilidade de *Staphylococcus aureus* frente à ação da dactylomelina-P, uma proteína isolada da tinta do molusco *Aplysia dactylomela***. 2004, 49 p. Monografia de graduação (Bacharelado em Ciências Biológicas), UFC, Fortaleza, 2004.

BAUER, A. W.; KIRB, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493 – 495, 1966.

BEZERRA, L. E. A.; CARVALHO, A. F. U.; BARREIRA, L. A.; NOGUEIRA, V. L. R.; SILVA, J. R. F.; VASCONCELOS, I. M.; MELO, V. M. M. The relationship between seaweed diet and purple ink production in *Aplysia dactylomela* Rang 1828 (Gastropoda: Opisthobranchia) from Northeastern Brazil. **Journal of Shellfish Research**, v. 23 (2), p. 581 – 584, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 – 254, 1976.

BOAL, J. G.; GOLDEN, D. K. Distance chemoreception in the common cuttlefish, *Sepia officinalis* (Mollusca, Cephalopoda). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 235, p. 307 – 317, 1999.

BOAL, J. G.; MARSH, S. E. Social recognition using chemical cues in cuttlefish (*Sepia officinalis* Linnaeus, 1758). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 230, p. 183 – 192, 1998.

BUTZKE, D.; MACHUY, N.; THIEDE, B.; HURWITZ, R.; GOEDERT, S.; RUDEL, T. Hydrogen peroxide produced by *Aplysia* ink toxin kills tumor cells independent of apoptosis

TAVARES, T. C. L. – Proteínas de tintas de moluscos marinhos...

via peroxiredoxin I sensitive pathways. **Cell Death and Differentiation**, v. 11, p. 608-617, 2004.

BUTZKE, D.; HURWITZ, R.; THIEDE, B.; GOEDERT, S.; RUDEL, T. Cloning and biochemical characterization of APIT, a new L-amino acid oxidase from *Aplysia punctata*. **Toxicon**, v. 46, p. 479 – 489, 2005.

CAREFOOT, T. H. *Aplysia*: Its biology and ecology. **Oceanography and Marine Biology: an Annual Review**, v. 25, p. 167-284, 1987.

CAREFOOT, T. H. A comparison of time/energy budgeting in two species of tropical sea hares *Aplysia*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 131, p. 267 – 282, 1989.

CAREFOOT, T. H.; PENNING, S. C.; DANKO, J. P. A test of novel function(s) for the ink of sea hares. **Journal of Marine Biology and Ecology**, v. 234, p. 185 – 197, 1999.

CAREW, T. J.; KANDEL, E. R. Inking in *Aplysia californica*. I. Neural circuit of an all-or-none behavioral response. **Journal of Neurophysiology**, v. 40, p. 692 – 707, 1977.

CHAPMAN, D. J.; FOX, D. L. Bile pigment metabolism in the sea-hare *Aplysia*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 4, p. 71 – 78, 1967.

COELHO, L.; PRINCE, J.; NOLEN, T. G. Processing of defensive pigment in *Aplysia californica*: acquisition, modification, and mobilization of the red algal pigment R-phycoerythrin by the digestive gland. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 425-438, 1998.

CUMMINS, S. F.; NICHOLS, A. E.; AMARE, A.; HUMMON, A. B.; SWEEDLER, J. V.; NAGLE, G. T. Characterization of *Aplysia* enticin and temptin, two novel waterborne protein pheromones that act in concert with attractin to stimulate mate attraction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 25614 – 25622, 2004.

DERBY, C. D. Escape by inking and secreting: Marine Molluscs Avoid Predators Through a Rich Array of Chemicals and Mechanisms. **Biological Bulletin**, v. 213, p. 274 – 289, 2007.

DERBY, C. D.; KICKLIGHTER, C. E.; JOHNSON, P. M.; ZHANG, X. Chemical composition of inks of diverse marine molluscs suggests convergent chemical defenses. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, p. 1105 – 1113, 2007.

DU, X.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, p. 659 – 665, 2002.

TAVARES, T. C. L. – Proteínas de tintas de moluscos marinhos...

EHARA, T.; KITAJIMA, S.; KANZAWA, N.; TAMIYA, T.; TSUCHIYA, T. Antimicrobial action of achacin is mediated by L-amino acid oxidase activity. **FEBS Letters**, v. 531, p. 509 – 512, 2002.

FROY, O.; GUREVITZ, M. Arthropod and mollusk defensins – evolution by exon-shuffling. **Trends in Genetics**, v. 19 (12), p. 684 – 687, 2003.

GILLY, W. F.; LUCERO, M. T. Behavioral responses to chemical stimulation of the olfactory organ in the squid *Loligo opalescens*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 162, p. 209 – 229, 1992.

GOMEZ, D.; LUCAS-ELÍO, P.; SANCHEZ-AMAT, A.; SOLANO, F. A novel type of lysine oxidase: L-lysine- ϵ -oxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 1577 – 1585, 2006.

GRANDE, C.; TEMPLADO, J.; CERVERA, J. L.; ZARDOYA, R. Phylogenetic relationships among Opisthobranchia (Mollusca: Gastropoda) based on mitochondrial cox 1, trn V, and rrnL genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 33, p. 378 – 388, 2004.

IJIMA, R.; KISUGI, J.; YAMAZAKI, M. Biopolymers from marine invertebrates. XIV. Antifungal properties of Dolabellin A, a putative self-defense molecule of sea hare, *Dolabella auricularia*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 17, p. 1144–1146, 1994.

IJIMA, R.; KISUGI, J.; YAMAZAKI, M. Antifungal activity of Aplysianin E, a cytotoxic protein of sea hare (*Aplysia kurodai*) eggs. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 19 (1), p. 13 – 19, 1995.

IJIMA, R.; KISUGI, J.; YAMAZAKI, M. A novel antimicrobial peptide from the sea hare *Dolabella auricularia*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 27, p. 305 – 311, 2003a.

IJIMA, R.; KISUGI, J.; YAMAZAKI, M. L-Amino acid oxidase activity of an antineoplastic factor of a marine mollusk and its relationship to cytotoxicity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 23, p. 505 – 512, 2003b.

JIMBO, M., NAKANISHI, F., SAKAI, R., MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. Characterization of L-amino acid oxidase and antimicrobial activity of aplysianin A, a sea hare-derived antitumor-antimicrobial protein. **Fisheries Science**, v. 69, p. 1240-1246, 2003.

JOHNSON, P. M.; KICKLIGHTER, C. E.; SCHMIDT, M.; KAMIO, M.; YANG, H.; ELKIN, D.; MICHEL, W. C.; TAI, P. C.; DERBY, C. D. Packaging of chemicals in the defensive secretory glands of the sea hare *Aplysia californica*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 78 – 88, 2006.

TAVARES, T. C. L. – Proteínas de tintas de moluscos marinhos...

KAMIO, M.; KO, K.; ZHENG, S.; WANG, B.; COLLINS, S. L.; GADDA, G.; TAI, P. C.; DERBY, C. D. The Chemistry of Escapin: Identification and Quantification of the Components in the Complex Mixture Generated by an L-Amino Acid Oxidase in the Defensive Secretion of the Sea Snail *Aplysia californica*. **Chemistry – an European Journal**, v. 15 (7), p. 1597-1603, 2009.

KAMIYA, H.; SHIMIZU, Y. A natural agglutinin inhibitable by D-galacturonic acid in the sea hare *Aplysia* eggs: Characterization and Purification. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 47 (2), p. 255-259, 1981.

KAMIYA, H.; MURAMOTO, K.; OGATA, K. Antibacterial activity in the egg mass of a sea hare. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 40 (9), p. 947 – 949, 1984.

KAMIYA, H.; MURAMOTO, K.; YAMAZAKI, M. Aplysianin-A, an antibacterial and antineoplastic glycoprotein in the albumen gland of a sea hare, *Aplysia kurodai*. **Experientia**, v. 42, p. 1065 - 1067, 1986.

KAMIYA, H.; MURAMOTO, K.; GOTO, R.; YAMAZAKI, M. Characterization of the antibacterial and antineoplastic glycoproteins in a sea hare *Aplysia juliana*. **Nippon Suisan Gakkaishi**, n. 54, p. 773 – 777, 1988.

KAMIYA, H.; MURAMOTO, K.; GOTO, R.; SAKAI, M.; ENDO, Y.; YAMAZAKI, M. Purification and characterization of an antibacterial and antineoplastic protein secretion of a sea hare, *Aplysia juliana*. **Toxicon**, n. 27, p. 1269 – 1277, 1989.

KAMIYA, H.; SAKAI, R.; JIMBO, M. In: CIMINO, G.; GAVAGNIN, M. (Eds.). Molluscs: The Chemo-ecological Study to Biotechnology Application. **Bioactive Molecules from Sea Hares**. Berlin Heidelberg: Springer, 2006, p. 215 – 239.

KANDEL, E. R. **Behavioral Biology of *Aplysia* – a contribution to the comparative study of opisthobranch mollusks**. W. H. Freeman and Company, San Francisco, 463 p., 1979.

KICKLIGHTER, C. E.; SHABANI, S.; JOHNSON, P. M.; DERBY, C. D. Sea hares use novel antipredatory chemical defenses. **Current Biology**, v. 15, p. 549–554, 2005.

KICKLIGHTER, C. E.; DERBY, C. D. Multiple components in the ink of the sea hare *Aplysia californica* are aversive to the sea anemone *Anthopleura sola*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 334 (2), p. 256-268, 2006.

KICKLIGHTER, C. E.; GERMANN, M.; KAMIO, M.; DERBY, C. D. Molecular identification of alarm cues in the defensive secretions of the sea hare *Aplysia californica*. **Animal Behaviour**, v. 74, p. 1481 – 1492, 2007.

TAVARES, T. C. L. – Proteínas de tintas de moluscos marinhos...

KISUGI, J.; KAMIYA, H.; YAMAZAKI, M. Purification and characterization of aplysianin E, an antitumor factor from sea hare eggs. **Cancer Research**, v. 47, p. 5649–5653, 1987.

KISUGI, J.; KAMIYA, H.; YAMAZAKI, M. Purification of dolabellin-C an antineoplastic glycoprotein in the body fluid of a sea hare, *Dolabella auricularia*. **Developmental & Comparative Immunology**, n. 13, p. 3 – 8, 1989.

KISUGI, J.; OHYE, H.; KAMIYA, H.; YAMAZAKI, M. Biopolymers from marine invertebrates. XIII. Characterization of an antibacterial protein, dolabellin A, from the albumen gland of the sea hare, *Dolabella auricularia*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, p. 1537–1539, 1992.

KLUSSMAN-KOLB, A. Phylogeny of the Aplysiidae (Gastropoda, Opisthobranchia) with new aspects of the evolution of sea hares. **Zoologica Scripta**, v. 33 (5), p. 439 – 462, 2004.

KO, K.; WANG, B.; TAI, P. C.; DERBY, C. D. Identification of Potent Bactericidal Compounds Produced by Escapin, an L-Amino Acid Oxidase in the Ink of the Sea Hare *Aplysia californica*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52 (12), p. 4455-4462, 2008.

MACCOOL, R.; GALIVAN, J.; BERNS, D. S.; NIMEC, Z.; GUARD-FRIAR, D. W.; WAGONER, D. The chromophore and polypeptide composition of *Aplysia* ink. **Biological Bulletin**, v. 179, p. 326-331, 1990.

MACGINITIE, G. E.; MACGINITIE, N. **Natural History of Marine Animals**, 2.ed. McGraw-Hill, New York, 512 p., 1968.

MACHEROUX, P.; SETH, O.; BOLLSCHWEILER, C.; SCHWARZ, M.; KURFÜRST, M.; AU, L.; GHISLA, S. L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 1679 – 1686, 2001.

MARIN, A.; ALVAREZ, L. A.; CIMINO, G.; SPINELLA, A. Chemical defense in Cephalaspidean gastropods: origin, anatomical location and ecological roles. **Journal of Molluscan Studies**, v. 121 - 131, 1999.

MEDINA, M.; WALSH, P. J. Molecular Systematics of the Order Anaspeida Based on Mitochondrial DNA Sequence (12S, 16S, and COI). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 15 (1), p. 41 – 58, 2000.

MELO, V. M. M.; FONSECA, A. M.; VASCONCELOS, I, M.; CARVALHO, A. F. F. U. Toxic, antimicrobial and heamagglutinating activities of the purple fluid of the sea hare *Aplysia dactylomela* Rang 1828. **Brazilian Journal of medical and Biological Research**, v. 31, p. 785 – 791, 1998.

TAVARES, T. C. L. – Proteínas de tintas de moluscos marinhos...

MELO, V. M. M.; DUARTE, A. B. G.; CARVALHO, A. F. F. U.; SIEBRA, E. A.; VASCONCELOS, I. M. Purification of a novel antibiotic and haemagglutinating protein from purple gland of the sea hare *Aplysia dactylomela* Rang 1828. **Toxicon**, v. 38 (10), p. 1415-1427, 2000.

MURAKAWA, M.; JUNG, S. K.; IJIMA, K.; YONEHARA, S. Apoptosis inducing protein, AIP, from parasite-infected fish induces apoptosis in mammalian cells by two different molecular mechanisms. **Cellular Death and Differentiation**, v. 8, p. 298 – 307, 2001.

NOGUEIRA, V. L. R. **Papel de proteínas presentes na tinta liberada pela lesma do mar *Aplysia dactylomela* Rang 1828 nos mecanismos de defesa do animal.** 2005. 90 p. Dissertação. (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – LABOMAR-UFC, Fortaleza, 2005.

NOGUEIRA, V. L. R.; TAVARES, T. C. L.; MELO, V. M. M. Tópicos em Malacologia - Ecos do XIX Ebram. **Potencial Biomedicinal de Proteínas de lesmas do mar.** Rio de Janeiro, 2010, v. , p. -.

KAMIYA, H.; SAKAI, R.; JIMBO, M. In: CIMINO, G.; GAVAGNIN, M. (Eds.). Molluscs: The Chemo-ecological Study to Biotechnology Application. **Bioactive Molecules from Sea Hares.** Berlin Heidelberg: Springer, 2006, p. 215 – 239.

NOLEN, T. G.; JOHNSON, P. M.; KICKLIGHTER, C. E.; CAPO, T. Ink secretion by the marine snail *Aplysia californica* enhances its ability to escape from a natural predator. **Journal of Comparative Physiology**, v. 176, p. 239 - 254, 1995.

PENNINGS, S. C.; NASTISCH, S.; PAUL, V. J. Vulnerability of sea hares to fish predators: importance of diet and fish species. **Coral Reefs**, v. 20, p. 320 – 324, 1990.

PENNINGS, S. C. Interspecific variation in chemical defenses in the sea hares (Opisthobranchia: Anaspidea). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 180, p. 203 – 219, 1994.

PETZELT, C.; JOSWIG, G.; STAMMER, H.; WERNER, D. Cytotoxic cyplasin of sea hare, *Aplysia punctata*, cDNA cloning, and expression of bioactive recombinants in insect cells. **Neoplasia**, v. 4, p. 49 - 59, 2002.

PRINCE, J. S.; JOHNSON, P. M. Ultrastructural comparison of *Aplysia* and *Dolabrifera* ink glands suggests cellular sites of anti-predator protein production and algal pigment processing. **Journal of Molluscan Studies**, v. 72, p. 349 – 357, 2006.

TAVARES, T. C. L. – Proteínas de tintas de moluscos marinhos...

RAJAGANAPATHI, R.; KATHIRESAN, K.; SINGH, T. P. Purification of anti-HIV protein purple fluid on the sea hare *Bursatella leachii* de Blainville. **Marine Biotechnology**, v. 4, p. 447-453, 2002.

RIOS, E. C. **Seashells of Brazil**. 2ª Edição – Rio Grande: FURG, 492 p., 1994.

ROBERTS, W. K., SELITRENNIKOFF, C. P. Zeamantin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. **Journal of General Microbiology**, v. 136, p. 1771-1778, 1990.

ROGERS, C. N.; STEINBERG, P. D.; DENYS, R. Factors associated with oligophagy in 2 species of sea hares (MOLLUSCA, ANASPIDEA). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 192 (1), p. 47 – 73, 1995.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa- Editora UFV, 279 p., 2001.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D.; FOX, R. S. **Zoologia dos Invertebrados**. Ed. Roca, 2005.

RUSSO, G. L.; DE NISCO, E.; FIORE, G.; DI DONATO, P.; D'ISCHIA, M.; PALUMBO, A. Toxicity of melanin-free ink of *Sepia officinalis* to transformed cell lines: identification of the active factor as tyrosinase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 308, p. 293 – 299, 2003.

SHAGGER, H.; JAGOW, G. V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, p. 368 – 379, 1987.

STOKA, A. M. Phylogeny and evolution in chemical communication: an endocrine approach. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 22, p. 207 – 225, 1999.

TAKAMATSU, N.; SHIBA, T.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. Molecular cloning of the defense factor in the albumen gland of the sea hare *Aplysia kurodai*. **FEBS Letters**, v. 337, p. 373–376, 1995.

TAVARES, T. C. L. **Potencial biomedicinal da dactilomelina-P, uma proteína isolada da tinta púrpura do molusco marinho *Aplysia dactylomela* Rang 1828**. 2007. 54 p. Monografia de graduação (Bacharelado em Ciências Biológicas), UFC, Fortaleza, 2007.

TÕNISMÄGI, K.; SAMEL, M.; TRUMMAL, K.; RÖNNHOLM, G.; SIIGUR, J.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, E. L-amino acid oxidase from *Vipera lebetina* venom: Isolation, characterization, effects on platelets and bacteria. **Toxicon**, v. 48, p. 227 – 237, 2006.

TAVARES, T. C. L. – Proteínas de tintas de moluscos marinhos...

TORII, S.; YAMANE, K.; MASHIMA, T.; HAGA, N.; YAMAMOTO, K.; FOX, J. W.; NAITO, M.; TSURUO, T. Molecular cloning and functional analysis of apoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. **Biochemistry**, v. 39, p. 3197 – 3205, 2000.

TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, p. 4350-55, 1979.

VALLON, O. New sequence motifs in flavoproteins: evidence for common ancestry and tools to predict structure. **Proteins**, v. 38. p. 95 – 114, 2000.

WÄGELE, H.; KLUSSMAN-KOLB, A. Opisthobranchia (Mollusca, Gastropoda) – more than just slimy slugs. Shell reduction and its implications on defense and foraging. **Frontiers in Zoology**, v. 2, p. 1 – 18, 2005.

WILLAN, R. C. **The ecology of two New Zealand opisthobranch molluscs**. 1979, 198 p. Tese de Doutorado. Universidade de Auckland, Nova Zelândia, 1979.

YAMAZAKI, M.; KIMURA, K.; KISUGI, J.; KAMIYA, H. Purification of a cytolytic factor from the purple fluid of a sea hare. **FEBS Letters**, v. 198 (1), p. 25 – 28, 1986.

YAMAZAKI, M.; KISUGI, J.; KAMIYA, H. Biopolymers from marine invertebrates. XI Characterization of an antineoplastic glycoprotein, dolabellin A, from the albumen gland of a sea hare, *Dolabella auricularia*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, p. 3343 – 3346, 1989a.

YAMAZAKI, M.; KIMURA, K.; KISUGI, J.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. Isolation and characterization of a novel cytolytic factor in the purple fluid of the sea hare. **Cancer Research**, v. 49, p. 3834 – 3838, 1989b.

YAMAZAKI, M.; TANSO, S.; KISUGI, J.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. Purification and characterization of a cytolytic protein from purple fluid of the sea hare, *Dolabella auricularia*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, p. 2179 – 2182, 1989c.

YAMAZAKI, M.; OHYE, H.; KISUGI, J.; KAMIYA, H. Bacteriostatic and cytolytic activity of purple fluid from the sea hare. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 14, p. 379 – 383, 1990.

YANG, H.; JOHNSON, P. M.; KO, K.; KAMIO, M.; GERMANN, M. W.; DERBY, C. D.; TAI, P. C. Cloning, characterization and expression of escapin, a broadly antimicrobial FAD-containing L-amino acid oxidase from ink of the sea hare *Aplysia californica*. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 3609 – 3622, 2005.