

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

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE  
LECTINAS DO EQUINODERMO *Holothuria grisea***

**RANIÈRE DA MATA MOURA**

**Fortaleza/CE**

**2010**

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

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE LECTINAS**  
**DO EQUINODERMO *Holothuria grisea***

**RANIÈRE DA MATA MOURA**

Tese desenvolvida no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, durante o curso de Pós-Graduação em Bioquímica e apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Fortaleza/CE

2010

M884p Moura, Raniere da Mata  
Purificação, caracterização e propriedades biológicas de lectinas do equinodermo *Holothuria grisea* / Raniere da Mata Moura. -- Fortaleza, 2010.  
106 f. ;il. color. enc.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada  
Área de concentração: Bioquímica  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, 2010.

1.Lectinas. 2. *Holothuria grisea*. I. Cavada, Benildo Sousa (Orient.). II. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-graduação em Bioquímica. III.Título.

CDD 574.192

Tese de doutorado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e se encontra a disposição dos interessados na Biblioteca desta Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde feita de acordo com as normas da ética científica.

Tese aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

---

Ranière da Mata Moura

---

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada - UFC – Presidente

---

Prof. Dr. Eliseu Antunes dos Santos - UFRN – Conselheiro

---

Prof. Dr. Alexandre Flávio Silva de Queiroz - UFRN – Conselheiro

---

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha - UFC – Conselheiro

---

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira - UFC – Conselheiro

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Raimundo N. Moura (*in memoriam*) e Neidmar da Mata. Meu irmão, Allan M. da M. Silva, e meus filhos, Arthur M. B. Moura e Sofia C. P. Moura.

## AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos são dirigidos a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

À Neidmar da Mata, minha mãe, que sempre iluminou meu caminho com seu amor.

Ao meu irmão Allan, pela contagiante alegria de viver, seu caráter e carinho.

Aos meus filhos, Arthur e Sofia, pela inteligência, vivacidade, e constante inspiração.

À minha Noiva Raquel Rodrigues e familiares, pelo amor, apoio e carinho que tornou agradável essa temporada no Ceará.

Aos meus fiéis e inseparáveis amigos: Jorge, Leandro e Marlisson. Pelo eterno incentivo, conselhos e pelas batalhas que já travamos juntos sempre vitoriosos.

Ao Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada, pelo exemplo, paciência, orientação, sempre incentivando todos seus alunos sem acepção.

Ao prof. Dr. Maurício P. Sales (*in memoriam*) pelos ensinamentos, coragem e início nos trabalhos com lectinas de invertebrados marinhos.

Aos Profs Drs. Bruno, Kyria, Ricardo e Celso, pelo vasto conhecimento compartilhado durante esse período.

Ao prof. Edson e seu grupo de pesquisa, pelos ensaios antibacterianos e cicratização.

À Dra. Karoline Aragão, pela parceria nas análises em modelos de inflamação.

A todos os colegas do Biomol, pelo convívio diário. Em especial à doutoranda Raquel e aos alunos de I.C. Arthur, Rômulo e André. Sem estes magníficos amigos seria impossível realizar este trabalho.

A todos os professores e funcionários que compõem o Departamento de Bioquímica (UFC).

*“Por razões de estado o negro se torna branco e o branco se torna negro. O horrível se torna humano e os atos mais vis e os crimes mais atrozes se tornam atos meritórios.”*

**Mikhail Bakunin**

*“O sábio não se exhibe, e por isso brilha. Ele não se faz notar, e por isso é notado.  
Ele não se elogia, e por isso tem mérito. E, porque não está competindo,  
ninguém no mundo pode competir com ele.”*

**Lao Tsé**



**Purificação, caracterização e propriedades biológicas de lectinas do equinodermo *Holothuria grisea***

**Autor: Ranière da Mata Moura**

**Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada**

**RESUMO**

Lectinas foram detectadas em frações protéicas do pepino do mar *Holothuria grisea*. As frações obtidas da precipitação com acetona 1,0 vol. e sobrenadante 2,0 vol. apresentaram maior atividade aglutinante/hemolítica para eritrócitos humanos do tipo A papainizados. A primeira lectina, denominada HGA, foi purificada do precipitado da fração 1,0 vol. por meio de cromatografia de Filtração em Gel TSK seguido de troca iônica em DEAE Sepharose ambas realizadas em sistema HPLC/FPLC ÄKTA *pürifier*. A segunda lectina purificada, denominada HGL, foi isolada do sobrenadante da Fração 2,0 vol por cromatografia de filtração em Gel TSK. Estas Lectinas foram fortemente inibidas pela glicoproteína mucina e não se mostraram dependentes de íons metálicos. Suas *Mr* nativas foram estimadas por cromatografia de filtração em gel TSK em 16,8 kDa para HGL e 228 kDa para HGA. Quando analisadas por SDS-PAGE, apresentaram *Mr* de 15,6 kDa (HGL) e 105 kDa (HGA), não sofrendo alterações na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol. Em modelos experimentais de inflamação, a lectina HGA foi capaz de inibir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina em 68% na dose de 1mg/kg. No ensaio de peritonite induzida por ácido acético um efeito antinociceptivo significativo foi observado por tratamento com HGA (0,1, 1 e 10 mg/kg), reduzindo as constrições em 27%, 90% e 84% respectivamente. No teste de formalina HGA apresentou efeito antinociceptivo apenas na fase inflamatória. No teste de chapa quente HGA não mostrou efeito nociceptivo. Nos testes rota-rod e de campo aberto HGA não alterou o comportamento do animal. O tratamento com HGA 10 mg / kg i.v. induziu a diminuição na atividade da MPO (81,6% de inibição) e elevou os níveis circulantes de NO em 50,4% . HGA tem demonstrado a capacidade de modular a resposta inflamatória em modelos de inflamação *in vivo*. HGA é a primeira lectina de invertebrados marinhos que apresentou um efeito antiinflamatório. A lectina HGL foi investigada quanto sua toxicidade sobre artemias em conjunto, de forma comparativa, com extratos aquosos de vários invertebrados marinhos e uma lectina com ação antitumoral da esponja marinha *C. varians*. Neste ensaio HGL apresentou um elevado efeito tóxico com um LC50 de 9,5  $\mu$ g/ml. Os dados obtidos até o presente momento indicam que as lectinas purificadas e estudadas neste trabalho possuem um

grande potencial de utilização como ferramenta de estudo para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas respostas inflamatórias, nos eventos moleculares da inflamação, reconhecimento específico e tóxico sobre patógenos. Consequentemente, indicando também a espécie *Holothuria grisea* como fonte potencial de outras lectinas e moléculas bioativas de interesse biotecnológico.

**Palavras – chave:** Lectinas, *Holothuria grisea*, hemólise, antiinflamatório, citotoxicidade

**Purification, partial characterization and biological properties of lectins from marine invertebrate *Holothuria grisea***

**Author: Ranière da Mata Moura**

**Adviser: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada**

**ABSTRACT**

Lectins were detected in protein fractions of sea cucumber *Holothuria grisea*. Fractions obtained from precipitation with 1.0 vol acetone and supernatant of 2.0 vol. showed hemagglutinating/hemolytic activity for human erythrocytes type A. The first lectin, called HGA, was purified by acetone fractioning followed by TSK gel filtration and ion exchange on DEAE Sepharose chromatographies both on HPLC/FPLC *ÄKTA purifier* system. The second lectin, called HGL, was isolated from the supernatant fraction of acetone 2.0 vol followed by TSK gel filtration chromatography. These lectins were strongly inhibited by mucin and were not ion-dependent. Their native Mr 16.8 kDa and 228 kDa were estimated for HGL and HGA, respectively. When analyzed by SDS-PAGE showed a Mr of 15.6 kDa (HGL) and 105 kDa (HGA), no changes were observed in the presence of  $\beta$ -Mercaptoethanol. HGA was tested in classical models of nociception and inflammation. HGA was able to inhibit the neutrophils migration into the peritoneal cavity induced by carrageenan by 68% at 1mg/kg. In acetic acid-induced writhing test a significant antinociceptive effect was observed by treatment with HGA (0.1, 1 and 10mg/kg) reducing constrictions in 27%, 90% and 84% respectively. In formaline test HGA showed antinociceptive effect only in the inflammatory phase. Nevertheless, in hot-plate test HGA did not show any nociceptive effect. In rota-rod and open-field tests HGA did not alter animal's behavior. The treatment with HGA 10 mg/Kg i.v presented diminished MPO activity (81.6% inhibition) and raised the circulating levels of NO in 50.4% when compared with the group control. HGA has demonstrated the ability to modulate the inflammatory response in models *in vivo*. HGA is the first marine invertebrate lectin that showed an antiinflammatory effect. Lectin HGL was investigated as its toxicity on artemias together in a comparative way, with aqueous extracts of several marine invertebrates and a lectin with anti-tumour action of the marine sponge *C. varians*. HGL showed a high toxicity with LC50 of 9.5 mg/ml. The data obtained indicate that the lectins purified and studied in this work possess a potential use as a study tool for better understanding of the

mechanisms involved in the inflammatory responses and molecular events, specific recognition of pathogens and cytotoxicity. These data had shown the specie *Holothuria grisea* as a source of lectins and other bioactive molecules with biotechnological potential.

**Key words:** Lectins, *Holothuria grisea*, hemolysis, inflammatory, cytotoxicity

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	18
CAPÍTULO I .....	20
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	20
1. Histórico das Lectinas .....	20
2. Classificação, estrutura e função das lectinas .....	20
2.1.Lectinas Vegetais .....	21
2.1.1. Merolectinas .....	21
2.1.2. Hololectinas .....	21
2.1.3. Quimerolectinas .....	22
2.1.4. Superlectinas .....	22
2.2. Lectinas Animais.....	24
2.2.1. Descrição das famílias de lectinas animais .....	25
2.2.1.1. Tipo-C .....	25
2.2.1.1.1.Selectinas .....	27
2.2.1.1.2.Colectinas .....	27
2.2.1.2. Galectinas.....	28
2.2.1.3. Tipo-I.....	32
2.2.1.4. Tipo -P .....	33
2.2.1.5. Intelectinas.....	34
2.2.1.6. Pentraxinas .....	35
2.2.1.7. Tipo-L .....	36
2.2.1.8. Calreticulina e Calnexina .....	37
2.2.1.9. Anexinas.....	37
2.2.1.10. Tipo-H .....	38
2.2.1.11. Tipo -F .....	39
2.2.1.12. Ficolinas .....	39
2.2.1.13. Taclectinas .....	40
2.2.1.14. Tipo-M .....	40
2.2.1.15.Tipo-R .....	41
2.2.1.16. Lectinas F-box .....	42

2.2.1.17. Lectinas chitinase-like (Chilectins).....	43
2.3. O filo Echinodermata e a classe Holothuroidea .....	43
2.3.1. Lectinas de Holothurias.....	44
3. OBJETIVOS.....	48
3.1. Objetivo Geral: .....	48
3.2. Objetivos Específicos: .....	48
4. Referências .....	49
CAPÍTULO II.....	59
<i>Holothuria grisea</i> AGGLUTININ (HGA): THE FIRST INVERTEBRATE LECTIN WITH ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS.....	60
Abstract.....	60
1. INTRODUCTION .....	60
2. Material and methods.....	62
2.1. Material .....	62
2.2. Animals... ..	62
2.3. Hemagglutinating assay .....	62
2.4. Purification of <i>Holothuria grisea</i> agglutinin ( HGA) .....	63
2.5. Carbohydrate specificity .....	63
2.6. Effects of metal ions, temperature and pH on haemagglutinating activity .....	63
2.7. Sub-units determination, molecular mass estimation .....	64
2.8. Acetic acid-induced writhing test .....	64
2.9. Formalin test .....	64
2.10. Hot-plate test .....	64
2.12. Open Field test .....	65
2.13. Determination of myeloperoxidase activity .....	65
2.14. NO-assay .....	65
2.15. Neutrophil migration to peritoneal cavity induced by indirect chemotactic agent (Carrageenan-Cg). .....	66
3. Results.....	66
3.1. HGA purification .....	66
3.2. Lectin specificity.....	68

3.3. Physical and chemical analysis of the HGA .....	69
3.4. Neutrophil migration in rats induced by intraperitoneal injection of carrageenan.....	71
3.5. Acetic acid-induced writhing test .....	72
3.6. Formaline test.....	72
3.7. Hot-plate test .....	73
3.8. Rota-rod and open-field tests.....	74
3.9. NO determination .....	75
3.10. MPO activity .....	75
4. Discussion.....	76
5. References.....	78
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>83</b>
<b>TOXIC ACTIVITIES OF BRAZILIAN MARINE INVERTEBRATES AND A NEW</b>	
<b>HEMOLYTIC LECTIN FROM <i>HOLOTHURIA GRISEA</i>.....</b>	<b>83</b>
Abstract.....	84
1. Introduction.....	84
2. Material and Methods .....	85
2.1. Animal collections .....	85
2.2. Brine shrimp.....	85
2.3. Preparation of aqueous extracts .....	85
2.4. Lethality Test in Artemia.....	86
2.5. Hemagglutinating/Hemolytic assay .....	86
2.6. Purification of <i>Hotothuria grisea</i> Hemolitic lectin ( HGL) and <i>Cliona varians</i> lectin (CVL) ..	86
.....	86
2.7. Effects of metal ions and pH on HGL activity .....	87
2.8. Carbohydrate specificity .....	87
2.9. Molecular mass estimation.....	88
3. Results.....	88
3.1. Toxic effects of marine invertebrates aqueous extracts. ....	88
3.2. Purification of hemolytic lectin from <i>Holothuria grisea</i> .....	90
3.3. Molecular mass determination of the purified HGL .....	91
3.4. Effects of metal ions, pH and inhibitory saccharides on HGL activity .....	92

<b>3.5. Brine shrimp Lethality Bioassay of HGL and CVL.....</b>	<b>93</b>
<b>4. DISCUSSION .....</b>	<b>94</b>
<b>5. References .....</b>	<b>95</b>
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>100</b>
<b>Considerações finais e anexos .....</b>	<b>100</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

- ABA:** Aglutinina de *Agaricus bisporus*  
**AJ:** *Apostichopus japonicus*  
**Arg:** Arginina  
**Asn:** Asparagina  
**BanLec:** Lectina de banana  
**bsa:** albumina submandibular bovina  
**Ca:** Cálcio  
**CD\_MPR:** Receptor Manose-6-fosfato dependente de Ca<sup>2+</sup>  
**cDNA:** DNA complementar  
**CEL:** lectinas de *Cucumaria echinata*  
**CERMAV:** *Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales*  
**Cg:** carragenana  
**CH-III:** Lectina de *C. hortensis*  
**CL-43:** Colectina-43 bovina  
**CL-L1:** Colectina do fígado 1  
**CL-L2:** Colectina do fígado 2  
**CL-P1:** Colectina da placenta 1  
**CNX:** Calnexina  
**Con A:** Concanavalina A  
**ConBr:** Lectina de *Canavalia brasiliensis*  
**CRA:** aglutinina quitinase-relacionados  
**CRT:** Calreticulina  
**CvL:** lectina de *Cliona varians*  
**DAT:** Teste de aglutinação direta  
**DNA:** Ácido desoxiribonucléico  
**DRC:** Domínio de reconhecimento de carboidratos  
**EDTA:** Ácido etileno diamino tetra acético  
**EEA:** Aglutinina de *Euonymus europaeus*  
**ELISA:** Ensaio de ligação imuno enzimática  
**ERAD:** Sistema de degradação associado ao R. E.  
**ERGIC-53:** Transportador intermediário dos compartimentos do retículo endoplasmático-Golgi  
**FBS:** Proteínas F-box ligantes de carboidratos  
**FemX:** Melanôma  
**Gal:** Galactose  
**GalNac:** N-acetil-galactosamina  
**G-CSF:** Fator estimulante de colônia de granulócitos  
**Glc:** Glicose  
**GlcNac:** N-Acetil-glicosamina  
**Glu:** Glutamato  
**GNA:** Aglutinina de *Galanthus nivalis*  
**GPI:** Glicosil-fosfatidil-inositol  
**H.U./mg:** Atividade específica  
**HeLa:** Câncer cervical  
**HGA:** aglutinina de *Holothuria. Grisea*  
**HGL:** lectina hemolítica de *Holothuria grisea*  
**His:** Histidina  
**HPA:** Lectina de *Helix pomatia*  
**HSL:** lectina de *Holothuria scabra*  
**HTAB :** Brometo de hexadeciltrimetilamônio  
**HU:** Unidade de hemaglutinação  
**i.p:** Intraperitoneal  
**i.v.:** Intravenoso  
**Ig C2-set:** Região constante do anticorpo  
**Ig V-set:** Região variável do anticorpo  
**Ig:** Imunoglobulina  
**IGF-II/MPR:** Receptor de manose-6-fosfato para fator de crescimento tipo-insulina II  
**IL-6:** Interleucina 6  
**KAV:** Coeficiente de distribuição de fase  
**kDa:** QuiloDaltons  
**LC50:** 50% da dose letal  
**LFA:** *Limax flavus* aglutinina  
**LPS:** Lipopolissacarídeos  
**LysM :** Motivo lisina  
**Man:** Manose  
**MASP:** MBL associado à serina protease  
**MBL:** Lectina ligante de manana  
**Mg:** Magnésio  
**MIC:** Concentração inibitória mínima  
**Mn:** Manganês  
**MBP:** Proteína ligante de manose  
**MPO:** Mieloperoxidase  
**Mr:** Massa molecular relativa  
**NaCl:** Cloreto de sódio  
**NaOH:** Hidróxido de sódio  
**NI:** não apresentou inibição  
**NO:** Óxido nítrico  
**PAGE:** eletroforese em gel de poliacrilamida  
**PCR:** Proteína C-reativa  
**PDB:** Protein Data Bank  
**PGE2:** Prostaglandina E2  
**pH:** Potencial hidrogeniônico  
**PHA:** Lectina de *Phaseolus vulgaris*  
**PTX3:** Pentraxina 3  
**RE:** Retículo endoplasmático  
**RIP:** Proteína inativadora de ribossomo  
**RNA :** Ácido ribonucléico  
**Rpm:** Rotações por minuto  
**rRNA:** RNA ribossômico  
**SAP:** Componente amilóide P sérico  
**SDS:** Duodecilsulfato de sódio  
**SEM:** Erro padrão médio  
**Siglecs:** Lectinas da superfamília das imunoglobulinas com afinidade para ác. Siálico  
**SJL:** lectinas de *Stichopus japonicus*  
**SLL-2=**Lectina de *Sinularia lochmodes*  
**SP-A:** Proteína surfactante A  
**SP-D:** Proteína surfactante D

**SPL:** lectinas do plasma de *s. japonicus*

**S-S:** Ponte dissulfeto

**TCA:** Ácido tricloroacético

**TEMED:** N',N',N',N'-Tetrametil-1,2-diaminometano

**TNF:** fator de necrose tumoral

**TRIS:** Tris(hidroximetil)aminometano

**Trp:** Triptofano

**UH:** Unidade de hemaglutinação

**v/v:** volume/volume

**Val:** Valina

**VIP-36:** Proteína integral de membrana vesicular

**WGA:** Aglutinina do trigo

**Xil:** Xilose

## INTRODUÇÃO

Muitas das interações/comunicações celulares importantes como: reconhecimento celular, regulação imunológica, controle de qualidade e endereçamento intracelular de glicoproteínas, são desempenhadas por glicanos. Isso decorre da ampla variedade estrutural que podem ser assumidas por estas moléculas gerando um enorme potencial codificador de informações biológicas. Essas informações (glicocódigos) são interpretadas, principalmente, por um grupo de proteínas denominadas lectinas (GABIUS *et al.*, 2002).

Lectinas são proteínas amplamente encontradas na natureza (vírus, bactérias, fungos, plantas e animais) (HARTSHORN *et al.*, 2008; MANCHEÑO *et al.*, 2010; SULÁK *et al.*, 2010, DOS SANTOS *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2008) com a habilidade de reconhecer e se associar, de forma reversível, com alta afinidade e especificidade aos carboidratos (PEUMANS ; VAN DAMME, 1995; GABIUS *et al.*, 2002; LORIS, 2002). Os processos de interação aos carboidratos ocorrem por meio de pontes de hidrogênio e interações de Van der Waals, estabelecidas entre os carboidratos e os resíduos aminoacídicos do sítio de ligação da lectina (WEIS; DRICKAMER, 1996).

Devido a essa característica primordial de se ligar aos carboidratos, as lectinas desempenham várias atividades biológicas como: atividade mitogênica, citotoxicidade em células e organismo, adesão celular, interações célula-matriz, apoptose, *splincing* do RNA, metástase tumoral e aglutinação de células e bactérias (PACE; BAUM, 1997; AKAHANI *et al.*, 1997; SALES *et al.*, 2000; DANGUY *et al.*, 2002). Essas propriedades tornam as lectinas poderosas ferramentas nos processos de isolamento e caracterização de polissacarídeos e glicoconjugados, fundamentais para investigação de alterações e mudanças na estrutura de carboidratos da superfície celular em células neoplásicas, bem como em estudos imunológicos (TURNER, 2003).

Análises preliminares realizadas pelo grupo dos profs. Maurício P. Sales, Elizeu A. dos Santos (LQFP/UFRN) e Alexandre F. S. de Queiroz (LBM/UFRN) sugeriram a presença de lectinas na espécie de pepino do mar *Holothuria grisea*. Como não há relato na literatura de lectinas isoladas dessa espécie, bem como o baixo índice de publicação sobre lectinas de equinodermos, este trabalho se propôs purificar, caracterizar e analisar as propriedades biológicas de lectinas presentes na espécie *Holothuria grisea*.

As etapas envolvidas no presente trabalho serão apresentadas em capítulos. No primeiro capítulo serão realizadas revisões bibliográficas sobre as lectinas: suas estruturas e funções, o filo echinodermata e as lectinas de holotúrias. O segundo e terceiro capítulos compreendem os processos de purificação e caracterização físico-químicas das lectinas de *Holothuria grisea*. Nestes capítulos serão reportadas as análises em modelos experimentais no formato de artigos científicos. Por fim, no quarto capítulo, encontram-se as considerações finais e anexos.

## CAPÍTULO I

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 1. Histórico das Lectinas

Historicamente, as lectinas foram, a princípio, identificadas como aglutininas por S. Weir Mitchell (1860), no veneno de cobra *Crotalus durissus*, e por H. Stillmark (1888), em extratos de semente de *Ricinus communis*, quando se observou proteínas extremamente tóxicas com capacidade de aglutinar eritrócitos. Meio século após este achado, obteve-se a primeira evidência de que as proteínas envolvidas nesse processo de aglutinação interagiam com carboidratos, interação esta inferida por J.B. Sumner e S. F. Howell (1936), quando realizavam trabalhos com concanavalina A (Con A), purificada de *Canavalia ensiformis*.

O termo lectina deriva do verbo latino *legere* (selecionar, escolher, segurar), ou de seu particípio passado *lectus*, e foi proposto por W.C. Boyd (1954) na tentativa de diferenciar a atividade aglutinante mediada pela relação proteínas-carboidratos, das demais interações aglutinantes, como, por exemplo, aglutinação por anticorpos, que é resultado de uma estimulação antigênica.

Estudos sobre estruturas tridimensionais de lectinas tiveram início na década de 70 com a cristalização da Con A (HARDMAN; AINSWORTH, 1972). Após quase 20 anos, a primeira estrutura de uma lectina vegetal foi apresentada, especificamente, a da Con A co-cristalizada ao carboidrato metil-manopiranosídeo (DEREWENDA, 1989). A primeira estrutura apresentada de uma lectina animal co-cristalizada foi uma galectina em 1993 (LOBSANOV, 1993). Desde então muitas estruturas foram elucidadas na forma livre ou complexadas com seus ligantes e podem ser observadas no banco de dados do CERMAV (Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales) (<http://www.cermav.cnrs.fr/lectines>) ou através dos arquivos .PDB presentes no sítio <http://www.pdb.org>.

#### 2. Classificação, estrutura e função das lectinas

Os dois maiores, e mais estudados, grupos de lectinas compreendem as lectinas de origem vegetal e animal. Como este trabalho tem como foco lectinas de um animal marinho, uma breve

explicação sobre a classificação das lectinas de origem vegetal será realizada, seguida de uma explicação pormenorizada sobre as famílias de lectina animais, suas estruturas e funções.

## **2.1. Lectinas Vegetais**

As lectinas de plantas formam um grupo muito heterogêneo de proteínas que claramente apresentam diferenças nos aspectos bioquímicos e físico-químicos. Assim, há uma grande dificuldade na obtenção de um sistema de classificação que consiga englobar todas as lectinas de plantas.

Uma das proposições de classificação se baseia numa análise estrutural superficial dos domínios de ligação aos carboidratos e a existência de outros domínios sem atividade lectínica, objetivando relacionar lectinas de estruturas semelhantes. Foram criadas, então, subdivisões em quatro grupos principais (VAN DAMME *et al.*, 1995).

### **2.1.1. Merolectinas**

São lectinas que apresentam um único sítio de ligação aos carboidratos. Assim, as merolectinas são estruturalmente as mais simples e incapazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Um exemplo de merolectina é a Heveína uma lectina quitina-ligante encontrada no látex da seringueira *Hevea brasiliensis*.

### **2.1.2. Hololectinas**

Neste grupo, as lectinas apresentam dois ou mais sítos de ligação com especificidade para o mesmo carboidrato, ou seja, sítos homólogos. Essas lectinas apresentam a capacidade de aglutinar células e precipitar glicoconjugados. Grande parte das lectinas de Leguminosas são hololectinas e se apresentam nas formas de dímeros ou tetrâmeros.

### 2.1.3. Quimerolectinas

Constituem este grupo as lectinas que apresentam um ou dois domínios de ligação aos carboidratos, ou seja, podem se comportar estruturalmente como merolectinas ou hololectinas. Todavia, essas proteínas apresentam outro domínio com atividade distinta ao de ligação aos carboidratos. São exemplos de quimerolectinas as RIP's tipo 2, como a Lectina de feijão precatório *Albus precatórios*, a Abrina, e a lectina de Mamona *Ricinus communis*, a Ricina (VAN DAMME *et al.*, 1998).

### 2.1.4. Superlectinas

Estas lectinas apresentam dois ou mais domínios de ligação, diferenciando-se das hololectinas por possuírem sítios de ligação com especificidade para diferentes grupos de carboidratos. A representante clássica deste grupo é a Lectina isolada do bulbo de tulipas com um domínio para manose e outro para GalNAc. A lectina de Banana *Musa Paradisiaca* (BanLec) possuindo um domínio que reconhece a laminaribiose e outro que reconhece o Xil- $\beta$ -1,3-Man- $\alpha$ -O-Metil (MEAGHER *et al.*, 2005).

Outro método de classificação se baseia na especificidade de ligação aos carboidratos. Resultando, assim, na distribuição de grupos de lectinas com especificidade para; manose- manose/glicose-; manose/maltose-; Gal/GalNAc-; GlcNAc/(GlcNAc)-; fucose- e ác. Siálico-. (VAN DAMME *et al.*, 1998<sup>a</sup>; VAN DAMME *et al.*, 1998<sup>b</sup>). Esse tipo de classificação enfatiza as lectinas como ferramentas capazes de diferenciar motivos glicídicos. Todavia, essa forma de classificação acaba por agrupar lectinas que não estão relacionadas evolutivamente.

Posteriormente, um sistema de classificação mais complicado foi proposto e é baseado nas relações sorológicas e/ou semelhanças de sequência, bem como suas relações evolutivas. Com base em tais critérios, sete famílias de lectinas foram sugeridas, incluindo: lectinas de leguminosas; lectinas de monocotiledôneas manose específicas; lectinas ligantes de quitina; Lectinas RIP tipo 2 e relacionadas; lectinas jacalina e relacionadas; lectinas Amarantina e lectinas de floema *Cucurbitaceae* (VAN DAMME *et al.*, 1998<sup>b</sup>).

Van Damme e colaboradores (2008) realizaram uma atualização do sistema já que muitas lectinas novas de plantas foram isoladas e caracterizadas. Estes pesquisadores classificaram as lectinas de plantas em 12 famílias, onde, pelo menos um membro de cada família foi

caracterizado em detalhes. Essas famílias são as seguintes: ABA (aglutinina de *Agaricus bisporus*); Amarantina; CRA (aglutinina quitinase-relacionados); Cianovirina; EEA (aglutinina de *Euonymus europaeus*); GNA (aglutinina de *Galanthus nivalis*); Heveína; Jacalina; lectina de legumes; motivo lisina (LysM); Nictaba e famílias Ricina\_B.

O sistema sugerido pelo grupo do CERMAV está baseado nas estruturas 3D das lectinas. Esse sistema correlaciona as lectinas em 6 grupos; Lectinas de plantas com especificidade para  $\alpha$ -D-manose (lectinas de monocotiledôneas); aglutininas com domínio Heveína; Lectinas de plantas com  $\beta$  prisma; lectinas com  $\beta$  trifólio; homólogos de cianovirina-N e lectinas de legumes.

Jiang e colaboradores (2010) revisaram os sistemas de classificação anteriores e, baseado nas estruturas dos domínios e análises filogenéticas, sugeriram um novo sistema de classificação a partir de estudos realizados nos genoma do arroz, soja e Arabidopsis. Neste sistema, 12 famílias diferentes foram relacionadas, sendo quatro delas formadas por membros recentemente identificados. Os sistemas mais atuais discutidos acima estão presentes na fig. 1.



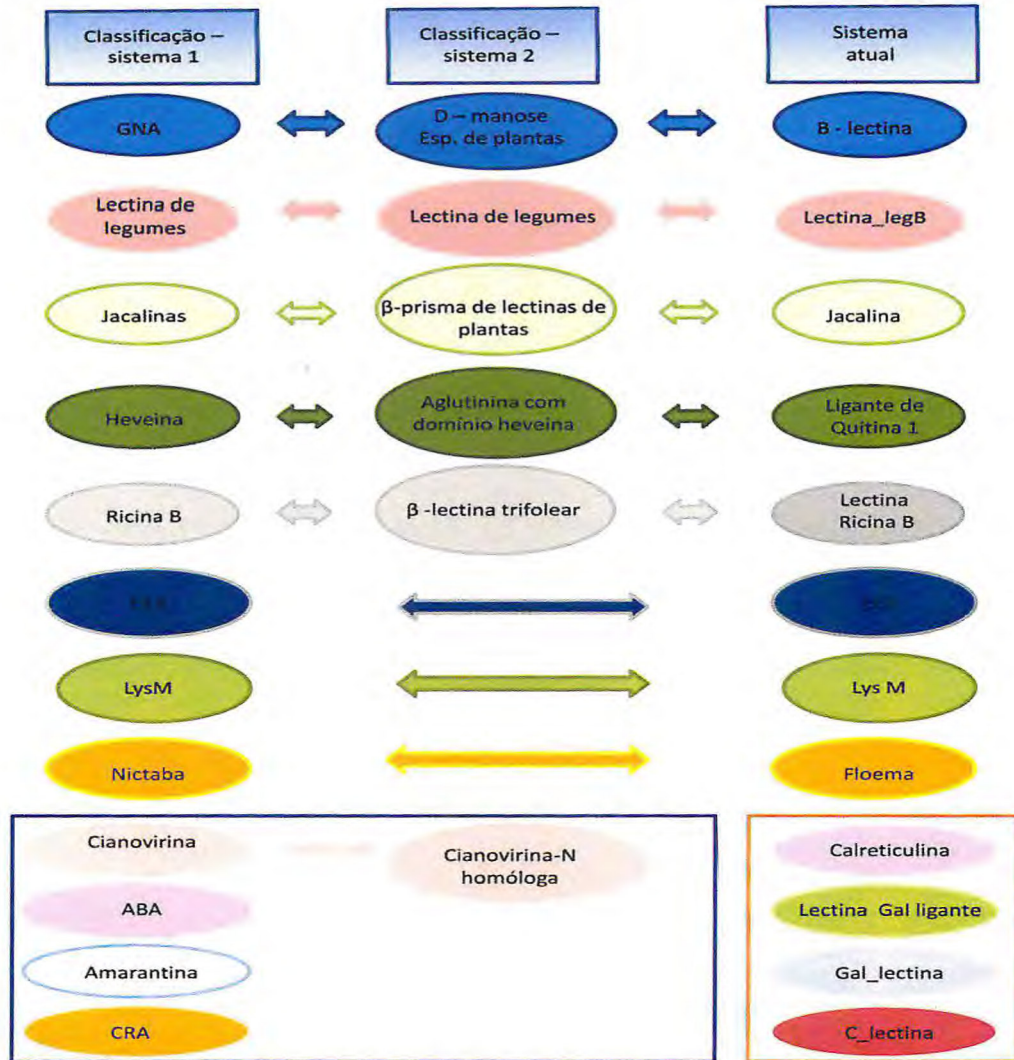


fig. I-1 Comparação dos sistemas de classificação de lectinas vegetais. O sistema 1 é baseado na descrição de Van Damme et al., 2008. O sistema 2 foi baseado em estruturas 3D de lectinas descritas no CERMAV. As famílias lectina sem membro detectados no arroz, soja e *Arabidopsis* foram indicadas pelo retângulo com linhas azul e as novas famílias de lectina identificadas no novo sistema de classificação são indicadas pelo retângulo com linhas laranja. (adaptado de Jiang *et al.*, 2010)

## 2.2. Lectinas Animais

As lectinas animais são classificadas dentro de diversos grupos e famílias, no entanto, algumas são tão singulares que não se encaixam nas famílias já estabelecidas. Mesmo dentro de uma mesma família, suas funções biológicas podem variar muito. Se definirmos as famílias de lectinas como grupos de duas ou mais proteínas com a habilidade de se ligar a carboidratos e com significativa homologia da estrutura primária, torna-se possível listar pelo menos 10 famílias de

lectinas animais (Tipo-I, Tipo-P, Tipo-L, Eglyctinas, Calreticulinas/Calnexinas, Anexinas, Discoidinas, Eel Aglutininas, Tipo-Fibrinogênio, Pentraxinas), além das galectinas e lectinas do tipo-C, que compreendem as duas maiores famílias de lectinas animais (KILPATRICK, 2002). Desde a revisão sobre as famílias de lectinas realizada por Kilpatrick, algumas famílias foram modificadas e novas famílias propostas, tais como: Tipo-M; lectinas F-box; intelectinas; Tipo-H; Tipo-F (FRENCHA *et al.*, 2007; DRICKAMER, 2006; SANCHEZ *et al.*, 2006; YOSHIDA; TANAKA, 2010).

### **2.2.1. Descrição das famílias de lectinas animais**

#### **2.2.1.1. Tipo-C**

A família de lectinas do tipo-C é composta por lectinas dependentes de Cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). As lectinas dessa família apresentam um elevado nível de conservação na estrutura dos seus domínios de reconhecimento aos carboidratos (DRC), geralmente composto por 120 resíduos aminoacídicos (DRICKAMER, 1988).

O Cálcio, presente no DRC, está diretamente envolvido no reconhecimento do carboidrato, ligando-se a uma de suas hidroxilas. Este envolvimento contribui para a manutenção da estrutura funcional da lectina, interagindo com dois resíduos de glutamato presentes no DRC (BERG *et al.*, 2002). Os DRCs das lectinas tipo-C encontram-se incorporados em variados contextos de organização molecular (Fig. 2), o que permite classificá-las em duas categorias: a) Lectinas do tipo-C solúveis (ex. colectinas), e b) lectinas do tipo-C transmembrana (ex. selectinas).



#### **2.2.1.1.1. Selectinas**

As selectinas formam uma família de glicoproteínas dependentes de cátions divalentes, que se ligam aos motivos fucosilados, especialmente sialyl-lewis X e mucinas. Essa família inclui três membros: selectina endotelial (E-selectina), selectina de leucócito (L-selectina) e selectina de plaqueta (P-selectina). Todos os membros dessa família possuem domínios extracelulares de reconhecimento aos carboidratos e do tipo fator de crescimento epidermal, possuindo ainda, um número pequeno de domínios repetidos, relacionados a proteínas regulatórias do complemento (KILPATRICK, 2002). Os membros da família das selectinas estão intimamente envolvidos no processo de adesão de leucócitos à parede do endotélio. Essa adesão é iniciada por fracas interações, que permitem o rolamento do leucócito na superfície do endotélio. Mediando esse processo inicial estão envolvidas a P-selectina e a L-selectina e depois, interações mais fortes são estabelecidas pela E-selectina, o que proporciona a diapedese dos leucócitos para o tecido linfóide e sítios inflamatórios subjacentes.

#### **2.2.1.1.2. Colectinas**

As colectinas (ou lectinas com domínio tipo colágeno) constituem uma distinta subclasse de lectinas do tipo-C. Elas são proteínas de estruturas tridimensionais únicas, agrupadas conforme sua estrutura primária, com um DRC do tipo-C combinado a um domínio do tipo colágeno, na presença de uma pequena região rica em cisteínas, na posição N-terminal. As cadeias básicas de polipeptídeos das colectinas (30-45 kDa) organizam-se em tripla hélice por enovelamento das regiões tipo colágeno (Fig. 3). Essas subunidades em tripla hélice podem se agrupar assumindo novas estruturas em forma de cruz (conglutininas) ou em formato de um “buquê de flores” (KAWASAKI, 1998).

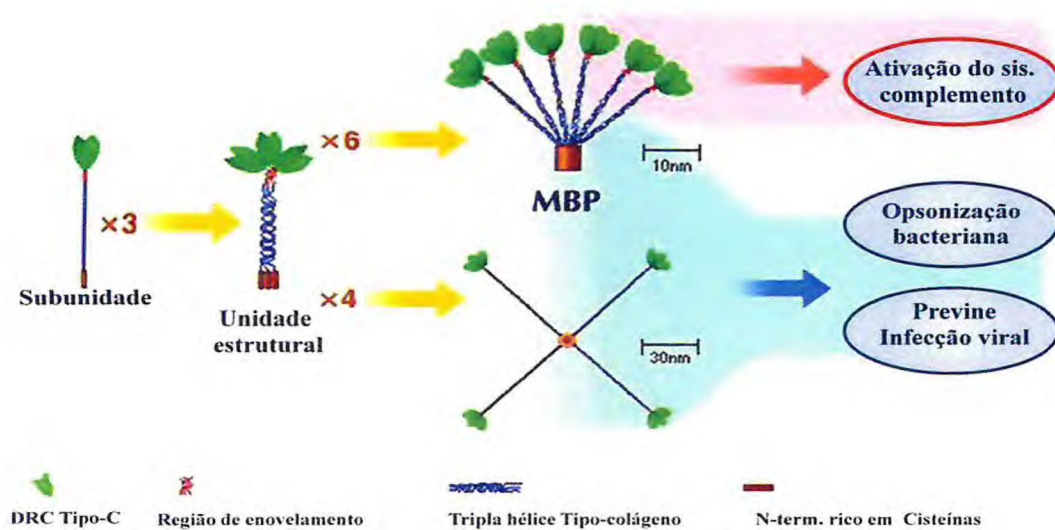


Fig. I-3 Organização molecular das colectinas. (adaptado de KAWASAKI, 1998)

As colectinas incluem três grupos de proteínas séricas: as proteínas ligantes de manose (MBP) ou lectina ligante de manana (MBL), congulinina bovina, e colectina-43 bovina (CL-43). Além disso, possuem duas proteínas pulmonares surfactantes (SP-A e SP-D). Há também um grupo de colectinas não secretadas: colectina do fígado-1 e -2 (CL-L1 e CL-L2) e a colectina de placenta (CL-P1). Os DRCs das colectinas atuam estabelecendo ligações com um íon de  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo também capazes de se ligarem a grupamentos hidroxilas 3- e 4- (extremidade não redutora) dos açúcares: N-acetil-glicosamina, manose, N-acetil-manosamina, fucose e glicose (TURNER, 2003). Isso permite às colectinas interagirem com os domínios glicídicos dispostos sobre a superfície de vírus, bactérias, fungos e protozoários.

As colectinas do tipo MBL, quando ligadas à superfície de alguns parasitas, são capazes de ativar o sistema imune, através do sistema complemento. Essa ativação é mediada pelo complexo MBL associado às proteases serínicas -1, -2 ou -3 (MASP-1, -2 ou -3). Não obstante, as MBLs podem interagir diretamente com receptores das células fagocitárias agindo como opsoninas.

#### 2.2.1.2. Galectinas

As galectinas formam uma enorme família de lectinas solúveis. Algumas formas podem sofrer alterações durante o *splicing* gerando proteínas ancoradas à membrana. Sua atividade

independe de íons metálicos, não apresentam pontes S-S e glicosilações. Possuem peso molecular entre 14-36 kDa e, geralmente, a região N-terminal apresenta-se acetilada, fosforilada, ou podendo, ainda, apresentar uma glutationa ou transglutaminase (CUMMINGS, 2004). As galectinas podem desempenhar funções no citoplasma (organização do citoesqueleto) e núcleo (transporte e *splicing* de RNA), como também, ser secretadas.

Suas funções extra- e intracelulares têm atraído a atenção dos pesquisadores, pois a ligação das galectinas aos beta-galactosídeos contidos em glicoconjugados pode participar na modulação de sinalizações celulares, como, por exemplo, a mediação do processo apoptótico, regulação do ciclo celular e metástase tumoral (fig.4) (LIU; RABINOVICH, 2005).

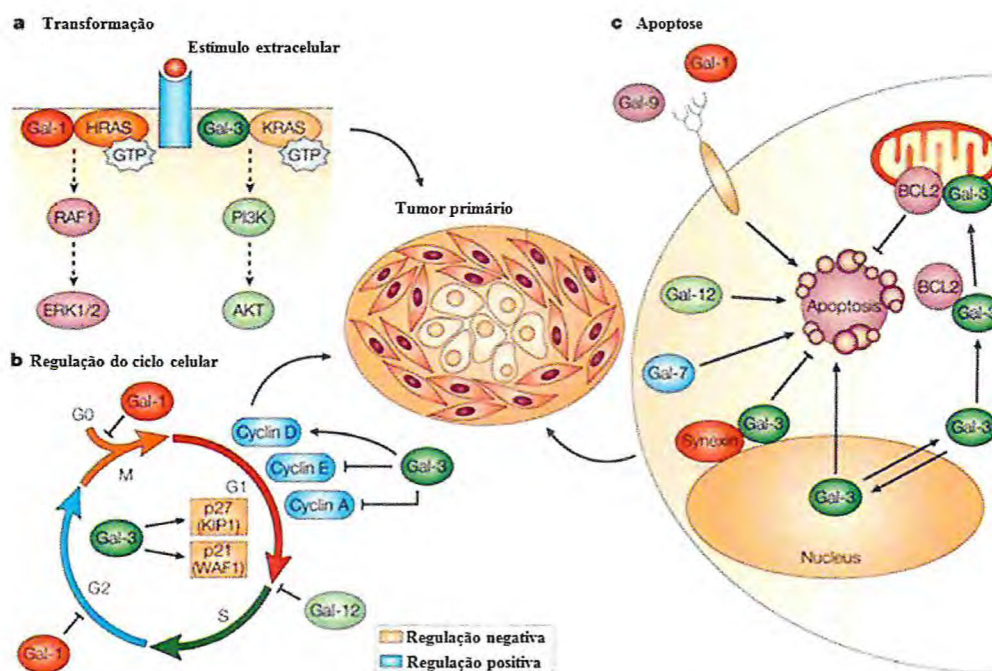


Fig. I-4 Galectinas como moduladoras celulares (LIU; RABINOVICH, 2005).

Os membros dessa família devem preencher dois critérios chave: a) possuir afinidade para galactosídeos, e b) possuir seqüências conservadas no sítio de ligação aos carboidratos (BARONDES *et al.*, 1997). A primeira representante dessa família foi descoberta em 1975 por V. Teichberg e colaboradores, quando analisavam extratos dos órgãos de enguias elétricas, responsáveis pela produção de descargas elétricas. Eles purificaram uma hemaglutinina de baixo peso molecular (14-16 kDa), cuja atividade era inibida por beta-galactosídeos.

As galectinas são amplamente distribuídas na natureza devido a uma preservação evolucionária em seus DRCs. Isso foi evidenciado não apenas por estudos de análise filogenética e também por estudos estruturais. Esses estudos evidenciaram uma forte conservação de oito resíduos aminoacídicos: His 45, Asn 47, Arg 49, Val 60, Asn 62, Trp 69, Glu 72 e Arg 74 (a numeração dos resíduos é referente à galectina-1). Esses resíduos formam o sítio de ligação ao carboidrato, especificamente, estabelecendo pontes de hidrogênio com os resíduos His 45, Asn 47, Arg 49, Asn 62, Glu 72 and Arg 74 e interações de Van der Waals com os resíduos de Val 60 e Trp 69.

Essa dependência foi confirmada por análise dos genes de galectinas e por estudos cristalográficos das proteínas, indicando que três hidroxilas presentes na lactose ou na n-acetil-lactosamina são essenciais para o reconhecimento do carboidrato, especificamente, as hidroxilas do carbono 4 e 6 da galactose, e a hidroxila do carbono 3 na N-Acetil-glicosamina ou glicose (HIRABAYASHI *et al.*, 2002).

Atualmente, 14 galectinas de mamíferos já foram identificadas e numeradas sequencialmente, de acordo com o número de entrada no *Genome Data Base*. Os Membros da família das galectinas também já foram identificados em várias outras espécies, incluindo aves, anfíbios, peixes, esponjas e fungos (AHAMED *et al.*, 1996), sendo adotado o mesmo critério de nomenclatura (numeração sequencial) para lectinas isoladas de outros organismos.

As galectinas podem ser classificadas, também, baseado na arquitetura estrutural de suas subunidades em: proto- (domínio simples), repetições em *tandem*- (dois domínios homólogos) ou tipo-quimera (um domínio de galectina com um domínio não lectínico), os quais podem ser representados pelas galectinas-1, -9 e -3, respectivamente (Fig. 5).





Em detrimento de compartilhar ínfima homologia na sequência de aminoácidos, ocorre uma convergência estrutural semelhante às folhas  $\beta$ -*sandwich* antiparalelas que foram descritas pela primeira vez na lectina Con A. Todavia, esta arquitetura não se trata de um evento de divergência de um ancestral comum, pois, como já dito anteriormente, a sequência de aminoácidos difere das lectinas de leguminosa que apresentam também permutação circular, número diferente de folhas  $\beta$ , sítios de ligação em posições não relacionadas e dependência de íons metálicos (LORIS, 2002).

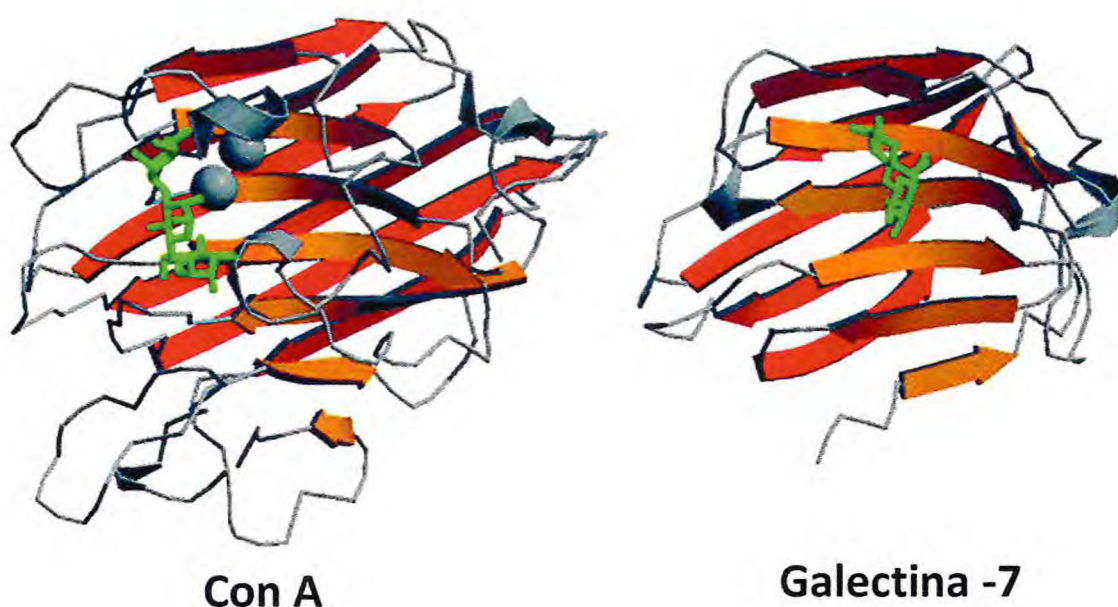


Fig. I-6 Comparação estrutural entre Con A e Galectina-7 (adaptado de LORIS, 2002)

### 2.2.1.3. Tipo-I

As lectinas do tipo-I formam um grupo de moléculas protéicas, proposto por Powell e Varki em 1995, com a capacidade de reconhecer carboidratos, pertencentes à superfamília das imunoglobulinas. Em sua maioria, as lectinas do tipo-I reconhecem especificamente o ácido siálico, monossacarídeo encontrado em abundância na superfície das células. Dentre as lectinas do tipo-I que reconhecem o ác. siálico, destacam-se as Siglecs (lectinas da superfamília de imunoglobulinas com afinidade ao ác. siálico), que formam uma subclasse distinta de lectinas do tipo-I. As Siglecs são proteínas transmembrana, com um único segmento inserido na membrana, apresentando um domínio extracelular com alto grau de homologia. Todos os membros desse

grupo apresentam, na região extracelular (N-terminal), um domínio Ig V-set (região variável do anticorpo) com um sítio de ligação para ác. siálico, seguido de um número variável de domínios Ig C2-set (região constante do anticorpo). Na sua maioria, as Siglecs possuem um motivo tipo imuno-receptor tirosina em seu domínio intracelular, sugerindo sua participação em eventos de sinalização celular (ANGATA ; BRINKMAN-VAN DER LINDEN, 2002; VARKI, 2004).

#### 2.2.1.4. Tipo -P

As lectinas do tipo-P caracterizam-se por possuírem DRCs com afinidade para manose-6-fosfato. Dois tipos de receptores intracelulares reconhecem resíduos de manose-6-fosfato em hidrolases de oligossacarídeos, direcionando-os do complexo de Golgi para os lisossomos. O primeiro, dependente de íons metálicos (CD\_MPR)<sup>1</sup>, possui um único DRC do tipo-P. O segundo (IGF-II/MPR)<sup>2</sup>, também chamado de CI-MPR, não dependente de íons metálicos, possui 15 domínios homólogos, sendo dois desses específicos para manose-6-fosfato (fig. 7) (DAHMS; HANCOCK, 2002; OLSONA *et al.*, 2010).

---

<sup>1</sup> cation-dependent mannose-6-phosphate

<sup>2</sup> insulin-like growth factor II/mannose-6-phosphate receptor

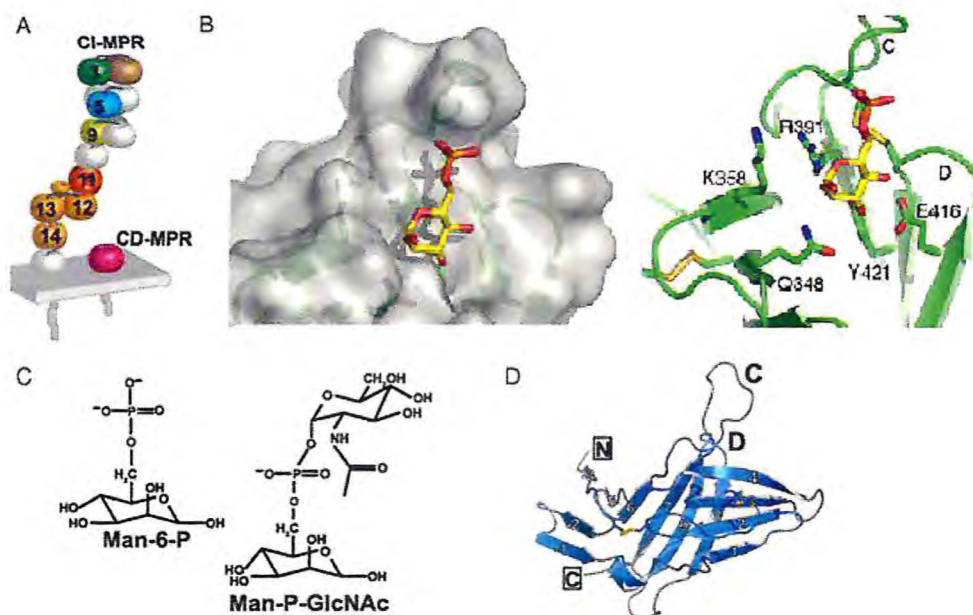


Fig. I-7 (A) representação esquemática dos receptores CI-MPR e CD-MPR. Domínios de ligação à Man-6-P (3 e 9), domínio de ligação para Man-P-GlcNAc (5) em azul (B) Domínio 3 do CI-MPR em superfície molecular e em *Ribbons* ligado à Man-6-P. (C) estrutura química da Man-6-P e Man-P-GlcNAc. (D) Representação conformacional do domínio 5 livre do ligante. Dentro da caixa N=N-terminal e C=C-terminal, fora da caixa C= loops e D sítio de ligação. (Adaptado de Olsson, 2010)

### 2.2.1.5. Intelectinas

As intelectinas, anteriormente chamadas de Eglectinas, foram isoladas e caracterizadas de grânulos corticais em ovos de anfíbios *Xenopus laevis* por Chang e colaboradores (2004). A primeira intelectina de mamíferos foi descrita 1998 por Komiya e colaboradores, detectadas em células intestinais sendo sugerida sua participação no mecanismo de defesa contra bactérias. Essas lectinas são cálcio-dependente, N-glicosiladas, apresentam domínios de fibrinogênio e especificidade para galactose. As intelectinas humanas são também conhecidas como receptores de lactoferrina e apresentam atividade imunomoduladora e antiinflamatória (SUZUKI *et al.*, 2001), além de demonstrarem um aumento na captação de glucose mediada pela insulina em adipócitos (YANG *et al.*, 2006). Outras possíveis funções são: participação na formação e fertilização dos ovos, envolvimento nos processos de adesão celular, estimulação da fagocitose, atuação como receptores, além da inibição da polispermia. Com base na estrutura conservada do sítio de ligação a carboidratos, lectinas de vários animais, desde ascídias ao homem, foram reunidas nesta família (CHANG *et al.*, 2004; VARKI, 2004).

### 2.2.1.6. Pentraxinas

Em 1930, Tillet e Francis identificaram no soro de doentes com pneumonia, proteínas com propriedade de precipitar a fração polissacarídica (fração C) do *Streptococcus pneumoniae*. Esta propriedade desaparecia rapidamente após a convalescença dos doentes e não se encontrava em indivíduos sãos. Quando se observou que essa ação era decorrente de uma proteína, foi denominada de Proteína C-Reativa (PCR). Sua alta afinidade para fosforilcolina, a princípio, ofuscou sua natureza lectínica. Todavia, esta natureza foi detectada quando se observou sua habilidade de se ligar a galactanas e galactose fosfatada (UHLENBRUCK *et al.*, 1981). O termo pentraxinas foi aplicado à PCR e ao seu homólogo, componente amilóide P sérico (SAP), como também para molécula PTX3, encontrada em células vermelhas do sangue. Essa nomenclatura remete não apenas à homologia encontrada em suas estruturas primárias, mas também às formas quaternárias dessas proteínas, que possuem cinco subunidades polipeptídicas combinadas formando um anel (Fig. 8).

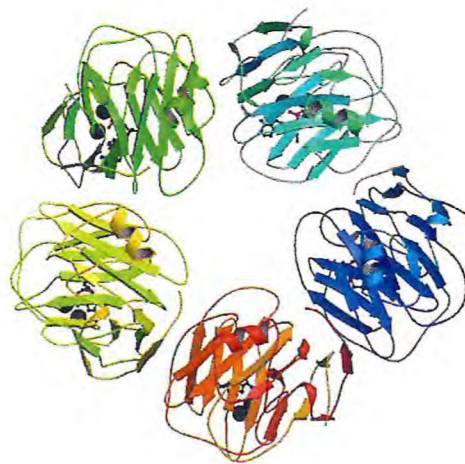


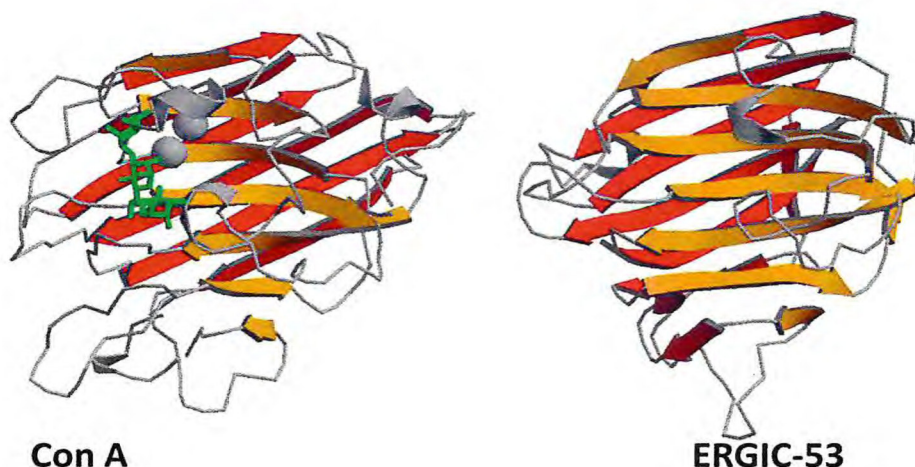
Fig. I-8 Estrutura pentamérica do componente amilóide P sérico (SAP). (PDB: 1LGN)

A família das pentraxinas é dividida em 2 grupos: as pentraxinas curtas (PCR e SAP) e longas (PTX3 e pentraxinas neuronais) e possuem um importante papel na depuração do material apoptótico e reconhecimento de patógenos (DE LA TORRE *et al.*, 2010). A PCR e SAP são geradas no fígado em resposta a estímulos da interleucina-6 (IL-6), enquanto que, PTX3 é produzida em resposta IL-6 e outros sinais inflamatórios (BOTTAZZI *et al.*, 2006). Essas

proteínas são constituintes clássicos da fase aguda, que distribuem os neutrófilos nos tecidos inflamados. Quando o pentâmero da PCR se dissocia, suas subunidades sofrem um rearranjo conformacional, resultando em um isômero com características físico-químicas únicas. Tal forma modificada aumenta a localização e a ativação dos neutrófilos encontrados no sítio inflamatório, atuando em conjunto com a via clássica do sistema complemento na depuração das células apoptóticas (ESPARZA; DÍAZ, 2002).

#### **2.2.1.7. Tipo-L**

As lectinas do tipo-L, ERGIC-53 e VIP-36, estão envolvidas na seleção de proteínas nos compartimentos celulares. Tanto a ERGIC-53 como a VIP-36 são proteínas transmembrana do tipo I, voltadas para o lúmen (L). A ERGIC-53 é encontrada nos compartimentos intermediários entre o retículo endoplasmático (RE) e o complexo de Golgi e a VIP-36 encontrada em vesículas secretoras pós-Golgi, e possuem um único domínio solúvel de lectina. Este padrão também é encontrado em abundância em lectinas de sementes de leguminosas (SHARON; LIS, 1990). As lectinas tipo-L de plantas são proteínas solúveis que são secretadas, sendo encontradas em elevados níveis em tecidos especializados. Essas diferenças refletem o fato de que, embora semelhantes, devido o DRC tipo-L, essas proteínas desempenham funções distintas em plantas e animais (fig. 9). Todavia, seus DRCs, aparentemente, mantiveram o mecanismo de ligação aos carboidratos. Ou seja, alguns resíduos-chave na formação tridimensional do DRC encontram-se conservados em todas as lectinas do tipo-L de animais e plantas (DODD; DRICKAMER, 2001; STOYLOFF; IVANOV, 2004).



**Fig. I-9** Comparação estrutural da ConA e ERGIC-53

#### **2.2.1.8. Calreticulina e Calnexina**

A Calreticulina (CRT) e a Calnexina (CNX) são lectinas encontradas no RE com afinidade para o oligossacarídeo  $\text{Glc}_1\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ . Ambas fazem parte da família de chaperonas do RE, envolvidas na síntese de novos peptídeos. Não obstante, atuam no armazenamento de  $\text{Ca}^{2+}$  no RE, como também podem atuar fora do RE, como receptores de exportação nuclear (HOLASKA *et al.*, 2001). Suas ações como chaperonas dependem da localização dos glicanos N-ligados da cadeia polipeptídica nascente. A CNX, uma proteína transmembrana do tipo I, interage com os glicanos compreendidos dentro dos primeiros 50 resíduos aminoácidos da sua porção N-terminal. Já a CRT encontra-se solúvel no lúmen do RE, interagindo com glicosilações distantes da região N-terminal. Dessa maneira, essas proteínas previnem o enovelamento prematuro da proteína entre resíduos aminoácidos adjacentes, bem como retendo proteínas não enoveladas ou enoveladas incorretamente no RE (LODISH *et al.*, 2000; DRICKAMER, 2006).

#### **2.2.1.9. Anexinas**

As Anexinas compreendem uma família de proteínas com a capacidade de se ligar ao  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfolipídios (MONASTYRSKAYAA, *et al.* 2007). Elas apresentam pesos moleculares variando entre 30 a 40 kDa (exceto a anexina VI que possui 66 kDa). Mais de 50 membros já foram detectados em eucariotos (plantas e animais), tendo como exceção os fungos

(MONASTYRSKAYAA *et al.*, 2007). A região N-terminal apresenta uma grande diversidade em sua sequência e comprimento, variando entre 11 a 196 resíduos. Contudo, a região C-terminal apresenta elevada conservação estrutural, constituída de quatro domínios em  $\alpha$ -hélice com 70 resíduos aminoacídicos com alto grau de conservação (exceto a anexina VI que possui oito domínios). O sítio de ligação para o  $\text{Ca}^{2+}$  e os fosfolipídios encontra-se na região C-terminal (GERKE; MOSS, 2002).

A primeira evidência de atividade lectínica foi observada na anexina IV, que apresenta um motivo de ligação para sialoglicoproteínas e glicosaminoglicanos (KOJIMA *et al.*, 1996). Depois foi demonstrado que a anexina V e VI, e algumas outras anexinas, exibiam atividades lectínicas similares. Ensaio *in vitro* sugeriram que a anexina IV estaria envolvida na formação de vesículas (secretoras) devido a sua interação com glicoproteínas e proteoglicanos ancorados. Outra sugestão é que essa família de proteínas participaria como sensores dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Sua interação com lipídios de membranas e a capacidade de modificá-las confeririam às células um impressionante repertório de controle dos níveis flutuantes de  $\text{Ca}^{2+}$  (MONASTYRSKAYAA, *et al.*2007).

### 2.2.1.10. Tipo-H

Em 2006, Sanchez e colaboradores, quando realizavam estudos estruturais em uma lectina de *Helix pomatia*, propuseram a criação de uma superfamília de lectinas denominada lectinas do tipo -H. baseado na homologia de estrutural entre várias lectinas (dentre elas as discoidinas) como pode ser observado abaixo.

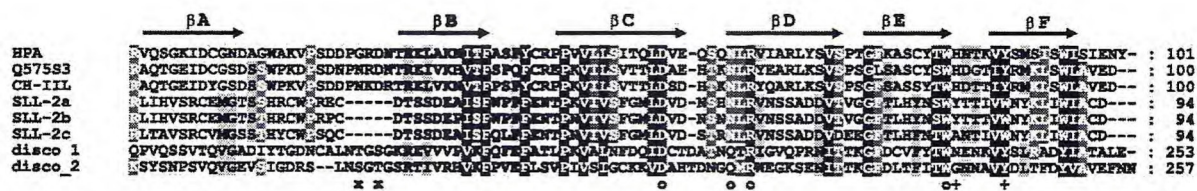


Fig. I-10 Alinhamento das sequências de: HPA= *H. pomatia*; CH-IIL=*C. hortensis*; SLL-2= *S. lochmodes* e discoidinas de *D. discoideum*.

As Discoidinas foram isoladas do muco celular de *Dictyostelium discoideum*, e apresentaram afinidade para oligossacarídeos com resíduos de galactose. Duas espécies de

discoidinas: discoidina I e II são potentes hemaglutininas com composição aminoacídica similar, e com subunidades de *Mr* variando entre 26-35,5 kDa e 24-27 kDa para a discoidina I e II, respectivamente. Essas duas lectinas possuem homologia em estrutura terciária; contudo, suas afinidades para carboidratos são distintas. Embora sua função fisiológica ainda não seja totalmente esclarecida, há indicações de sua participação nos processos de adesão celular e adesão a substratos (BERGER; ARMANT, 1982; CURAT; VOGEL, 2002).

#### **2.2.1.11. Tipo -F**

Lectinas do tipo-F são proteínas fucose específicas que compartilham uma sequência característica. Os domínios do tipo-F são encontrados em proteínas de uma ampla variedade de organismos, desde bactérias (transferência horizontal) aos vertebrados. Contudo, sua distribuição desigual entre grupos filogenéticos distintos, sugere que os genes do tipo-F têm sido seletivamente perdidos, mesmo entre linhagens estreitamente relacionadas, tornando difícil rastrear a ascendência do domínio tipo-F (DRICKAMER, 2006).

Descacam-se nessa família as fucolectinas. Este grupo de proteínas vem sendo muito utilizadas como ferramentas em estudos hematológicos e glicobiológicos devido sua especificidade para fucose (KONAMI *et al.*, 1991; BIANCHET *et al.*, 2002). Honda e colaboradores (2000) determinaram a estrutura primária de fucolectinas de enguia elétrica, observando serem compostas de quatro subunidades. Isso indicou a ausência de similaridade com outras fucolectinas, sugerindo uma multiplicidade de domínios lectínicos para fucose entre os membros dessa família. A presença dessas proteínas em vários animais indica sua participação nos processos de defesa contra a invasão de parasitos (HONDA *et al.*, 2000; BIANCHET *et al.*, 2002).

#### **2.2.1.12. Ficolinas**

As Ficolinas formam um grupo de proteínas que apresentam domínios do tipo- colágeno e do tipo-fibrinogênio, com especificidade para N-Acetil-glicosamina, e são encontradas em vertebrados e invertebrados (MATSUSHITA *et al.*, 1996). O domínio tipo-fibrinogênio é



responsável pela atividade lectínica. Em humanos são encontradas duas ficolinas séricas: L-ficolina e H-ficolina. A primeira é uma proteína multimérica, com subunidades de 35 kDa, com a habilidade de se ligar a oligossacarídeos da superfície de patógenos, agindo como uma opsonina. Podendo ainda, ligar-se à elastina e a corticosteróides. A H-ficolina apresenta-se em forma oligomérica, com subunidades de 34 kDa ligadas por pontes dissulfeto, e participa da ativação do sistema complemento (MATSUSHITA *et al.*, 2002).

#### 2.2.1.13. Tactectinas

As Tactectinas foram identificadas por Kawabata e Iwanaga (1999) na hemolinfa do artrópode *Tachypleus tridentatus*. Cinco lectinas foram encontradas, recebendo o nome supracitado e um número sequencial para identificá-las. A tactectina-5, única com domínio do tipo-fibrinogênio, apresenta forte atividade aglutinante de bactérias exibindo especificidade a substâncias possuidoras de grupamentos acetilados, incluindo não carboidratos. Em sua região N-terminal há um pequeno segmento de cisteínas, e em sua região C-terminal encontra-se o domínio do tipo-fibrinogênio, que possui homologia de 51% com as ficolinas de mamíferos (KAWABATA, 2000). Diferentemente das outras tactectinas encontradas no hemócito, a tactectina-5A e seu homólogo tactectina-5B são encontradas no plasma do artrópode. Ambas apresentam dependência de íons  $Ca^{2+}$  e possuem uma forte atividade aglutinante de bactérias e eritrócitos, agindo como um potente fator protéico de defesa, tanto no reconhecimento do patógeno, e também participando da coagulação (KAIRIES *et al.*, 2001).

#### 2.2.1.14. Tipo-M

As lectinas tipo-M são membros do grupo estrutural das proteínas da família glicosil hidrolase 47. Estas proteínas estão intimamente relacionadas com as  $\alpha$ -mannosidases do R.E. e cis-Golgi e sua função está associada ao controle de qualidade e degradação de glicoproteínas N-glicosiladas no R.E. As lectinas do tipo M são proteínas transmembrana tipo II, com uma cauda citoplasmática muito curta (em alguns casos ausentes). Em comum com os domínios de ligação de outra família glicosil hidrolase 47 proteínas, tais como mannosidase ER humanos, o DRC do Tipo-M é uma estrutura de barril com duas hélices alfa e beta-folhas (MAST *et al.*, 2005; HIRAO *et al.*, 2006, DRICKAMER, 2006).



### 2.2.1.16. Lectinas F-box

Quando as proteínas são incorretamente enoveladas e perdem seus estados funcionais, são degradadas pelo sistema de degradação associado ao R. E. (ERAD). Este sistema envolve a transferência retrógrada de proteínas do RE para o citosol com uma subsequente degradação mediada pela ubiquitina e proteassomo (ELLGAARD, 1999). A família de proteínas F-box é a maior superfamília de proteínas conhecidas, o número total de membros que vão desde aproximadamente 20 em leveduras até centenas em eucariotos superiores (LANNOO *et al.*, 2008). Análises bioquímica e estrutural demonstraram que dentro dessa superfamília há um subfamília com capacidade de reconhecer motivos glicídicos, as FBS (Sugar-binding F-Box proteins). Essa subfamília reconhece especificamente N-glicanos presentes em glicoproteínas, desempenhando um papel fundamental na homeostase de glicoproteína (MIZUSHIMA *et al.*, 2004).

Recentemente, foi proposto o mecanismo de seleção de glicoproteínas pelas lectinas F-box demonstrando sua seletividade por proteínas com falhas no enovelamento (YOSHIDA; TANAKA, 2010). A quitobiase, um N-glicano presente em glicoproteínas, é protegida pelos resíduos dos aminoácidos adjacentes ao sítio de glicosilação nas proteínas com sua conformação nativa. Dessa forma as FBS sofrem impedimento estérico, como pode ser observado na figura 12. No caso da perda de sua estrutura nativa, ocorre uma exposição favorável do glicano permitindo o reconhecimento pelas FBS.

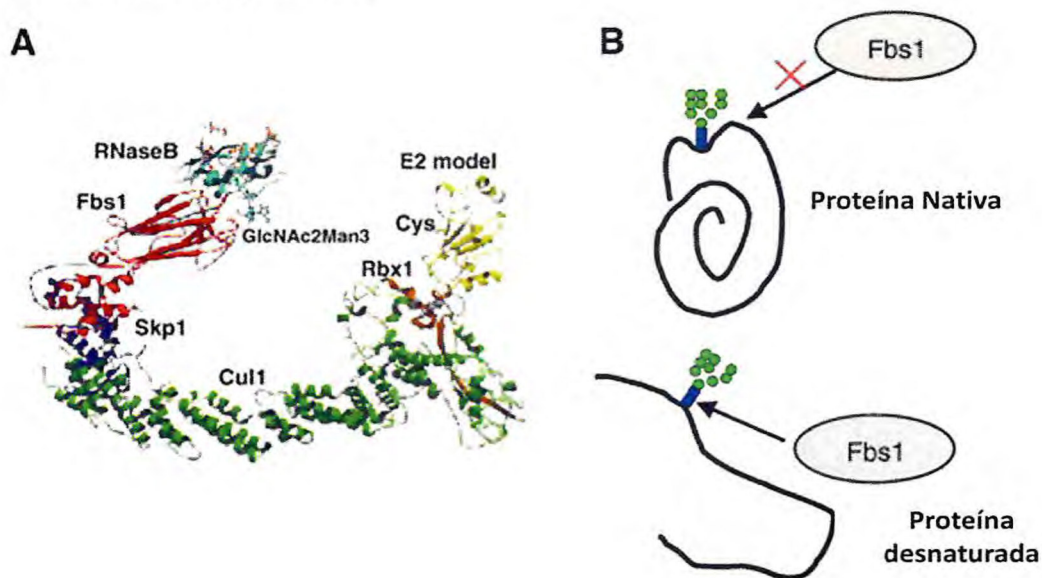


Fig. I-12 Estrutura e mecanismo de seleção das lectinas F-box (adaptado de YOSHIDA; TANAKA, 2010)

### 2.2.1.17. Lectinas chitinase-like (Chilectins)

As lectinas chitinase-like são proteínas animais que fazem parte da família das glicosil hidrolases 18. Essa é uma família de proteínas solúveis, intracelulares ou secretadas, que possuem a estrutura de barril-TIM (triose fosfato isomerase) (DRICKAMER, 2006). Apesar dos mamíferos e outros vertebrados superiores não possuírem uma maquinaria bioquímica para sintetizar a quitina, vários genes com atividade quitinásica são expressos. Alguns desses genes expressam proteínas que perderam sua atividade catalítica por mutações no sítio ativo, continuam a apresentar a capacidade de se ligar à quitina e outros polisacarídeos (MORROLL *et al.*, 2008). As atividades biológicas desse grupo ainda não estão bem esclarecidas, mas é proposto que essas proteínas participem de vários processos biológicos, como: indução de proliferação celular, inibição da apoptose, modulação do endotélio vascular umbilical, supressão da síntese de ácido Hialurônico, dentre outras (JOHANSEN, 2006).

Atualmente, ainda há muitas proteínas que reconhecem e se ligam aos carboidratos que não se encontram agrupadas dentro das várias famílias de lectinas já estabelecidas, por não possuírem homologia em suas sequências, por exemplo: interleucinas, citocinas, dentre outras. Futuros conhecimentos acerca de suas estruturas e propriedades bioquímicas, possivelmente, levarão essas lectinas “órfãs” a se encaixarem em famílias preestabelecidas, ou formarão novas famílias de lectinas (KILPATRICK, 2002; VARKI, 2004).

## 3. O filo Echinodermata e a classe Holothuroidea

O filo Echinodermata, atualmente, compreende cerca de 7.000 espécies, e 13.000 espécies em registros fósseis. Este filo é distribuído em cinco classes: Crinoidea (lírios-do-mar), Asteroidea (estrelas-do-mar e ofiúros), Ophiuroidea (serpentes-do-mar), Echinoidea (ouriços-do-mar e bolachas-da-praia) e Holothuroidea (pepinos-do-mar) (BRUSCA; BRUSCA, 2007). Este grupo de animais pode ser brevemente definido como possuidor de um esqueleto de carbonato de cálcio, na forma de calcita, um sistema vascular único que medeia a alimentação, locomoção e outras funções e uma simetria radial, mais ou menos evidente em cinco partes. Das 7.000 espécies dos Echinodermatas cerca de 1.400 pertencem à classe Holothuroidea (PAWSON,

2007). As holotúrias são amplamente distribuídas nos oceanos e são encontradas desde a região entremarés até o fundo das planícies abissais, apresentando ampla variação morfológica, e ainda são os equinodermos menos estudados. (KERR; KIM, 1999).

Por características, as holotúrias possuem uma pele coriácea, um corpo muito alongado no eixo oral / aboral, apresentando simetria bilateral, com musculatura circular e cinco faixas longitudinais e o esqueleto calcário se reduz a ossículos microscópicos individuais (BARNES *et al.*, 1995). Eles são conhecidos como pepinos do mar e, frequentemente, utilizados na alimentação e medicina popular pelos asiáticos no tratamento da artrite, lesões de tendões e articulações, dores, inflamações musculares e hipertensão (LOVATELLI *et al.*, 2004).

### 3.1. Lectinas de Holothurias

Dentre as poucas espécies de holotúrias analisadas quanto à presença de lectinas, sem dúvida, a espécie *Cucumaria echinata* é a mais estudada. Os estudos sobre suas lectinas tiveram início em 1994 pelo grupo do prof. Hatakeyama. Nesse ano, foram purificadas 4 lectinas dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Tipo-C) a partir de uma coluna de afinidade à lactose (HATAKEYAMA *et al.*, 1994). As lectinas denominadas CEL-I, CEL-II, CEL-III e CEL-IV apresentaram afinidades a carboidratos distintos e massas estimadas por SDS-PAGE em condições redutoras de: 27, 35, 45 e 68 kDa, respectivamente. Sendo que, a CEL-III apresenta atividade hemolítica. Foi precogitado pelos autores que a especificidade para diferentes açúcares estaria associada ao reconhecimento de diferentes ligantes *in vivo* e que a atividade hemolítica de CEL-III estaria dividida em 2 passos: o reconhecimento de galactosil-derivados na superfície da membrana seguido da formação de poros íons permeáveis. Assim, seguiram-se várias análises ao longo de mais de duas décadas, desde a elucidação da estrutura primária à tridimensional, quando se tornou possível inferir os mecanismos envolvidos na ação dessa lectina. A CEL-III apresenta uma estrutura primária com homologia às lectinas do Tipo-R, adotando a estrutura tridimensional com 2 domínios  $\beta$ -trifoliales (1 e 2) e um domínio rico em folhas  $\beta$ , onde há um região hidrofóbica que contém duas hélices (NAKANO *et al.*, 1999; UCHIDA *et al.*, 2004). Dados demonstraram que a região hidrofóbica do domínio 3 é responsável pela oligomerização de 6 proteínas, formando assim, um complexo formador de poro na membrana celular (UCHIDA *et al.*, 2004) e,

ainda, peptídios gerados a partir dessa região apresentaram atividade antibacteriana (HATAKEYAMA *et al.*, 2004) como pode ser observado na figura 13.

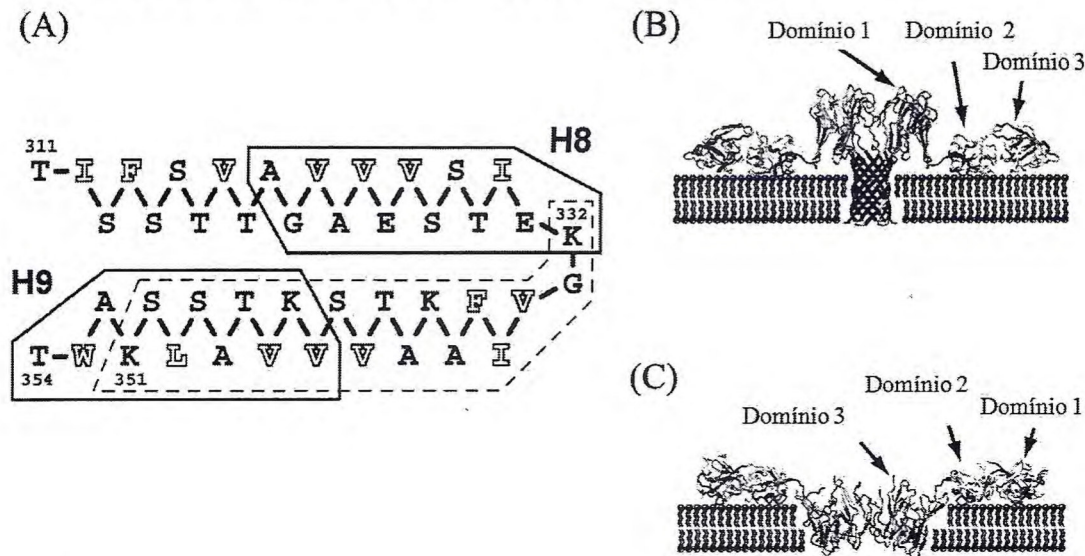


Fig. I-13 Modelos de oligomerização e formação de poros da CEL-III. (A) Modelo hipotético de 2 folhas  $\beta$  antiparalelas, sob certas circunstâncias, assumem conformação de  $\alpha$ -hélices. As linhas sólidas reúnem os domínios H8 e H9, a linha pontilhada os peptídeos com atividade antibacteriana. (B) modelo onde os domínios H8 e H9 assumem a conformação de barril  $\beta$ . (C) modelo onde os domínios H8 e H9 assumem conformação de  $\alpha$ -hélices. (Adaptado de UCHIDA *et al.*, 2004)

Por apresentar essas características peculiares, CEL-III foi investigada, também, acerca de sua ação sobre células leucêmicas e seus efeitos no desenvolvimento de protozoários causadores da malária em mosquitos vetores transgênicos, apresentando resultados promissores nos dois casos (SALLAY *et al.*, 2000; YOSHIDA *et al.*, 2007). A outra lectina dessa espécie que foi investigada contra células tumorais foi a CEL-I, que apresentou uma potente atividade tóxica contra várias linhagens, sendo mais eficaz que várias lectinas de vegetais como: WGA, PHA e Con A (KURAMOTO *et al.*, 2005).

Na espécie *Stichopus japonicus*, duas lectinas, SPL-I (400 kDa) e SPL-II (60 kDa), dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , foram purificadas (MATSUI *et al.*, 1994). Estas proteínas estão presentes, na forma solúvel, no plasma do animal, e suas sequências N-terminais indicam pertencerem à família de lectinas do Tipo-C (MATSUI, *et al.* 1994;). Ato contínuo, foi sugerido pelos autores que estas proteínas estavam envolvidas nos mecanismos de defesa deste animal. As lectinas atuam na formação de coágulos pela agregação de celomócitos por uma via independente dos

domínios de ligação aos carboidratos. Nessa mesma espécie, Hatakeyama e colaboradores (1993) purificaram outras 2 lectinas, denominadas SJL-I (13kDa) e SJL-II (15 kDa). Como estas proteínas foram extraídas na presença de Triton X-100, há uma forte indicação de que essas proteínas estejam, em seu estado funcional, ancoradas às membranas. SJL-I possui sua estrutura primária resolvida, apresentando domínios de lectinas do Tipo-C (HIMESHIMA *et al.*, 1994).

Em 2007 uma lectina foi isolada do líquido celomático da espécie *Apostichopus japonicus* (BULGAKOV *et al.*,2007). Esta lectina, denominada MBL-AJ, apresentou afinidade para manana e o motivo EPN (Glu-Pro-Asp) conservado em todas as lectinas do Tipo-C MBL. Em seu estado nativo, essa lectina apresentou estados de oligomerização em dímeros e tetrâmeros com 34 e 68 kDa, respectivamente. Seu monômero possui 159 AA (17 kDa) com uma identidade de sequência de 65% e similaridade de 79% com a CEL-IV (BULGAKOV *et al.*,2007).

Na espécie *Cucumaria japonicus* uma lectina de 44 kDa foi isolada do líquido celomático e apresentou características semelhantes às apresentadas pela MBL-AJ, tais como: afinidade para mananas, não inibição por açúcares simples, dependência de íons metálicos e composição aminoacídica indicando pertencer à subfamília das MBLs (BULGAKOV *et al.*, 2000).

No líquido celomático da espécie *Holothuria scabra* foi purificada uma lectina (HSL) que teve sua expressão induzida pelo desafio desses animais por cepas bacterianas. A lectina apresentou um monômero de 182 kDa por SDS-PAGE e 190 kDa por filtração em gel. Esta proteína não apresentou dependência de íons metálicos e não teve sua atividade afetada pela variação de pH na faixa de 2-11. Sua sequência primária indicou homologia às lectinas da espécie *Cucumaria echinata* e afinidade para o antígeno -T (GOWDA *et al.*,2008<sup>a</sup>). Esta lectina foi capaz de inibir o crescimento da linhagem de adenocarcinoma de pulmão A549 na concentração de 20µg/ml (MOJICA; MERCA, 2010), e apresentou uma potente atividade antibiótica de amplo espectro contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas em concentrações de 5µg/ml (GOWDA *et al.*,2008<sup>b</sup>)

Na espécie *Holothuria atra* uma lectina foi isolada com a capacidade de inibir o crescimento da linhagem de adenocarcinoma de pulmão A549 na concentração de 50µg/ml

(MOJICA; MERCA, 2010). Essa lectina demonstrou ser capaz de aglutinar eritrócitos de vários animais, contudo, não foi possível determinar a especificidade desta proteína. Esta lectina apresentou sua massa estimada em 335 kDa, por filtração em gel, dependência de  $\text{Ca}^{2+}$  e presença de glicosilações (MOJICA; MERCA, 2006).



## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo Geral:

Detectar, purificar e avaliar as propriedades biológicas de proteínas com atividade lectínica presentes em extratos aquosos do Echinodermata *Holothuria grisea*.

### 4.2. Objetivos Específicos:

Desenvolver um protocolo de purificação da(s) lectina(s) presentes no extrato aquoso de *Holothuria grisea*.

Caracterizar a(s) proteína(s) isolada(s) por técnicas bioquímicas. Estimando sua massa molecular, dependência de íons metálicos, efeito do pH sobre sua atividade, estabilidade térmica e especificidade por ligantes glicídicos.

Realizar ensaios biológicos, para avaliar a possível aplicação das lectinas como ferramenta de modulação do processo inflamatório e toxicidade sobre células e organismo.

## 5. Referências

1. AHMED, H.; POHL, J.; FINK, N. E.; STROBELI, F. E VASTA, G. R. The Primary Structure and Carbohydrate Specificity of a b-Galactosyl-binding Lectin from Toad (*Bufo arenarum* Hensel) Ovary Reveal Closer Similarities to the Mammalian Galectin-1 than to the Galectin from the Clawed Frog *Xenopus laevis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, (51) p. 33083–33094, 1996.
2. AKAHANI, S.; INOHARA, H.; NANGIA-MAKKER, P. E.; RAZ, A. Galectin-3 in Tumor Metastasis **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v.9 (45), p.69–77, 1997.
3. ANGATA, T. ; BRINKMAN-VAN DER LINDEN, E. C. M. I-type lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572 (2-3) p. 294-316, 2002.
4. BARNES, R. S. K.; CALOW, P., OLIVE, P. J. W.; GOLDING, D. W. The **Invertebrates: A New Synthesis**, 186-188, 1995.
5. BARONDES, S. H. Galectins A personal overview. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 9 (45) p.1–7, 1997.
6. BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. New York:W. H. Freeman and co, 2002.
7. BERGER, E.A.; ARMANT, D.R. Discoidins I and II Common and unique regions on two lectins implicated in cell-cell cohesion in *Dictyostelium discoideum*. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v.79 p. 2162-2166, 1982.
8. BIANCHET, M.A.; ODOM, E.W.; VASTA, G.R.; AMZEL, L.M. A novel fucose recognition fold involved in innate immunity. **Nature Structural Biology** 9, 628 - 634 (2002)
9. BOTTAZZI,B.; GARLANDA,C.; SALVATORI,G.; JEANNIN, P.; MANFREDI, A.; MANTOVANI,A. Pentraxins as a key component of innate immunity **Current Opinion in Immunology** Volume 18, Issue 1, February 2006, Pages 10-15
10. BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. 2007. **Invertebrados**. 2ª ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.

11. BULGAKOV, A.A.; NAZARENKO, E.L.; PETROVA, I.Y.; ELISEIKINA, M.G.; VAKHRUSHEVA, N.M.; ZUBKOV, V.A. Isolation and properties of a mannan-binding lectin from the coelomic fluid of the holothurian *Cucumaria japonica*. **Biochemistry** (Mosc). 2000 Aug;65(8):933-9
12. Bulgakov, A. A.; Eliseikina, M.G.; Petrova, I.Y.; Nazarenko, E.L.; Kovalchuk, S.N.; KOZHEMYAKO, V.B.; RASSKAZOV, V.A. Molecular and biological characterization of a mannan-binding lectin from the holothurian *Apostichopus japonicus*. **Glycobiology**. 2007 Dec;17(12):1284-98.
13. CHANG, B. Y.; PEAVY, T. R.; WARDRIP N. J. E HEDRICK, J. L. The *Xenopus laevis* cortical granule lectin cDNA cloning, developmental expression, and identification of the eglectin family of lectins **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 137 p. 115-129, 2004.
14. CUMMINGS, R. D.; LIU, FU-TONG **ESSENTIALS OF GLYCOBIOLOGY** "GALECTINS" LECTURE 21, 2004 <http://grtc.ucsd.edu/lecture21.pdf>
15. CURAT, C. A.; VOGEL, W. F. Discoidin Domain Receptor 1 Controls Growth and Adhesion of Mesangial Cells **J. Am. Soc. Nephrol.**, v.13 p. 2648–2656, 2002.
16. DAHMS, N. M.; HANCOCK, M. K. P-type lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, (2-3) p. 317-340, 2002.
17. DANGUY, A.; CAMBY, I.; KISS, R. Galectins and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1572 (2-3) p. 285-293, 2002.
18. DE LA TORRE, Y.M.; FABBRI, M.; JAILLON, S.; BASTONE, A.; NEBULONI, M.; VECCHI, A. MANTOVANI, A.; GARLANDA, C. Evolution of the Pentraxin Family: The New Entry PTX4. **Journal of Immunology**, 2010, 184, 5055 -5064
19. DEREWENDA, Z.; YARIV, J.; HELLIWELL, J.R.; KALB A.J.; DODSON, E.J.; PAPIZ, M.Z.; WAN, T. E CAMPBELL, J. The structure of the saccharide-binding site of concanavalin. **A. EMBO J.**, v. 8 p. 2189–2193, 1989
20. DODD, R. B.; DRICKAMER, K. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. **Glycobiology**, v. 11 (5) p. 71-79, 2001.
21. DOS SANTOS, A.F.; CAVADA, B.S.; DA ROCHA, B.A.; DO NASCIMENTO, K.S.; SANT'ANA, A.E. Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. **Bioresour Technol.** 2010 Jan;101(2):794-8.

22. DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins **J. Biol. Chem.**, v. 263 p. 9557-9560, 1988.
23. DRICKAMER, K.; WEIS, W. I. Structural basis of recognition lectin-carbohydrate **Annu. Rev. Biochem.**, v.65 p. 441-473, 1996.
24. DRICKAMER, K. A genomics resource for animal lectins 2006 <http://www.imperial.ac.uk/research/animalleclectins/default.html> Acesso em : 12/10/2010
25. ELLGAARD, L.; MOLINARI, M.; HELENIUS, A. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. **Science** 286, 1882–1888 1999.
26. ESPARZA, R. H.; DÍAZ, E. A. Autoinmunidad y Apoptosis-El lupus a un siglo de la propuesta de Erlich. **Rev. Mex. Reumat.**, v. 17 (3) p. 173-179, 2002.
27. FRENCHA, A. T.; BETHUNEA, J.A.; KNIGHTA, P. A.; MCNEILLYB, T. N.; WATTEGEDER. A.B.; RHINDA, S.; MILLERA, H. R.P.; PEMBERTONA, A. D. The expression of intelectin in sheep goblet cells and upregulation by interleukin-4 **Veterinary Immunology and Immunopathology** Volume 120, Issues 1-2, 15 November 2007, Pages 41-46
28. FUJIMOTO, Z.; KUNO, A.; KANEKO, S.; YOSHIDA, S.; KOBAYASHI, H.; KUSAKABE, I.; MIZUNO, H. Crystal structure of Streptomyces olivaceoviridis E-86 b-xylanase containing xylan-binding domain. **J. Mol. Biol.**, 300, 575-585, 2000.
29. GABIUS, H-J.; ANDRÉ, S.; KALTNER, H. E SIEBERT, H-C. The sugar code: functional lectinomics. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1572 (2-3) p. 165-177, 2002.
30. GERKE, V.; MOSS, S. E. Annexins: From Structure to Function. **Physiol. Rev.**, v.82 p. 331–371, 2002.
31. (A)GOWDA,N.M.; GOSWAMI ,U.; KHAN, M.I. Purification and characterization of a T-antigen specific lectin from the coelomic fluid of a marine invertebrate, sea cucumber (Holothuria scabra). **Fish & Shellfish Immunology** Volume 24, Issue 4, Pages 450-458, 2008.
32. (B)GOWDA,N.M.; GOSWAMI ,U.; KHAN, M.I. T-antigen binding lectin with antibacterial activity from marine invertebrate, sea cucumber (Holothuria scabra): Possible involvement in differential recognition of bacteria. **Journal of Invertebrate Pathology**, Volume 99, Issue 2, pp 141-145, 2008.

33. HARDMAN, K.D.; AINSWORTH, C. F. Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. **Biochemistry**, v.11 p. 4910–4919, 1972.
34. HARTSHORN, K.L.; WEBBY, R.; WHITE, M.R.; TECLE, T.; PAN, C.; BOUCHER, S.; MORELAND, R.J.; CROUCH, E.C.; SCHEULE, R.K. Role of viral hemagglutinin glycosylation in anti-influenza activities of recombinant surfactant protein D. **Respir Res.** 23; 9:65, 2008.
35. HATAKEYAMA, T.; HIMESHIMA, T.; KOMATSU, A.; YAMASAKI, N. Purification and characterization of two lectins from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. **Biosci Biotechnol Biochem.** Oct;57(10):1736-9, 1993.
36. HATAKEYAMA, T.; KOHZAKI, H.; NAGATOMO, H.; YAMASAKI, N. Purification and Characterization of Four Ca<sup>2+</sup>-Dependent Lectins from the Marine Invertebrate, *Cucumaria echinata* **The Journal of Biochemistry** Volume116, Issue1 Pp. 209-214, 1994.
37. HATAKEYAMA, T.; KOHZAKI, H.; NAGATOMO, H.; YAMASAKI, N. Interaction of the Hemolytic Lectin CEL-III from the Marine Invertebrate *Cucumaria echinata* with the Erythrocyte Membrane. February 24, **The Journal of Biological Chemistry**, 270, 3560-3564. 1995.
38. HATAKEYAMA, T.; SUENAGA, T.; ETO, S.; NIIDOME, T.; AOYAGI, H. Antibacterial Activity of Peptides Derived from the C-Terminal Region of a Hemolytic Lectin, CEL-III, from the Marine Invertebrate *Cucumaria echinata*. **J Biochem** 135 (1): 65-70, 2004.
39. HIMESHIMA, T.; HATAKEYAMA, T.; YAMASAKI, N. Amino Acid Sequence of a Lectin from the Sea Cucumber, *Stichopus japonicus*, and Its Structural Relationship to the C-Type Animal Lectin Family. **J Biochem** 115(4): 689-692, 1994.
40. HIRABAYASHI, J.; HASHIDATE, T.; ARATA, Y.; NISHI, N.; NAKAMURA, T.; HIRASHIMA, M.; URASHIMA, T.; OKA, T.; FUTAI, M.; MULLER, W. E. G.; YAGI, F. E. KASAI, K. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1572 (2-3) p. 232-254, 2002.
41. HIRAO, K.; NATSUKA, Y.; TAMURA, T.; WADA, I.; MORITO, D.; NATSUKA, S.; ROMERO, P.; SLENO, B.; TREMBLAY, L.O.; HERSCOVICS, A.; NAGATA, K.; HOSOKAWA, N. EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein

- endoplasmic reticulum-associated degradation and mannose trimming. *J. Biol. Chem.*, 218, 9650-9658, 2006.
42. HOLASKA, J. M.; BLACK, B. E.; LOVE, D. C.; HANOVER, J. A.; LESZYK, J. E PASCHAL, B. M. Calreticulin Is a Receptor for Nuclear Export. **The Journal of Cell Biology**, v. 52 (1) p. 127-140, 2001.
43. HONDA, S.; KASHIWAGI, M.; MIYAMOTO, K.; TAKEI, Y. E HIROSE, S. Multiplicity, Structures, and Endocrine and Exocrine Natures of Eel Fucose-binding Lectins. **J. Biol. Chem.**, v. 275 (42) p. 33151-33157, 2000.
44. IMAI, Y. Heterogeneity of C-type Lectins, 1998.  
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/lectin/LEA04E.html> acesso em: 19/10/2010
45. JIANG, S-Y.; MA, Z.; E RAMACHANDRAN, S. Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants **BMC Evolutionary Biology**, 10:79, 2010.
46. JOHANSEN, J. S. Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer **Dan Med Bull**;53:172-209, 2006.
47. KAIRIES, N.; BEISEL, H.; FUENTES-PRIOR, P.; TSUDA, R.; MUTA, T.; IWANAGA, S.; BODE, W.; HUBER, R. E KAWABATA, S. The 2.0-Å crystal structure of tachylectin 5A provides evidence for the common origin of the innate immunity and the blood coagulation systems **PNAS**, v.98 (24) p. 13519-13524, 2001.
48. KAWABATA, S.; IWANAGA, S. Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 23 (4-5) p. 391-400, 1999.
49. KAWABATA, S. Tachylectins: Horseshoe Crab Lectins Involved in Innate Immunity (2000) <http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/lectin/LEB01E.html> acesso em: 07/10/2010
50. KAWASAKI, N. Collectins and Their Roles in Host Defense. (1998) [http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/lectin/LE\\_E.html](http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/lectin/LE_E.html) acesso em 19/10/2010
51. KERR, A.; KIM, J. Bi-Penta-Bi-Decaradial Symmetry: A Review of Evolutionary and Developmental Trends in Holothuroidea (Echinodermata) **JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY** 285:93–103, 1999.
52. KILPATRICK, D.C. Animal lectins: a historical introduction and overview **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572 (2-3) p. 187-197, 2002.

53. KOJIMA, K.; YAMAMOTO, K.; IRIMURA, T.; OSAWA, T.; OGAWA, H.; E MATSUMOTO, I. Characterization of carbohydrate-binding protein p33/41. -relation with annexin IV, molecular basis of the doublet forms (p33 and p41), and modulation of the carbohydrate binding activity by phospholipids **J. Biol. Chem.**, v. 271 p. 7679-7685, 1996.
54. KOMIYA, T.; TANIGAWA, Y.; HIROHASHI, S. Cloning of the novel gene intelectin which is expressed in intestinal paneth cells in mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 251, pp. 759–762, 1998.
55. KONAMI, Y.; YAMAMOTO, K. E OSAWA, T. The primary structures of two types of the *Ulex europaeus* seed lectin **Journal of Biochemistry**, v.109 (4) p. 650-658, 1991.
56. KURAMOTO, T.; UZUYAMA, H.; HATAKEYAMA, T.; TAMURA, T.; NAKASHIMA, T.; YAMAGUCHI, K.; ODA, T. Cytotoxicity of a GalNAc-Specific C-Type Lectin CEL-I toward Various Cell Lines. **J. Biochem.** 137 (1): 41-50, 2005.
57. LANNOO, N.; PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E. J.M. Do F-box proteins with a C-terminal domain homologous with the tobacco lectin play a role in protein degradation in plants? **Biochem. Soc. Trans.** 36, 843–847, 2008.
58. LIU, F.; RABINOVICH, G. Galectins as modulators of tumour progression **Nature Reviews Cancer** 5, 29-41, 2005.
59. LOBSANOV, Y.D.; GITT, M.A.; LEFFLER, H.; BARONDES, S.H.; RINI, J.M. X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9 Å resolution. **J. Biol. Chem.**, v. 268 p. 27034–27038, 1993.
60. LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D. E DARNELL, J. E. In **Molecular cellbiology**. 4th ed. New York: W. H. Freeman & Co.; 2000.
61. LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1572 (2-3) p. 198-208, 2002.
62. LOVATELLI, A. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Advances in sea cucumber aquaculture and management: Volume 463 of FAO fisheries technical paper **United Nations Food & Agriculture Org.**, 2004.
63. MANCHEÑO, J.M.; TATENO, H.; SHER, D.; GOLDSTEIN, I.J. Laetiporus sulphureus lectin and aerolysin protein family. **Adv Exp Med Biol.**677:67-80, 2010.

64. MAST, S.W.; DIEKMAN, K.; KARAVEG, K.; DAVIS, A.; SIFERS, R.N.; MOREMEN, K.W. Human EDEM2, a novel homolog of family 47 glycosidases, is involved in ER-associated degradation of glycoproteins. **Glycobiology**, 15, 421-436, 2005.
65. MATSUI, T.; OZEKI, Y.; SUZUKI, M.; HINO, A.; TITANI, K. Purification and Characterization of Two Ca<sup>2+</sup>-Dependent Lectins from Coelomic Plasma of Sea Cucumber, *Stichopus japonicus*. **J Biochem.** 116 (5): 1127-1133, 1994.
66. MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; TAIRA, S.; SATO, Y.; FUJITA, T.; ICHIKAWA, N.; NAKATA, M. E MIZUOCHI, T. A Novel Human Serum Lectin with Collagen- and Fibrinogen-like Domains That Functions as an Opsonin. **J.B.C.**, v. 271, p. 2448-2454, 1996.
67. MATSUSHITA, M.; KURAYA, M.; HAMASAKI, N.; TSUJIMURA, M.; SHIRAKI, H.; FUJITA, T. Activation of the Lectin Complement Pathway by H-Ficolin **The Journal of Immunology**, v. 168 p. 3502-3506, 2002.
68. MEAGHER, J. L.; WINTER, H. C.; EZELL, P.; GOLDSTEIN, I. J.; STUCKEY, J. A. Crystal structure of banana lectin reveals a novel second sugar binding site **Glycobiology** Volume15, Issue10 pp. 1033-1042. 2005.
69. MELO, L.M.; TEIXEIRA, D.I.; HAVT, A.; DA CUNHA, R.M.; MARTINS, D.B.; CASTELLETTI, C.H.; DE SOUZA, P.R.; FILHO, J.L.; FREITAS, V.J.; CAVADA, B.S.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin family. **Mol Reprod Dev.**75(1):8-16. 2008.
70. MIZUSHIMA, T.; HIRAO, T.; YOSHIDA, Y.; LEE, S.J.; CHIBA, T.; IWAI, K.; YAMAGUCHI, Y.; KATO, K.; TSUKIHARA, T.; TANAKA, K. Structural basis of sugar-recognizing ubiquitin ligase. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, 11, 365-370. 2004.
71. MOJICA, E.R.E.; MERCA, F.E. Partial characterization of lectin from the internal organs of black sea cucumber (*Holothuria atra* Jaeger) **Asia Life Sciences**. 2006.
72. MOJICA, E.R.E.; MERCA, F.E., LECTINS FROM INTERNAL ORGANS OF SEA CUCUMBERS <http://www.pcamrd.dost.gov.ph/systems/zone2/papers/8th/mojica2.pdf>. Acesso em: 23/10/2010
73. MONASTYRSKAYAA, K.; BABIYCHUKA, E.B.; HOSTETTLERA, A.; RESCHERB, U.; DRAEGERA, A. Annexins as intracellular calcium sensors. **Cell Calcium** Volume 41, Issue 3, Pages 207-219.2007.



74. MORROLL, S.; TURNER, S.; FALCONE, F. H. Animal Lectins: Structure–Function Relationship in Mammalian Chitinase-Like Lectins. **Taylor & Francis Group**. cap 36 531-538. 2008.
75. NAKANO, M.; TABATA, S.; SUGIHARA, K.; KOUZUMA, Y.; KIMURA, M.; YAMASAKI, N. Primary structure of hemolytic lectin CEL-III from marine invertebrate *Cucumaria echinata* and its cDNA: structural similarity to the B-chain from plant lectin, ricin **BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA** Volume: 1435 Issue: 1-2 Pages: 167-176. 1999.
76. OLNES, S.; PIHL, A. "Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis". *Biochemistry* 12: 3121–26. 1973.
77. OLSONA, L.J.; PETERSONA, F. C.; CASTONGUAYA, A.; BOHNSACKA, R. N.; KUDOB, M.; GOTSCHALLB, R.R.; CANFIELDB, W. M.; VOLKMANA, B.F.; DAHMSA, N. M. Structural basis for recognition of phosphodiester-containing lysosomal enzymes by the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. **PNAS**, vol. 107 no. 28 12493-12498. 2010.
78. PACE, K. E.; BAUM, L. G. Induction of T Lymphocyte Apoptosis: A Novel Function for Galectin-1 **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v. 9 (45) p.21–29, 1997.
79. PAWSON, D. L. **Phylum Echinodermata Zootaxa** 1668: 749–764. 2007.
80. PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, v. 109 p. 347-352, 1995.
81. POWELL, L.D.; VARKI, A. I-type lectins. **J. Biol. Chem.**, v. 270 p. 14243–14246, 1995.
82. SALES, M.P.; GERHARDT, I.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. E XAVIER-FILHO, J. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? **Plant Physiology**, v. 124 p. 515-522, 2000.
83. SALLAY, I.; MORIWAKI, S.; NAKAMURA, O.; YASUDA, S.; KIMURA, M.; YAMASAKI, N.; ITOH, K.; OHBA, H. Interaction of the hemolytic lectin, CEL-III, with cultured human leukemic cell lines. **JOURNAL OF HEMATOTHERAPY & STEM CELL RESEARCH** Volume: 9 Issue: 6 Pages: 877-883, 2000.

84. SANCHEZ,J.; LESCAR, J.; CHAZALET, V.; AUDFRAY, A.; GAGNON,J.; ALVAREZ,R.; BRETON, C.; IMBERTY, A.; MITCHELL, E. Biochemical and Structural Analysis of Helix pomatia Agglutinin A HEXAMERIC LECTIN WITH A NOVEL FOLD **JBC**. 2006.
85. SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins: a large proteins. **FASEB J.**, v.4 p. 3198-3208, 1990.
86. STOYLOFF, J.; IVANOV, S. X. Animallectins: classification and functions **EXPERIMENTAL PATHOLOGY AND PARASITOLOGY**, 711, 2004.
87. SULÁK, O.; CIOCI, G.; DELIA, M.; LAHMANN, M.; VARROT, A.; IMBERTY, A.; WIMMEROVÁ M. A TNF-like trimeric lectin domain from Burkholderia cenocepacia with specificity for fucosylated human histo-blood group antigens. **Structure**. 13;18(1):59-72, 2010.
88. SUZUKI, Y.A.; SHIN, K.; LONNERDAL, B. Molecular cloning and functional expression of a human intestinal lactoferrin receptor., **Biochemistry** 40, pp. 15771–15779, 2001.
89. TURNER, M.W. The role of mannose-binding lectin **health and disease Molecular Immunology**, v.40 (7) p. 423-429, 2003.
90. UCHIDA, T.; YAMASAKI, T.; ETO, S.; SUGAWARA, H.; KURISU, G.; NAKAGAWA, A.; KUSUNOKI, M.; HATAKEYAMA, T. Crystal structure of the hemolytic lectin CEL-III isolated from the marine invertebrate Cucumaria echinata: implications of domain structure for its membrane pore-formation mechanism. **J Biol Chem**. 2004 Aug 27;279(35):37133-41, 2004.
91. UHLENBRUCK, G.; SÖLTER, J.; JANSSEN, E. E HAUPT, H. Two new, additional "combining sites" of C-reactive protein: lectin specificity of the anti-galactan type and anti-haemocyanin reactivity. *Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem.*, v. 362 p. 1167–1169, 1981.
92. (a) VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; BARRE, A.; ROUGE, P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionally related proteins with diverse biological roles. **Crystal Rev Plant Sci**, 17:575-692. 1998.

93. (b). VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S. Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications. **John Wiley & Sons**, Chichester, UK, 1998.
94. Van Damme E.J.M.; Lannoo, N.; Peumans, W.J. Plant Lectins. **Adv Botanical Res**, 48:107-209. 2008
95. VARKI, A.; CUMMINGS, R.D.; ESKO, J.D.; FREEZE, H.H.; STANLEY, P.; BERTOZZI, C. R.; HART, G.W.; ETZLER, M. E. **Essentials of Glycobiology**, 2nd edition Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
96. VARKI, A. Essentials of Glycobiology The "I-type" Lectins and the Siglecs Lecture 23, 2004 <http://grtc.ucsd.edu/lecture23.pdf>
97. YANG, R.Z.; LEE, M.J.; HU, H.; PRAY, J. ; WU, H.B.; HANSEN, B.C.; SHULDINER, A.R.; FRIED, S.K.; J.C. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 290, pp. E1253–E1261, 2006.
98. YOSHIDA, S; SHIMADA, Y; KONDOH, D, KOUZUMA, Y., GHOSH, A.K., JACOBS-LORENA, M., SINDEN, R.E. Hemolytic C-type lectin CEL-III from sea cucumber expressed in transgenic mosquitoes impairs malaria parasite development. **PLOS PATHOGENS** Volume: 3 Issue: 12 Pages: 1962-1970, 2007.
99. YOSHIDA, Y.; TANAKA, K. Lectin-like ERAD players in ER and cytosol. **Biochimica et Biophysica Acta- General Subjects** Volume 1800, Issue 2, Pages 172-180, 2010.

## CAPÍTULO II

***Holothuria grisea* AGGLUTININ (HGA): THE FIRST INVERTEBRATE LECTIN WITH ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS**

## ***Holothuria grisea* AGGLUTININ (HGA): THE FIRST INVERTEBRATE LECTIN WITH ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS**

### **Abstract**

A new lectin (HGA) was purified from the gutted body of the marine invertebrate *Holothuria grisea*. HGA is a dimeric lectin of molecular mass 228 kDa by gel filtration with monomers of 105 kDa by SDS-PAGE. The lectin is highly thermostable retains full activity for 1 h at 70 °C. Unlike other lectins purified from marine invertebrates, the hemagglutination activity of HGA does not require any divalent metal ions. The affinity analysis of HGA showed that only mucin was able to inhibit the haemagglutinating activity. HGA was tested in classical models of nociception and inflammation. HGA was able to inhibit the neutrophils migration into the peritoneal cavity induced by carrageenan by 68% at 1mg/kg. In acetic acid-induced writhing test a significant antinociceptive effect was observed by treatment with HGA (0.1, 1 and 10mg/kg) reducing constrictions in 27%, 90% and 84% respectively. In formaline test HGA showed antinociceptive effect only in the inflammatory phase. Nevertheless, in hot-plate test HGA did not show any nociceptive effect. In rota-rod and open-field tests HGA did not alter animal's behavior. The treatment with HGA 10 mg/Kg i.v presented diminished MPO activity (81.6% inhibition) and raised the circulating levels of NO in 50.4% when compared with the group control. HGA has demonstrated the ability to modulate the inflammatory response in models of inflammation *in vivo*. HGA is the first marine invertebrate lectin that showed an anti-inflammatory effect. This finding opens a new perspective on the potential of lectins from the marine environment.

### **1. INTRODUCTION**

Lectins are ubiquitous sugar-binding proteins, which possess at least a non-catalytic domain with high specificity for carbohydrates motifs (1). The lectins present a wide range of activities, such as: mitogenesis, toxicity in cells, cellular adhesion, interactions cell-cell, apoptosis,

splincing of RNA, tumor metastasis, agglutination of cells, fungi and bacteria (2,3,4,5, 17). The biological property of the lectins in the carbohydrates recognition turns these proteins powerful tools in processes of isolation and characterization of oligosaccharides. It is being fundamental for investigation about alterations and changes in the structure of glycans in the cellular surface of malignant cells, as well as immunological studies (6). A considerable number of marine invertebrate lectins were already purified and characterized and a considerable attention is focalized in its biological recognition role (7, 8, 9, 10, 25). Currently, there are strong indications that lectin presence in marine invertebrate are involved, mainly, in the innate defense processes against microbial agents by complement system activation. Then, they come as ancestral molecules that shown high conservation degree during the evolution to superior vertebrates (11,12,13,14). Nevertheless, when appraised about the modulation of the non-self immune system they present, commonly, pro-inflammatory activities and toxicity in cells and organisms (15,16,17,18).

Holothurians are sea animal belonging to Echinodermata phylum with a leathery skin and an elongated body a lot extended in the axis oral/aboral and presenting bilateral symmetry. They are commonly known as sea cucumber and frequently used in the popular medicine by the Asians in the treatment of the arthritis, tendons and articulations lesions, pains, muscular inflammations and hypertension treatment. Those animals are distributed thoroughly in the oceans and possess 1500 species worldwide. They are found from the zone intertidal to the bottoms of abyssal plain of the world (19). In detriment of the great diversity of species inside of the class Holothuroidae, few lectins were isolated and characterized. About lectins biological properties investigated in this class were presented: antibiotic activity and recognition of the antigen T (20), toxicity in leukemia cells (18), induction of TNF-alpha and G-CSF(16), hemolytic activity for pores formation in membranes (21).

In this work, we present the first lectin of marine invertebrate purified from *Holothuria grisea* that exhibits anti-inflammatory activity. The study about invertebrate's lectin have been intensified because they can be powerful tools in the study of inflammatory modulation, antinociceptive, antitumor effects and in diagnose of the malignant cells (17, 22, 23, 24).

## 2. Material and methods

### 2.1. Material

Human erythrocytes type A, B and O were donated by the Blood Bank, HEMOCE, Fortaleza CE. Papain, trypsin, Carraggenan and inhibitory sugars (Sigma). Acetic acid (Grupo Química Brasil) Diazepam (Roche), Formol (Merck), Hematoxilin (Reagen), Heparin (Cristália), Saline solution (Pharmace), Turk's solution (Isofar), morphine sulfate (Cristália).

### 2.2. Animals

Adult specimens of *Holothuria grisea* were collected at the littoral of St. Rita beach, RN, Brazil, and Bitupitá, CE, Brazil. Specimens were collected and washed in marine water and transported in clear marine water to the laboratory where had gutted body and stored at -20°C.

Adult male Wistar rats (160-220g) and Swiss mice (25-30g) were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Ceará and housed at 25±°C under a 12/12h light/dark cycle, and food and water *ad libitum*. Experiments were performed according the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the U.S. Department of Health and Human Services (NIH publication no. 85-23, revised 1985) and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza, Brazil.

### 2.3. Hemagglutinating assay

The activity was assayed in microtiter V plates (Nunc Brand products, Denmark) according Debray *at al.*, 1981(26). The blood cells were used native or treated with papain or trypsin according Benevides *et al.*,1998 (27). One haemagglutinating unit (HU) was defined as the amount of lectin able to agglutinate and hence precipitate the erythrocytes in suspension after 30 min. To each well was added 25 µL of the twofold serially diluted lectin solutions and 25 µL of treated and untreated human erythrocytes (2% v/v suspension) and allowed to incubate for 30 min at room temperature. The degree of haemagglutinating activity was examined. The controls were set up with saline and erythrocytes and 1 mg/mL of ConBr solution and erythrocytes.

#### **2.4. Purification of *Hotothuria grisea* agglutinin (HGA)**

Specimens were cut into small pieces using sharp scissors. The pieces were washed in distilled water and lyophilized. The pieces were reduced in mortar and pestle and extracted (1:2, w/v) with 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.6, for 2 h at room temperature. After centrifugation for 30 min at  $8,000 \times g$  at 4 °C, the supernatant (crude extract) was precipitated with acetone at 0.5 vol, 1.0 vol and 2.0 vol. These fractions (F1, F2 and F3) were then freeze-dried and submitted to assays. The F2 fraction showed a higher level of hemagglutinating activity to human papain treated erythrocytes type A. This fraction was applied to TSKgel G3000SWXL (1.28 × 30 cm) chromatography, equilibrated with 50 mM Tris-HCl, 150mM NaCl buffer, pH 7.6. The active fraction was applied to HITRAP DEAE FF chromatography equilibrated with 50 mM Tris-HCl, buffer, pH 7.6. The retained proteins were eluted by the same buffer in a linear NaCl gradient 0-1M. Protein content of all fractions were measured as described by Bradford 1976 (29) and chromatography was monitored at 280 nm.

#### **2.5. Carbohydrate specificity**

All inhibitors tested were dissolved in 150 mM NaCl at an initial concentration of 200 mM for monosaccharides (D-galactose, D-glucose, D-mannose, D-fucose, D-arabinose, D-N-acetylglucosamine and D-galactoneuraminic acid), disaccharides (lactulose, sucrose and lactose) and 5mg/ml glycoprotein (Mucin). An equal volume of the lectin solution was added to 25 µL of the twofold serially diluted inhibitor solutions and the plate was incubated for 1 h at room temperature. Twenty-five microliters of human erythrocytes (2% v/v suspension) was added to each well and allowed to incubate for 30 min at room temperature. Results were expressed as the minimal sugar or glycoprotein concentration required haemagglutinating inhibit doses of the lectin.

#### **2.6. Effects of metal ions, temperature and pH on haemagglutinating activity**

The effect of pH on the lectin activity was studied by hemagglutinating assay of the lectin after dialysis against buffers of different pH ranging from pH 2.5 to pH 10.5 for 3 h. 50 mM glycine-HCl buffer (pH 2.5), 50 mM acetate buffer (pH 4.5), 50 mM phosphate buffer (pH 6.5), 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5), and 50 mM glycine-NaOH buffer (pH 10.5) were used. The effect of divalent metal ions on the hemagglutinating activity of the lectin was assessed as follows. The lectin was dialyzed exhaustively against 50 mM EDTA followed by dialysis against 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6. The hemagglutinating activity was tested in the presence and in the absence



of 100 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$ . To study the effects of temperature on haemagglutinating activity, lectin (0.1 mg/mL) was serially diluted, incubated at 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 °C for 1h at each temperature and assayed after the hemagglutinating activity.

### **2.7. Molecular mass estimation**

SDS polyacrylamide (12%) gel electrophoresis (SDS-PAGE) in the absence and presence of  $\beta$ -mercaptoethanol (0.1 M) was conducted as described by Laemmli, 1970 (28), to estimate the molecular mass of lectin and its sub-units by comparing of mobility of bands with protein molecular weight markers (kDa): ConBr Alpha chain (25), ConBr Beta chain (14), ConBr Gama chain (12). Proteins were detected by staining with 0.1% Coomassie brilliant blue R-250. Also, the molecular mass of HGA was estimated by TSKgel G3000SWXL (1.28 × 30 cm) gel filtration column calibrated with protein markers (kDa): Conalbumin (Mr 74), Ovoalbumin (Mr 43), Carbonic anhydrase (Mr 29) Ribonuclease (Mr 13,5) and Aprotinin (Mr 6.5).

### **2.8. Acetic acid-induced writhing test**

The experiment was performed according to Koster et al 1959 (30), with some modifications. The animals were treated with a HGA 0.1 and 10 mg/kg (i.v), 15 minutes before administration intraperitoneally (i.p) of 0.6% acetic acid 10 ml/kg. 10 minutes after administration of acid, counted the number of contortions for 20 min.

### **2.9. Formalin test**

Run according to Hunskaar et al. 1987, animals were treated with HGA 1 and 10 mg/Kg, 15 minutes before receiving 20  $\mu\text{L}$  of formalin 1.5% s.c. (v/v in distilled water) in right hind paw. Soon after administration of formalin it was counted licking time by 5 min and after 15 min, observed by another 5 min.

### **2.10. Hot-plate test**

The animals were placed on a plate heated to 50 °C; and measured the time they remains on the board until proof of stereotyped behavior in reaction to pain (licking or jump). It was measured the basal time and, the animals that did not respond until 20 s were eliminated from the test. Soon after was done treatment with morphine, or HGA in doses of 1 and 10 mg/kg, the reaction times were recorded in time intervals of 30 min (32).

### 2.11. Rota –Rod test

In an attempt to demonstrate some possible muscle relaxing or sedative effect, ran the Rota-Rod test, which consists of a bar 2.5 cm in diameter rotating at 4 rpm (33). The animals were trained with 1 day in advance and those that remained less than 2 min in the bar were excluded from the test. The animals were treated with salina, HGA (1 mg/Kg i.v.) and Diazepam (5 mg/Kg i.p.) 30 minutes before the experiment.

### 2.12. Open Field test

30 minutes after treatment with salina, HCA (1 mg/Kg i.v.) and Diazepam (5 mg/Kg i.p.). The animals were placed wandering freely in an open field (30 x 30 x 15cm) divided in 9 squares of equal area, during 1 min for ambience. Then, during the following 4 min they were observed by the number of crossings from one marked area in the field to another (34).

### 2.13. Determination of myeloperoxidase activity

Mice were treated with HGA 10mg/Kg or saline, 30 min later they received 300µg/paw of carrageenan in right hind paw, 4 h later they were killed and a sample of tissue (50 mg) has been removed, weighed and homogenated in 1ml of hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) buffer containing 5 g HTAB in 1 L potassium phosphate buffer 50 mM, pH 6.0. (Bradley *et al.*, 1982) using a Polytron homogenizer (two cycles of 30 s at maximum speed). After centrifugation at 10,000 r.p.m. for 2 min, supernatant fractions were assayed for MPO activity, as an index of cellular migration, using the method described by Bradley *et al.* (1982) (35). To prepare the solution for analysis, 10 µl of supernatant were mixed with 200 µl of 50 mM phosphate buffer, pH 6.0, containing 0.167 mg/ml O-dianisidine dihydrochloride and 0.0005% hydrogen peroxide. MPO activity was measured by the absorbance of the solution at 450 nm (Spectra max), taking three readings at 1 min intervals. Calculation of units of MPO was realized considering that 1U MPO=1 mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> split and 1 mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gives a change in absorbance of  $1.13 \times 10^{-2}$  (change in absorbance=  $\eta\text{m} \times \text{min}^{-1}$ ).

### 2.14. NO-assay

Mice were treated with HGA 10 mg/kg or saline and killed 4h after intraplantar carrageenan administration. Blood were collected in eppendorfs containing 300ul of EDTA, centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 10 °C and the supernatant separated and were used for NOx (nitrite plus nitrate) quantification. Supernatants and a standard curve of sodium nitrate were incubated in a

microplate with nitrate reductase ( $0.016 \text{ U} \times \text{well}^{-1}$ ) for 12 h to convert  $\text{NO}_3$  to  $\text{NO}_2$ . After centrifugation at 14,000 r.p.m. for 15 min, total nitrite ( $\text{NO}_x$ ) content was determined using the Griess method (Green et al. 1982) (36).  $\text{NO}_x$  content was calculated by using the internal standard curve.

### **2.15. Neutrophil migration to peritoneal cavity induced by indirect chemotactic agent (Carrageenan-Cg).**

HGA (0.1 and 1 mg/kg) was administered 30 min before injection intraperitoneal (ip) of the inflammatory stimulus (carrageenan -  $500 \mu\text{g} / \text{cavity}$ ). The control group received positive and negative, respectively, carrageenan and saline. Mice were sacrificed 4 h after carrageenan injection and the peritoneal cavity was washed with 10 mL 5 UI/mL of saline containing heparin. The peritoneal fluid was collected and leucocytes were counts, total and differential, according to Souza and Ferreira 1985. Results were expressed as mean  $\pm$  E.P.M. the number of cells  $\times 10^3/\text{mL}$  peritoneal fluid.

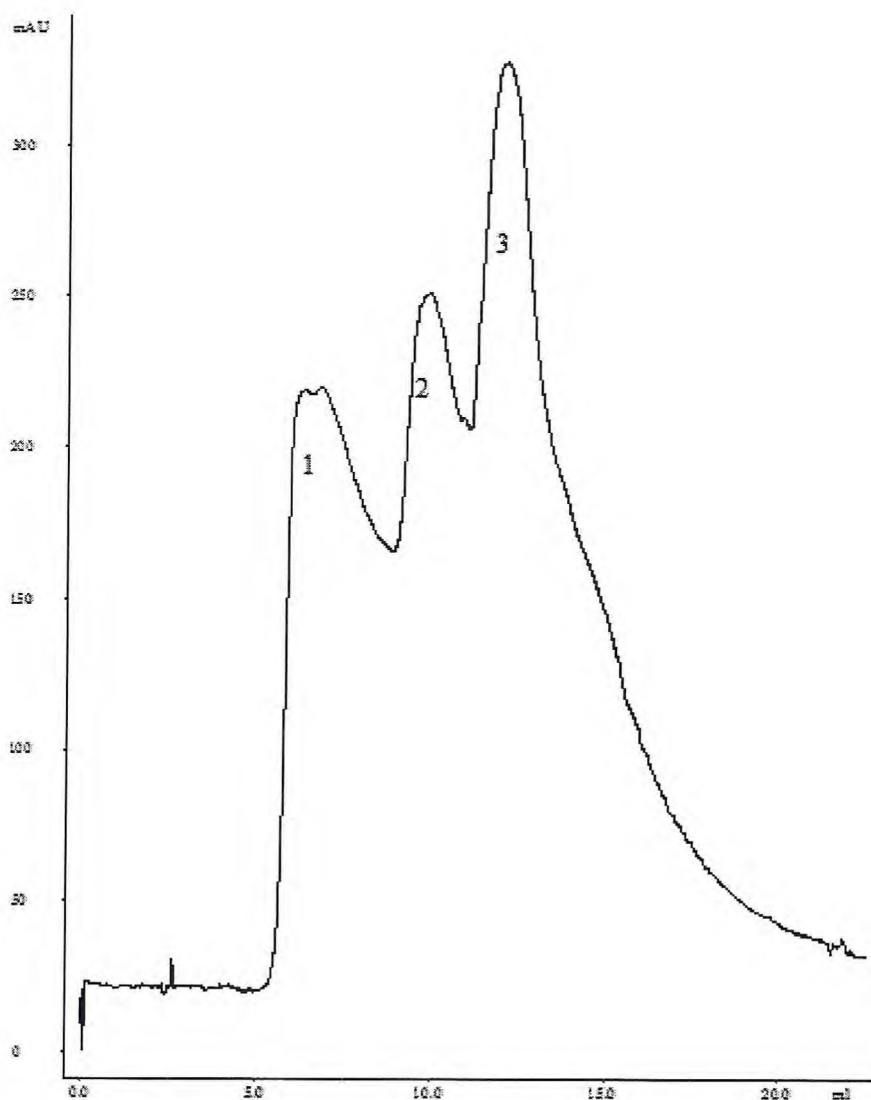
## **3. Results**

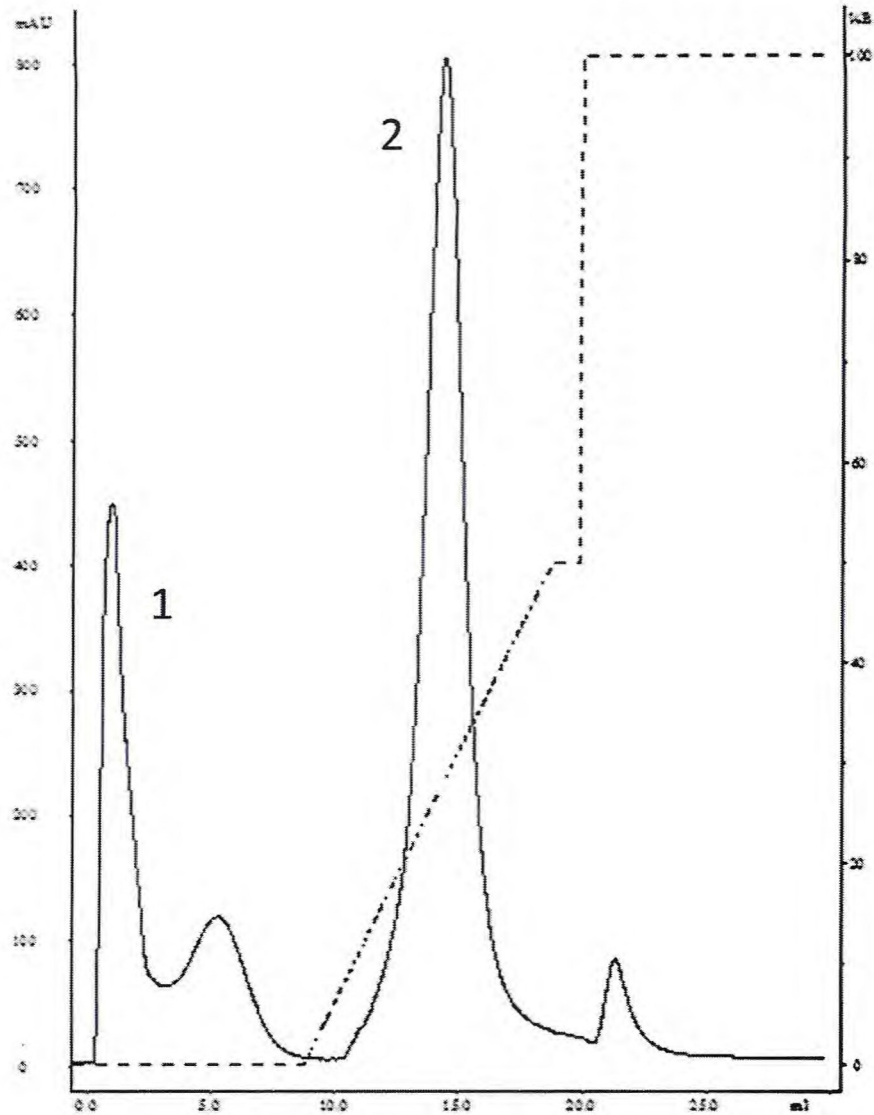
### **3.1. HGA purification**

Crude soluble protein extract obtained from sea cucumber was initially precipitated at 0.5, 1.0 and 2.0 vol with acetone and three protein fractions were obtained (F1, F2 and F3), respectively. The F2 protein fraction showed strong hemagglutinating activity to papain treated type A erythrocytes, while the other fractions exhibited low activity (F1) and hemolysis (F3). The F2 was then applied to TSKgel G3000SWXL column (0.15 m  $\times$  30 cm) gel filtration chromatography (Fig.1) and the peaks were submitted to haemagglutinating test. The active fraction (P1 TSK) was collected and applied to HITRAP DEAE FF chromatography. The adsorbed peak (P2 DEAE) showed hemagglutinating activity (Fig. 2). This process resulted in a purification of 7.5 fold with a 37.5 % recovery (table 1). The hemagglutinating activity of the C.E. cannot be determined by the presence of hemolysis.

Table II-1 Purification processes of HGA lectin

Purification fractions	Total protein (mg)	Titer	H.U./mg	Total activity	Purification	Recovery%
C.E.	271.2	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
F2	38.4	512	853.33	32,768	1.0	100
P1 TSK	6.6	512	2,031.74	13,312	2.4	40.63
P2 DEAE	1.9	1,024	6,400	12,288	7.5	37.5

Fig. II-1 *Holothuria grisea* F2 elution profile on TSKGel G3000SWXL (abs 280nm).



**Fig. II-2 HITRAP DEAE FF profile** Lectin-active fraction 1 from TSKGel G3000SWXL column was applied to column yielding lectin-active fraction 2 (abs 280nm). Dotted line denotes the linear gradient (0-1M) of NaCl.

### 3.2. Lectin specificity

As shown in table 2, the effects of mono-, oligosaccharides and glycoprotein on HGA hemagglutination activity were examined. Haemagglutinating activity of HGA towards papain treated type A erythrocytes was only inhibited by Mucin.

**Table II-2 Inhibition of hemagglutinating activity of HGA**

<b>Inhibitor compounds</b>	<b>MIC</b>
Glucose	NI
Mannose	NI
Galactose	NI
Fucose	NI
N-Acetyl Glucosamine	NI
Galactoneuraminic acid	NI
Arabinose	NI
Lactulose	NI
Lactose	NI
Sucrose	NI
Mucin	0,65
Fucoidan	NI
Carrageenan	NI

MIC, minimum inhibitory concentration; NI, sugar not inhibitory until a concentration of 200 mM.

### **3.3. Physical and chemical analysis of the HGA**

The lectin purification procedure from sea cucumber *Holothuria grisea* was observed by SDS-PAGE (Fig.3). Electrophoretic analysis of HGA in the absence of a reducing agent ( $\beta$ -mercaptoethanol), showed one protein band with molecular mass of approximately 105,7 kDa. The relative molecular mass of the native lectin was estimated at 228 kDa by gel filtration on a calibrated TSKGel G3000SWXL column (Fig. 4) The study of the temperature effect on HGA showed that the lectin was stable at 70°C and had abolished its activity at 100°C (Fig. 5). The hemagglutinating activity of HGA was not metal ion dependent.

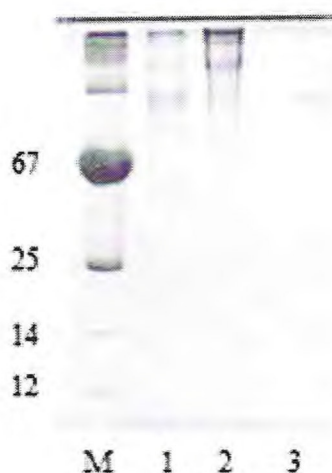


Fig. II-3 SDS-PAGE Final steps of HGA purification. (M) Molecular Weight Markers (kDa): BSA (67) ConBr Alpha chain (25), ConBr Beta chain (14), ConBr Gama chain( 12).Proteins were stained with Coomassie blue. 1= P1 TSK, 2=PI DEAE, 3=PII DEAE

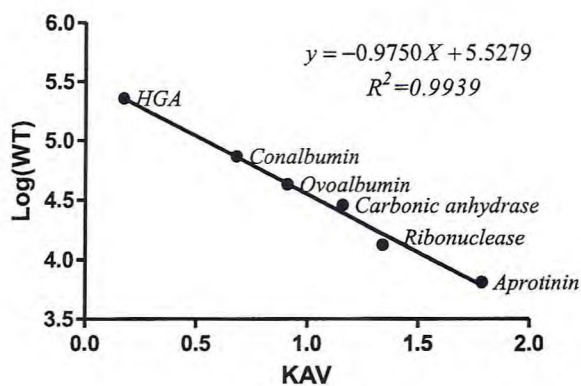


Fig. II-4 Determination of molecular weight of HGA by gel filtration on TSKGel G3000SWXL chromatography. Proteins were applied in the column equilibrated with 50 mM Tris-HCl 150mM NaCl buffer, pH 7.0. The eluted protein fractions were monitored at 280 nm. Protein molecular weight standards were: Conalbumin (74 kDa), Ovoalbumin (43 kDa), Carbonic anhydrase (29 kDa) Ribonuclease (13,5 kDa) and Aprotinin (6.5 kDa). phase distribution coefficient (Kav)

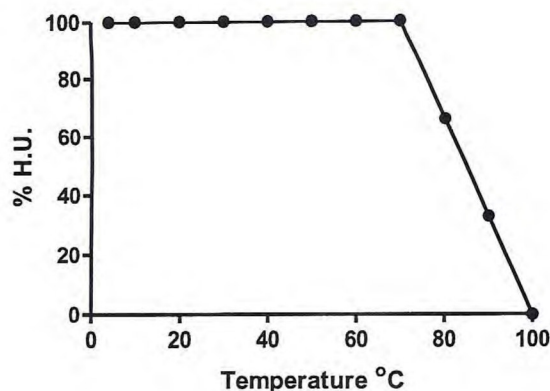


Fig. II-5 The temperature effects on the hemagglutination activity of HGA.

#### 3.4. Neutrophil migration in rats induced by intraperitoneal injection of carrageenan.

*In vivo* neutrophil migration induced by carrageenan (Cg, 500 $\mu$ g/cavity) was severely inhibited by dose at 1mg/kg of lectin HGA (68%) (Fig.6).

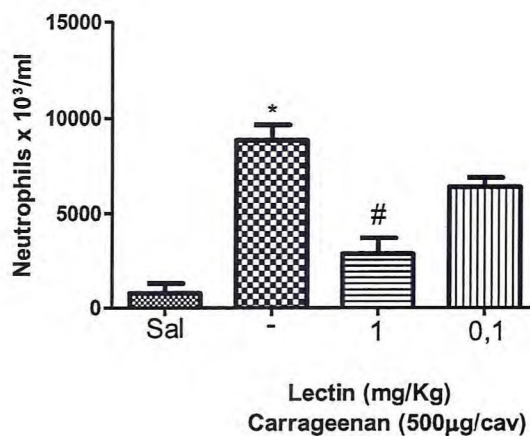


Fig. II-6 Inhibition of neutrophil migration by HGA. Rats were given 0.1 ml (i.v.) of lectin 30 min before carrageenan as inflammatory stimuli. Neutrophil migration was evaluated after 4 h. Values are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 5). \*P<0.05 compared to saline, #P<0.05 compared to carrageenan (ANOVA followed by Bonferroni's post test).



### 3.5. Acetic acid-induced writhing test

Treatment with HGA i.v. 30 min before the intraperitoneal injection of acetic acid showed significant antinociceptive effect inhibiting the number of abdominal writhing episodes evoked by the stimulus (Table 1). HGA (0.1, 1 e 10 mg/kg) reduced the number of constrictions by 27%, 90% e 84%, respectively, when compared with control group who received saline. The positive control, treated with the reference drug morphine (5 mg/kg, s.c.), also manifested strong analgesic effect (by about 99%).

**Table II-3 Effects of HGA on Acetic acid-induced writhing test**

<b>Experiemental Groups</b>	<b>Number of abdominal constrictions (20 MIN)</b>	<b>% Inhibition</b>
Saline	37 ± 2,38	
Morphine	0.1 ± 0.12*	99.7
HGA 0.1	27 ± 3.8*	27.0
HGA 1	3.7 ± 1.47*	90.0
HGA 10	4.3 ± 2.01*	88.4

Values are reported as mean ± S.E.M.; \* indicate significant differences from acetic acid (0.6%; i.p.) (P<0.05). ANOVA followed by Student Neuman-Keuls.

### 3.6. Formaline test

The i.v. treatment with HGA (1 and 10 mg/kg), 30 min before formaline, showed a significant antinociceptive effect, reducing the licking time only in the inflammatory phase (second) of the test. The percentual reductions were 69% compared with the control group. As expected, morphine significantly reduced the formalin response in both phases, by 60% and 98%, respectively (Table 4).

Table II-4 Effects of HGA on Formaline test

Treatment	Paw Licking (s)			
	Neurogenic Phase		Inflammatory Phase	
	First Phase	Inhibition (%)	Second Phase	Inhibition (%)
saline	60.2 ± 3.5		46.3 ± 5.6	
Morphine	24.0 ± 1.4*	60.1	0.85 ± 0.5*	98.2
HGA 1	44.9 ± 3.3	25.4	46.4 ± 9.2	-0.2
HGA 10	51.8 ± 4.7	14.0	14.4 ± 8.6*	68.9

Values are reported as mean ± S.E.M. \* indicates significant differences from formalin (1.2%; s.c.) (P<0.05). ANOVA followed by Student-Neuman-Keuls.

### 3.7. Hot-plate test

The treatment with HGA (1 and 10 mg/kg i.v.) did not show any antinociceptive effect. The administration of the reference drug morphine at 5 mg/kg showed antinociception (Table 5), with a delay in the reaction time of 41± and 36.8± s compared to controls (16.3±2.3 and 13.6±2.5s) at the 30- and 60-min time points, respectively.

Table II-5 Effects of HGA on Hot-plate test

Treatment	Reaction Time (s)				
	Basal	30 min	60 min	90 min	120 min
Saline	17.7	16.3	13.6	10.8	12.1
Morphine	13.6	41	36.8	27.1	13.5
HGA 1	15.1	18.75	13.9	16.2	15.7
HGA 10	16.1	12.9	15.4	9.6	13.5

Values are reported as mean ± S.E.M.; \* indicates significant differences from saline group (P<0.05).two way ANOVA followed by Bonferroni post-test.

### 3.8. Rota-rod and open-field tests

Treatment of animals with HGA (1 and 10 mg/kg) did not alter the number of crossings, rearing, or immobility in the open-field test compared to controls (Fig. 7). Similarly, the lectin, at any dose tested, did not alter the behavior responses in the rota-rod test compared to control group (Fig.8). Diazepan (5 mg/kg) treatment decreased the responses evaluated in both tests.

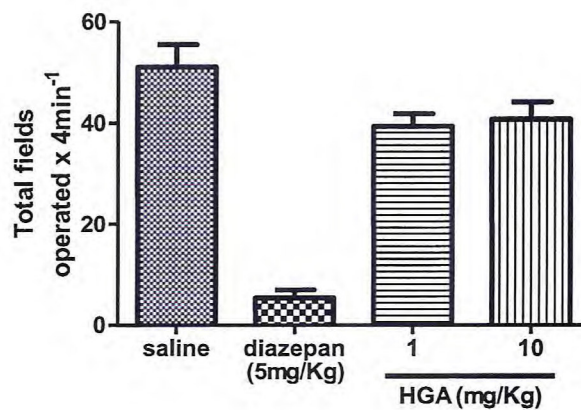


Fig.II-7 Effects of HGA on Open-Field test. Values are reported as mean  $\pm$  S.E.M.; \* indicates significant differences from saline group ( $P < 0.05$ ).two way ANOVA followed by Bonferroni post-test.

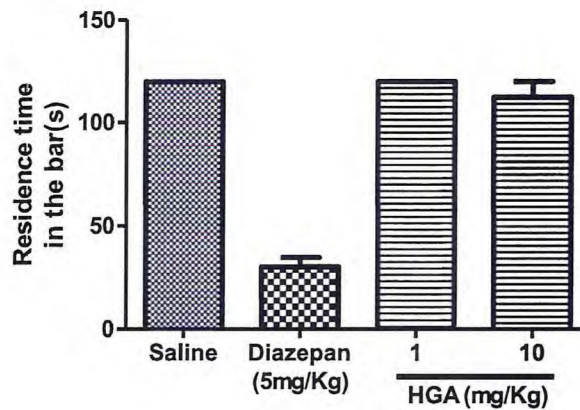


Fig. II-8 Effects of HGA on Rota-rod test. Values are reported as mean  $\pm$  S.E.M.; \* indicates significant differences from saline group ( $P < 0.05$ ).two way ANOVA followed by Bonferroni post-test.

### 3.9. NO determination

HGA 10 mg/Kg intravenously administered 30 min before carrageenan raised the circulating levels of NO in 50,4% when compared with the group which received only the phlogistic agent (carrageenan). This result means an increased production of NO, once we can infer the assayed  $\text{NO}_2$  and  $\text{NO}_3$  are its direct metabolites.

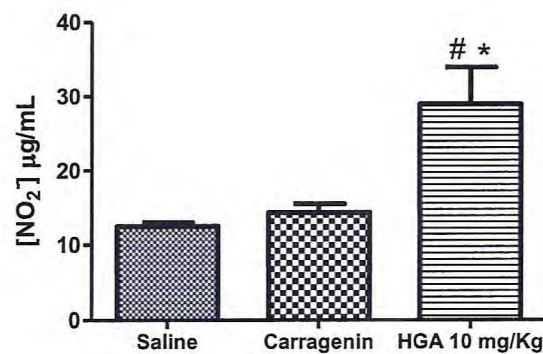


Fig. II-9 The serum level of nitric oxide ( $\text{NO}_3/\text{NO}_2$ ) measured on animals after intravenous injection of lectin HGA. Values are reported as mean  $\pm$  S.E.M.; \* indicates significant differences from saline group and # indicates significant difference from carragenin group ( $P < 0.05$ ). two way ANOVA followed by Bonferroni post-test.

### 3.10. MPO activity

The animals treated with HGA 10 mg/Kg i.v presented diminished MPO activity (81,6% inhibition) when compared with the group who received intraplantar administration of carrageenan. It means that HGA inhibited the migration of neutrophils to the inflammation site.

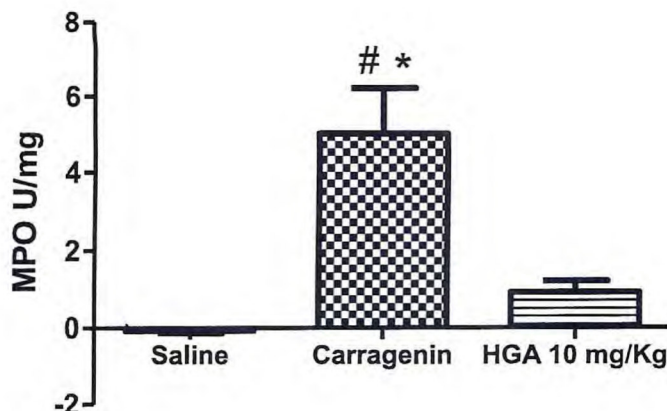


Fig. II-10 Myeloperoxidase activity measured in paw edema tissue. Values are reported as mean  $\pm$  S.E.M.; \* indicates significant differences from saline group and # indicates significant difference from carragenin group ( $P < 0.05$ ), two way ANOVA followed by Bonferroni post-test.

#### 4. Discussion

Lectins have been isolated from various marine invertebrates and a large attention is given regarding their application as tools in biotechnology. In the invertebrates lectins make an important contribution to innate immune protection and work along with epithelial barriers, cellular defenses such as phagocytosis, and pattern-recognition receptors that trigger pro-inflammatory signaling cascades (37). In this work, we had purified a novel lectin from gutted body of *Holothuria grisea*. This lectin (HGA) demonstrated the ability to agglutinate human erythrocytes with preference for type A treated with papain. The lectin is present in native form composed of two subunits not covalently linked with molecular mass of 228 kDa, its monomer containing 105 kDa and was visualized by SDS-PAGE. Marine lectins are generally identified by their metal ion requirement for hemagglutination activity. However, HGA didn't present the metal ion dependence, similar HSL (38). Its inhibition of mucin coupled with the absent inhibition by monosaccharides suggests an affinity for n-glycans motifs as HSL and *Holothuria atra* lectin (38-39). However, while there was no inhibition by lactose and lactulose, columns of lactose and guar gum affinity ligand demonstrated that adsorb the lectin. Further analysis will be conducted aim to characterize in detail the profile of affinity of the HGA. The formalin test is widely used for elucidation of mechanisms of pain and analgesia (40). In this test occurs two distinct phases of nociception. Neurogenic phase (initial phase) is characterized by direct

chemical stimulation of nociceptors, mainly the C fibers. Whereas the late phase, called inflammatory is related to a combination of inflammatory reaction in tissue peripheral and functional changes in dorsal horn of the spinal cord. (40). In the second phase occurs the release of various inflammatory mediators such as excitatory amino acids, neuropeptides, PGE<sub>2</sub>, cytokines and nitric oxide (41-43). Only the HGA dose of 10 mg/kg significantly inhibited the second phase when compared to saline group, suggesting an effect antinociceptive only related to inflammatory pain. The morphine group showed significant activity in both phases when compared with the saline group. This result confirms the activity of opiates in both phases as shown in previous studies (44,45) The hot plate test involves a specific central response, in which involves spinal and supraspinal pathways (46). The morphine group caused a significant increase in time when the animals on heated plate were compared to saline group. Since the HGA (1 and 10 mg / kg) did not show significant activity when compared to morphine group. This result suggests that the lectin does not show a central antinociceptive effect, confirming what was observed in the formalin test. Later, Rota Rod and open- field test were performed in order to study a possible activity of HGA on the locomotor and motor system, respectively. The results showed that there were no significant changes when compared to diazepam (central nervous system depressor). These data suggest that the HGA lectin does not interfere in the reaction of the animal through chemical stimuli (acetic acid 0.6% and 1% formalin) and thermal (hot plate). MPO is a peroxidase abundantly expressed in neutrophils. MPO activity in the tissue is a direct marker of the infiltration of these cells. The animals treated with HGA 10 mg/mL showed less infiltration than the non-treated. Thus, animals which were injected with carrageenan, a known inflammatory agent that causes edema and neutrophil infiltration, showed high activity of MPO in homogenates analyzed, but when treated with HGA 10 mg/mL 30min before, this activity was significantly lower. Thus treatment with HGA showed an inhibitory effect on the migration of these cells to the inflammatory focus. Confirming the experimental peritonitis results. This effect can also explain the antinociceptive action of HGA, as was shown the preponderant role of neutrophils in the installation of inflammatory pain. This impairment of migration may be related to increased production of nitric oxide, since it has been shown that the increased circulating NO inhibits neutrophil migration (40). Animals that were treated with HGA had a significant increase in circulating levels of NO when compared to carrageenan.

## 5. References

1. Peumans and Van Damme, 1995 W. J. Peumans, E.J.M. Van Damme, EJM., Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* **109** (1995), pp. 347–352.
2. Pace and Baum, 1997 K. E. Pace, L. G. Baum, Induction of T Lymphocyte Apoptosis: A Novel Function for Galectin-1 *Trends in Glycoscience and Glycotechnology.* **9** (1997), p.21–29.
3. Akahani *et al.*, 1997 S. Akahani, H. Inohara, P.E. Nangia-Makker, A. Raz Galectin-3 in Tumor Metastasis *Trends in Glycoscience and Glycotechnology.* **9** (1997), pp.69–77.
4. Sales *et al.*, 2000 M.P. Sales, I.R. Gerhardt, M.F. Grossi-de-Sá, and J. Xavier-Filho Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? *Plant Physiology.***124** (2000), pp. 515-522.
5. Danguy *et al.*, 2002 A. Danguy, I. E. Camby, R. Kiss Galectins and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1572** (2002), pp. 285-293.
6. Turner, 2003 M.W.Turner The role of mannose-binding lectin. *Health and Disease Molecular Immunology*, **40** (2003), pp. 423-429.
7. Belogortseva *et al.*, 1998 N. Belogortseva, V. Molchanova, V. Glazunov, E. Evtushenko, P. Luk'yanov, N-Acetyl-D-glucosamine-specific lectin from the ascidian *Didemnum ternatanum*. *Biochim Biophys Acta.* **1380** (1998),pp. 249-56.
8. Moura *et al.*, 2006 R.M. Moura, A.F. Queiroz, J.M. Fook, A.S. Dias, N.K. Monteiro, J.K. Ribeiro, G.E. Moura, L.L. Macedo, E.A. Santos, M.P. Sales CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **145** (2006),pp. 517-23.
9. Alpuche *et al.*, 2010 J. Alpuche, A. Pereyra, G. Mendoza-Hernández, C. Agundis, C. Rosas, E. Zenteno Purification and partial characterization of an agglutinin from *Octopus maya* serum. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **156** (2010), pp.1-5.
10. Bulgakov *et al.*, 2000 A.A. Bulgakov, E.L. Nazarenko, I.Y. Petrova, M.G. Eliseikina, N.M. Vakhrusheva, V.A. Zubkov Isolation and properties of a mannan-binding lectin from the coelomic fluid of the holothurian *Cucumaria japonica*. *Biochemistry (Mosc).* **65** (2000), pp. 933-939.

11. Hatakeyama *et al.*, 2004 T. Hatakeyama, T. Suenaga, S. Eto, T. Niidome, H. Aoyagi Antibacterial activity of peptides derived from the C-terminal region of a hemolytic lectin, CEL-III, from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*. *J Biochem.* 135(2004), pp. 65-70.
12. Wang *et al.*, 2009 X.W. Wang, W.T. Xu, X.W. Zhang, X.F. Zhao, X.Q. Yu, J.X.A. Wang C-type lectin is involved in the innate immune response of Chinese white shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* **27** (2009), pp. 556-62.
13. Skjoedt *et al.*, 2010 M.O. Skjoedt, Y. Palarasah, K. Rasmussen, L. Vitved, J. Salomonsen, A. Kliem, S. Hansen, C. Koch, K. Skjodt Two mannose-binding lectin homologues and an MBL-associated serine protease are expressed in the gut epithelia of the urochordate species *Cliona intestinalis*. *Dev Comp Immunol.* **34** (2010), pp. 59-68.
14. Sekine *et al.*, 2001 H. Sekine, A. Kenjo, K. Azumi, G. Ohi, M. Takahashi, R. Kasukawa, N. Ichikawa, M. Nakata, T. Mizuochi, M. Matsushita, Y. Endo and T. Fujita. An Ancient Lectin-Dependent Complement System in an Ascidian: Novel Lectin Isolated from the Plasma of the Solitary Ascidian, *Halocynthia roretzi*. *The Journal of Immunology*, **167** (2001), pp. 4504-4510.
15. Queiroz *et al.*, 2008 A.F. Queiroz, R.M. Moura, J.K. Ribeiro, I.L. Lyra, D.C. Cunha, E.A. Santos, M.P. de-Sales Pro-inflammatory effect in mice of CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **147** (2008), pp. 216-21.
16. Yamanishi *et al.*, 2007 T. Yamanishi, Y. Yamamoto, T. Hatakeyama, K. Yamaguchi, T. Oda CEL-I, an invertebrate N-acetylgalactosamine-specific C-type lectin, induces TNF-alpha and G-CSF production by mouse macrophage cell line RAW264.7 cells. *J Biochem.* **142** (2007), pp. 587-95.
17. Queiroz *et al.*, 2009 A.F. Queiroz, R.A. Silva, R.M. Moura, J.L. Dreyfuss, E.J. Paredes-Gamero, A.C. Souza, I.L. Tersariol, E.A. Santos, H.B. Nader, G.Z. Justo, M.P. de Sales. Growth inhibitory activity of a novel lectin from *Cliona varians* against K562 human erythroleukemia cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* **63** (2009), pp. 1023-33
18. Sallay *et al.*, 2000 I. Sallay, S. Moriwaki, O. Nakamura, S. Yasuda, M. Kimura, N. Yamasaki, K. Itoh, H. Ohba. Interaction of the hemolytic lectin, CEL-III, with cultured human leukemic cell lines. *J Hematother Stem Cell Res.* **9** (2000), pp. 877-83.



19. Barnes *et al.*, 1995 R. S. K. Barnes, P. Calow,; P. J. W. Olive, D. W. Golding, The Invertebrates: A New Synthesis. (1995), pp. 186-188.
20. Gowda, *et al.*, 2008 N.M. Gowda, U. Goswami, M.I. Khan T-antigen binding lectin with antibacterial activity from marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*): possible involvement in differential recognition of bacteria. *J Invertebr Pathol.* **99** (2008), pp.141-5.
21. Kouriki-Nagatomo *et al.*, 1999 H. Kouriki-Nagatomo, T. Hatakeyama, M. Jelokhani-Niaraki, M. Kondo, T. Ehara, N. Yamasaki Molecular mechanism for pore-formation in lipid membranes by the hemolytic lectin CEL-III from marine invertebrate *Cucumaria echinata*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **63** (1999), pp.1279-84.
22. Mody *et al.*, 1995 R. Mody, S. Joshi, W. Chaney Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **33** (1995), pp. 1–10.
23. Brooks and Wilkinson, 2003 S. A. Brooks and D. Wilkinson Validation of a simple avidin–biotin detection method for *Helix pomatia* lectin (HPA) binding as a prognostic marker in cancer. *Acta Histochem.* **105** (2003), pp. 205–212.
24. Aragão *et al.*, 2008 K.S. Aragão, M. Satre, A. Imberty, A. Varrot Structure determination of discoidin II from *Dictyostelium discoideum* and carbohydrate binding properties of the lectin domain. *Proteins*, **73** (2008), pp. 43–52.
25. Mathieu, *et al.*, 2010 S. V. Mathieu *et al.*, Discoidin I from *Dictyostelium discoideum* and Interactions with Oligosaccharides: Specificity, Affinity, Crystal Structures, and Comparison with Discoidin II, *J. Mol. Biol.* (2010), doi:10.1016/j.jmb.2010.05.042
26. Debray *et al.*, 1981 H. Debray, D. Decout, G. Strecker, G. Spik, J. Montreuil Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to Nglycosylproteins. *Eur. J. Biochem.* **117** (1981), pp. 41–55.
27. Benevides *et al.*, 1998 N.M.B. Benevides, M.L. Holanda, F.R. Melo, A.L.P. Freitas, A.H. Sampaio Purification and partial characterisation of the lectin from the marinered alga *Enantiocladia duperreyi* (C. Agardh) Falkenberg. *Bot. Mar.* **41** (1998), pp. 521–525.
28. Laemmli, 1970 U.K. Laemmli Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227** (1970), pp. 680–683.
29. Bradford, 1976 M.M. Bradford, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principles of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* **72** (1976), pp. 248–254.

30. Koster *et al.*, 1959 R. Koster, M. Anderson, E.J. De Beer Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc* **18** (1959), pp. 412–414.
31. Hunskaar and Hole, 1987 S. Hunskaar, K. Hole The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* **30** (1987), pp. 103–114.
32. Eddy and Leimbach N.B. Eddy, D. Leimbach Synthetic analgesics I: dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exper Ther* **107** (1953), pp. 385–393.
33. Durham and Miya, 1957 N.W. Durham, T.S. Miya A note on a simple apparatus for detecting neurological deficits in rats and mice. *J Am Pharm Assoc* **46** (1957), pp. 208–210.
34. Capaz *et al.*, 1981 F.R. Capaz, L.E.M. Vanconcellos, S. De Moraes, J. Palermo-Neto The open field: a simple method to show ethanol withdrawal symptoms. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **25** (1981), pp. 228–236.
35. Brandley *et al.*, 1982 P.P. Brandley, D.A. Priebat, R.D. Christensen, G. Rothstein Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophils content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.*, **78** (1982), pp. 206–209.
36. Green *et al.*, 1982 L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* **126** (1982), pp. 131–8.
37. Malagoli *et al.*, 2010 D. Malagoli, S. Sacchi, E. Ottaviani. Lectins and cytokines in celomatic invertebrates: two tales with the same end. *Invertebrate Survival Journal.* **7**(2010), pp. 1-10.
38. Gowda *et al.*, 2008 N.M. Gowda, U. Goswami, M.I. Khan Purification and characterization of a T-antigen specific lectin from the coelomic fluid of a marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*) *Fish & Shellfish Immunology.* **24** (2008), pp. 450-458.
39. Mojica and Merca, 2006 E.R.E. Mojica, F.E. Merca, P. Partial characterization of lectin from the internal organs of black sea cucumber (*Holothuria atra* Jaeger) *Asia Life Sciences* (2006)
40. Tjolsen *et al.*, 1992 A. Tjolsen, O.G Berge, S. Hunskaar, J.H Rosland, K Hole The formalin test: an evaluation of the method. *Pain.* v.**51** (1992), pp.5-17.
41. Malmberg and Yaksh, 1995 A. B. Malmberg, T.L. Yaksh The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E2 using microdialysis in conscious rats. *Br. J. Pharmacol.* **114** (1995), pp. 1069-1075.

42. Santos and Calixto. 1997 A.R.S. Santos, J.B. Calixto Further evidence for the involvement of tachycinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuropeptides*. **31** (1997), pp. 381-389.
43. Omote *et al.*, 1998 K. Omote, T. Kawamata, M. Kawamata, A. Namiki Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw. *Brain Research*. **787** (1998),pp.161-164.
44. Hunskaar *et al.*, 1985 S. Hunskaar, O.B. Fasmer, K. Hole Formalin test in mice, a useful technique foe evaluating mild analgesia. *J. Neurosci. Methods.*, **14** (1985), pp. 69–76.
45. Shibata *et al.*, 1989 M. Shibata, T. Ohkubo, H. Takahashi, R. Inori Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain*, v. 38, p. 347–352, 1989.
46. Nemirovsky *et al.*, 2001 A. Nemirovsky, L. Chen, V. Zelma, I. Jurna The antinociceptive effect of the combination of spinal morphine with systemic morphine or buprenorphine *Anesthesiol Analgesic* 2001;93:197–203.
47. Souza and Ferreira. 1985 G.E.P. SOUZA, S.H. FERREIRA Blockade Antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflammed peritoneal cavity. *Ag. Actions*, v. 17, p. 97-103, 1985.

**CAPÍTULO III**

**TOXIC ACTIVITIES OF BRAZILIAN MARINE INVERTEBRATES AND A NEW  
HEMOLYTIC LECTIN FROM *Holothuria grisea*.**

## TOXIC ACTIVITIES OF BRAZILIAN MARINE INVERTEBRATES AND A NEW HEMOLYTIC LECTIN FROM *Holothuria grisea*.

### Abstract.

Aqueous extracts from two marine sponges (*Cliona varians* and *Haliclona caerulea*), two zoanthids (*Palythoa caribbaeorum* and *Zoanthus sociatus*) and one echinoderm *Holothuria grisea* were tested for cytotoxicity with the *Artemia* lethality model. The organisms tested which showed the highest toxicity were *Haliclona caerulea* with LC50 11.53 µg/ml and *Holothuria grisea* with LC50 8.1 µg/ml in 24h. The zoanthids showed toxicity >200 µg/ml. In aqueous extracts of the species *H. grisea* was detected and purified a lectin with hemolytic activity. This protein (HGL) was evaluated for its toxic effect on *Artemia* and compared the results of the lectin from the marine sponge *C.varians* that has antileukemic effect.

### 1. Introduction

The marine environment has a representative part of the biodiversity of our planet and provides a wide variety of compounds with biotechnological applications (De Vries *et al.*, 1994, Haefner 2003). Many of these compounds, already isolated and studied, belong to marine invertebrates such as sponges, cnidarians, mollusks, arthropods, echinoderms and tunicates (Munro *et al.*, 1999, Chung, *et al.* 2000, Bulgakov *et al.*, 2003, Yang *et al.*, 2006, Han *et al.*, 2006, Sekine *et al.*, 2001). Among these compounds are mostly proteins (Pajic *et al.*, 2002, Yoshida *et al.*, 2007, Queiroz *et al.*, 2008) and secondary metabolites (Kuramoto *et al.*, 2004, Mayer *et al.*, 2007) with a large range of biological activities. Lectins are a group of carbohydrate-binding proteins found in a wide range of organisms including virus, bacteria, fungi, plants and animals (Sharon and Lis, 2003). Lectins are involved in various biological functions, such as host defense, cell–cell interaction, folding of glycoproteins, and other functions (Kilpatrick, 2002, Sharon and Lis, 2004). Based on binding specificity, lectins have been used as reagents to detect sugar chains in biochemical and histochemical investigations (Kilpatrick, 2000). *Artemias* are small crustacean of the order Anostraca (Persoone, 1980, Mayer *et al.*, 1982,

Thompson *et al.*, 1985, Carballo *et al.*, 2002). The lethality test in artemias are a recent practice as an indicator of bioactive compounds cytotoxicity to a range of pharmacological activities such as anti-cancer, antiviral, insecticide, pesticide, anti-HIV. (Carballo *et al.* 2002; Pervin *et al.*, 2006, Ho *et al.*, 2006). The use of artemias for this type of analysis is due to its high sensitivity combined with the fact that the cysts are easily obtained, can be hatched and stored at room temperature for several months (Vanhaecke *et al.*, 2001). At first, this work aims to study the effect of aqueous extract from two marine sponges (*Cliona varians* and *Haliclona caerulea*), two zoanthids (*Palythoa caribbaeorum* and *Zoanthus sociatus*) and echinoderm *Holothuria grisea*. Subsequently, to investigate the presence of lectins and assess its participating over toxic effects.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Animal collections**

The animals were collected on the beaches of Bitupita, Paracuru, Taiba and Pecem, located in the west coast of Ceara, Brazil, Santa Rita (north coast) and Buzios (south coast) beaches, of Rio Grande do Norte, Brazil. The animals were transported in thermal box at 4 ° C and then stored at -20 ° C.

### **2.2. Brine shrimp**

*Artemia* cysts were acquired in local trade and hatched in artificial seawater at 28 ° C under constant illumination and strong aeration. *Artemia* cysts were incubated in a cylindrical vessel with conical bottom polyethylene the ratio of 1 g of cysts to 1 liter of artificial seawater. This condition simulates the natural emergence of these organisms, an area of shallow seas. After a period of 12 h, aeration is switched off and lighting directed at the bottom of the container. As the nauplii have positive phototaxis swim toward the light, while the unhatched cysts are on the water surface. The nauplii are collected and used for bioassay.

### **2.3. Preparation of aqueous extracts**

The animals were thawed and ground. Tris-HCl was added 50 mM pH = 7.6 at a ratio of 1:2 (w/v) to pieces that were homogenized for 20 minutes. The extract was centrifuged at 8000 rpm

for 30 minutes and the supernatant filtered. Then the filtrate was dialyzed against distilled water, dried and used in the bioassay.

#### **2.4. Lethality Test in Artemia.**

The aqueous extracts were homogenized with artificial sea water at a concentration of 5 mg/ml. The tests were done on board Limbro plates 24 wells where each well contained 2 mL of artificial seawater with 10 nauplii each. Specific volumes of samples were added to each well to obtain concentrations of 10, 25, 50 and 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$  for each sample. The experiments were performed in triplicate with control containing only 2 mL of artificial seawater and 10 nauplii. Reading the dead nauplii was performed after 24 hours. From these data we calculate the percentage of deaths for each concentration and LC50 values of the curve of the log dose (Goldstein and Kalkan, 1974) and also by probit analysis described by Finney (1971).

#### **2.5. Hemagglutinating/Hemolytic assay**

The activity was assayed in microtiter V plates (Nunc Brand products, Denmark) according Debray et al., 1981. The blood cells were used native or treated with papain or trypsin according Benevides *et al.*, 1998 . One haemagglutinating unit (HU) was defined as the amount of lectin able to agglutinate and hence precipitate the erythrocytes in suspension after 30 min. To each well was added 25  $\mu\text{L}$  of the twofold serially diluted lectin solutions and 25  $\mu\text{L}$  of treated and untreated human erythrocytes (2% v/v suspension) and allowed to incubate for 30 min at room temperature. The degree of haemagglutinating activity was examined. Hemolytic activity was examined by visual examination of lysis of the erythrocytes under same condition as for hemagglutination assay.

#### **2.6. Purification of *Holothuria grisea* hemolytic lectin ( HGL) and *Cliona varians* lectin (CVL)**

Specimens of *Holothuria grisea* were cut into small pieces. The pieces were washed in distilled water and lyophilized. The pieces were reduced in mortar and pestle and extracted (1:2, w/v) with 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.6, for 2 h at room temperature. After centrifugation for 30 min

8000 rpm at 4 °C, the supernatant (crude extract) was partitioned with n-butanol 50% and ethanol 75% and precipitated with acetone at 2.0 vol.(F1). The supernatant fraction (F2) was then dried in speedvac centrifuge and submitted to assays. The fraction 2 was applied to TSKgel G3000SWXL (1.28 ×30 cm) chromatography, equilibrated with 50 mM Tris-HCl, 150mM NaCl buffer, pH 7.6. Protein content was measured as described by Bradford 1976 (29) and chromatography was monitored at 280 nm.

CVL purification was carried out as describe by Moura (2006). Briefly, specimens were cut into small pieces. The pieces were ground with a mixer machine and extracted (1:2, w/v) with 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5, for 2 h at room temperature. After centrifugation for 30 min at 8000 rpm at 4 °C, the supernatant (crude extract) was precipitated with acetone at 0.5 vol (F1), 1.0 vol (F2) and 2.0 vol(F3). The F2 fraction was applied to a Sepharose CL 4B (8 × 2.5 cm) affinity chromatography, equilibrated with 50 mM Tris-HCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub> buffer, pH 8.0. CVL were eluted with 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8.0.

### **2.7. Effects of metal ions and pH on HGL activity**

The effect of pH on the lectin activity was studied by hemagglutinating/hemolytic assay of the lectin after dialysis against buffers of different pH ranging from pH 4 to pH 9 for 3 h. 50 mM glycine-HCl buffer (pH 2), 50 mM. Acetate buffer (pH 4-5), 50 mM citrate buffer (pH 6), 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7-8), and 50 mM glycine-NaOH buffer (pH 9) were used. The effect of divalent metal ions on the hemagglutinating activity of the lectin was assessed as follows. The lectin was dialyzed exhaustively against 50 mM EDTA followed by dialysis against 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6. The hemagglutinating activity was tested in the presence and in the absence of 50 mM Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>.

### **2.8. Carbohydrate specificity**

All inhibitors tested were dissolved in 150 mM NaCl at an initial concentration of 200 mM for monosaccharides (D-galactose, D-glucose, D-mannose, D-fucose, D-arabinose, D-N-acetylglucosamine and D-galactoneuraminic acid), disaccharides (lactulose, sucrose and lactose) and glycoprotein 5mg/ml (Mucin). An equal volume of the lectin solution was added to 25 μL of the twofold serially diluted inhibitor solutions and the plate was incubated for 1 h at room



temperature. Twenty-five microliters of human erythrocytes (2% v/v suspension) was added to each well and allowed to incubate for 30 min at room temperature. Results were expressed as the minimal sugar or glycoprotein concentration required haemagglutinating inhibit doses of the lectin.

### 2.9. Molecular mass estimation

SDS polyacrylamide (15 %) gel electrophoresis (SDS-PAGE) in the absence and presence of  $\beta$ -mercaptoethanol (0.1 M) was conducted as described by Laemmli, 1970 (28) to estimate the molecular mass of lectin and its sub-units by comparing of mobility of bands with protein molecular weight markers (kDa): albumin (Mr 67), Ovoalbumin (Mr 43), Carbonic anhydrase (Mr 29) Ribonuclease (Mr 13,5) and Aprotinin (Mr 6.5). Proteins were detected by staining with 0.1% Coomassie brilliant blue R-250. Also, the molecular mass of HGA was estimated by TSKgel G3000SWXL (1.28  $\times$ 30 cm) gel filtration column calibrated with protein markers (kDa): Conalbumin (Mr 74), Ovoalbumin (Mr 43), Carbonic anhydrase (Mr 29) Ribonuclease (Mr 13,5) and Aprotinin (Mr 6.5).

## 3. Results

### 3.1. Toxic effects of marine invertebrates aqueous extracts.

The toxic activities on Artemias were observed in 3 of 5 invertebrates extracts tested (Table 1). The results were collected 24h after the start of the test. The values of LC50 were obtained after probit analysis and values for the organisms *C. varians*, *H. caerulea*, *P. caribbaeorum*, *Z. sociatus* and *H. grisea* are shown in table 1. The organisms tested which showed the highest toxicity were the sponge *H. caerulea* with LC50 11.53  $\mu$ g/ml and *H. grisea* with LC50 8.1  $\mu$ g/ml after 24h. The zoanthids do not shown an effective toxicity what were observed by LC50 >200 $\mu$ g/ml. The toxic effects were observed to be dose dependent. Based on these results has started an investigation into the presence of lectins in these species (Except for *Cliona varians* which already has a purified lectin).

Table III-1 Brine shrimp Lethality Bioassay of marine invertebrates aqueous extracts.

Extracts	Dose ( $\mu\text{g/ml}$ )	% Lethality 24h	LC50 24h
<i>Cliona varians</i>	10	0	116.7 ( $\pm 23.3$ )
	25	0	
	50	3.3	
	100	36.7	
<i>Haliclona caerulea</i>	10	40	11.53 ( $\pm 2.01$ )
	25	90	
	50	93.3	
	100	100	
<i>Palythoa caribbaeorum</i>	10	3.3	>200
	25	0	
	50	0	
	100	16.7	
<i>Zoanthus sociatus</i>	10	0	>200
	25	0	
	50	0	
	100	3.3	
<i>Holothuria grisea</i>	10	56.6	8.1 ( $\pm 3.8$ )
	25	76.6	
	50	86.6	
	100	96.6	

Values are reported as regression statistics of probit analysis LC50 and LC50 Standard Error (LC50 S.E.)

The species *H. caerulea* showed strong hemagglutinating activity for human erythrocytes. But until now we could not purify a lectin from that organism. The species, *P. caribbaeorum*, *Z. sociatus* and *H. grisea* showed hemolytic activity. Aiming to redeem some doubt about the participation of saponins and palytoxins in hemolytic activity shown by extracts of *P. caribbaeorum*, *Z. sociatus* and *H. grisea* these materials were subjected to partitioning with ethanol and n-butanol. Subsequent to treatment with ethanol and n-butanol only the specie *H. grisea* showed hemolytic activity. As there are reports of hemolytic lectins in holoturians we followed in an attempt to purify this lectin. Thus, our group had success in isolating a lectin with hemolytic activity from this specie as described below.

### 3.2. Purification of hemolytic lectin from *Holothuria grisea*.

Crude protein extract obtained from sea cucumber was initially partitioned with ethanol 75% and n-butanol 50% followed by precipitation with acetone at 2.0 vol. The supernatant fraction (F2) was then dried in speedvac centrifuge and submitted to assays. The F2 fraction showed a higher level of hemagglutinating/hemolytic activity to all human blood group types. The fraction 2 was applied to TSKgel G3000SWXL (1.28 × 30 cm) chromatography, equilibrated with 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl buffer, pH 7.6 ( Fig. 1).The peak with 10.98 retention volume was collected and analyzed. This process resulted in a purification of 35.6% fold with a 53.4 % of yield (table 1).

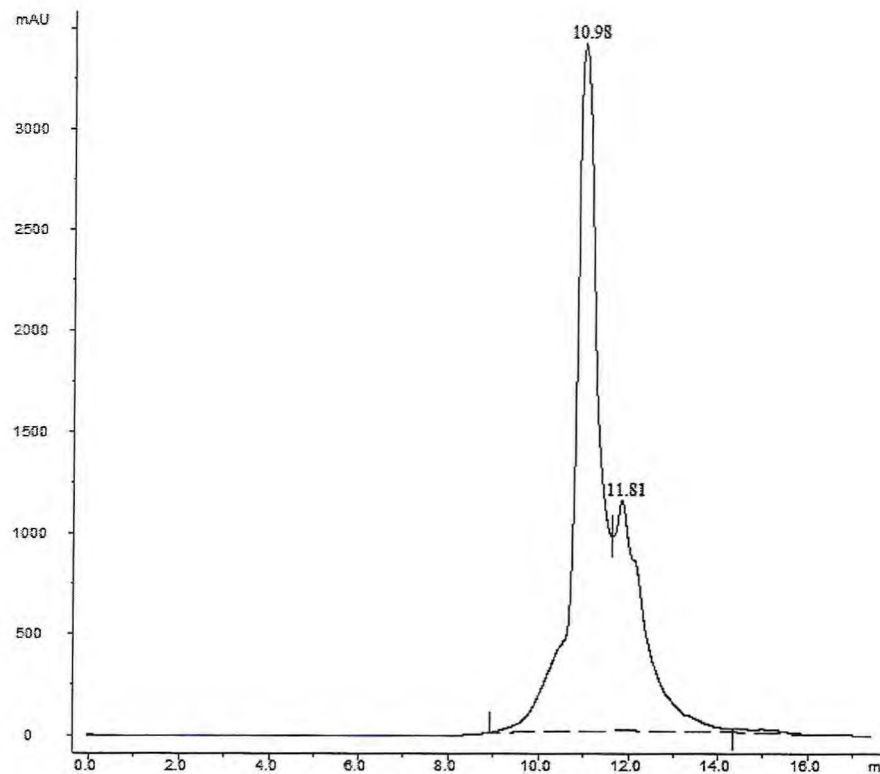


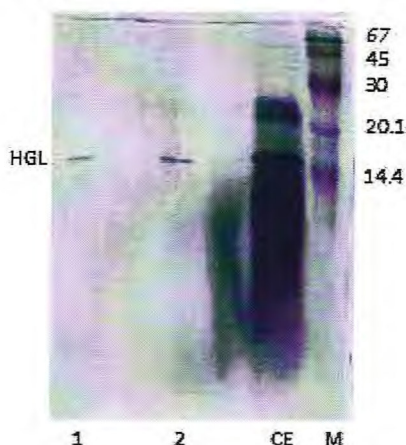
Fig. III-1 Purification of HGL lectin. TSK gel profile of F2 from *H. grisea* (abs 280 nm).

**Table III-2 Purification processes of HGL lectin**

Purification fractions	Total protein (mg)	Titer	H.U./mg	Total activity	Purification	Yield%
C.E.	271.1	128	114,5	31,040	1,0	100,0
F2	28.8	256	595.3	17,152.0	5,2	55,3
TSK	4.1	2,048	4,079.7	16,588.8	35,6	53,4

### 3.3. Molecular mass determination of the purified HGL

The apparent molecular mass of the purified native HGL was estimated by gel filtration on precalibrated TSKgel G3000SWXL column. It was calculated as 16.8 kDa. In addition, the band with apparent molecular weights of 15.6 kDa were estimated using SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions (Fig. 2). These results suggest that HGL is a monomeric lectin devoid of intermolecular disulfide bonds.



**Fig. III-2 15% SDS-PAGE of HGL Lectin purification. (1) Protein HGL (2) protein HGL +  $\beta$ mercaptoethanol, (CE) Crude extract and (M) Molecular Weight Markers (kDa): Lysozyme (14.4 KD), Trypsin inhibitor (20.1 kDa), Carbonic anhydrase (30 kDa), Ovalbumin (45 kDa) and Albumin (67kDa)**

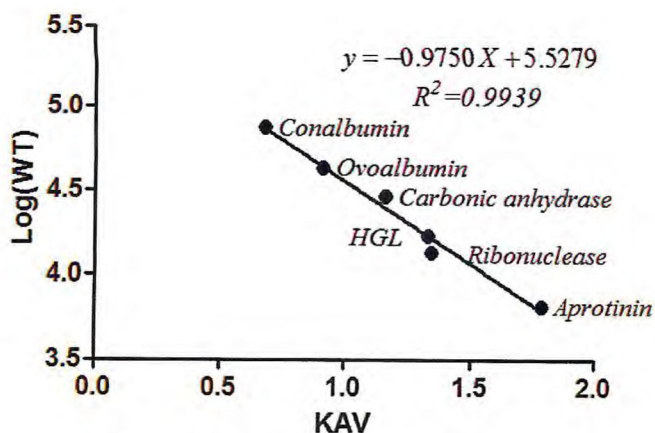


Fig. III-3 The apparent molecular weight of the purified native HGL estimated by gel filtration on precalibrated TSKgel G3000SWXL column. Standard markers: Conalbumin (Mr 74), Ovalbumin (Mr 43), Carbonic anhydrase (Mr 29) Ribonuclease (Mr 13,5) and Aprotinin (Mr 6.5).

#### 3.4. Effects of metal ions, pH and inhibitory saccharides on HGL activity

We were unsuccessful in trying to achieve the inhibition of hemolytic activity with sugars. But, at the beginning of haemolysis process is possible to observe the erythrocytes agglutination. Thus, we conducted an osmotic protection assay with 5.5% dextrose. With this procedure, at the last dilution of HGL was possible to observe that the dextrose could protect the erythrocyte lysis. This allowed us to visualize the agglutination by optical microscope (fig.4) and perform the inhibition test (table.3). The protein HGL activity was not inhibited when treated previously with 50 mM EDTA. Anyway, we did the addition of divalent cations  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  but observed no change in protein activity. The same happened in the pH range tested.

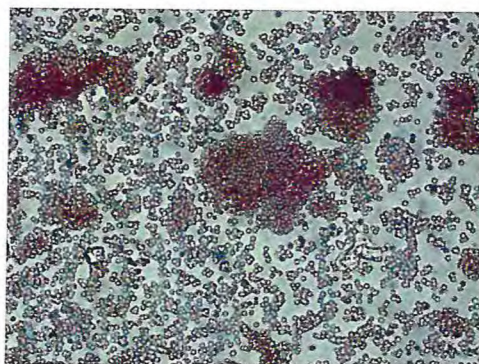


Fig. III-4 Hemagglutinating activity of lectin HGL under osmotic protection with 5.5% dextrose.

**Table III-3 Inhibition of hemagglutinating activity of HGA**

Inhibitor compounds	MIC	
Glucose	NI	mM
Mannose	50	mM
Galactose	NI	mM
Fucose	NI	mM
N-Acetyl Glucosamine	NI	mM
Galactoneuraminic acid	NI	mM
Arabinose	NI	mM
Lactulose	25	mM
Lactose	NI	mM
Sucrose	25	mM
Mucin	0.31	mg/ml
Fucoidan	2.5	mg/ml
Carrageenan	NI	mM
Xylose	50	mM

MIC, minimum inhibitory concentration; NI, sugar not inhibitory until a concentration of 200 mM.

### 3.5. Brine shrimp Lethality Bioassay of HGL and CVL.

The lectins HGL and CVL showed potent activity against brine shrimp. LC<sub>50</sub> values were obtained were 9.5 to HGL and 5.6 to CVL and can be viewed in table 4.

**Table III-4 Brine shrimp Lethality Bioassay of marine invertebrates aqueous extracts.**

Lectin	Dose (µg/ml)	% Lethality 24h	LC <sub>50</sub> 24h	Lectin	Dose (µg/ml)	% Lethality 24h	LC <sub>50</sub> 24h
<b>CVL</b>	10	70	5.6 (±3.1)	<b>HGL</b>	10	53.3	9.5 (±1.4)
	25	96.6			25	96.6	
	50	96.6			50	100	
	100	100			100	100	

Values are reported as regression statistics of probit analysis LC<sub>50</sub> and LC<sub>50</sub> Standard Error (LC<sub>50</sub> S.E.)

#### 4. DISCUSSION

Many extracts of aquatic organisms have been tested against artemia and showed toxic activities (Carballo *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 1985). Some of these compounds have already been isolated and evaluated in other models. The results showed a range of biological activities as anti-cancer, suppression of the HIV virus, anti-inflammatory activity, pro-inflammatory activity. (Queiroz *et al.*, 2009, McCune *et al.*, 1989, Herencia *et al.*, 1997). Between species of sponges used in this work the specie *C. varians* has a protein purified with biological activities already described (Moura *et al.*, 2006; Queiroz *et al.*, 2007; Queiroz *et al.*, 2009). the genus *Haliclona* has a lectin with anti-cancer proprieties (Pajic *et al.*, 2002) and several secondary metabolites (Schmitz *et al.*, 1978, Aratake *et al.*, 2009, Sorek *et al.*, 2010). Tests similar to this study, however, methanolic extracts were conducted with several species of sponges including the genus *Cliona* and *Haliclona*, relating lethality test in artemia with other biological assays (Thompson *et al.*, 1985). When comparing the toxic effect of lectin CVL with an aqueous extract of the sponge *C. varians* is clear its participation in the toxic effect and confirms the toxicity data on leukemia cells and bacteria. Although we have not purified a lectin from *Haliclona caerulea*, the high toxicity suggests the presence of compound with biotechnological potential. Based on the presence of a lectin with activity against tumor cells in *Haliclona cratera* there is a strong indication that the toxic effect may reflect the action of a lectin. Unlike sponges, zoanthidae have no reports of lectins purified, but there are many studies of secondary metabolites such as palytoxin and zoanthamine. Thus, we expected a potent toxic activity. Nevertheless, secondary metabolite biosynthesis is often affected by environmental factors that may modify its structure in different environmental conditions, changing, perhaps, the toxic part of the molecule (Soares *et al.*, 2006). In the class *Holothuroidea* several lectins have been purified and evaluated for their biotechnological applications (Hatakeyama *et al.*, 2004) (Sallay *et al.*, 2000; Yoshida, *et al.*, 2007). (Kuramoto *et al.*, 2005). (Mojica ; Merca, 2010), (Gowda *et al.*, 2008<sup>b</sup>). In this study, we purified and characterized a lectin with hemolytic activity. Different from the majority of lectins from marine invertebrates HGL showed no ion-dependent. But similarities in molecular weight with SJL-II of *Stichopus japonicus* (Hatakeyama *et al.*, 1993) and hemolytic activity as CEL-III and *Holothuria scabra* lectin (Hatakeyama *et al.*, 1994) (Mojica ; Merca, 2005) were observed. In lethality test aqueous extract of *Holothuria grisea* showed a high toxic activity and relating

this activity to HGL there are indications of other components exerting toxic activity. This opens a new investigation into the presence of lectins or other metabolites with possible applications in science.

## 5. References

1. Behenna, et al, 2008 D.C. Behenna, J.L. Stockdill, B.M. Stoltz. The Biology and Chemistry of the Zoanthamine Alkaloids. *Angewandte Chemie Int. Ed.* 47, 2365-2386(2008)
2. Béréss, et al, 1983 L. Béréss, H.J. Zwick, P.N. Kolkenbrock, O. Kaul, A. Wassermann. A method for the isolation of the Caribbean palytoxin (C-PTX) from the coelenterate (zoanthide) *Palythoa caribbaeorum*. *Toxicon* 21: 285-290. (1983)
3. Bulgakov, et al, 2004 A. Bulgakov, K. Park, K. Choi, H. Lim, M. Cho. Purification and characterization of a lectin isolated from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Fish & Shellfish Immunology* 16; 487-499(2004)
4. Carballo, et al. 2002 J.L. Carballo, Z.L. Hernández-Inda, P. Pérez, M.D. García-Grávalos. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology* , 2:17(2002)
5. Chung, et al, 2001 J.J. Chung, L.A. Ratnapala, I.M. Cooke, A.A. Yanagihara. Partial purification and characterization of a hemolysin(CAH1) from Hawaiian box jellyfish (*Carybdea alata*) venom. *Toxicon* 39 ; 981-990(2001)
6. De Vries and Hall, 1992 D.J. De Vries, M.R. Hall. Marine biodiversity as a source of chemical diversity. *Fisheries*; 17: 20-25(1992)
7. Finney,1971 D.J. Finney. *Probit analysis*. 3<sup>rd</sup> Ed. University press, Cambridge, UK, 18: 37,77. (1971)
8. Goldstein and Kalkan, 1974 A.L. Goldstein, S.M. Kalkan. *Principle of drug action* 2<sup>nd</sup> End. Wiley Biomedical Health Publication, pp: 376-381. (1974)
9. Han et al, 2007 H. Han, Y.H. Yi, L. Li, X.H. Wang, B.S. Liu, P. Sun, M.X. Pan. A new triterpene glycoside from sea cucumber *Holothuria leucospilota*. *Chinese Chemical Letters* 18; 161-164.(2007)
10. Haefner, 2003 B. Haefner. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug discovery today* Vol.8, No.12 (2003)



11. Herencia, et al, 1998 F. Herencia, A. Ubeda, M.L. Ferrándiz, M.C. Terencio, M.J. Alcaraz, M. Carrascosa, R. Capaccioni, M. Payá. Anti-inflammatory activity in mice of extracts from mediterranean marine invertebrates. *Life Sciences*, Vol. 62, No. 9, pp. PL. 115-120(1998)
12. Ho, et al, 2007 J.C. Ho, C.M. Chen, L.C. Row Oleanane-type triterpenes from the flowers, pith, leaves, and fruit of *Tetrapanax papyriferus*. *Phytochemistry* 68 pp631-635 (2007)
13. Kaul, et al, 1974 P.N. Kaul, M.R. Farmer, L.S. Ciereszko. Pharmacology of palytoxin: The most potent marine toxin know. *Proc West Pharmacol Soc* 17: 294.(1974)
14. Krishnaraju, et al, 2005 A.V. Krishnaraju, T.V.N. Rao, D. Sundararaju, M. Vanisree, H.S. Tsay, G.V. Subbaraju. Assessment of bioactivity of Indian medicinal plants using brine shrimp (*artemia salina*) Lethality assay. *Intern J. of Applied Science and Engineering*. 3,2: 125-134(2005)
15. Kuramoto, et al, 2004 M. Kuramoto, H. Arimoto, D. Uemura. Bioactive Alkaloids from the Sea: A Review. *Marine Drugs*,1,39-54(2004)
16. Mayer, et al, 2007 A. Mayer, A. Rodríguez, R. Berlinck, M. Hamann Marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 145 pp553-581(2007)
17. McCune, et al, 1989 J.M. McCune, R. Namikawa, C.C. Shih, L. Rabin, H. Kaneshima. Suppression of HIV infection in AZT-Treated SCID-hu Mice. *Science*, Vol. 247, 564-565.(1989)
18. Moura, et al, 2006 R.M. Moura, A.F.S. Queiroz, N.K.V. Monteiro, G.E.D.D. Moura, L.L.P. Macedo, E.A. Santos, M.P. Sales CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 145(2006) 517-523
19. Munro, et al, 1999 M.H.G. Munro, J.W. Blunt, E.J. Dumdei, S.J.H. Hickford, R.E. Lill, S. Li, C.N. Battershill, A.R. Duckworth. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Biotechnology* 70 ;15-25(1999)
20. Pajic, et al, 2002 I. Pajic, Z. Kljajic, N. Dogovic, D. Sladic, Z. Juranic, M. J. Gasic. A novel lectin from the sponge *Haliclona crater*: isolation, characterization and biological activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 132 ; 213-221(2002)

21. Persoone, 1980 G. Persoone. Proceeding of the international symposium on brine shrimp *Artemia salina*. Vol. 1-3. University press, Belgium,3: 1-3.(1980)
22. Pervin, et al, 2006 F. Pervin, M.M. Hossain, S. Khatun, S.P. Siddique, K.A. Salam, M.R. Karim, N. Absar Comparative cytotoxicity study of six bioactive lectins purified from pondweed (*Potamogeton nodosus* Poir) rootstock on Brine Shrimp. *J. Med. Sci.*6(6): 999-1002 (2006)
23. Queiroz, et al 2008 A.F.S. Queiroz, R.M. Moura, J.K.C. Ribeiro, I.L. Lyra, D.C.S. Cunha, E.A. Santos, M.P. de-Sales Pro-inflammatory effect in mice of CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 147 pp216-221(2008)
24. Queiroz, et al, 2009 A.F.S. Queiroz, R.A. Silva, R.M. Moura, J.L. Dreyfuss, E.J. Paredes-Gamero, A.C.S. Souza, I.L.S. Tersariol, E.A. Santos, H.B. Nader, G.Z. Justo, M.P. Sales Growth inhibitory activity of a novel lectin from *Cliona varians* against K652 human erythroleukemia cells.*Cancer Chemother Pharmacol*,63:1023-1033(2009)
25. Schmitz, et al, 1978 F.J. Schmitz, Hollenbeak K.H., Campbell D.C.: Marine Natural Products: Halitoxin, Toxic Complex of several marine sponges of the genus *Haliclona*. *J. Org. Chem.*, Vol. 43, No.20. (1978)
26. Sekine, et al, 2001 H. Sekine, Kenjo A., Azumi K., Ohi., Takahashi M., Kasukawa R., Ichikawa N., Nakata M., Mizuochi T., Matsushita M., Endo Y., Fujita T.:2001. An ancient lectin-dependent complement system in an Ascidian: Novel lectin isolated from the plasma of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *The Journal of Immunology* 167;4504-4510
27. Soares, et al, 2006 C.L.S. Soares, C.D. Pérez, M.B.S. Maia, R.S. Silva, L.F.A. Melo. Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 16(4): 463-468(2006)
28. Sorgeloos, 1980 P. Sorgeloos. The use of the brine shrimp *artemia* in aquaculture. *The brine shrimp Artemia* Vol 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture.(1980)
29. Sorgeloos, et al, 1978 P. Sorgeloos, C.R. Van Der Wielen, G. Persoone. The use of *artemia* náuplio for toxicity tests- A critical analysis. *Ecotoxicology and enviromental safety* 2, 249-255(1978)

30. Thompson, et al, 1985 J.E. Thompson, R.P. Walker, D.J. Faulkner. Screening and bioassays for biologically-active substances from forty marine sponge species from San Diego, California, USA. *Marine Biology* 88, 11-21.(1985)
31. Vanhaecke, et al, 1981 P. Vanhaecke, G. Persoone, C. Claus, P. Sorgeloos. Proposal for a short-term toxicity with *Artemia náuplio*. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 5, 382-387. (1981)
32. Yang, et al, 2007 H. Yang, T. Luo, F. Li, S. Li, X. Xu. Purification and characterisation of a calcium-independent lectin (PjLec) from the haemolymph Fo the shrimp *Penaeus japonicas*. *Fish & Shellfish Immunology* 22 ; 88-97(2007)
33. Yoshida, et al, 2007 S. Yoshida, Shimada Y., Kondoh D., Kouzuma Y., Ghosh A.K., Jacobs-Lorena M., Sinden R.E.: Hemolytic C-Type lectin CEL-III from sea cucumber expressed in transgenic mosquitoes impairs malaria parasite development. *PLoS Path* 3(12): e 192. (2007)
34. Gemeiner, et al, 2009 P. Gemeiner, D. Mislovicová, J. Tkác, J. Svitel, V. Pätoprstý, E. Hrabárová, G. Kogan, T.L Kozár *Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics*. *Biotechnol Adv. Jan-Feb;27(1):1-15. (2009)*
35. Sharon and Lis, 2003 N. Sharon and H. Lis, *Lectins second edition*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands 105–174. (2003)
36. Kilpatrick, 2000 D.C. Kilpatrick, *Handbook of animal lectins: properties and biomedical applications*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK 59–69. (2000)
37. Sharon and Lis. 2004 N. Sharon and H. Lis, *History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules*, *Glycobiology* 14, pp. 53R–62R. (2004)
38. Kilpatrick, 2002 D.C. Kilpatrick, *Animal lectins: a historical introduction and overview*, *Biochim. Biophys. Acta* 1572, pp. 187–197.(2002)
39. Krishnaraju et al., 2006 A. V. Krishnaraju, T. V. N. Rao, D. Sundararaju, M. Vanisree, H.Tsay, G.V. Subbaraju *Biological Screening of Medicinal Plants Collected from Eastern Ghats of India Using Artemia salina (Brine Shrimp Test)*. *Intern. Jour. of App. Scie. and Engin.* 4, 2, PP. 115-125(2006)
40. Aratake, et al, 2009 Aratake S, Trianto A, Hanif N, de Voogd NJ, Tanaka J. A new polyunsaturated brominated fatty acid from a *Haliclona* sponge. *Mar Drugs*. 2;7(4):523-7. (2009)

41. Sorek, et al, 2010 H. Sorek, A. Rudi, M. Akin, E. Gaydou, Y. Kashman. Isohalitulin and haliclorensins B and C, three marine alkaloids from *Haliclona tulearensis*. *J Nat Prod.* Mar 26;73(3):456-8. (2010)
42. Hatakeyama, et al, 1994 T. Hatakeyama, H. Kohzaki, H. Nagatomo, N. Yamasaki Purification and Characterization of Four Ca<sup>2+</sup>-Dependent Lectins from the Marine Invertebrate, *Cucumaria echinata* *The J. of Bioche.* Vol. 116, Issue 1 pp. 209-214. (1994)
43. Sallay, et al, 2000 I. Sallay, S. Moriwaki, O. Nakamura, S. Yasuda, M. Kimura, N. Yamasaki, K. Itoh, H. Ohba Interaction of the hemolytic lectin, CEL-III, with cultured human leukemic cell lines. *J Hematother Stem Cell Res.* Dec;9(6):877-83. (2000)
44. Yoshida, et al. 2007 S Yoshida, Y, Shimada, D. Kondoh, Y. Kouzuma, A.Ghosh, M. Jacobs-Lorena, R. Sinden Hemolytic C-type lectin CEL-III from sea cucumber expressed in transgenic mosquitoes impairs malaria parasite development. Source: *PLOS PATHOGENS* Volume: 3 Issue: 12 Pages: 1962-1970 (2007)
45. Kuramoto, et al, 2005 T. Kuramoto, H. Uzuyama, T. Hatakeyama, T. Tamura, T. Nakashima, K. Yamaguchi, T. Oda. Cytotoxicity of a GalNAc-Specific C-Type Lectin CEL-I toward Various Cell Lines. *J Biochem* 137 (1): 41-50. (2005)
46. Mojica and Merca, 2010 E.R.E. Mojica, F.E. Merca LECTINS FROM INTERNAL ORGANS OF SEA CUCUMBERS <http://www.pcamrd.dost.gov.ph/systems/zone2/papers/8th/mojica2.pdf>.
47. Gowda, et al, 2008 N.M. Gowda, U. Goswami, M.I. Khan T-antigen binding lectin with antibacterial activity from marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*): Possible involvement in differential recognition of bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology*, Vol 99, Issue 2, pp 141-145(2008)
48. Hatakeyama, et al. 1993 T. Hatakeyama, T. Himeshima, A. Komatsu, N. Yamasaki. Purification and characterization of two lectins from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Biosci Biotechnol Biochem.*57 (10):1736-9. (1993)

## **CAPÍTULO IV**

### **Considerações finais e anexos**

## Conclusões

Frações protéicas do Echinodermata *Holothuria grisea* possuem lectinas que apresentam atividade hemaglutinante/hemolítica.

Duas lectinas, denominadas HGL e HGA foram purificadas, apresentando as seguintes características: Foram fortemente inibidas pela glicoproteína mucina e não se mostraram dependentes de íons metálicos. Suas *Mr* nativas foram estimadas em 16,8 kDa para HGL e 228 kDa para HGA, por cromatografia de filtração em gel em TSKGel. As proteínas, quando analisadas por SDS-PAGE, apresentaram *Mr* de 15,6 kDa (HGL) e 105 KDa (HGA), não sofrendo alterações na presença de  $\beta$ -Mercaptanol.

A lectina HGA foi capaz de inibir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina em 68% na dose de 1mg/kg. No ensaio de peritonite induzida por ácido acético um efeito antinociceptivo significativo foi observado por tratamento com HGA (0,1, 1 e 10 mg / kg), reduzindo as contrações em 27%, 90% e 84% respectivamente. No teste de formalina HGA mostrou efeito antinociceptivo apenas na fase inflamatória. No entanto, no teste de chapa quente HGA não apresentou efeito nociceptivo. Nos testes rota-rod e de campo aberto HGA não alterou o comportamento natural do animal. O tratamento com HGA 10 mg / kg i.v. apresentaram diminuição na atividade da MPO (81,6% de inibição) e elevou os níveis circulantes de NO em 50,4% quando comparado com o grupo controle. HGA tem demonstrado a capacidade de modular a resposta inflamatória em modelos de inflamação *in vivo*. HGA é a primeira lectina de invertebrados marinhos que mostrou um efeito antiinflamatório.

A lectina HGL foi investigada quanto sua toxicidade sobre artemias em conjunto, de forma comparativa, com extratos aquosos de vários invertebrados marinho e uma lectina com ação antitumoral da esponja marinha *C. varians*. Neste ensaio HGL apresentou um elevado efeito tóxico com um LC50 de 9.5  $\mu$ g/ml.

Os dados obtidos até o presente momento indicam que as lectinas purificadas e estudadas nesse trabalho possuem um grande potencial de utilização como ferramenta de estudo para

melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas respostas inflamatórias, nos eventos moleculares da inflamação, reconhecimento específico e tóxico sobre patógenos. Consequentemente, indicando também a espécie *Holothuria grisea* como fonte potencial de outras lectinas e moléculas bioativas de interesse biotecnológico.

## Anexo I

### Trabalhos realizados no período do Doutorado

Purificação de uma lectina das sementes de *Lonchocarpus campestris* (LCL).

Purificação de uma nova lectina da esponja marinha *Cliona varians* (CVL-II).

Análises estruturais por espectrometria de massas de lectinas dos gêneros *Meristiela*, *Canavalia* e *Lonchocarpus*.

Análises cromatográficas de hemoglobinas de 9 espécies.

Investigação sobre a presença de lectinas em 10 esponjas marinhas do litoral do RN e CE.

Purificação parcial de uma lectina de *H. caerulea*.

Coleta de dados de difração de Raio-X de cristais de lectinas no LNLS.

### Artigos publicados.

1. QUEIROZ, A.F.; MOURA, R.M.; RIBEIRO, J.K.; LYRA, I.L.; CUNHA, D.C.; SANTOS, E.A.; DE-SALES, M.P. Pro-inflammatory effect in mice of CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2008 Mar;147(2):216-21.
2. QUEIROZ, A.F.; SILVA, R.A., MOURA, R.M.; DREYFUSS, J.L.; PAREDES-GAMERO, E.J.; SOUZA, A.C.; TERSARIOL, I.L.; SANTOS, E.A.; NADER, H.B.; JUSTO, G.Z.; DE SALES, M.P. Growth inhibitory activity of a novel lectin from *Cliona varians* against K562 human erythroleukemia cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009 May;63(6):1023-33.

### Trabalhos apresentados em congressos.

1. SILVA, A. M. ; MOURA, R. M. ; CAVADA, B. S. . ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES PROTÉICAS DE FARINHA DA SEMENTE DE LONCHOCARPUS CAMPESTRIS (MART. EX BENTH.). In: Encontros Universitários 2009 UFC, 2009, Fortaleza. Encontros Universitários 2009 UFC, 2009.
2. VIANA, M. L. M. B. ; NASCIMENTO NETO, L. G. ; TAJRA, F. S. ; BASTOS, R. M. ; EVARISTO, F. F. V. ; MOURA, R. M. . AVALIAÇÃO DOS SINAIS CLÍNICOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO CICATRICAL DE LESÕES CUTÂNEAS TRATADAS COM LECTINA ISOLADA DO ORGANISMO MARINHO DA ESPÉCIE HOLOTHURIA GRISEA. In: Encontros Universitários 2009 UFC, 2009, Fortaleza. Encontros Universitários 2009 UFC, 2009.
3. RIOS, T. H. C. ; ARRUDA, F. V. S. ; NEVES, C. C. ; MOURA, R. M. ; ALVES, F. C. S. ; VASCONCELOS, M. A. . AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INFLAMATÓRIA DA LECTINA DE SEMENTES DE LONCHOCARPUS CAMPESTRIS EM MODELO MURINO DE PERITONITE. In: Encontros Universitários 2009 UFC, 2009. Encontros Universitários 2009 UFC, 2009.
4. CARNEIRO, R. F. ; MELO, A. A. ; MOURA, R. M. ; CAVADA, B. S. ; NAGANO, C. S. ; SAMPAIO, A. H. . IDENTIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE UMA NOVA LECTINA DA ESPONJA MARINHA CLIONA VARIANS (CVL2), POR CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA. In: Encontros Universitários 2009



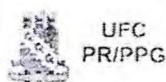
- UFC, 2009, Fortaleza. Encontros Universitários 2009 UFC, 2009.
5. Bezerra, E.H.S. ; MOURA, T. R. ; MOURA, R. M. ; Nascimento, K. S.; CAVADA, B. S. Purificação e caracterização de uma lectina presente em sementes de *Camptosema pedicellatum* Benth. In: 59 Congresso Nacional de Botânica, 2008, Natal. 59 Congresso Nacional de Botânica, 2008.
  6. SILVA, A. M. ; MELO, A. A. ; MOURA, R. M. ; CAVADA, B. S. . PURIFICAÇÃO PARCIAL DE UMA LECTINA PRESENTE EM EXTRATOS PROTÉICOS DE FARINHA DA SEMENTE DE *LONCHOCARPUS CAMPESTRIS* (MART. EX BENTH.). In: Encontros Universitários 2008 UFC, 2008, Fortaleza. Encontros Universitários 2008 UFC, 2008.
  7. MELO, A. A. ; SILVA, A. M. ; MOURA, R. M. ; SAMPAIO, A. H. . PURIFICAÇÃO PARCIAL DE UMA LECTINA HEMOLÍTICA DE HOLOTÚRIA. In: Encontros Universitários 2008 UFC, 2008, Fortaleza. Encontros Universitários 2008 UFC, 2008.
  8. CARNEIRO, R. F. ; NASCIMENTO, F. E. P. ; MOURA, R. M. ; BENEVIDES, R. G. ; SAMPAIO, A. H. . PURIFICAÇÃO PARCIAL DE UMA LECTINA DE HOLOTÚRIA. In: Encontros Universitários 2008 UFC, 2008, Fortaleza. Encontros Universitários 2008 UFC, 2008.
  9. QUEIROZ, Alexandre F. S. ; Cunha, D.C.S. ; MOURA, R. M. ; FERREIRA, C.V. ; JUSTO, G. Z. ; SILVA, R. A. ; LYRA, I. L. ; RIBEIRO, Jannison K C ; SANTOS, Elizeu A ; SALES, Maurício P. . CITOTOXICITY OF CvL, A LECTIN FROM MARINE SPONGE *CLIONA VARIANS* AGAINST LEUKEMIA CELLS LINES K562 AND K562-LUCENA. In: XXXVI Annual Meeting of the SBBq, 2007, Salvador. SBBq, 2007.

### Formação complementar

1. Ion Mobility Mass Spectrometry "Qq-IMS-oa-TOF.
2. High-resolution oa-TOF Mass Spectrometry.
3. Synapt HDMS: MALDI and High Throughput Proteomics.
4. Bioinformática e modelagem molecular de proteínas.
5. AKTA Explorer.
6. Bioinformática Estrutural.
7. Cristalografia de Proteínas.
8. Estudo sobre Planejamento de Fármacos.
9. Termodinâmica Aplicações ao estudo de biomol.

## AnexoII

## Ata de defesa de tese



## ATA DE SESSÃO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

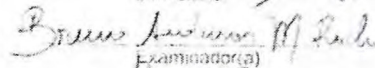
Centro/Instituição	Departamento	Curso de Pós-Graduação
Centro de Ciências	Bioquímica e Biologia Molecular	Bioquímica
ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE		
Raniere da Mata Moura		
REALIZADA NO DIA		
14 de dezembro de 2010		

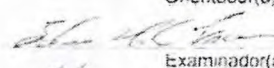
As quatorze horas do dia quatorze de dezembro de dois mil e dez realizou-se a sessão de defesa da 134ª (centésima trigesima quarta) tese de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação de autoria do aluno Raniere da Mata Moura. O trabalho tinha como título "Purificação, caracterização biológicas de lectinas do invertebrado marinho *Holothuria grisea*." Compunham a Banca Examinadora os professores doutores Benildo Sousa Cavada, orientador Bruno Anderson Matias da Rocha, Edson Holanda Teixeira, todos da Universidade Federal do Ceará, Alexandre Flávio Silva de Queiroz, Elizeu Antunes dos Santos, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. A sessão foi aberta pela professora doutora Norma Maria Barros Benevides, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica que apresentou a Banca Examinadora e passou a palavra para o presidente e este ao candidato. Após a exposição do trabalho, seguiu-se o processo de arguição do doutorando. Em seguida, a Banca Examinadora se reuniu reservadamente a fim de avaliar o desempenho do estudante, sendo atribuída a menção APROVADO. Nada mais havendo a relatar a sessão foi encerrada às 16:50 h e eu José Márcio de Souza secretário do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, lavrei a presente ata, que depois de lida e aprovada será assinada por mim, pelos membros da Banca Examinadora e pelo candidato.

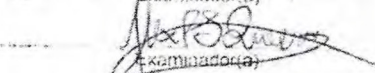
Fortaleza 14 de dezembro de 2010.

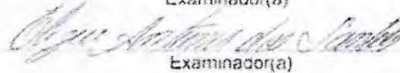
  
Secretário

  
Orientador(a)

  
Examinador(a)

  
Examinador(a)

  
Examinador(a)

  
Examinador(a)

\_\_\_\_\_  
Candidato(a)