UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA - ENSERFAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

GABRIELA PATRÍCIA MARTINS DE ALMEIDA BERNARDES

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UMA NOVA LECTINA DO PEIXE *Thalassophryne nattereri*

MACEIÓ
2018

GABRIELA PATRÍCIA MARTINS DE ALMEIDA BERNARDES

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UMA NOVA LECTINA DO PEIXE *Thalassophryne nattereri*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Francis Soares Gomes

Co-orientadora: Profa. Dra. Russolina Benedeta Zingali

MACEIÓ

2018

Catalogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Janis Christine Angelina Cavalcante – CRB:1664

B518i Bernardes, Gabriela Patrícia Martins de Almeida.
Isolamento, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de uma nova lectina do peixe *Talassophryne nattereri* / Gabriela Patrícia Martins de Almeida Bernardes. – 2018.
53f. : il.

Orientador: Francis Soares Gomes.
Coorientadora: Russolina Benedita Zingali.
Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 44-53.

1. Lectina. 2. Muco de peixe. 3. *Talassophryne nattereri*. 4. Atividade antiomicriobiana I. Título.

CDU: 577.1

GABRIELA PATRÍCIA MARTINS DE ALMEIDA BERNARDES

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE UMA NOVA LECTINA DO PEIXE *Thalassophryne nattereri*

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 28 de março de 2018.

Banca Examinadora:

_____

Prof. Dr. Francis Soares Gomes - Universidade Federal de Alagoas (Orientador)

_____

Profa. Dra. Edma Carvalho De Miranda - Universidade Federal De Alagoas

(Examinador Externo)

_____

Prof. Dr. Hugo Juarez V. Pereira - Universidade Federal De Alagoas

(Examinador Interno)

TSUTSUI, S. et al. A unique epidermal mucus lectin identified from catfish (*Silurus asotus*): first evidence of intelectin in fish skin slime. **The Journal Biochemistry**, 150, n. 5, 2011a. 501-514.

TSUTSUI, S. et al. A new type of lectin discovered in a fish flathead (*Platycephalus indicus*), suggests an alternative functional role for mammalian plasma kallikrein. **Glycobiology**, 21, n. 12, 2011b. 1580-1587.

VASTA, G. R. et al. Structural and functional diversity of the lectin repertoire in teleost fish: relevance to innate and adaptative immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, 35, n. 12, 2011. 1388-1399.

VASTA, G. R.; AHMED, H. Introduction to Animal lectins. In: VASTA, G. R.; AHMED, H. **Animal lectin:** a functional view. 1. ed. [S.l.]: Taylor & Francis Group/CRC Press, 2008. Cap. 1, p. 3-9.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4. ed. [S.l.]: Artmed, 2013.

WATANABE, Y. et al. Lectins of marine origin and their clinical applications. In: FANG, E. F.; NG, T. B. **Antitumor potential and other emerging medicinal properties of natural compounds**. [S.l.]: Springer, Dordrecht, 2013. Cap. 4, p. 33-54.

WEIDENBACH, D. et al. Polarized defense against fungal pathogens is mediated by the jacalin-related lectin domain of modular Poaceae-specific proteins. **Molecular Plants**, 9, n. 4, 2016. 514-527.

WILSON, M. E.; PEARSON, R. D. Stage-specific variations in lectin binding to *Leishmania donovani*. **Infection and Immunity**, 46, n. 1, 1984. 128-134.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The envolving threat of antimicrobial resistance: options for action**. WHO. France. 2012.

ZHANG, M.; HU, Y.; SUN, L. Identification and mlecular analysis of a novel C-type lectin from *Scophthalmus maximus*. **Fish & Shellfish Immunology**, 29, n. 1, 2010. 82-88.

Dedico

Aos meus filhos, Gabriel e Esdras, que tiveram de lidar com minha ausência e minha pressa nesses dois longos anos.

“Não importa quanto a vida possa ser ruim, sempre existe algo que você pode fazer, e triunfar. Enquanto a vida, há esperança. ”

Stephen Hawking

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo apoio incondicional de sempre. Agradeço ao meu pai e à minha mãe, pela a sua generosidade e amor. Agradeço as minhas irmãs, pelo carinho e pela torcida.

Sou muito grata ao Professor Francis Soares, meu orientador, pela paciência, apoio e confiança. Obrigada pela sua valiosa orientação!

O meu esposo, Chrysthian Bernardes, merece meu agradecimento especial, por sempre estar ao meu lado, compreendendo, acreditando, incentivando, aconselhando e cuidando de nossos filhos para que eu pudesse me dedicar mais à pesquisa. Obrigada por seu amor recíproco! Aos meus queridos filhos, Gabriel Didier e Esdras Didier, que foram privados da minha presença, mas que sempre foram compreensíveis e amáveis. Não tenho palavras para expressar a alegria e o orgulho que sinto de ser mãe de dois rapazes maravilhosos como vocês! Amo vocês de todo meu coração!

Não posso deixar de agradecer aos meus companheiros de bancadas Janaína Kívia e Ricardo Costa pelo companheirismo, pela paciência, pelas contribuições ao longo do processo de elaboração desse trabalho. Agradeço a amizade de vocês!

Agradeço também à equipe do Laboratório de Diversidade Molecular, especialmente ao Gustavo e a Profª Melissa Landell, pela acolhida e contribuições para os experimentos microbiológicos.

Um agradecimento à equipe do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, em particular aos colegas Antônio Thomás e Josiel, pela parceria nessa empreitada.

Com carinho, agradeço aos meus colegas e professores do Laboratório de Metabolismo e Proteômica pela convivência harmoniosa e pelos momentos de socialização inestimáveis que tivemos.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de forma direta e indireta pela a realização deste sonho!

RESUMO

As lectinas são proteínas que possuem a capacidade de se ligarem reversivelmente a carboidratos, apresentando uma ampla variedade de atividades biológicas. Essas proteínas estão presentes em quase todos os organismos vivos. Diversas lectinas foram isoladas e posteriormente caracterizadas de vários peixes. O *Thalassophryne nattereri* é um peixe peçonhento que habita a região Norte e Nordeste do Brasil e é uma rica fonte de lectina, a qual pode ser encontrada em sua peçonha. Dentre as atividades biológicas que as lectinas podem apresentar destaca-se a atividade antimicrobiana, que consiste na capacidade de inibir o crescimento de microrganismos. Assim, a presente pesquisa teve como objetivo purificar e caracterizar uma nova lectina encontrada no peixe *T. nattereri* e avaliar a atividade antimicrobiana dessa lectina sobre os microrganismos de importância médica. A lectina denominada TnSL foi isolada através da cromatografia de gel de filtração (FPLC, Sephacryl S-100, Tris-HCl 50mM NaCl 0,5M, pH 8,0) do extrato bruto do muco do peixe, obtido através da raspagem da pele do peixe. A presença da proteína na amostra foi verificada através da atividade hemaglutinante (AH). TnSL foi caracterizada por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sulfato sódico de dodecila (SDS-PAGE 12%), além de teste de inibição de carboidratos, estabilidade térmica e avaliação da estabilidade em diversos valores de pH e a íons. A atividade antimicrobiana da lectina sobre o crescimento dos microrganismos foi avaliada através da determinação inibitória mínima (MIC) em bactérias e fungos. A cromatografia em gel de filtração mostrou um único pico de proteína com atividade hemaglutinante e o SDS-PAGE 12% revelou uma única banda de aproximadamente 20kDa. TnSL apresentou estabilidade témica e a diferentes valores de pH. Trata-se de uma lectina Ca-independente com atividade bacteriostática, porém não apresentou atividade antifúngica contra as leveduras testadas. Nesse contexto, um único passo cromatográfico resultou em uma nova lectina presente nessa espécie de peixe, que foi isolada pela primeira vez através deste trabalho, cujo potencial antimicrobiano e biotecnológico está em estudo.

Palavras-Chaves: Lectina, Muco, *T. nattereri*, Bactéria, Fungo.

ABSTRACT

Lectins are proteins that have the ability to bind reversibly to carbohydrates and exhibit a wide variety of biological activities. Furthermore, these proteins are present in almost all living organisms, several lectins were isolated and subsequently characterized in various fish. The *Thalassophryne nattereri* is a venomous fish that inhabits the North and Northeast Brazil and is a rich source of lectin, which can be found in its venom. Among the biological activities that have lectins is antimicrobial activity, which is the ability to inhibit the growth of microorganisms. Thus, this research aimed to purify and characterize a new lectin found in *T. naterreri* fish and evaluated the antimicrobial activity of lectin on microorganisms of medical importance. The lectin called TnSL was isolated by filtration gel chromatography (FPLC, Sephacryl S-100, 50mM Tris-HCl 0,5M NaCl pH8,0) from the crude extract of the fish mucus, obtained by scraping the fish skin. The presence of protein in the sample was verified by hemagglutination activity (HA). TnSL was characterized by polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE 12%), as well as carbohydrate inhibition test, thermal stability and evaluation of stability at various pH and ion values. The antimicrobial activity of the lectin on the growth of the microorganisms was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) in bacteria and fungi. Filtration gel chromatography showed a single protein peak with hemagglutinating activity and 12% SDS-PAGE revealed a single band of approximately 20kDa. TnSL presented thermal stability and at different values of pH. It was a Ca-independent lectin with bacteriostatic activity, but did not showed antifungal activity against the yeasts tested. In this context, a single chromatographic step resulted in a new lectin present in this fish species, which was isolated for the first time through this work, whose antimicrobial and biotechnological potential is under study.

Keywords: Lectin, Mucus, *T. nattereri,* Bacteria, Fungi.

LISTA DE SIGLAS

AH: Atividade hemaglutinante;

AHE: Atividade hemaglutinante específica;

AJL-1: Lectina da *Anguilla japonica* 1;

AJL-2: Lectina da *A. japonica* 2;

Asn: Asparagina;

Asp: Ácido aspártico;

BHI: Brain Heart Infusion;

Ca^{2+}: Cálcio;

CLTD: Domínio semelhante a lectina tipo C;

CMF: Concentração Mínima Fungicida;

CMI: Concentração Mínima Inibitória;

ConCL-s: Lectina da pele de *Conger myrister* ;

CRD: Domínio de Reconhecimento de Carboidratos;

CRD RBL: Domínio tipo lectina ligadora de L-rhamnose;

CSL: Lectina de salmão cão;

CTL: Lectina tipo-C;

DDD: Dispositivos de entrega de drogas;

EPN: Resíduos de ácido glutâmico, prolina e asparagina;

FHL: Lectina flathead;

Gln: Glutamina;

PFL-1: Lectina de ponyfish 1;

PFL-2: Lectina de ponyfish 2;

PRR: Receptores de Reconhecimento de Patógenos;

QDNVY: Resíduos de glutamina, ácido aspártico, asparagina, valina e tirosina;

QPD: Resíduos de glutamina, prolina e ácido aspático;

RBL: Lectina ligadora de L-rhamnose;

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

STL: Lectina de *Salvelinus leucomaenis*;

Tyr: Tirosina;

Val: Valina;

WND: Resíduos de triptofano, asparagina e ácido aspártico;

YPD: Yeast extract – Peptone – Dextrose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da interação da lectina com um carboidrato. 15

Figura 2 - Representação esquemática de aglutinação de bactérias mediada por lectinas. 29

Figura 3 - Representação esquemática do processo de atividade hemaglutinante e sua inibição por carboidratos livres. 29

Figura 4 - Peixe sapo (*Thalassophryne nattereri*). 30

Figura 5 - Aparato e mecanismo de inoculação da peçonha do *T. nattereri.* 31

Figura 6 - Cromatograma da purificação da lectina TnSL em coluna de gel de filtração Sephacryl S-100 (GE Healthcare) eluída em Tris/HCl 50 mM, pH 8,0, 0,5 M NaCl. .36

Figura 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%. 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela de Purificação de TnSL. 37

Tabela 2 - Inibição da Atividade Hemaglutinante (IAH) com carboidratos. 40

Tabela 3 - Atividade antibacteriana da do extrato e peçonha de *T. natereri.* 41

Tabela 4 - Atividade antibacteriana da lectina do *T. natereri* (TnSL).....42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Estabilidade térmica da TnSL. 38

Gráfico 2 - Estabilidade da TnSL frente a diferentes valores de pH. 39

Gráfico 3 - Estabilidade de TnSL na presença de íons metálicos.....39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12
1.1 Objetivos 13
1.1.1 Objetivo Geral 13
1.1.2 Objetivos Específicos 13

2 LECTINAS 14
2.1 Lectinas do muco de peixes 16
2.2 Classificação das lectinas do muco de peixes 18
2.2.1 Galectinas 19
2.2.2 Lectina tipo C 21
2.2.3 Lectina tipo Lily 23
2.2.4 Lectina ligadora de L-rhamnose 24
2.2.5 Outras lectinas 25
2.3 Propriedades biológicas e potencial biotecnológico de lectinas de muco de peixes 26
2.4 Purificação de lectinas 28
2.5 *Thalassophryne nattereri* 30

3 MATERIAL E MÉTODO 33
3.1 Extração do muco 33
3.2 Microrganismos 33
3.3 Isolamento da lectina da secreção de *T. nattereri* 33
3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida 33
3.5 Atividade hemaglutinante (AH) 34
3.6 Ensaio de Bradford para quantificação proteica 34
3.7 Ensaio de especificidade de carboidratos 34
3.8 Avaliação de estabilidade térmica e efeito do pH e dos íons na atividade hemaglutinante 34
3.9 Avaliação de atividade antimicrobiana 35
3.9.1 Atividade Antibacteriana 35
3.9.2 Atividade Antifúngica 35

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES 36
4.1 Purificação e identificação da lectina 36

4.2 Determinação da estabilidade térmica e efeito do pH e íons na atividade hemaglutinante 38
4.3 Inibição da atividade hemaglutinante 40
4.4 Ensaio da atividade antibacteriana 41
4.5 Ensaio da atividade antifúngica 42

5 CONCLUSÃO 43

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 44

1 INTRODUÇÃO

As lectinas representam um grupo heterogêneo de proteínas que variam amplamente em tamanho, estrutura, organização molecular, bem como na constituição de seus sítios de interação (FARIAS, 2013). A capacidade de se ligarem de maneira seletiva e reversível aos carboidratos, permitem que essas proteínas desempenhem uma ampla variedade de atividades biológicas.

As lectinas foram descritas primeiro por Stillmark em 1888, que observou a aglutinação de hemácias enquanto estudava o efeito tóxico de extratos de *Ricinus communis* (mamona) no sangue, devido a uma proteína extraída conhecida por ricina. Esta descoberta marcou o início das pesquisas envolvendo lectinas (KENNEDY et al.,1995 *apud* GOMES, 2009). Contudo, o estudo sobre estas proteínas começou a ser impulsionado apenas em 1960, ampliando as possibilidades de aplicação para as lectinas (GABOR, BOGNER, *et al.*, 2004).

Este reconhecimento entre proteínas e carboidratos é de importância fundamental em muitos processos biológicos como infecções virais, bacterianas, de micoplasmas e de parasitas, na marcação de células, fertilização, metástases e no crescimento e diferenciação celular (PARK, KIM, *et al.*, 2000).

Thalassophryne nattereri é um peixe peçonhento que habita o Norte e Nordeste do Brasil, pertencente à família Batrachoididae. Responsável por inúmeros casos de acidentes com humanos, principalmente pescadores. Este animal é uma rica fonte de lectina, que pode ser encontrada tanto na peçonha desse peixe quanto no muco que recobre o seu corpo.

Lectinas encontradas em peçonha de animais têm sido objeto de alguns estudos (LOPES-FERREIRA, MAGALHÃES, *et al.*, 2011); (MAGALHÃES, LOPES-FERREIRA, *et al.*, 2005), visando compreender as vias de indução de resposta imune (KOMEGAE, RAMOS, *et al.*, 2011), isolamento e caracterização (GUIMARÃES-GOMES, OLIVEIRA-CARVALHO, *et al.*, 2004). Contudo sua interação com microrganismos é pouco explorada (NUNES, DE SOUZA, *et al.*, 2011).

Complicações decorrentes de infecções por fungos ou bactérias, assim como, a busca por produtos bioativos que venham a reduzir esses tipos de infecções

consistem em um desafio para a medicina e para a ciência até os dias atuais. Dessa forma, o desenvolvimento de pesquisas que visem investigar a interação entre esses microrganismos e as lectinas torna-se um grande aliado na ciência na busca de compostos que possa combater as infecções por microrganismos.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Isolar, caracterizar e avaliar a lectina a do muco do peixe *Thalassophryne nattereri* quanto a atividade antimicrobiana contra microrganismos de importância médica.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Isolar a lectina da secreção de *T. nattereri;*
- Caracterizar a lectina obtida quanto ao perfil proteico e efeito de íons, temperatura e valores de pH na atividade hemaglutinante da lectina;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da lectina isolada da secreção de *T. nattereri;*
- Determinar a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima fungicida (CMF);

2 LECTINAS

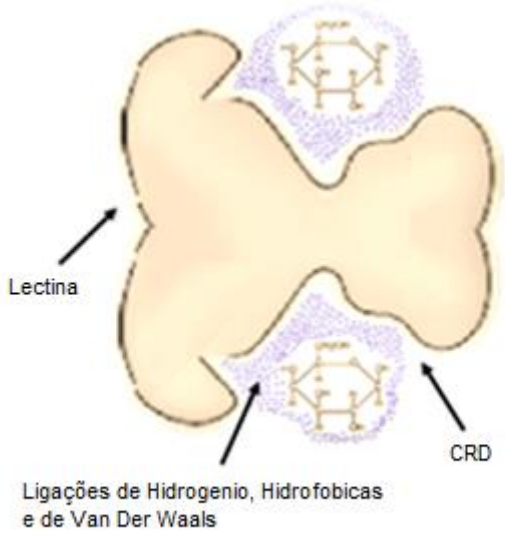
Segundo Rodwell, Bender *et al.* (2017) as lectinas são proteínas de origem não imunológica capazes de aglutinar células através de sua interação específica e transitória com os carboidratos presentes na superfície celular. Como bem nos assegura Nelson e Cox (2014), as lectinas são proteínas capazes de decifrar o código dos carboidratos e participam de muitos processos biológicos, como no combate às infecções em gerais, reconhecimento, sinalização e adesão celular.

Para Maciel Carvalho, Bezerra *et al.* (2012, p. 880) as lectinas servem para muitos propósitos. Na imunidade inata, por exemplo, essa molécula funciona como receptores de reconhecimento de patógenos (PRPs), induzindo a proliferação de linfócitos, opsonização, fagocitose ou ativação do complemento. Essas proteínas identificam células estranhas como "não-própria" através do reconhecimento de carboidratos expressos na superfície celular dos patógenos e subsequentemente induzem sua destruição por ativação do complemento e/ou células fagocitárias.

Por esses motivos que as lectinas tem despertado o interesse de muitos pesquisadores, que veem nessas moléculas um grande potencial biotecnológico. Uma vez que elas podem ser utilizadas como receptores de reconhecimento moleculares, ativador do sistema complemento, inibidores celulares, adjuvantes no processo de detecção e separação de glicoproteínas entre outras aplicações.

As lectinas reconhecem e interagem de maneira seletiva e bastante específica com os carboidratos presente na superfície celular através da mediação dos domínios de reconhecimento de carboidratos (CDR) por intermédio de ligações não covalentes, como ligações iônicas, de hidrogênio, hidrofóbicas e de Van de Walls (DA SILVA, 2018) (Figura 1). Cita-se, como exemplo, a lectina presente no soro de um peixe Amazônico (*Colossoma macropomum*), também conhecido como Tambaqui, que tem a capacidade de reconhecer os carboidratos presentes na superfície celular das bactérias patogênicas de peixes de água doce, inibindo o crescimento desses microrganismos (MACIEL CARVALHO, BEZERRA, *et al.*, 2012).

Figura 1 – Representação esquemática da interação da lectina com um carboidrato.



Fonte: Adaptado de PROCÓPIO, MOURA, *et al.*, 2017.

Ainda para Maciel Carvalho, Bezerra *et al.* (2012), as lectinas estão presentes na natureza e, devido a sua propriedade única de reconhecer carboidratos, elas podem se ligar a açúcares presente na superfície da célula desempenhando vários processos celulares, como reconhecimento celular, simbiose, opsonização e apoptose. Estas características têm sido utilizadas em várias aplicações biotecnológicas como em estudos de proliferação de linfócitos, atividade antimicrobiana e regeneração celular.

Nesse sentido, as lectinas permitem identificar a presença de patógenos e/ou moléculas-alvos em estudos variados. A exemplo disso tem-se o uso das lectinas para testes diagnósticos, onde as lectinas são capazes tanto de identificar diretamente os patógenos, quanto são eficientes para diferenciar entre suas formas de vidas, bem como reconhecer padrões de glicosilação entre células normais de tumorais (GHAZARIAN, IDONI e OPPENHEIMER, 2011); (WATANABE, NAGANUMA, *et al.*, 2013); (WILSON e PEARSON, 1984); (LI, SIMEONE, *et al.*, 2009); (COULDREY e GREEN, 2000). Além disso podem ser fontes alternativas a fármacos em caso de resistência microbiana.

A resistência microbiana tem se tornado uma das grandes preocupações mundial. Estima-se que as infecções por microrganismo têm se tornado cada vez mais graves, dispondo de fármacos cada vez menos eficazes. O custo anual para tratamento é muito elevado e o risco para a população é alarmante. Dentre as medidas para evitar ou diminuir esta ameaça está o incentivo por desenvolvimento de novos medicamentos. Contudo, a resistência caminha a passos mais largos que o desenvolvimento de novos fármacos. De forma que estudos que possam contribuir com novas alternativas são encorajados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

Logo, é importante compreender que essas moléculas estão disponíveis na natureza em todos os organismos vivos e desempenham atividade biológica bem diversificada. Muito já se conhece sobre as lectinas de origem vegetal, que são exaustivamente estudadas desde a sua primeira observação em 1888, por Stillmark (GABIUS, 2013). Diferentemente das lectinas animais, que mais recentemente tem despertado o interesse dos pesquisadores, em especial as lectinas encontradas no soro, plasma, muco e ovos de peixes. As lectinas de organismos marinhos vêm acrescentando a essa área de estudo grandes contribuições. Nesse sentido, vamos apresentar um breve panorama das lectinas já conhecidas que foram encontradas no muco dos peixes.

2.1 Lectinas do muco de peixes

A epiderme do peixe está susceptível a ataque de patógenos presente no meio externo, uma vez que o ambiente aquático é perfeito para a proliferação de microrganismos patógenos. Está secreção que recobre o corpo dos peixes constitui-se em um mecanismo de barreira contra a invasão de microrganismos patogênicos do meio externo (HUANG, MA e WANG, 2009). Atualmente já é conhecido a presença de substâncias envolvidas na defesa do sistema imune, como as lectinas, presente no muco dos peixes.

Estas proteínas estão presentes em quase todos tecidos dos peixes: soro, plasma, músculos, ovos fertilizados e muco. O papel da lectina é identificar e ligar diferentes substâncias produzindo reações aglutinantes e impedindo a entrada de microrganismos nos peixes. Dessa forma, o muco do peixe constitui a primeira barreira bioquímica contra o ataque de patógenos.

A primeira lectina encontrada em um teleósteo, foi uma lectina carboidrato específica extraída de uma enguia por Watkins & Morgan em 1952, que posteriormente foi identificada como ligadora de L-fucose (GABIUS, 2013). Desde então, o número de lectinas encontradas nesse grupo tem aumentado significativamente. Seja por ter despertado o interesse dos pesquisadores desta área, seja pelo desenvolvimento da tecnologia que permitiu acelerar o desenvolvimento das pesquisas com lectinas.

Com o advento da tecnologia recombinante, a partir dos anos 80, as pesquisas com lectinas puderam ser mais rapidamente desenvolvidas e isso trouxe grandes contribuições nessa área de estudo. Já era conhecido que essas proteínas ocorriam internamente no organismo animal, entretanto descobriu-se que elas também poderiam ocorrer em secreções da superfície corporal de alguns animais, principalmente em peixes. As primeiras observações da presença dessas proteínas no muco de peixe datam dos anos 80, quando Kamiya & Shimizu (1980) observaram lectina no muco do corpo da sôia, *Lophopsetta maculata*, e Ingran (1980) propôs que a superfície do corpo de peixes continha lectinas e as descreveu como proteínas ligadoras de carboidratos.

Posteriormente, diversos trabalhos descrevendo a purificação de lectina no muco de peixes foram conduzidos, incluindo o do bagre do Golfo Árabe, *Arius thalassinus* (AL-HASSAN, THOMSON, *et al.*, 1986), em enguia *Conger myriaster* (KAMIYA, MURAMOTO e GOTO, 1988); (SHIOMI, UENATSU, *et al.*, 1989), dragonete *Repomucenus richardsonui* (SHIOMI, UEMATSU, *et al.*, 1990), dojô *Misgurnus anguillicaudatus* (GOTO-NANCE, WATANABE, *et al.*, 1995), abadejo *Genypterus capensis* (TODA, GOTO-NANCE, *et al.*, 1996). Estes trabalhos demonstraram a presença da lectina na superfície desses peixes e que a mesma está associada com a imunidade humoral, apresentando competência equivalente a do complemento e imunoglobulinas.

Da mesma forma a estrutura molecular e função biológicas destas moléculas que raramente eram relatadas anteriormente, devido à falta de tecnologia necessária, agora se tornou alvo das pesquisas nessa área. O primeiro estudo relatando simultaneamente a localização e função biológica foi o da lectina presente no tecido epitelial da enguia *Anguilla japonica*, realizado por Suzuki (1985) e Suziki & Kaneko

(1986). Subsequentemente, a lectina do muco da enguia *Conger myriaster* foi sequenciada por Muramoto e Kamiya (1992). Em 1999, esses autores apresentaram a classificação estrutural da lectina do muco da superfície corporal da enguia, denominadas de congerinas I e II (MURAMOTO , KAGAWA, *et al.*, 1999).

Outros estudos estruturais baseados no CRD e na dependência de Ca^{2+} da lectina do muco para aglutinar, foram conduzidos, como o da enguia *Anguilla japonica* (TASUMI , YANG, *et al.*, 2004), *Leiognathus nuchalis* (OKAMOTO, TSUTSUI, *et al.*, 2005) e fugu *Takifugu rubripes* (TSUTSUI, OKAMOTO, *et al.*, 2006a). Pesquisas recentes envolvendo lectinas do muco de peixes se concentram na elucidação da diversidade estrutural molecular e nas funções biológicas que essas proteínas podem desempenhar. A exemplo, dos trabalhos com corvina amarela gigante *Larimichthys crocea* (LV, ZHANG e WANG, 2016), bacalhau do Atlântico *Gadus morhua* (RAJAN, FERNANDES, *et al.*, 2011) e do cabeça-chata *Platycephalus indicus* (TSUTSUI, OKAMOTO, *et al.*, 2011b). Em suma, pode se afirmar que as lectinas do muco de peixes têm ampla diversidade molecular e que os estudos dessas proteínas têm se mostrado promissor.

2.2 Classificação das lectinas do muco de peixes

As lectinas animais são classificadas com base, principalmente, na estrutura dos CRDs. Por se tratar de uma classe de proteínas com estruturas bem diversificada, existem também um número grande de famílias de lectinas. Segundo Vasta e Ahmed (2008) as lectinas animais estão classificadas atualmente como: lectinas do tipo C, galectinas, tipo P, tipo I, pentraxinas, ligadora de heparina, tipo F, calnexina, tipo M, tipo L, tipo R, F-box, ficolina, tipo quitinase (quilectinas) e intelectinas (tipo X). E ainda, o grupo das lectinas ligadoras de rhamnose (TATENO, OGAWA, *et al.*, 2002).

No que diz respeito as lectinas do muco de peixes, até o momento foram identificados 6 tipos de lectinas, denominadas: galectina, lectina do tipo C, lectina do tipo Lily, lectina ligadora de L-rhamnose, intelectina (HUANG, MA e LEI, 2013). E adicionalmente, Tsutsui *et al.* (2011b) propôs a criação da família das caliclectinas.

Existe um grande número de famílias de lectinas animais. Porém esse número ainda pode aumentar, uma vez que os estudos dessas proteínas têm atraído a atenção de vários pesquisadores. A exemplo das lectinas do muco de peixes, que

com suas propriedades únicas tem contribuído para a expansão dos números de famílias desse grupo de proteínas. Segundo Vasta e Ahmed (2008), a classificação das lectinas tem sido muito mais específica devido a disponibilidade da sequência de aminoácidos e da estrutura de cristal dessas moléculas, baseada nos domínios de reconhecimento de carboidratos.

A galectina é o grupo de lectina mais abundante no muco da pele dos peixes e possui a capacidade de se ligar especificamente a galactose ou a lactose. Seguida pela lectina do tipo C, encontrada na enguia *Anguilla japonica*. Denominada de Lily, a lectina extraída do fugu apresenta estrutura similar a das lectinas de plantas. Já a lectina ligadora de L-rhamnose possui homologia com as lectinas presentes em ovos de peixes. Em sequência, uma lectina endógena, denominada intelectina, presente no muco do peixe gato, e a caliclectina, encontrada no muco do peixe cabeça-chata e exibe similaridade estrutural com a calicreína plasmática e o fator de coagulação XI de mamíferos (HUANG, MA e LEI, 2013).

2.2.1 Galectinas

As galectinas são uma família de lectinas animais que possuem um CRD conservado, com aproximadamente 130 resíduos de aminoácidos e especificidade para β-galactosídeos. Presente na maioria dos mucos de peixes, a galectina apresenta atividade independente de Ca^{2+}, N-terminal bloqueado (extremidade amina modificada), ausência de peptídeo sinal (sequência de aminoácidos responsável pelo endereçamento da proteína), ausência de glicosilação e a maioria está localizada no citoplasma das células (KILPATRICK, 2000).

Cerca de 15 tipos de galectinas foram identificados até o momento. Eles podem ser subdivididos em três grupos de acordo com a quantidade e disposição dos CRDs: os prototípicos, são aquelas que possuem um CRD (galectina-1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 15); o tipo quimera, que possui um CRD ligado a um domínio N-terminal rico em prolina, glicina e tirosina (galectina-3); e o tipo tandem repetido, que possuem dois CRDs distintos conectados por uma ponte de mais de 70 aminoácidos (galectina-4, 6, 8, 9 e 12). Acredita-se que essas proteínas estejam envolvidas em diversos processos biológicos, como: imunomodulação, adesão celular, regulação de crescimento,

inflamação, apoptose, desenvolvimento e progressão de neoplasias (LIU e RABINOVICH, 2005);(HOKAMA, MIZOGUCHI e MIZOGUCHI, 2008).

Além dos mamíferos, alguns peixes teleósteos apresentam galectinas no muco da pele, como as galectinas encontradas nas enguias *C. myriaster* (MURAMOTO e KAMIYA, 1992 ; MURAMOTO , KAGAWA, *et al.*, 1999) e *A. japonica* (TASUMI, OHIRA, *et al.*, 2002). Bem como as aglutininas presentes nos mucos da enguia *Lycodontis nudivomer* (RANDALL, AIDA, *et al.*, 1981), do peixe-gato *A. thalassinus* (AL-HASSAN, THOMSON, *et al.*, 1986), e do dragonete *R. richardsonui* (SHIOMI, UEMATSU, *et al.*, 1990) são consideradas galectinas devido a reação de afinidade de carboidratos apontarem a especificidade com galactose. Dessa forma, é possível que outros teleósteos também possuam galectinas presente no muco da pele.

A respeito das lectinas isoladas em *C. myriaster*, Muramoto e Kamiya (1992) observaram que as congerinas I e II apresentavam atividade hemaglutinante (AH) tanto para eritrócitos de coelho, quanto para os de cavalo e ovelha, além de aglutinar uma bactéria marinha, a *Vibrio anguillarum.* Ambas lectinas apresentam massa molecular de aproximadamente de 30kDa, porém cargas elétricas distintas. Ainda segundo estes autores, essas galectinas são exclusivas do muco e apresentam AH independente de cátions divalentes. Possuem especificidade a derivados de galactose, particularmente lactose.

A sequência de aminoácido destas lectinas foram determinadas, e a estrutura das congerinas foi caracterizada como sendo homodimérica, na qual cada subunidade consiste de 135 resíduos de aminoácidos, incluindo um N-terminal acetilado e sem resíduos de cistina. Congerina II apresenta apenas 47% de homologia com a sequência de congerina I, apesar dessas proteínas apresentarem muitas estruturas secundárias semelhantes. Ambas exibem sequências homologas de aproximadamente 35% com as galectinas de mamíferos e pertencem a família de galectinas prototípicas (MURAMOTO , KAGAWA, *et al.*, 1999).

O muco da *A. japonica* também apresenta duas lectinas, denominadas AJL-1 e AJL-2. Entretanto, apenas AJL-1 exibe especificidade para β-galactosídeos, independente de cátions divalentes. Tasumi *et al*. (2004) a descreveu como homodimérica sem ligações covalentes, com massa molecular de 30kDa, composta

por 142 resíduos de aminoácidos e apresentando homologia com os membros da família de galectinas prototípicas. Sua expressão foi observada apenas na pele e é capaz de aglutinar a bactéria patogênica *Streptococcus difficile.*

Uma análise comparativa de AJL-1 com as congerinas revela que esta possui 45% de homologia com a congerina II, lectina mais abundante no muco da *C. myriaster*, e exibe três diferentes resíduos de aminoácidos em seu CRD, similar a estrutura da congerina I (SHIRAI, MITSUYAMA, *et al.*, 1999). A similaridade destas proteínas reforça a evidência do papel da lectina do muco no reconhecimento e defesa contra invasões de microrganismos patogênicos.

2.2.2 Lectina tipo C

Lectinas do tipo-C (CTL) são proteínas animais que exibem propriedades ligadoras de carboidratos dependente de Ca^{2+} e uma variedade estrutural significativa. Membros desta família apresentam um ou mais domínio de reconhecimento de carboidratos, o C-type lectin-like domain (CLTD), e o domínio funcional pode apresentar 2 ou 3 pares de ligações sulfúrica, formando uma estrutura distinta e estável (HUANG, MA e LEI, 2013). Esses domínios são bastante conservados apresentado motivos de ligação de carboidratos.

As CTLs são classificadas em duas principais categorias de proteínas: as manose-específico com motivo EPN (resíduos de ácido glutâmico, prolina e asparagina) e a galactose-específica com motivo QPD (resíduos de glutamina, prolina e ácido aspártico) (VASTA e AHMED, 2008). Funcionalmente as CTLs provaram participarem de vários processos imunes, tais como, reconhecimento de patógenos, adesão celular, sinalização intercelular, entre outros. Em peixes já foram descritas várias CTLs, como em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (JOHANSSON, WANG, *et al.*, 2016), carpa comum *Cyprinus carpio* (NAKAO e YANO, 2006), salmão do Atlântico *Salmo salar* (RICHARDS, HUDSON, *et al.*, 2003), falso alabote japonês *Paralichtys olivaceus* (KONDO, TZEH, *et al.*, 2007), grande rodovalho *Scophtalmus maximus* (ZHANG, HU e SUN, 2010), niquim *Thalassophryne nattereri* (LOPES-FERREIRA, MAGALHÃES, *et al.*, 2011), peixe escorpião *Scorpaena plumieri* (ANDRICH, RICHARDSON, *et al.*, 2015) e corvina amarela gigante *Larimichthys crocea* (LV, ZHANG e WANG, 2016).

Embora seja comumente encontrada no interior dos organismos, como todas as CTLs citadas acima, existem relatos da presença dessas proteínas também na superfície corporal de alguns peixes. A AJL-2 é uma lectina que foi extraída do muco que recobre o corpo da *A. japonica* e apresenta estrutura molecular similar a lectina tipo C, com atividade específica de lactose e tanto aglutina *Escherichia coli* quanto inibe o seu crescimento (TASUMI, OHIRA, *et al.*, 2002). Adicionalmente, conCL-s é outra CTL, encontrada no muco da *C myriaster*, com atividade manose-específica e que aglutina a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Porém estas lectinas não apresentam atividade dependente de cátions divalentes (TSUTSUI, IWAMOTO, *et al.*, 2007).

Estruturalmente AJL-2 é um homodímero ligado covalentemente por ligações dissulfeto, resultante de 4 resíduos de cisteínas. Apresenta aproximadamente 30% de homologia com várias CTLs, com sequência de aminoácidos altamente conservados do CRD, apesar de mostrar atividade independente de Ca^{2+}. Esta lectina é produzida nas células claras do epitélio e secretada para a superfície corporal, onde é exclusivamente encontrada como um componente do muco. Além disso, AJL-2 possui a capacidade de aglutinar *Escherichia coli* e adicionalmente inibir o seu crescimento numa concentração de 1µg/ml, sugerindo sua participação na defesa do hospedeiro (TASUMI, OHIRA, *et al.*, 2002).

De acordo com Tsutsui *et al.* (2007), conCL-s possui estrutura tretamérica, consistindo de dímeros associados não covalentemente que são ligados para formar a estrutura tetramérica por pontes dissulfetos. Esta lectina é produzida nas células claras do epitélio, mas pode ser encontrada tanto internamente quanto externamente no peixe. Em comparação com outra CTLs, conCL-s exibiu alta homologia com várias lectinas do tipo-C e apresentou motivos EPN no seu CRD e WND (resíduos de triptofano, asparagina e ácido aspártico) no sítio de ligação do íon divalente. Possui atividade aglutinante a levedura *S. cerevisiae* e a bactéria *E. coli*.

Não há dúvidas que ambas as lectinas, AJL-2 e conCL-s, fazem parte da família de lectinas tipo C, mesmo apresentando atividade independente de cátion divalente. Em comparação com as congerinas, lectinas encontrada no muco da *C. myriaster* e que pertence a familia das galectinas, AJL-2 não apresenta homologia com essas proteínas. Com relação a conCL-s, apesar de serem produzidas pelo mesmo tipo de

células, e serem encontradas no muco do mesmo peixe, as congerinas diferem estruturalmente, pertencendo a famílias distintas de lectinas. Mesmo AJL-2 e conCL-s que pertencem a mesma superfamília de lectinas, estão agrupadas em famílias distintas devido a suas diferenças estruturais e especificidade a carboidratos diferentes. Contudo, ambas lectinas são capazes de aglutinar *E. coli*, sendo que AJL-2 também é capaz de inibir o crescimento destas bactérias, enquanto conCL-s apenas aglutina a bactéria citada e adicionalmente levedura (SHIOMI, UENATSU, *et al.*, 1989); (TASUMI, OHIRA, *et al.*, 2002); (TSUTSUI, IWAMOTO, *et al.*, 2007).

2.2.3 Lectina tipo Lily

Um novo tipo de lectina foi extraída do muco que recobre a superfície corporal do fugu, *Takifugu rubpripes*, e pertence à família Tetraodontidae, a mesma família a qual pertence o conhecido baiacu. Segundo Suzuki *et al.* (2003), a pufflectina é uma nova lectina cuja a sequência de aminoácidos não apresenta homologia, atualmente, com nenhum tipo de lectina animal, porém possui alta homologia com lectinas de plantas monocotiledôneas específica para manose.

Como descrito por Tsutsui *et al.* (2006a), a pufflectina é uma lectina manose-específica que apresenta estrutura homodimérica mantidas por ligações não covalentes, com subunidades de massa molecular de aproximadamente 13kDa e atividade independente de Ca^{2+}. Posteriormente foi encontrada uma isoforma desta lectina presente na mucosa intestinal, de forma que a lectina presente na pele passou a ser denominada pufflectina-s e a específica do intestino de pufflectina-i.

A sequência de aminoácidos do CRD da pufflectina-s exibe dois sítios de ligações com a manose, o sítio 1 (Gln30, Asp32, Asn34, Val36, Tyr38) e o sítio 2 (Gln59, Asp61, Asn63, Val65, Tyr67). E essa lectina foi encontrada tanto no interior do corpo quanto no exterior. Enquanto que a pufflectina-i foi encontrada exclusivamente no intestino. E apresenta dois motivos QDNVY (resíduos de glutamina, ácido aspártico, asparagina, valina e tirosina) no CRD. A diferença de localização desses dois tipos de lectinas sugere que o mecanismo de secreção dessas duas lectinas sejam diferentes (TSUTSUI, OKAMOTO, *et al.*, 2006a).

Embora outras lectinas do muco de peixes tenham exibido aglutinação de algumas bactéria e leveduras, a exemplo da lectina de sôia que aglutina uma levedura

e uma bactéria marinha, *Metschnikowia reukaufii* e *Microcyclus marina*, (KAMIYA e SHIMIZU, 1980). Congerinas, isoladas de *C. myriaster* possuem capacidade de aglutinar, mas não de inibir, o crescimento de *Vibrio anguillarum* (KAMIYA, MURAMOTO e GOTO, 1988). E as lectinas isoladas de *A. japonica*, AJL-1 que é capaz de aglutinar uma bactéria Gram-positiva, o *Streptococcus difficile* (TASUMI , YANG, *et al.*, 2004) e AJL-2 que exibe aglutinação e inibição do crescimento de *E. coli* (TASUMI, OHIRA, *et al.*, 2002). Pufflectina-s não se mostrou muito eficiente na aglutinação de bactérias, mas apresentou habilidade em se ligar ao parasita *Heterobothrium okamotoi* (TSUTSUI, OKAMOTO, *et al.*, 2006a).

Pufflectina é a primeira lectina extraída do muco de peixes que apresenta atividade aglutinante para parasita. Confirmando mais uma vez o papel na defesa do corpo dos peixes destas proteínas, tanto para bactérias quanto para parasitas (TSUTSUI, OKAMOTO, *et al.*, 2006a).

2.2.4 Lectina ligadora de L-rhamnose

Anteriomente descrita em ouriço do mar e em ovos de peixes, a lectina ligadora de L-rhamnose (RBL) foi extraída da secreção corporal de ponyfish, *Leiognathus nuchalis*, que é um peixe sem escamas que pertence a família de Leiognathidae e da ordem Perciformes. As RBLs apresentam de dois a três CRDs homólogos em *tandem* (repetições organizadas em sequencias) de cerca de 95 resíduos de aminoácidos (TATENO, OGAWA, *et al.*, 2002).

Duas RBLs foram isoladas do ponyfish, PFL-1 e PFL-2. Conforme descrito por Okamato *et al.* (2005), PFL-1 exibe uma sequência de aminoácidos com alta homologia com lectinas ligadoras de L-rhamnose descritas anteriormente e possui ainda um domínio de reconhecimento de carboidratos conservado típico de lectinas ligadoras de L-rhamnose (CRD RBL), com repetições em *tandem* e está presente apenas na superfície corporal do ponyfish. PFL-2 apresenta uma sequência N-terminal altamente idêntica à PFL-1, sugerindo que PFL-2 seja uma isoforma de PFL-1.

Em contraste com as RBLs anteriormente descritas, que estão frequentemente associadas a gônadas e ovos de peixes, a exemplos da RBL dos ovos da truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (TATENO, OGAWA, *et al.*, 2001) e da truta branca

Salvelinus leucomaenis (TATENO, OGAWA, *et al.*, 2002), que ocorrem em diversos tecidos e especificamente nos ovários, as lectinas isoladas no ponyfish são apenas expressas na superfície corporal deste peixe, não possuindo nenhuma ligação com a lectina expressa nos ovários desse peixe e que ainda está em estudo.

Algumas RBLs, em ovos de peixes, apresentam habilidade de aglutinar patógenos, como as lectinas do salmão cão (CSLs) e as lectinas de truta branca (STLs), que são capazes de aglutinar *E. coli* e *Bacillus subtilis* (SHIINA, TATENO, *et al.*, 2002) (TATENO, OGAWA, *et al.*, 2002). No entanto, as lectinas encontradas no muco do ponyfish não exibiu atividade aglutinante para as seis bactérias a qual foi testado, sugerindo que no futuro essas lectinas sejam testadas em um número maior de bactérias e outros patógenos, uma vez que as pufflectinas apresentaram atividade aglutinante bastante específica para um número reduzido de bactérias e foi a primeira lectina do muco de peixes descrita que possui a capacidade de se ligar a parasitas (OKAMOTO et al, 2005).

Vários tipos de lectinas estão presentes no muco de peixes. Essa diversidade molecular é muito importante para a elucidação da função destas moléculas nesses organismos. RBLs são conhecidas por estarem envolvidas em mecanismos de resposta inflamatória, atuando como moléculas de reconhecimento e transporte celular, assim como ativadores da cascata inflamatória através de citocinas (VASTA, NITA-LAZAR, *et al.*, 2011).

2.2.5 Outras lectinas

Adicionalmente as lectinas já descritas, dois novos tipos de lectinas foram observados no muco que recobre a superfície corporal de teleósteos. Essas lectinas foram denominadas de intelectinas e a caliclectinas.

As intelectinas (lectina tipo-X) é uma família de lectina animal que apresenta um CRD com um tamanho variado, extensão N-terminal não conservado com um peptídio sinal. O CRD destas proteínas não está relacionado com nenhum domínio proteico conhecido. De acordo com Lee *et al.* (2004), apenas uma sequência de aproximadamente 45 resíduos de aminoácido na porção N-terminal apresenta similaridade com um motivo semelhante ao fibrinogênio. A atividade ligadora de

carboidrato é dependente de Ca^{2+} e a presença de um peptídeo sinal sugerem que estas proteínas são secretadas.

As duas isoformas de lectinas encontrada no muco do peixe-gato *Silurus asotus* apresentam atividade manose-específica com dependência de Ca^{2+}. Porém a sequência de resíduos de aminoácidos do seu CRD não está relacionada com o das CTLs e apresenta o motivo globular do fibrinogênio. Essas lectinas são membros da família de intelectinas, podendo ser expressa na pele, guelras e rins. Além disso, estas proteínas apresentam atividade aglutinante para a bactéria patogênica *Aeromonas salmonicida*, confirmando que a lectina apresenta um papel importante na defesa de invasões patogênicas na superfície corporal do peixe como componente do muco (TSUTSUI, KOMATSU, *et al.*, 2011a).

De acordo com Tsutsui *et al.* (2011b), a família de caliclectinas foi proposta após a descoberta de um novo tipo de lectina encontrada no muco do peixe conhecido como cabeça-chata, *Platycephalus indicus*, e foi denominada FHL (do inglês, FlatHead Lectin). Esta lectina apresenta similaridade estrutural com o domínio da cadeia pesada da calicreína plasmática de humanos e do fator de coagulação XI, a qual ainda não tinham sido identificados em teleósteos.

FHL exibe uma estrutura homodimérica unidas por uma ponte dissulfeto entre as subunidades, de massa molecular de aproximadamente 40kDa cada. Essa lectina apresenta atividade manose-específica dependente de Ca^{2+}. Genes homólogos a FHL foi encontrado em medaka (*Oryzias latipes*), Tetraodon e fugu (*Takifugu rubpripes*), sugerindo que proteínas semelhantes a FHL são amplamente distribuída em peixes. Este estudo não contemplou a análise da atividade aglutinante de patógenos dessa lectina (TSUTSUI, OKAMOTO, *et al.*, 2011b).

2.3 Propriedades biológicas e potencial biotecnológico de lectinas de muco de peixes

Segundo Esteban (2012), o muco que recobre a pele dos peixes apresenta propriedades antimicrobianas contra infecções de patógenos e tem sido demonstrado em diferentes peixes. Watanabe *et al.* (2013), admite que o muco dos peixes funciona como um mecanismo de barreira bioquímica.

Entre as moléculas que compõem o muco do peixe, as lectinas possuem a capacidade de aglutinar células, através do reconhecimento de carboidratos

específicos. Esta capacidade de aglutinar das lectinas do muco de peixe previne a entrada de patógenos no organismo desses animais. O muco de peixes permite o controle de muitos eventos no organismo vivo, tais como fertilização, desenvolvimento e reconhecimento do próprio/não-próprio, pela variação estrutural do glicocálice das células (SUZUKI e TASUMI, 2003).

Como se pode verificar, lectinas em geral são proteínas que apresentam diversas atividades biológicas. Existem relatos de atividades antibacterianas (TASUMI, OHIRA, *et al.*, 2002); (TASUMI , YANG, *et al.*, 2004); (CARVALHO, SILVA, *et al.*, 2015); (MOURA, NAPOLEÃO, *et al.*, 2015); (SILVA, NAPOLEÃO, *et al.*, 2016); (PROCÓPIO, PATRIOTA, *et al.*, 2017), antivirais (MOLCHANOVA, CHIKALOVETS, *et al.*, 2007); (BARTON, KOUOKAM, *et al.*, 2014); (SATO, MORIMOTO, *et al.*, 2015), inseticidas (COELHO, MARANGONI e MACEDO, 2007); (SÁ, SANTOS, *et al.*, 2009), antifúngicas (SITOHY, DOHEIM e BADR, 2007); (TSUTSUI, IWAMOTO, *et al.*, 2007); (REGENTE, TAVEIRA, *et al.*, 2014); (ALBUQUERQUE, PONTUAL, *et al.*, 2014); (WEIDENBACH, ESCH, *et al.*, 2016) (SILVA, MOURA, *et al.*, 2018), antitumorais (PETROSSIAN, BANNER e OPPENHEIMER, 2007); (KAWANO, SUGAWARA, *et al.*, 2009) entre outras, indicando que essas proteínas funcionam no mecanismo de defesa do organismo vivo. Evidentemente estas proteínas podem ser utilizadas para aplicações clinicas e biotecnológicas, como marcadores celulares, transporte de moléculas, a exemplo de fármacos que agem em células-alvos pelo sistema de transporte de drogas (DDD, Drugs Delivery Development) (BIES, LEHR e WOODLEY, 2004), testes diagnósticos e outras inúmeras possibilidades.

Muitos estudos têm mostrado que as lectinas do muco de peixes podem se ligar a bactérias (FUOCHI, VOLTI, *et al.*, 2017), fungos (SILVA, MOURA, *et al.*, 2018), parasitas (BRINCHMAN, PATEL, *et al.*, 2018) e outros microrganismos patógenos. Essas macromoléculas são altamente específicas para o seu ligante e podem impedir a aderência de potenciais patógenos ao corpo dos peixes, inibindo sua invasão. Devido a essas propriedades, lectinas são consideradas potencias agentes antimicrobianos presentes no muco.

Pesquisas com lectinas de plantas são mais abundantes e mais profundamente exploradas. Mas a descoberta de novas lectinas animais, especificamente do muco de peixes, tem trazido uma nova dimensão a biologia e imunologia de peixes.

2.4 Purificação de lectinas

Segundo Gomes (2009), a purificação de lectinas consiste no isolamento dessas proteínas a partir de um extrato proteico, fazendo uso dos métodos comumente utilizados para qualquer outra proteína. Sendo que a escolha das estratégias de separação de proteínas, isoladas ou combinadas dependerá das propriedades intrínseca de cada proteína (NELSON e COX, 2014).

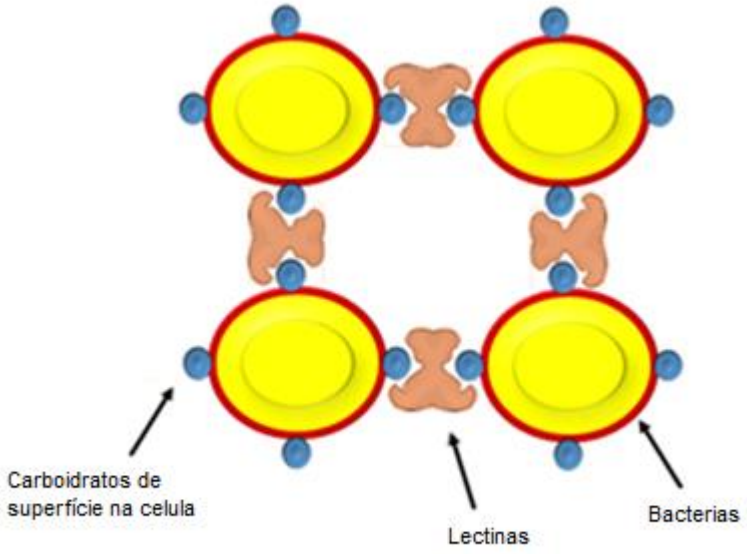
Para Voet & Voet (2013) a purificação de lectinas possibilita o estudo e caracterização dessas proteínas. De forma que estas substâncias precisam estar relativamente livres de contaminantes para que possam ser devidamente caracterizadas.

A partir de um extrato, preparado com salina ou tampão, a lectina pode ser pré-purificada através de técnicas de fracionamento e diálise. Posteriormente a amostra obtida é submetida a um dos métodos cromatográficos disponíveis, como cromatografia de exclusão de tamanho, troca iônica ou de afinidade. De acordo com Nelson & Cox (2014), os métodos mais eficientes para fracionar proteínas utilizam cromatografia em coluna, que se utiliza das diferenças na carga das proteínas, tamanho, afinidade de ligação e outras propriedades, podendo citar como exemplos: a lectina do peixe-escorpião que foi isolada por cromatografia de gel de filtração (ANDRICH, RICHARDSON, *et al.*, 2015), a lectina flathead que foi purificada por cromatografia de afinidade de manose (TSUTSUI, OKAMOTO, *et al.*, 2011b) e a Natectina que foi purificada por cromatografia de troca iônica (LOPES-FERREIRA, MAGALHÃES, *et al.*, 2011).

Lectinas possuem a capacidade de aglutinar células, como eritrócitos e bactérias, (Figura 2) sendo que essa interação lectina-carboidrato é facilmente detectável através do ensaio de atividade hemaglutinante, que consiste em colocar as amostras em contato com eritrócitos de coelhos, deixando em repouso e ao término do tempo se observa a presença ou não de aglutinação das células (PROCÓPIO, MOURA, *et al.*, 2017); (PAIVA, GOMES, *et al.*, 2010). De maneira que as amostras que apresentam lectina reagem com os carboidratos da membrana dos eritrócitos formando uma rede de proteínas e carboidratos (Figura 3A). A inibição da Atividade Hemaglutinante através da adição de carboidratos confirma que a reação de

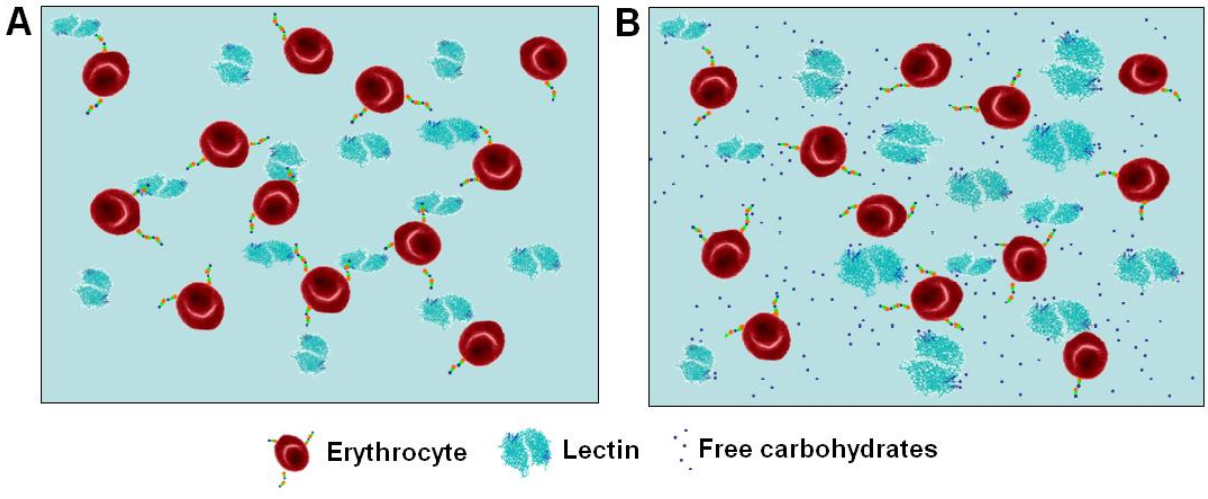
aglutinação se dá pela ligação com os carboidratos da membrana dos eritrócitos e não por outros compostos que podem mimetizar a reação da atividade hemaglutinante (Figura 3B) (PAIVA, GOMES, *et al.*, 2010).

Figura 2 - Representação esquemática de aglutinação de bactérias mediada por lectinas.



Fonte: Adaptado de PROCÓPIO, MOURA, *et al.*, 2017.

Figura 3 - Representação esquemática do processo de atividade hemaglutinante (A) e sua inibição por carboidratos livres (B).



Fonte: Adaptado de PAIVA, GOMES, *et al.*, 2010.

Nesse sentido, a purificação de lectinas permite obter uma amostra homogênea destas proteínas, o que possibilita conhecer suas propriedades e funções biológicas. Devido ao seu potencial biotecnológico, quer seja na área médica ou agronômica, um número cada vez mais crescente de lectinas vem sendo purificadas.

2.5 *Thalassophryne nattereri*

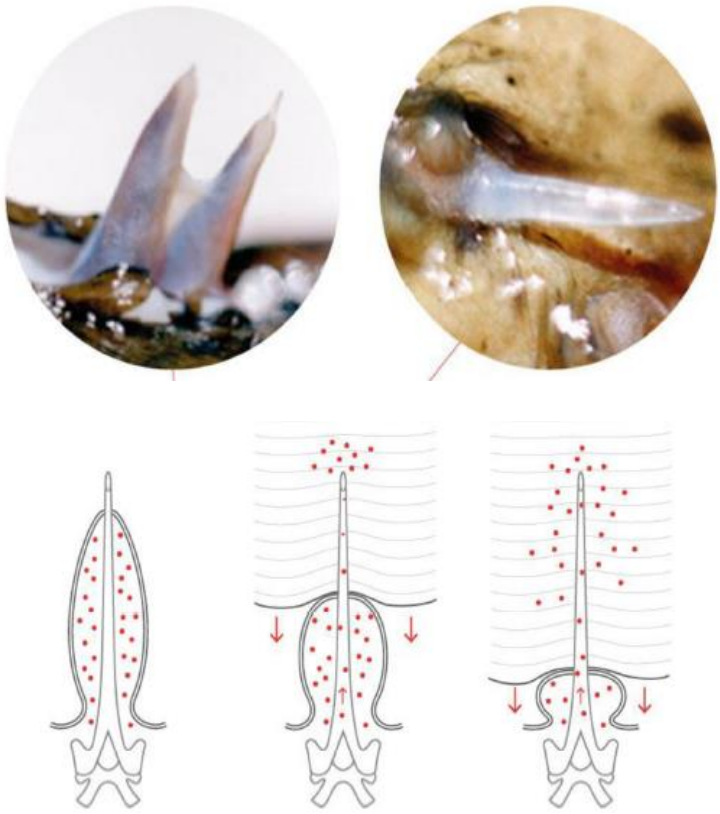
O peixe sapo, *Thalassophryne nattereri*, é um peixe peçonhento, pertencente à família Batrachoididae, que habita em águas rasa do litoral brasileiro, de Norte ao Nordeste, em lagoas ou áreas estuarinas (MARQUES, TENÓRIO, *et al.*, 2016). Também conhecido por niquim, este peixe tem em média de 12 a 15 cm, apresenta uma cabeça grande, com olhos grandes e esbugalhados, boca ampla, sem escamas e o corpo coberto por um muco espesso e pegajoso (Figura 4). Ele é um peixe carnívoro que se alimenta de caranguejos, moluscos e pequenos peixes, ele vive em grupos e é extremamente resistente, podendo sobreviver fora d'água por mais de 12h (LOPES-FERREIRA, GRUND e LIMA, 2014); (FERREIRA, LIMA e LOPES-FERREIRA, 2014).

Figura 4 - Peixe sapo (*Thalassophryne nattereri*).

Fonte: Autoria própria.

De acordo com Tenório *et al.* (2015) a peçonha desse peixe é capaz de causar edema local, dor intensa e necrose. *T. nattereri* possui dois espinhos canaliculados dorsal e dois laterais, coberto por uma membrana conectada as glândulas de venenos (Figura 5). Quando o espinho penetra no tecido da vítima, a membrana conectada contrai, fazendo pressão na glândula e a peçonha é conduzida pelo canal e injetada na vítima.

Figura 5 - Aparato e mecanismo de inoculação da peçonha do *T. nattereri.*



Fonte: LOPES-FERREIRA, GRUND e LIMA, 2014.

Acidentes com esse peixe são muito comuns e as áreas do corpo mais afetadas são a sola dos pés e a palma das mãos. As principais vítimas são pescadores e banhistas que acidentalmente pisam no peixe ou tentam pegá-lo com as mãos (FONSECA e LOPES-FERREIRA, 2000).

O fracionamento da peçonha do *T. nattereri* revelou a presença de uma lectina, que foi denominada Nattectina. Esta lectina é uma proteína monomérica básica, não glicosilada, com atividade galactose-específica, pertencendo a família das CTLs, com massa molecular de 15 kDa. Ela exibe atividade hemaglutinante independente de Ca^{2+}

e com notável atividade pró-inflamatória e indução de mobilidade de neutrófilos em ratos (LOPES-FERREIRA, MAGALHÃES, *et al.*, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Extração do muco

Dez espécimes de *T. nattereri* foram coletados na lagoa Mundaú, no estado de Alagoas, Brasil. O muco dos peixes foi obtido através da raspagem da secreção da epiderme dos peixes. Após coleta, o pool do muco foi homogeneizado, centrifugado e o sobrenadante foi estocado a -80 ºC até o uso. O procedimento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética e Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (Nº 013/2014).

3.2 Microrganismos

As bactérias *Enterococcus* spp., *Acinetobacter* spp*., Staphylococcus aureus, Serratia* spp *e Pseudomonas aeruginosa* foram fornecidas pelo setor de Microbiologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas. Culturas bacterianas foram mantidas em Ágar Manitol Salgado, Cetrimide Ágar e MacConkey Ágar respectivamente, e estocadas a 4 °C. As leveduras *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* foram fornecidas pelo Laboratório de Diversidade Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas.

3.3 Isolamento da lectina da secreção de *T. nattereri*

Para a purificação da lectina foi aplicado 300 µl do extrato proteico (Atividade Hemaglutinante Específica (AHE): 25,6; 1,25 mg de proteínas) em uma coluna de gel de filtração Sephacryl S-100 (GE Healthcare, 60x2 cm) em FPLC (ÄKTA Pure M1, GE Healthcare Life Science), equilibrada em tampão Tris/HCL 50 mM (pH 8.0) 0,5 M de NaCl e eluída com o mesmo tampão. As frações coletadas no volume de 2 mL a um fluxo de 0,1 mL/min., a 25 ºC e monitorada a 280 nm foram avaliadas posteriormente quanto a atividade hemaglutinante (AH).

3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sulfato sódico de dodecila (SDS-PAGE 12%) foi procedida de acordo com Laemmli (1970). As amostras submetidas a eletroforese sob condições não-redutoras e os marcadores de massa molecular (Promega) foram ressuspensos em tampão e submetidos a aquecimento a

100 °C durante 7 minutos. A detecção das bandas proteicas foi realizada por coloração com Azul de Coomassie.

3.5 Atividade hemaglutinante (AH)

O ensaio de atividade hemaglutinante (AH) foi realizado em placas de microtitulação, de acordo com a metodologia descrita por Paiva e Coelho (1992). Alíquota (50 µL) da amostra foi diluída serialmente em NaCl 0,15 M antes da adição de 50 µL de suspensão (2,5% v/v) de eritrócitos tratados com glutaraldeído. A AH (título^{-1}) foi expressa como o inverso da maior diluição da amostra que promoveu hemaglutinação. AH específica (AHE) foi definida pela razão entre o título e a concentração protéica (mg/mL).

3.6 Ensaio de Bradford para quantificação proteica

A dosagem de proteínas foi efetuada de acordo com Bradford (1976), utilizando curva-padrão de albumina sérica bovina de concentrações 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1 mg/ml em duplicata.

3.7 Ensaio de especificidade de carboidratos

Foi realizado o ensaio de inibição da atividade hemaglutinante (IAH) em placas de microtitulação utilizando soluções de carboidratos (glicose, sacarose, galactose, maltose, manose, frutose, fucose, arabinose, lactose, L-raminose e metil-D-glicopiranoside) em diferentes concentrações (200, 100, 50 e 25 mM). Após feitas diluições sucessivas das amostras lectínicas (50 µL) nas soluções de carboidrato e incubação (45 min., 27 °C), foi adicionado uma suspenção (50 µL) de eritrócitos de coelho a 2.5% (v/v) e a AH foi observada após 45 min.

3.8 Avaliação de estabilidade térmica e efeito do pH e dos íons na atividade hemaglutinante

Para a determinação da estabilidade térmica, amostras lectínicas foram submetidas a diferentes temperaturas (30 a 100 ºC) e em seguida foi efetuado o ensaio de hemaglutinação. Para a determinação do efeito do pH na AH, tampão citrato fosfato (pH 3,0 a 6,0); tampão fosfato de sódio (pH 6,0 a 7,0); tampão tris-HCl (pH 7,5 a 9,5); água ajustada com NaOH 0,1 M (pH 10 a 11) foram utilizados no ensaio de hemaglutinação. Para a determinação dos efeitos dos íons na AH, a amostra foi

dialisada exaustivamente em solução de 5 mM de EDTA para retirar os possíveis íons aderidos na lectina e posteriormente realizado o teste hemaglutinante, em solução de 10 mM de $CaCl_2$ e $MnCl_2$.

3.9 Avaliação de atividade antimicrobiana

3.9.1 Atividade Antibacteriana

As linhagens bacterianas foram cultivadas em Caldo Nutriente BHI (Brain Heart Infusion) por incubação a 35 ºC. Em seguida, as concentrações das culturas foram ajustadas turbidometricamente a 600 nm para 1,5 x 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) por ml. Para determinação da concentração mínima inibitória (CMI), amostras (50 µL) foram adicionadas a 50 µL do meio de cultura (Caldo Nutriente BHI) e em seguida foram realizadas seis diluições (até 1:128). Todos os poços foram inoculados com 50 µL de cultura e as microplacas foram incubadas a 35 ºC por 24h. No controle positivo, 50 µL de cultura bacteriana foram inoculados em um poço contendo somente o meio de cultura utilizado. Enquanto no controle negativo foi utilizado 50 µL do meio de cultura mais 50 µL de solução fisiológica 0,9%. Após incubação, a densidade ótica a 630 nm (DO630) foi medida utilizando espectrofotômetro para microplacas. A CMI foi determinada como a menor concentração na qual ocorreu diminuição maior ou igual a 99% em relação à DO630 no controle negativo (NCCLS, 2003).

3.9.2 Atividade Antifúngica

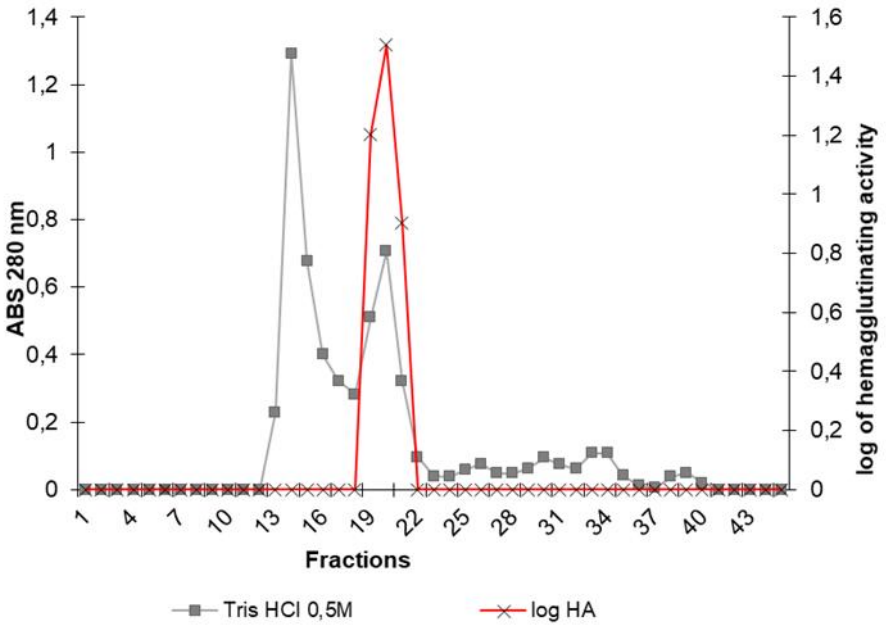
As linhagens fúngicas foram cultivadas em Meio YPD (Yeast extract – Peptone - Dextrose) por incubação a 35 ºC. Em seguida, as concentrações das culturas foram colônia (UFC) por ml. Para determinação da concentração mínima inibitória (CMI), amostras (50 µL) foram adicionadas a 50 µL do meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute) e em seguida foram realizadas seis diluições (até 1:128). Todos os poços foram inoculados com 50 µL de cultura e as microplacas foram incubadas a 35 ºC por 48h. No controle positivo, 50 µL de cultura de fungos foram inoculados em um poço contendo somente o meio de cultura RPMI. Enquanto no controle negativo foi utilizado 50 µL do meio de cultivo RPMI. Após incubação, a densidade ótica a 530 nm (DO530) foi medida utilizando espectrofotômetro para microplacas (NCCLS, 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Purificação e identificação da lectina

Existem diversas estratégias para isolamento e purificação de uma proteína. A escolha da estratégia irá depender das características desta proteína. A lectina presente no muco do peixe *T. nattereri* foi purificada através de cromatografia em gel de filtração e as frações coletadas foram avaliadas quanto à atividade hemaglutinante com eritrócitos de coelhos. O cromatograma apresentou apenas um pico proteico com atividade hemaglutinante (Figura 6), confirmando a presença da lectina nas frações. As demais frações foram testadas, mas não exibiram atividade hemaglutinante.

Figura 6 - Cromatograma da purificação da lectina TnSL em coluna de gel de filtração Sephacryl S-100 (GE Healthcare) eluída em Tris/HCl 50 mM, pH 8,0, 0,5 M NaCl.



Neste estudo, pela primeira vez foi isolado do muco do *T. nattereri* uma lectina, a qual denominamos TnSL. A Nattectina é uma lectina presente na peçonha desse mesmo peixe. A qual foi isolada a partir de uma trocadora catiônica, mas que também exibiu apenas um pico que apresentou atividade hamaglutinante (LOPES-FERREIRA, MAGALHÃES, *et al.*, 2011).

A tabela de purificação da proteína (Tabela 1) confirma a eficiência do processo de purificação. A atividade hemaglutinante específica (AHE) indica a concentração de

proteína ao longo do processo de purificação. Observa-se que esse valor aumentou após um passo cromatográfico. E o fator de purificação indica quantas vezes, em relação ao material de partida, a proteína de interesse foi concentrada. Dessa forma, pode-se afirmar que esse processo de purificação foi eficiente uma vez que a proteína foi concentrada acima de dez vezes.

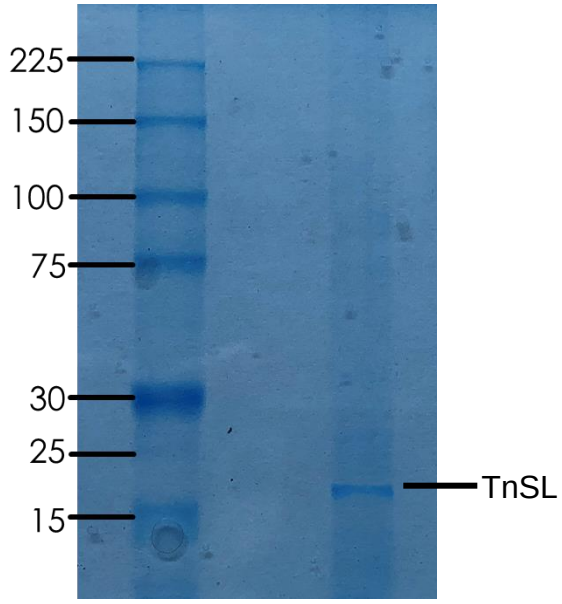
Tabela 1 – Tabela de Purificação de TnSL.

Amostra	**Volume (ml)**	**Proteína (mg/mL)**	**AH^{-1}**	**AHE**	**Fator de Purificação**
Extrato	5	0,355	32	90,14	1
TnSL	2	0,0166	16	963,85	10,69

AH: Atividade Hemaglutinante; AHE: Atividade Hemaglutinante específica.

A lectina purificada apresentou no gel de poliacrilamida em condições desnaturante (SDS-PAGE), uma massa molecular de aproximadamente 20 kDa (Figura 7). Esse valor foi um pouco maior do que o encontrado para a Nattectina (LOPES-FERREIRA, MAGALHÃES, *et al.*, 2011), que foi de 15 kDa.

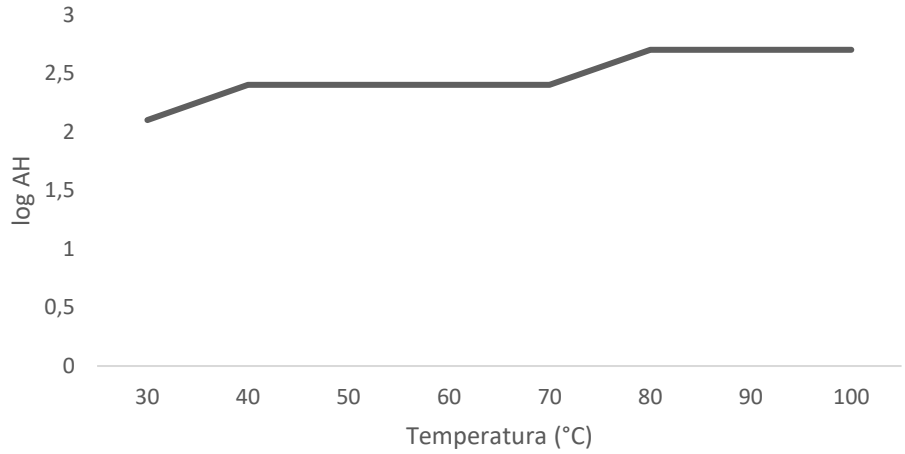
Figura 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%.



4.2 Determinação da estabilidade térmica e efeito do pH e íons na atividade hemaglutinante

Na avalição da estabilidade térmica de TnSL, a lectina manteve sua atividade mesmo com o aumento da temperatura e em determinados pontos essa lectina teve sua atividade ampliada, conforme observado no Gráfico 1. Sugerindo que o desnovelamento parcial desta lectina expõe resíduos de aminoácidos que antes não estavam acessíveis, melhorando a interação com o seu ligante. Não existem dados da termoestabilidade da Nattectina que possam ser comparados com a TnSL.

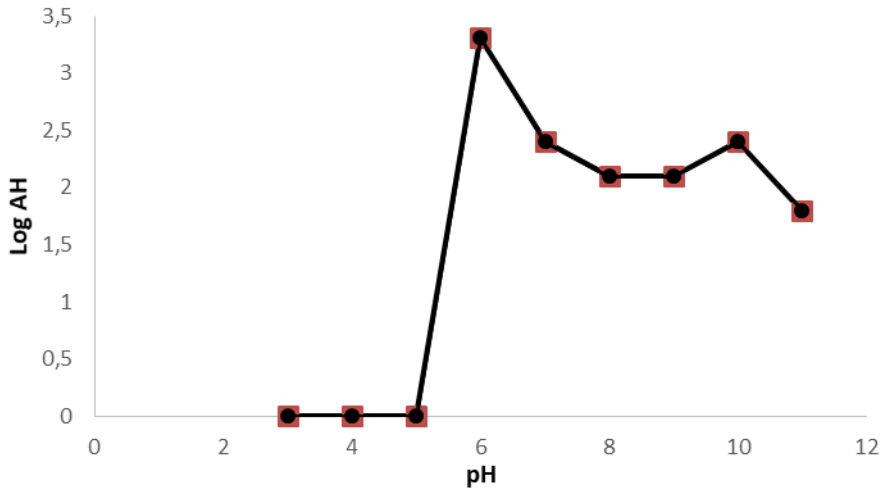
Gráfico 1 - Estabilidade térmica da TnSL.



TnSL foi sensível a valores de pH muitos ácidos, apresentando maior atividade quando submetida a pH próximo de 6,0 e com atividade diminuída em pH mais elevados (Gráfico 2). Este fato pode ser resultante a sua adaptação ao meio em que esses peixes são encontrados, em águas estuarinas, cujo pH se encontra nessa faixa, podendo alcançar valores mais altos em período chuvoso. A Nattecina apresentou atividade em pH básico, sendo, portanto, considerada uma proteína básica (LOPES-FERREIRA, MAGALHÃES, *et al.*, 2011), ao contrário da TnSL que exibiu melhor atividade em pH ácido.

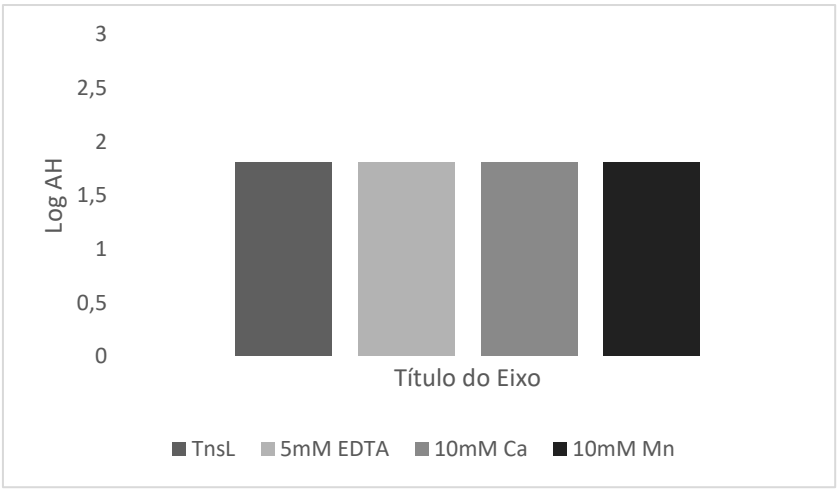
A termoestabilidade e a manutenção da atividade entre pH 6 a 7 são características almejadas e estimulam a investigação antimicrobiana visando sua aplicação biotecnológica. Para atuar como antimicrobiano TnSL precisa ser capaz de atuar em uma ampla variedade de pH e temperaturas em que as bactérias e fungos possam crescer (GOMES, PROCÓPIO, *et al.*, 2012).

Gráfico 2 - Estabilidade da TnSL frente a diferentes valores de pH.



Com relação ao efeito de íons, a lectina TnSL não apresentou alteração da sua atividade hemaglutinante, mesmo a proteína sendo tratada com o agente quelante EDTA (Gráfico 3). A maioria das CTLs exibem propriedades dependente de Ca^{2+}, contudo a própria Nattectina é uma lectina do tipo C que apresenta atividade independente de Ca^{2+}. Outras CTLs, presentes no muco de outros peixes, também não apresentam atividade dependente de cátions divalentes, como é o caso da AJL-2 (TASUMI, OHIRA, *et al.*, 2002) e conCL (TSUTSUI, IWAMOTO, *et al.*, 2007). A ausência de dependência, explica-se pela lectina não necessita de íons metálicos para exercer sua atividade, ou se íons estão presente na estrutura da proteína estão fortemente ligados à molécula (CRUZ, 2015).

Gráfico 3 - Estabilidade de TnSL na presença de íons metálicos.



4.3 Inibição da atividade hemaglutinante

A AH da TnsL foi inibida parcialmente pelos carboidratos Manose, Frutose, Fucose e Arabinose, conforme observado na Tabela 2. Sendo que Frutose e Manose foram os carboidratos que apresentaram maior inibição. O que ocorre diferentemente na Nattectina, a qual foi inibida por D-galactose e não por D-manose (LOPES-FERREIRA, MAGALHÃES, *et al.*, 2011). Contudo esse achado sugere que a lectina TnSL possa ser classificada como uma lectina tipo-C. Uma vez que tais lectinas podem apresentar um dos dois tipos de domínios: e Inibição da AH por carboidratos ou glicoconjugados caracteriza a natureza lectiníca para as ligações às quais poderá estabelecer, sendo a inibição por frutose e manose desejável, uma vez que esses são carboidratos podem ser encontrados em microrganismos. EPN, em lectinas manose-específicas ou QPD, em lectinas galactose-específicas (TSUTSUI, OKAMOTO, *et al.*, 2011b). Além disso, existem relatos onde um mesmo peixe produz mais de um tipo de lectina. A exemplo, da *A. japonica*, cujo o mesmo tipo de célula é capaz de secretar uma lectina da família das galectinas e outra da família das CTLs (TASUMI, OHIRA, *et al.*, 2002). Ou ainda, a *C. myriaster* que apresenta duas lectinas da família da galectinas e uma terceira lectina das CTLs, todas presentes no muco (MURAMOTO , KAGAWA, *et al.*, 1999); (TSUTSUI, IWAMOTO, *et al.*, 2007). A inibição da AH por carboidratos caracteriza a natureza lectiníca para as ligações às quais poderá estabelecer, sendo que a inibição por frutose e manose seja desejável, uma vez que esses carboidratos podem ser encontrados em microorganismos. Sugerindo dessa forma a possibilidade dessa lectina apresentar atividade antimicrobiana.

Tabela 2 - Inibição da Atividade Hemaglutinante (IAH) com carboidratos.

Carboidrato	**AH (Título^{-1})**
D-glicose	NI
D-galactose	NI
D-manose	16
D-frutose	16
D-fucose	32
Arabinose	32
Raminose	NI
Metil-D-glicopiranosídeo	NI
Sacarose	NI
Lactose	NI
Maltose	NI

NI, Nenhuma inibição.

4.4 Ensaio da atividade antibacteriana

O muco do *T. natereri,* apresentou em um teste preliminar, atividade bacteriostática (MIC de 16,25 µg/mL) contra as bactérias *Klesbiella pneumoniae, Escherichia coli, Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, de acordo apresentado na Tabela 3*.* O mesmo não foi observado com a peçonha do mesmo peixe. Este resultado preliminar evidencia que a lectina TnSL possui atividades antimicrobiana enquanto a Nattectina não apresenta tal atividade.

Tabela 3 - Atividade antibacteriana da do extrato e peçonha de *T. natereri.*

Microorganismo	**Amostra**	**MIC (µg/mL)**
Klebsiella pneumoniae	Muco	16,25
	Peçonha	ND
Escherichia coli	Muco	16,25
	Peçonha	ND
Staphylococcus aureus	Muco	16,25
	Peçonha	ND
Enterococcus aureus	Muco	16,25
	Peçonha	ND

ND: não detectado

A propriedade antimicrobiana também foi observada ao analisar a lectina purificada (TnSL) contra *Enterococcus* spp, *Acinetobacter* spp, *Serratia* spp, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. As concentrações mínimas inibitória foi determinada para a lectina conforme apresentada na Tabela 4. Os resultados da atividade antibacteriana indicam que TnSL apresenta atividade bacteriostática para as bactérias testadas, uma vez que a lectina inibiu seu crescimento. As cepas das bactérias cedidas pelo Setor de Microbiologia da UFAL foram oriundas de pacientes imunocomprometidos do Centro de Alta Complexidade em Oncologia (CACON-UFAL), o que confere a essas cepas uma resistência considerada e justifica o fato da lectina não ter apresentado atividade bactericida. A presença de atividade antibacteriana no muco com valores de MIC menores do que os obtidos para a lectina isolada demonstram que outros compostos presentes no muco de *T. nattereri* além das lectinas possuem atividade antibacteriana ou que a

lectina TnSL sofre sinergismo com algum componente do muco, resultando em elevação da atividade.

Tabela 4 - Atividade antibacteriana da lectina do *T. natereri* (TnSL).

Cepas	**MIC (µg/mL)**
Enterococcus spp	250
Acinetobacter spp	250
Serratia spp	125
Staphylococcus aureus	62,5
Pseudomonas aeruginosa	31,25

4.5 Ensaio da atividade antifúngica

A atividade antifúngica de TnSL sobre as leveduras *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* não foi observada. A lectina não apresentou inibição do crescimento para ambas leveduras. Estes resultados sugerem que estes microrganismos não possuem na composição de suas respectivas paredes celulares carboidratos que possuem afinidade ao sítio de ligação da lectina. Contudo a investigação desta atividade em um rol de fungos com características diversificadas torna-se necessária antes de descartar sua capacidade antifúngica. Uma vez que muitas lectinas presente no muco do peixe apresentam atividade aglutinante seja para bactéria, fungo ou até mesmo parasitas. Em especial a pufflectina, que não apresentou uma atividade aglutinante eficiente em bactérias, mas quando testada com parasitas exibiu uma forte interação (TSUTSUI, OKAMOTO, *et al.*, 2006a). Além disso, TnSL apresentou algumas características vantajosas, que encorajam o estudo de seu potencial biotecnológico.

5 CONCLUSÃO

- A lectina presente no muco do *T. nattereri* foi purificada em um único passo cromatográfico;
- TnSL é uma proteína ácida, termoestável, apresentando massa molecular aproximadamente de 20 kDa e atividade independente de íons divalentes;
- A proteína foi parcialmente inibida por manose e frutose;
- Apresentou atividade bacteriostática;
- Potencial para uso biotecnológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, P. et al. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemisia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector Biophalaria glabrata. **Acta Tropica**, 138, 2014. 23-27.

AL-HASSAN, J. M. et al. Purification and propertiens of a hemagglutination factor from Arabian Gulf catfish (*Arius thalassinus*) epidermal secretion. **Biochemistry and Physiology Part B**, 85, n. 1, 1986. 31-39.

ANDRICH, F. et al. Identification of C-type isolectins in the venom of the scorpionfish *Scorpaena plumieri*. **Toxicon**, 95, 2015. 67-71.

BARTON, C. et al. Activity of and effect of subcutaneous treatment with the broad-spectrum antiviral lectin Griffithsin in two laboratory rodent models. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 58, n. 1, 2014. 120-127.

BIES, C.; LEHR, C.-M.; WOODLEY, J. F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 56, 2004. 425-435.

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

BRINCHMAN, M. F. et al. Functional Aspects of fish mucosal lectins interaction with non-self. **Molecules**, 23, 2018. 1119-1130.

CARVALHO, A. D. S. et al. Purification, characterization and antibacterial potetial of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, 75, 2015. 402-408.

COELHO, M. B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, 146, 2007. 406-414.

COULDREY, C.; GREEN, J. E. Metastases: the glycan connection. **Breast Cancer Research**, 2, n. 5, 2000. 321-323.

CRUZ, D. R. D. R. Isolamento, purificação e caracterização parcial da lectina de folhas de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel, nativa do bioma Caatinga. **Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido)**, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Petrolina, Petrolina-PE, 2015.

DA SILVA, J. A. Isolamento e caracterização de uma nova lectina da casca de *Schinus terenbinthifolius* (aroeira-da-praia). **Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia)**, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2018.

ESTEBAN, M. Á. An overview of the immunological defenses in fish skin. **International Scholarly Research Network Immunology**, 2012. 1-29.

FARIAS, D. L. Isolamento, purificação e atividades biológicas de uma nova lectina de sementes de feijão da praia (*Canavalia maritima*). **Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)**, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

FERREIRA, M. J.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Anti-inflamatory effect of Natterins, the major toxins from the *Thalassophryne nattereri* fish venom is dependent on TLR4/MyD88/PI3K signaling pathway. **Toxicon**, 87, 2014. 54-67.

FONSECA, L. A.; LOPES-FERREIRA, M. Estudo clínico e experimental sobre envenenamento causado pelo peixe *Thalassophryne nattereri* (niquim). **Anais Brasileiro de Dermatologia**, 75, n. 4, 2000. 435-443.

FUOCHI, V. et al. Antimicrobial and anti-proliferative effects of skin mucus derived from *Dasyates pastinaca* (Linaeus, 1758). **Marine Drugs**, 15, 2017. 342-351.

GABIUS, H.-J. The history of lectinology. In: FANG, F.; NG, T. B. **Antitumor Potential and other emerging medicinal properties of natural compounds**. [S.l.]: Springer, Dordrecht, 2013.

GABOR, F. et al. The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Viena, 2004. 459-480.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A Glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemical**, 113, n. 3, 2011. 236-247.

GOMES, F. S. Lectina do cerne e entrescasca de *Myracrodruon urundeuva*: atividade antimicrobiana e larvicida sobre *Aedes aegpty*. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia)**, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

GOMES, F. S. et al. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**, 114, 2012. 672-679.

GOTO-NANCE, R. et al. Characterization of lectins from the skin mucus of the loach *Misgurnus anguilicaudatus*. **Fisheries Science**, 61, n. 1, 1995.

GUIMARÃES-GOMES, V. et al. Cloning, characterization,and structural analysis of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 432, 2004. 1-11.

HOKAMA, A.; MIZOGUCHI, E.; MIZOGUCHI, A. Roles of galectins in inflammatory bowel disease. **World Journal Gastroenterology**, 14, n. 33, 2008. 5133-5137.

HUANG, Z.-H.; MA, A.-J.; LEI, J.-L. Progress in study on the skin mucus lectin in fish. **Zoological Research**, 34, n. 6, Dezembro 2013. 674-676.

HUANG, Z.-H.; MA, A.-J.; WANG, M. Research prgression in secretion of fish skin mucous and its function. **Marine Sciences**, 33, n. 4, 2009. 90 - 94.

INGRAM, G. A. Substances involved in the natural resistance of fish to infection - a review. **Journal Fish Biology**, 16, n. 1, 1980. 23-60.

JOHANSSON, P. et al. Identification and expression modulation of a C-type lectin domain family 4 homologue that is highly expressed in monocytes/macrophages in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Developmental and Comparative Immunology**, 54, 2016. 55-65.

KAMIYA, H.; MURAMOTO, K.; GOTO, R. Purification and properties of agglutinins from conger eel, *Conger myriaster* (Brevoort), skin mucus. **Developmental and Comparative Imunology**, 12, n. 2, 1988. 309-318.

KAMIYA, H.; SHIMIZU, Y. Prurification and Characterization of agglutinins from mucus of windowpane flounder *Lophopsetta maculata*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 622, 1980. 171-178.

KAWANO, T. et al. Globotriasylceramide-expressing Burkitt's lymphoma cells are committed to early apoptose status by rhamnose-binding lectin from catfish eggs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 32, n. 3, 2009. 345-353.

KILPATRICK, D. C. **Handbook of Animal Lectins:** properties and biomedical applications. [S.l.]: John Wiley and Sons, 2000.

KOMEGAE, E. N. et al. Insights into the local pathogenesis induced by fish toxins: role of natterins and nattectin in disruption of cell-cell and cell-extracellular matrix interactions and modulation of cell migration. **Toxicon**, 58, 2011. 509-517.

KONDO, H. et al. Identification of a novel C-type lectin gene in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Fish & Shellfish Immunology**, 23, 2007. 1089-1094.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assemply of the head of bacteriophage t4. **Nature**, 227, 1970. 680-685.

LEE, J. K. et al. The X-lectins: a new family with homology to the Xenopus laevis oocyte lectin XL-35. **Glicoconjugate Journal**, 21, 2004. 443-450.

LI, C. et al. Pacreatic cancer serum detection using a lectin/glyco-antibody array method. **Journal of Proteome Research**, 8, n. 2, 2009. 483-492.

LIU, F.-T.; RABINOVICH, G. A. Galectins as modulators of tumours progression. **Nature Reviews Cancer**, 5, 2005. 29-41.

LOPES-FERREIRA, M. et al. Structural and biological characterization of Nattectin, a new C-type lectin from the venomous fish *Thalassophryne nattereri*. **Biochimie**, 93, 2011. 971-980.

LOPES-FERREIRA, M.; GRUND, L. Z.; LIMA, C. *Thalassophryne nattereri* fish venom: from the envenoming to understanding of the immune system (Review). **Journal Venomous Animal Toxins Including Tropical Diseases**, 20, 2014. 1-12.

LV, C.; ZHANG, D.; WANG, Z. A novel C-type lectin, nattectin-like protein, with a wide range of bacterial agglutination activity in large yellow croaker *Larimichthys crocea*. **Fish & Shellfish Immunology**, 50, 2016. 231-241.

MACIEL CARVALHO, E. V. M. et al. Detection of the first lectin with antimicrobial activity present in serum of the Amazon fish tambaqui *Colossoma macroporum*. **Fisheries Science**, 78, 2012. 879-887.

MAGALHÃES, G. S. et al. Natterins, a new class of proteins with kininogenase activity characterized from *Thalassophryne nattereri* fish venom. **Biochimie**, 87, n. 8, 2005. 687-699.

MARQUES, M. E. D. C. et al. Angiotensin converting enzyme of *Thalassophryne nattereri* venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, 91, 2016. 980-986.

MOLCHANOVA, V. et al. A new lectin fromthe sea worm *Serpula vermicularis*: isolation, characterization and anti-HIV activity. **Comparative Biochesmistry and Physiology Part C**, 145, 2007. 184-193.

MOURA, M. C. et al. Water-soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. **Journal Apllied Microbiology**, 119, n. 3, 2015. 666-676.

MURAMOTO , K. et al. Functional and structural characterization of mutiple galectins from the skin mucus of conger eel, *Conger myriaster*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, 123, 1999. 33-45.

MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. The amino-acid sequence of a lectin from conger eel, *Conger myriaster*, skin mucus. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1116, 1992. 129-136.

NAKAO, M.; YANO, T. Structural and functional indentification of complement componentes of the bony fish, carp (*Cyprinus carpio*). **Immunology Review**, 116, n. 1, 2006. 27-38.

NCCLS. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de levedura à terapia antifúngica: norma aprovada - Segunda Edição**. NCCLS documento M27-A2. Estados Unidos. 2002.

NCCLS. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: norma aprovada - Sexta Edição**. NCCLS documento M7-A6. Estados Unidos. 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6ª. ed. Porto Alegre: Artemed, 2014.

NIKOLAKOPOULOU, K.; ZARKADIS, K. Molecular cloning and characterisation of two homologues of mannose-binding lectin in rainbow trout. **Fish & Shellfish Immunology**, 21, n. 3, 2006. 305-314.

NUNES, E. D. S. et al. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, 159, 2011. 57-63.

OKAMOTO, M. et al. Tandem repeat L-rhamnose-binding lectin from the skin mucus of ponyfish *Leiognathus nuchalis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 333, 2005. 463-469.

PAIVA, P. M. G. et al. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectin from plants. In: MÉNDEZ-VILAS, A. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. [S.l.]: Formatex, 2010. p. 396-406.

PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 36, n. 2, 1992. 113-118.

PARK, R. et al. Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in mistletoe lectin II induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. **Biochemical Pharmacology**, 60, 2000. 1685-1691.

PETROSSIAN, K.; BANNER, L. R.; OPPENHEIMER, S. B. Lectin binding and effect in culture on human cancer and non-cancer cell lines: exmination of issues of interest in drug design strategies. **Acta Histochemica**, 109, 2007. 491-500.

PROCÓPIO, T. F. et al. Antibacterial Lectins: action mechanism, defensive roles and biotechnological potential. In: COLLINS, E. **Antibacterials:** synthesis, properties and biological activities. [S.l.]: Nova SciencePublishers, Inc, 2017. Cap. 3, p. 69-89.

PROCÓPIO, T. F. et al. CasuL: a new lectin isolated from *Calliandra sutinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, 98, 2017. 419-429.

RAJAN, B. et al. Proteome reference map of the skin mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*) revealing immune competent molecules. **Fish & Shellfish Immunology**, 31, n. 2, 2011. 224-231.

RANDALL, J. E. et al. Occurence of a crinotoxic and hemagglutinin in the skin mucus of the moray eel *Lycodontis nudivomer*. **Marine Biology**, 62, 1981. 179-184.

REGENTE, M. et al. A sunflower lectin with antifungal properties and puntative medical mycology applications. **Current Microbiology**, 69, n. 1, 2014. 88-95.

RICHARDS, R. C. et al. Cloning and characterization of the Atlantic salmon serum, a long-form C-type lectin expressed in kidney. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 162, n. 1, 2003. 110-115.

RODWELL, V. W. et al. **Bioquímica Ilustrada de Harper**. 30ª. ed. Porto Alegre: AMGH, 2017.

SÁ, R. A. et al. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on Aedes aegypti. **Comparative Biochemistry and Physiology, part C**, 149, 2009. 300-306.

SATO, Y. et al. Entry inhibition of influenza viruses with high mannose binding lectin ESA-2 from the red alga *Eucheuma serra* through the recognition of viral hemagglutin. **Marine Drugs**, 13, 2015. 3454-3465.

SHIINA, N. et al. Isolation and characterization of L-rhamnose-binding lectins from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) eggs. **Fisheries Science**, 68, 2002. 1352-1366.

SHIOMI, K. et al. Purification and characterization of a galactose-binding lectin from the skin mucus of the conger eel *Conger myriaster*. **Comparatibe Biochemistry and Physiology, Part B**, 92, n. 2, 1989. 255-261.

SHIOMI, K. et al. Purification and properties of a lectin in the skin mucus of dragonet *Repomucenus richardsonii*. **Nippon Suisan Gakkaisi**, 56, n. 1, 1990. 119-123.

SHIRAI, T. et al. High-resolution structure of the conger eel galectin, congerin I, in lactose-liganded and ligand-free forms: emergence of a new structure class by accelerated evolution. **Structure**, 7, n. 10, 1999. 1223-1233.

SILVA, P. M. D. et al. PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 108, 2018. 391-400.

SILVA, P. M. et al. The juicy sarcotesta of *Punica granatum* contains a lectin that affects growth survival as well as adherence and invasive capacities of human pathogenic bacteria. **Journal ofFunctional Foods**, 27, 2016. 695-702.

SITOHY, M.; DOHEIM, M.; BADR, H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. **Food Chemistry**, 104, n. 3, 2007. 971-979.

SUZUKI, Y. Hemolysin and Hemagglutinin in skin mucus of the japanese eel *Anguilla japonica*. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 51, n. 12, 1985. 2083.

SUZUKI, Y. et al. Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, 136, 2003. 723-730.

SUZUKI, Y.; KANEKO, T. Demonstration of the mucous hemagglutinin in the club cells of eel skin. **Developmental and Comparative Immunology**, 10, n. 4, 1986. 509-518.

SUZUKI, Y.; TASUMI, S. Nonespecific defense mechanisms of the eel. In: AIDA, K.; TSUKAMOTO, K.; YAMAUCHI, K. **Eel Biology**. [S.l.]: Springer, 2003. Cap. 33, p. 469-484.

TASUMI , S. et al. Characteristics and primary structure of a galectin in the skin mucusof the japanese eel, *Anguilla japonica*. **Developmental and Comparative Immunology**, 28, 2004. 325-335.

TASUMI, S. et al. Primary structure and characteristics of a lectin from skin mucus of the japanese eel *Anguilla japonica*. **The Journal of Biological Chemistry**, 277, n. 30, 2002. 27305-27311.

TATENO, H. et al. A novel rhamnose-binding lectins family from eggs of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) with different structures and tissue distribution. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 65, n. 6, 2001. 1328-1338.

TATENO, H. et al. Distribuition and molecular evolution of rhamnose binding lectins in Salmonidae: isolation and characterization of two lectins from white-spotted Charr (*Salverinus leucomaenis*) eggs. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 66, n. 6, 2002. 1356-1365.

TENÓRIO, D. A. et al. Angiotensin processing activities in the venom of the *Thalassophryne nattereri*. **Toxicon**, 98, 2015. 49-53.

TODA, M. et al. Characterization of the lectin from the skin mucus of the kingklip *Genypterus capensis*. **Fisheries Science**, 62, n. 1, 1996. 138-141.

TSUTSUI, S. et al. Novel mannose-specific lectin found in torafugu, Takifugu rubripes: a review. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part D**, 1, 2006a. 122-127.

TSUTSUI, S. et al. Carbohydrate-binding site of a novel mannose-specific lectin from fugu (*Takifugu rubripes*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, 143, 2006b. 514-519.

TSUTSUI, S. et al. Yeast-binding C-type lectin with opsonic activity from conger eel (*Conger myriaster*) skin mucus. **Molecular Immunology**, 44, 2007. 691-702.