

ROSIELY FELIX BEZERRA

**Purificação e Caracterização Parcial
da Lectina Presente no Soro do
Peixe Amazônico Tambaqui
(*Colossoma macropomum*)**

Recife, 2009



ROSIELY FELIX BEZERRA

**Purificação e Caracterização Parcial da Lectina
Presente no Soro do Peixe Amazônico Tambaqui
(*Colossoma macropomum*)**

Recife, 2009

Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia

ROSIELY FELIX BEZERRA

**Purificação e Caracterização Parcial da Lectina
Presente no Soro do Peixe Amazônico Tambaqui
(*Colossoma macropomum*)**

Dissertação apresentada ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, M.C., Ph.D

Co-Orientador: Prof. Ranilson de Souza Bezerra, M.C., Doutor

Colaboradora: Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho, M.C., Doutora

Recife, 2009

Bezerra, Rosiely Felix

Purificação e caracterização parcial da lectina presente no soro do peixe amazônico Tambaqui (*Colossoma macropomum*) /Rosiely Felix Bezerra. – Recife: O Autor, 2009.

49 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Luana C.B.B Coelho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Bioquímica e Fisiologia, 2010.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Lectina 2. *Colossoma macropomum*. 3. Brasil: Psicultura I. Título.

363.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2010-163

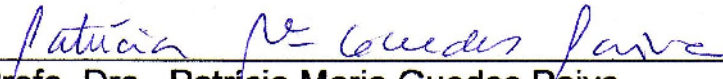
ROSIELY FELIX BEZERRA

**Purificação e Caracterização Parcial da Lectina Presente no Soro
do Peixe Amazônico Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**

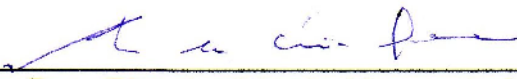
Aprovado por:



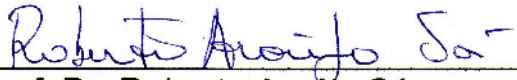
Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Presidente



Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva



Profa. Dra. Rita de Cássia Moura do Nascimento



Prof. Dr. Roberto Araújo Sá

Data: 26 / 11 / 2009

SUMÁRIO

Dedicatória	I
Agradecimentos	II
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABELAS	V
RESUMO	VI
<i>Abstract</i>	VII
1 INTRODUÇÃO: LECTINAS	01
1.1 Breve Histórico	01
1.2 Detecção	03
1.3 Especificidade	03
1.4 Classificação	04
1.4.1 <i>Lectina tipo-C</i>	07
1.4.2 <i>Tipo-S ou Galectina</i>	08
1.4.3 <i>Lectinas ligantes a L-Ramnose (RBLs)</i>	08
1.4.4 <i>Tipo-F ou Fucolectinas</i>	09
1.5 Papel Biológico e Distribuição na Natureza	10
1.5.1 <i>Lectinas em Peixes</i>	12
1.6 Peixe Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	14
1.6.1 <i>Características Gerais</i>	14
1.6.2 <i>Doenças em Tambaqui</i>	16
1.7 Purificação de Lectinas	16
1.8 Referências	18
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4 CAPÍTULO I <i>Purification and Partial Characterization of the Lectin(s) Present in the Serum of Amazon Fish Tambaqui (<u>Colossoma macropomum</u>, CUVIER, 1888). Artigo a ser submetido à Revista Acta Tropica.</i>	33
<i>Abstract</i>	34
4.1 Introduction	34

4.2 Material and methods	35
4.2.1 <i>Blood collecting and serum separation</i>	35
4.2.2 <i>Hemagglutinating activity (HA)</i>	36
4.2.3 <i>Effect of pH and calcium on the bioactivity of the lectin</i>	36
4.2.4 <i>Carbohydrate specificity, ions and thermal stability</i>	36
4.2.5 <i>Purification of tambaqui serum lectin</i>	36
4.2.6 <i>Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)</i>	37
4.3 Results	37
4.3.1 <i>Effect of pH, calcium and salinity on the bioactivity of the lectin</i>	37
4.3.2 <i>Ammonium sulphate precipitation</i>	37
4.3.3 <i>Determination of the thermal stability and evaluation of the HA in the presence of ions</i>	38
4.3.4 <i>Hemagglutinating Activity Inhibition (HAI)</i>	39
4.3.5 <i>Purification of the tambaqui serum lectin</i>	40
4.4 Discussion	41
Acknowledgements	44
References	44
5 CONCLUSÕES	46
ANEXO: Guide for Authors, Acta Tropica	47

“Que nunca te falte um sonho pelo que lutar, um projeto para realizar, algo que aprender, um lugar aonde ir, e alguém a quem amar.”

Autor Desconhecido

***Dedico este trabalho aos meus pais
Marina e Leonel pelo amor e dedicação.***

Agradecimentos

À Deus, por me dar forças para superar todos os obstáculos.

Aos meus pais Marina e Leonel, pela força, compreensão, por sempre terem me incentivado a lutar pelos meus objetivos com dedicação, perseverança e humildade, por me ensinarem que o conhecimento é nossa maior herança. E principalmente por entender minha ausência durante toda esta fase. Mesmo distantes, um forte laço de amor nos une.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa de mestrado.

À Prof^a. Dr^a. Luana Cassandra B.B. Coelho pela valiosa orientação científica, confiança e apoio em todos esses anos de convivência.

À grande amiga de todas as horas Dr^a. Elba Verônica M.M. de Carvalho, pela valiosíssima contribuição neste trabalho, amizade e estímulo devo mais que agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra pela co-orientação.

À Prof^a. Maria Tereza dos Santos Correia e Prof. Athiê Jorge Guerra, pela colaboração.

Aos integrantes da Estação de Aquicultura Continental Prof. Johei Koike, Departamento de Pesca da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela contribuição.

A todos que fazem o laboratório de Glicoproteínas-UFPE e laboratório de Enzimologia-UFPE, em especial à Maria Reis, Felipe, Fernando, Romero, Nataly, Francis, Tiago Henrique, Kaleen, Dalila, Marina, Thiago Cahú, Caio, Cynarha, Mércia e Marília.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica pelo apoio dispensado, Maria Reis, João, Djalma, Neide e Miron.

Ao corpo docente do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia pelas contribuições repassadas em meio às disciplinas.

Aos meus irmãos Jailton, Rosimery, Renata pelo apoio e torcida com todo amor.

Aos meus cunhados Paulo e Rita, pelo carinho, amizade e apoio.

Ao meu grande amigo e namorado Eric Dourado pelo apoio, paciência e torcida.

Às amigas Cíntia e Aline por toda amizade.

Ao amigo Caio pela amizade e por estar sempre disposto a ajudar.

Às amigas Ilyana e Eliane pela torcida e estímulo.

À Cynarha Gyrlene pela atenção e carinho.

À Mauricélia Firmino pela amizade, apoio e atenção.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para esta minha conquista.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO: LECTINAS

Figura 1:	Silas Weir Mitchell (1829-1914), primeiro pesquisador a observar atividade de lectina animal. <i>Fonte:</i> www.collphyphil.org/find_aid/hist/histswm1.htm .	02
Figura 2:	Representação esquemática da hemaglutinação de eritrócitos por lectinas.	04
Figura 3:	Representação esquemática da inibição da hemaglutinação de eritrócitos por lectinas, em presença de carboidratos.	05
Figura 4:	Representação esquemática de quatro tipos de lectinas de plantas: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas, segundo a classificação de PEUMANS & VAN DAMME (1995).	06
Figura 5:	Peixe tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>). <i>Fonte:</i> CONABIO.	14
Figura 6:	Dentição do tambaqui adulto. <i>Fonte:</i> Lima e Goulding, 1998.	15

CAPÍTULO I Purification and Partial Characterization of the Lectin(s) Present in the Serum of Amazon Fish Tambaqui (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1888). Artigo a ser submetido à Revista Acta Tropica.

Figure. 1	Reducing SDS-PAGE 7.5%. Analysis of serum and fractions.	38
Figure. 2	Native acid PAGE (7.5%), serum and fractions (A), Con A-Sepharose fraction (B) and DEAE Sepharose fraction (C).	40
Figure 3	(A) Profile of Con A Sepharose 4B chromatography, eluted with 200 mM α -methyl glucosamine in TBS showed a peak with activity. (B) Profile of DEAE Sepharose chromatography eluted with 150 to 500 mM NaCl showed a peak with activity in 200 mM.	41

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I Purification and Partial Characterization of the Lectin(s) Present in the Serum of Amazon Fish Tambaqui (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1888). Artigo a ser submetido à Revista Acta Tropica.

Table 1	Ammonium sulphate precipitation of tambaqui serum.	37
Table 2	Hemagglutination inhibition (HAI) with sugars and glycoproteins.	38
Table 3	Thermal stability of serum and F0-50.	39
Table 4	Purification of tambaqui serum lectin.	40

RESUMO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma das principais espécies nativas para a piscicultura brasileira, apresentando um ótimo padrão de crescimento e alta produtividade, fato que torna abundante a sua oferta no mercado consumidor. *C. macropomum* foi a primeira espécie de peixe amazônico que atraiu um número relativamente grande de pesquisadores, pois, ele incorpora em uma única espécie, a maioria dos problemas que precisam ser resolvidos para se manejar a pesca e ao mesmo tempo desenvolver a aquicultura. Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que reconhecem carboidratos com alto grau de especificidade através de sítios de ligação. As lectinas estão envolvidas na imunidade inata, sendo por isso, consideradas como a primeira linha de defesa imunológica dos peixes. Essas proteínas versáteis têm sido encontradas em ovos, muco da pele e também no soro de peixes. Neste trabalho, a lectina do soro de tambaqui foi purificada parcialmente através de precipitação com sulfato de amônio. A fração 0-50% (F0-50) apresentou maior atividade hemaglutinante específica e foi escolhida para as próximas etapas de purificação. F0-50 reconheceu especificamente os carboidratos fucose, galactose e metil- α -D-galactose. Em seguida F0-50 foi submetida à Con A Separose 4B; o material adsorvido e eluído foi submetido à DEAE Sepharose. Todas as etapas foram acompanhadas por medidas da atividade hemaglutinante, dosagem de proteínas e eletroforese nativa ácida e na presença de SDS. Frações e lectina parcialmente purificada foram caracterizadas também quanto à estabilidade térmica, dependência de íons e pH. A lectina parcialmente purificada do soro do tambaqui é uma proteína ácida, termoestável, com atividade independente de cálcio, que reconhece os monossacarídeos fucose, galactose e metil- α -D-galactose, podendo, portanto, ser incluída na família das fuclectinas.

Palavras Chave: Tambaqui; *Colossoma macropomum*; Purificação; Lectinas; Imunidade.

Abstract

Tambaqui (*Colossoma macropomum*) is one of the main native species of Brazilian pisciculture, showing a good pattern of growth and high productivity, which makes its abundant supply in the consumer market. *C. macropomum* was the first species of Amazonian fish that attracted a relatively large number of researchers, since it incorporates in a single species, the majority of problems that need to be solved to manage the fishery while to develop aquaculture. The lectins are involved in innate immunity and are therefore regarded as the first line of immune defense of fish. These versatile proteins have been found in eggs, skin mucus and fish serum. In the presente work, the tambaqui serum lectin was partially purified by ammonium sulfate precipitation. The fraction 0-50% (F0-50) showed higher specific hemagglutinating activity and was chosen for next purification steps. F0-50 specifically recognized the carbohydrate fucose, galactose and methyl- α -D-galactose. F0-50 was submitted to Con A Sepharose 4B; the adsorbed and eluted material was subjected to DEAE Sepharose. All steps were followed by measurements of hemagglutinating activity, determination of proteins, acidic native electrophoresis and in the presence of SDS. Fractions and partially purified lectin were also characterized about thermal stability, ion dependence and pH values. The partially purified tambaqui serum lectin is an acidic protein, thermostable, with calcium independent activity, that recognizes the monosaccharides fucose, galactose and methyl- α -D-galactose, and can therefore be included in the family of fuclectins.

Keywords: Tambaqui; *Colossoma macropomum*; Purification; Lectins; Imunity.

1 INTRODUÇÃO: LECTINAS

1.1 Breve Histórico

Em 1884 Bruylants e Venneman demonstraram que a toxicidade das sementes de *Abrus precatorius* devia-se a uma fração protéica, denominada Abrina, que podia ser precipitada com álcool a partir de um extrato aquoso da semente (MOREIRA et al., 1991). Quatro anos depois, em 1888, Peter Hermann Stillmark, da Universidade Dorpat (agora Universidade de Tartu na Estônia), apresentou sua tese de doutorado intitulada “*Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen Von Ricinus comm. L. und einigen anderen Euphorbiaceen*”, que se referia à descoberta de uma proteína também tóxica presente no feijão castor, denominada Ricina, a qual tinha a propriedade de aglutinar células do sangue. Este evento é internacionalmente conhecido como o nascimento de um novo ramo na ciência chamado de lectinologia (KENNEDY et al., 1995; GABOR et al., 2001; BIES et al., 2004).

Paul Ehrlich, um médico cientista, usou a Abrina e a Ricina, em seus estudos imunológicos na última década de 1800 (LIS e SHARON, 1991). William Boyd e Elizabeth Shapleigh em 1954 nomearam este novo grupo de proteínas de Lectinas, do latim, *Lectus* (escolhido, selecionado), para focar sua propriedade geral de aglutinar seletivamente grupos sanguíneos, bem como tipos celulares específicos (BOYD e SHAPLEIGH, 1954; KENNEDY et al., 1995; MATSUI et al., 2001).

Lectinas são, portanto, definidas como um grupo de proteínas ou glicoproteínas que não são anticorpos nem enzimas e possuem a habilidade de se ligar especificamente a mono ou oligossacarídeos sem alterar sua estrutura (GOLDSTEIN e PORETZ, 1986; VIJAYAN e CHANDRA, 1999; SATO et al., 2000; SOUZA et al., 2001; DUTTA et al., 2005). Segundo Peumans e Van Damme (1995) estas proteínas devem possuir pelo menos um domínio de ligação não catalítico para carboidratos. Lectinas têm também, a habilidade de se ligar a resíduos de açúcares, através de sítio(s) de ligação a carboidrato, os quais podem estar conjugados com lipídeos ou proteínas, precipitando glicoconjugados em solução (GOLDSTEIN et al. 1980; VORNHOLT et al., 2007).

Inicialmente, o estudo de lectinas era focado apenas em plantas, em meados do século XX foi quando se tornou evidente que lectinas também são distribuídas no

reino animal (PROBSTMEIER e PESHEVA, 1999). Em 1974, Stockert et al. publicaram um artigo descrevendo uma aglutinina para eritrócitos humanos encontrada em fígado de coelho. Esta *“lectina hepática mamífera”*, como ele a chamou, foi aclamada *“a primeira lectina de origem mamífera”*. Lectinas animais, incluindo lectinas mamíferas, foram conhecidas ao mesmo tempo, ou antes, que lectinas de plantas, embora o contexto de sua descoberta tenha sido um tanto diferente, algumas foram descobertas muito antes de sua identificação como proteínas ligantes a carboidratos (KILPATRICK, 2000).

Mais historicamente significativa, no entanto, foi o artigo de Mitchell e Reichert em 1886 (*Apud* KILPATRICK, 2002) descrevendo o estudo sobre veneno de cascavel, contendo uma descrição explícita da aglutinação, apesar do termo lectina não ter sido usado. Este artigo foi publicado 2 anos antes da primeira descrição de Herman Stillmark da atividade de lectina de planta (KILPATRICK e GREEN, 1992). Mitchell, na verdade, observou a atividade de lectinas de veneno de cascavel antes de 1860. Deste modo, pode-se concluir que Silas Weir Mitchell (Figura 1) foi o primeiro pesquisador a observar atividade de lectina animal, e provavelmente o primeiro a observar atividade de lectina por si (KILPATRICK, 2002).

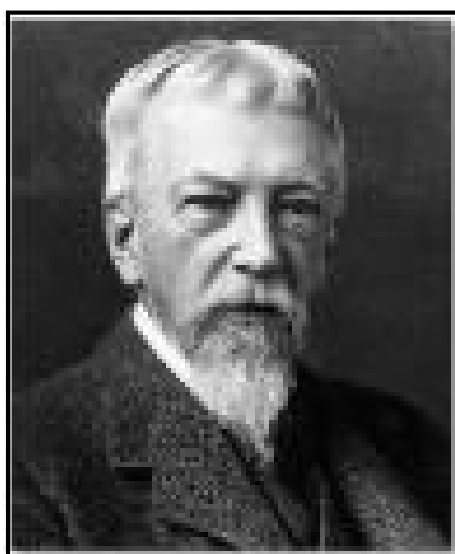


Figura 1: Silas Weir Mitchell (1829-1914), primeiro pesquisador a observar atividade de lectina animal.

Fonte: www.collphyphil.org/find_aid/hist/histswm1.htm

Em 1902, Flexner e Noguchi, da Universidade da Pensilvânia, baseados na descrição de Mitchell e Stewart da aglutinação de células vermelhas do sangue por veneno de cobra publicaram um estudo detalhado da aglutinação e lise de eritrócitos e leucócitos por uma variedade de venenos de cobra. Eles atribuíram a atividade aglutinante a *“intermediários sanguíneos”*, ou a fatores similares a anticorpos (KILPATRICK, 2002)

Centenas de lectinas são, atualmente, bem caracterizadas, e o número de isolamento das mesmas vem crescendo muito rápido; elas têm sido isoladas de plantas, animais e microorganismos (LIS e SHARON, 1991, VORNHOLT et al., 2007).

Devido à habilidade dessas proteínas de se ligar a carboidratos, cada ligação pode resultar em uma variedade de efeitos biológicos (MACHUKA et al., 1999) os quais atraem cada vez mais o interesse da comunidade científica (SATO et al., 2000; KONOZY et al., 2002; MONZO et al., 2007).

1.2 Detecção

As lectinas podem se ligar a açúcares livres ou à resíduos de carboidratos, de polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídios, onde podem estar livres ou ligados à membrana da célula (MONZO et al., 2007). A presença de lectinas é principalmente revelada através de um ensaio de hemaglutinação (Figura 2), que utiliza uma diluição seriada da lectina antes da incubação com eritrócitos (COELHO e SILVA, 2000; PAJIC et al., 2002). Os eritrócitos utilizados para este ensaio podem ser humanos ou de animais, tratados enzimaticamente (tripsina, papaína, entre outras) ou quimicamente (glutaraldeído ou formaldeído) aumentando ou não a sensibilidade das células à lectina (CORREIA e COELHO, 1995; COELHO e SILVA, 2000; MO et al., 2000).

1.3 Especificidade

Os carboidratos específicos podem se ligar às lectinas através de ligações de hidrogênio, coordenações metálicas, interações de Van der Waals e interações hidrofóbicas (SCHWARTZ et al., 1993; DRICKAMER e TAYLOR, 1998). A especificidade de uma lectina tem sido analisada através de ensaios de inibição da

atividade hemaglutinante (Figura 3), utilizando para isto diferentes soluções de carboidrato ligante (GABOR et al., 2001; OTTA et al., 2002).

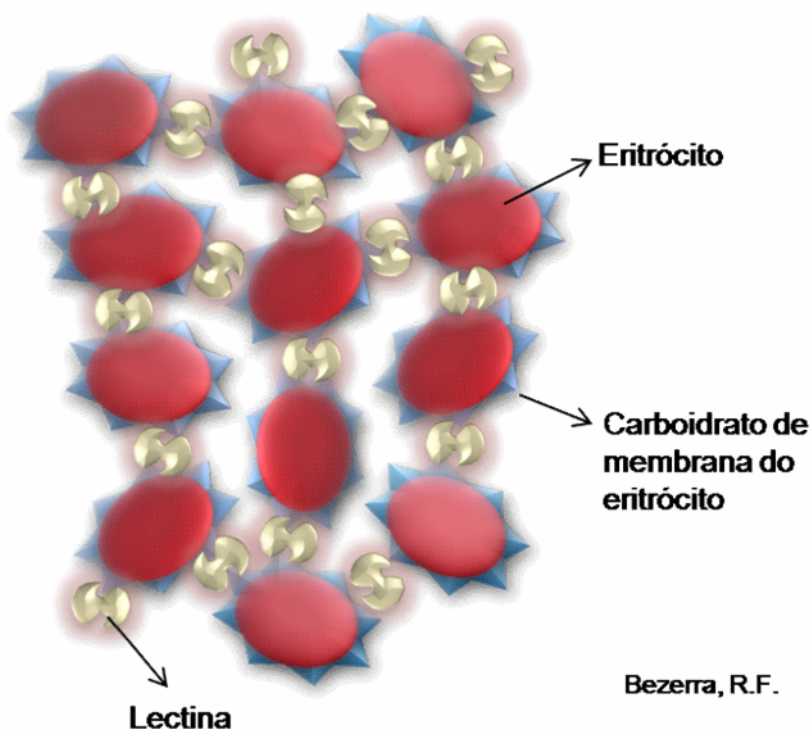


Figura 2: Representação esquemática da hemaglutinação de eritrócitos por lectinas.

1.4 Classificação

Segundo Peumans e Van Damme (1995) lectinas de plantas foram classificadas de acordo com sua estrutura geral em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 4). Merolectinas consistem de apenas um domínio de ligação a carboidrato e devido a seu caráter monovalente são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Hololectinas também consistem exclusivamente de domínios de reconhecimento a carboidrato, mas possuem pelo menos dois domínios de ligação e estes podem ser idênticos ou muito similares. As hololectinas podem ser di ou multivalentes e assim podem aglutinar células e precipitar glicoconjugados. As superlectinas são compostas de no mínimo dois domínios de ligação a carboidrato e, diferente das hololectinas, os domínios de ligação a carboidrato não são idênticos ou similares reconhecendo açúcares estruturalmente diferentes.

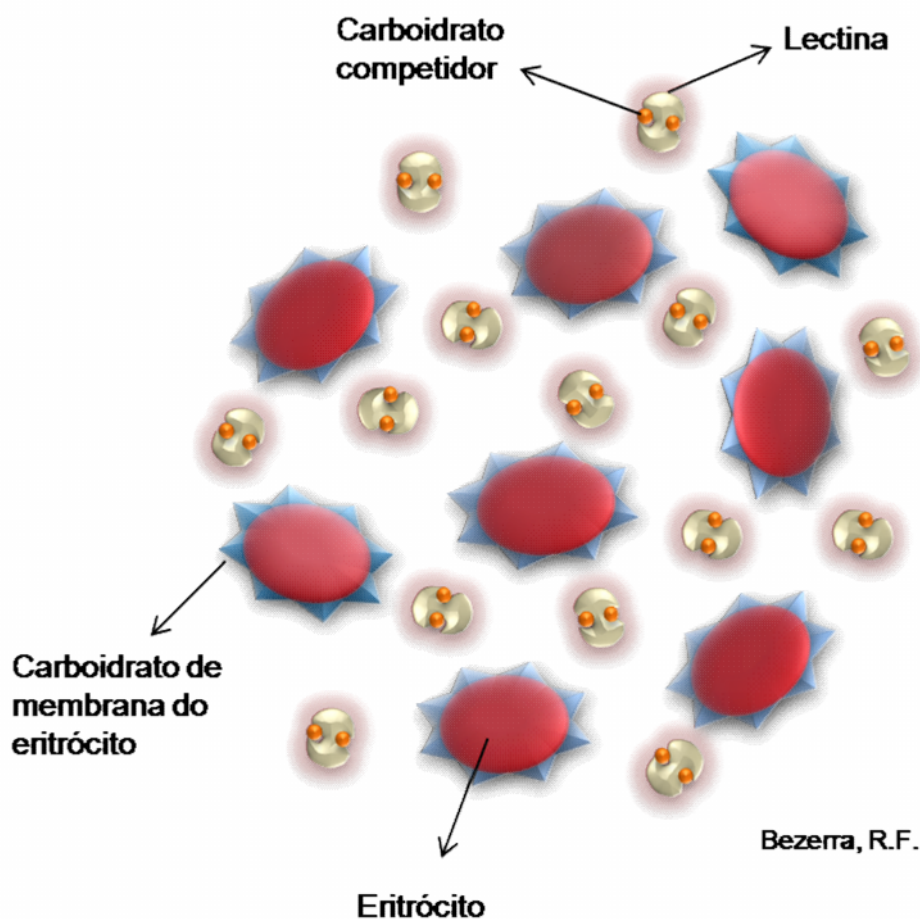
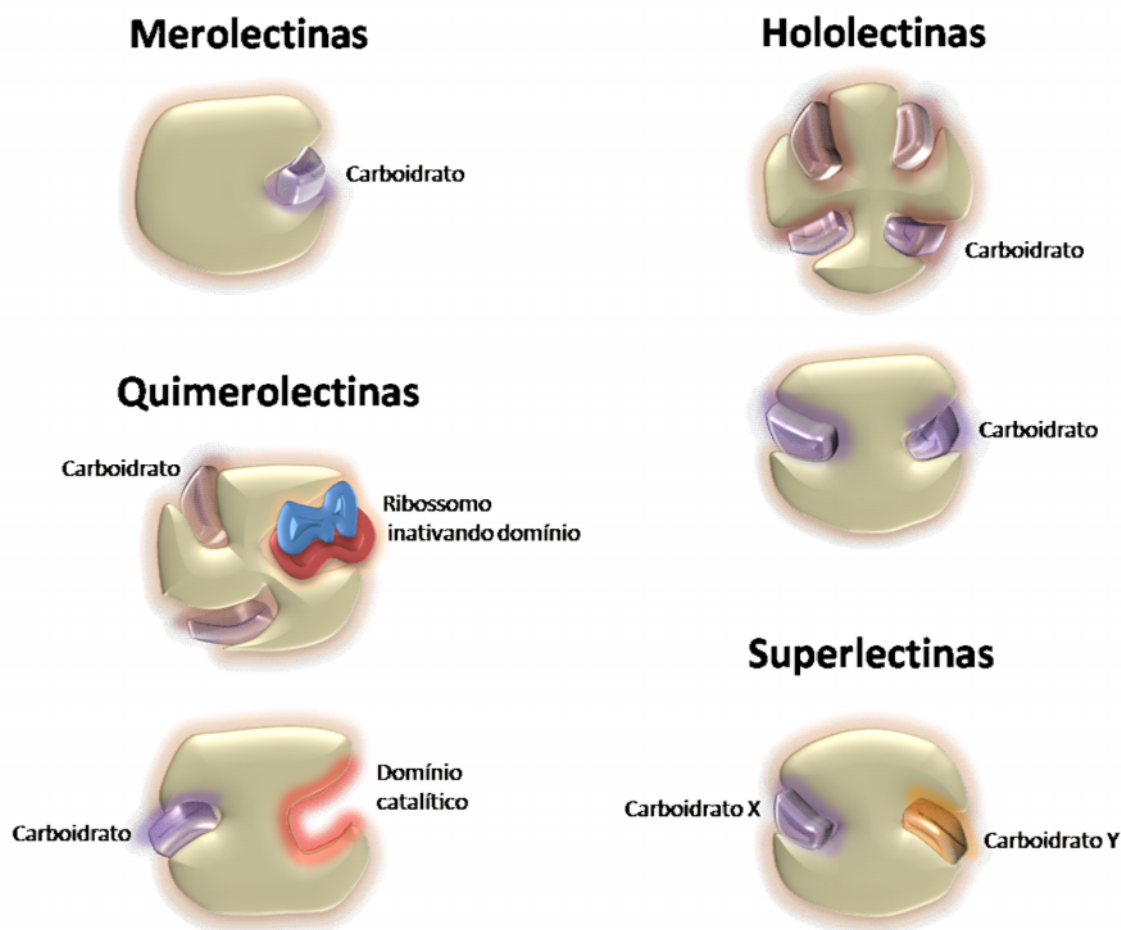


Figura 3: Representação esquemática da inibição da hemaglutinação de eritrócitos por lectinas, em presença de carboidratos.

Ao contrário das merolectinas, das holo e das superlectinas, as quimerolectinas não consistem exclusivamente de domínios de reconhecimento a carboidrato (*Carbohydrate Recognition Domain* – CRD), mas são formadas por domínio de ligação a carboidratos e outro domínio que possui uma atividade catalítica ou outra atividade biológica que deve agir independente do CRD. As quimerolectinas comportam-se como mero ou hololectinas dependendo do número de sítios de ligação a carboidrato. As lectinas ainda podem ser classificadas, de acordo com o carboidrato a que preferencialmente se ligam (NOMURA et al., 1998; PEUMANS e VAN DAMME, 1995; RABINOVICH et al., 1999, SUZUKI et al., 2003).



Bezerra, R.F.

Figura 4: Representação esquemática de quatro tipos de lectinas de plantas: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas, segundo a classificação de PEUMANS & VAN DAMME (1995).

O reconhecimento de carboidratos por lectinas é mediado por CRD, baseado na estrutura do CRD, na seqüência primária e no requerimento de íons divalentes, as lectinas animais são classificadas em várias famílias: tipo-C (DAY, 1994; OURTH et al., 2008), tipo-S ou galectina (BARONDES et al., 1994; KASAI e HIRABAYASHI, 1996, FUKUMORI et al., 2007), tipo-P (KORNFELD, 1922), tipo-I (POWELL e VARKI, 1995), proteína ligante à heparina (MARGALIT et al., 1993) ou pentraxina (STEEL e WHITEHEAD, 1994; GEWURZ et al., 1995), lectinas ligantes de ramnose (TATENO et al., 2002a; WATANABE et al., 2009), tipo-F ou fucolectinas (ODOM, 2004; ODOM e VASTA, 2006, CAMMARATA et al., 2007, ARGAYOSA e. LEE, 2009; SALERNO et al., 2009), entre outras. As famílias de lectinas mais frequentemente caracterizadas em peixes são tipo-C, tipo-S, lectinas ligantes à ramnose e tipo-F.

1.4.1 Lectina tipo-C

As lectinas tipo-C representam uma superfamília que compartilham a característica de possuir um domínio de ligação a carboidrato que liga o íon cálcio (Ca^{2+}), o *C-type lectin-like domain* (CTLD) (DRICKAMER, 1996). Essas lectinas estão agrupadas em três famílias: as lectinas endocíticas, as colectinas e as selectinas (LIS & SHARON, 1991).

As lectinas endocíticas funcionam como receptor de membrana com diferentes especificidades como N-acetilgalactosaminas, galactose e manose-específica. As lectinas endocíticas do tipo II são proteínas transmembranais, constituídas de um domínio citoplasmático N-terminal, um domínio de membrana e uma região C-terminal composta pelo CRD (LIS & SHARON, 1991). As lectinas manose-específicas, encontradas na superfície de macrófagos, diferem das outras lectinas endocíticas por apresentarem uma proteína transmembranar do tipo I, a extremidade C-terminal da lectina encontra-se no citoplasma da célula e a extremidade N-terminal fora da célula. Além disso, a parte extracelular desta molécula apresenta três domínios, um domínio rico em cisteínas, uma região similar a do tipo II com o domínio fibronectina e um CRD (DRICKAMER, 1996).

As colectinas possuem uma função similar às galectinas, porém diferem no mecanismo, que é realizado por MBP's (*Mannose Binding Protein*) no soro e fígado de mamíferos. Estas lectinas ligam-se em oligomanosídios de microorganismos infectantes, causando ativação do sistema complemento sem a participação de anticorpos, e subsequente lise de patógenos (LIS & SHARON, 1991).

As selectinas formam outra família de lectinas tipo-C que participam do papel de interação de açúcar com lectina no reconhecimento biológico. As selectinas mediam a adesão dos leucócitos em circulação para células endoteliais do sangue, um pré-requisito para a migração dos leucócitos para os tecidos. Este controle regula o tráfego do leucócito para os sítios inflamatórios e a migração dos linfócitos para os órgãos linfóides. As selectinas são divididas em três tipos: as selectinas – L (90-110kDa), selectinas – E (115kDa), selectinas – P(140kDa).

1.4.2 Tipo-S ou Galectina

Galectinas representam uma das principais famílias de lectinas de origem animal, estão presentes em uma ampla gama de tecidos animais e participam de diversos processos biológicos, tais como modulação da resposta imune (OFFNER et al., 1990), regulação do crescimento celular (YAMAOKA et al., 1991) e indução e regulação da apoptose (PERILLO et al., 1995). As galectinas têm várias características em comum tais como atividade independente de cálcio (Ca^{2+}), especificidade para β -galactosídeos e possuem pontes dissulfeto (KILPATRICK, 2000).

Baseado na sequência de aminoácidos, quatorze membros da família de galectinas têm sido identificados e classificados em três subgrupos (KASAI e HIRABAYASHI, 1996):

- a) Prototipo (galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13 e 14)
- b) Quimera (galectina 3)
- c) *Tandem repeat* (galectinas 4, 6, 8, 9 e 12)

Todos estes subgrupos contêm um CRD altamente conservado (DUMIC et al., 2006). As galectinas do tipo prototipo contêm um CRD por subunidade e são, usualmente, homodímeros de subunidades ligadas não-covalentemente (RABINOVICH et al., 1999; AHMED et al., 2004). Em contraste, galectina do tipo quimera são monômeros com um CRD C-terminal similar ao prototipo, e este está conectado a um domínio N-terminal rico em glicina e prolina (KISHORE et al., 1997; AHMED et al., 2004). A galectina *tandem repeat* é formada por uma única cadeia polipeptídica que forma dois distintos CRD, conectados por repetições de 7-10 aminoácidos com uma sequência consenso (KISHORE et al., 1997; RABINOVICH et al., 1999; DUMIC et al., 2006).

1.4.3 Lectinas ligantes a L-Ramnose (RBLs)

Recentemente uma nova família de lectinas, as lectinas ligantes à L-ramnose (RBLs) foi proposta baseado em sua característica de especificidade de ligação a carboidrato e estrutura molecular, que consiste em dois ou três CRD homólogos em *tandem* de cerca de 95 resíduos de aminoácidos (TATENO et al., 1998; HOSONO et al., 1993). As RBLs são classificadas em 5 subgrupos baseado na arquitetura do seu

domínio, atividade hemaglutinante para eritrócitos humanos e especificidade ao carboidrato (NITTA et al., 2007). Estas proteínas têm sido isoladas de vários tipos de peixes e invertebrados e interagem com vários tipos de bactérias. Sugere-se também estarem envolvidas em reações inflamatórias por funcionarem como agentes de reconhecimento e tráfico de células para sítios de inflamação bem como ativar a cascata inflamatória pela regulação da expressão de citocinas (WATANABE et al., 2009).

RBLs tem uma variedade de funções em ovos de peixes, tais como prevenção de poliespermia, regulação do metabolismo de carboidrato e mitogênese (TATENO et al., 2002a); desempenham também um importante papel como proteínas de reconhecimento padrão (PRP) na imunidade inata, aglutinam bactérias Gram-negativas e Gram-positivas por reconhecer a estrutura de lipopolissacarídeo (LPS) e ácido lipoteicóico (LTA) em sua superfície, respectivamente (TATENO et al., 2002b; SHIINA et al., 2002). RBLs são principalmente localizadas em tecidos relatados com o sistema imune, tais como muco de células de brânquias, células caliciformes do intestino, baço, trombócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos (TATENO et al., 2002c; WATANABE et al., 2008), sugerindo que RBLs estão envolvidas na imunidade inata e na reação inflamatória (WATANABE et al., 2009), em *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris) RBLs estão presentes nos grânulos corticais em ovos não fertilizados e são liberados para o espaço peri-vitelínico logo após a fertilização (TATENO et al., 2002c).

1.4.4 Tipo-F ou Fucolectinas

Recentemente, uma nova família de lectinas que ligam especificamente os carboidratos L-fucose e D-galactose foi identificada (ODOM, 2004; BIANCHET et al., 2002) e descrita como moléculas de reconhecimento imune em ambos procariotos e eucariotos, incluindo vertebrados e invertebrados (ODOM e VASTA, 2006). Essas lectinas foram nomeadas por Honda et al. (2000) de “Fucolectinas” e são caracterizadas por serem não-glicosiladas e cálcio (Ca^{2+}) independentes (CAMMARATA et al., 2001). As lectinas tipo-F apresentam um motivo de ligação ao cálcio (BIANCHET et al., 2002).

Em algumas espécies o domínio de ligação pode ser associado com outros domínios estruturais incluindo pentraxina, outros domínios de lectinas tais como, lectina tipo-C (ODOM e VASTA, 2006). Uma observação comum nesta família de

lectinas é a expansão de CRD *tandem repeats* que parecem ser um exclusivo modo de diversificação evidente em espécies teleósteas (CAMMARATA et al., 2007).

As fuclectinas têm sido detectadas em procariotos e eucariotos, em tecidos e fluidos de espécies vertebradas e invertebradas (HONDA et al., 2000). Em peixes teleósteos, membros bem caracterizados desta família são lectinas do soro de *Anguilla japonica* (HONDA et al., 2000), *Dicentrarchus labrax* (CAMMARATA et al., 2001), *Anguilla anguilla* (BIANCHET et al., 2002), *Morone saxatilis* (ODOM e VASTA, 2006), *Sparus aurata* (CAMMARATA et al., 2007) e *Oreochromis niloticus* L. (ARGAYOSA e LEE, 2009).

Apesar das lectinas tipo-F terem seu papel caracterizado como mediadoras do reconhecimento molecular na imunidade inata, até o presente momento os mecanismos detalhados de sua atividade ainda não foram bem elucidados.

1.5 Papel Biológico e Distribuição na Natureza

As variedades de lectinas com características e especificidades a carboidratos distintos vêm despertando um amplo interesse da comunidade científica, tanto para utilização em processos médicos, como também para aplicações biotecnológicas destas proteínas purificadas, tendo em vista um melhor entendimento da participação das lectinas no sistema imunológico de organismos vertebrados e invertebrados (EWART et al., 2001; COMINETTI et al., 2002; MONZO et al., 2007). Devido à sua propriedade de ligar carboidratos em superfícies celulares, desempenham papel importante em eventos celulares como aglutinação, proliferação celular, opsonização, transdução de sinal, metástases e apoptoses (TASUMI et al., 2002; NAUTA et al., 2004; TATENO et al., 2002a, MACIEL et al., 2004, DUTTA et al., 2005; TSUTSUI et al., 2006b, LITMAN et al., 2007).

São utilizadas também na caracterização de diferentes estágios de desenvolvimento de parasita (KENNEDY et al., 1995) estimulação mitogênica (MACIEL et al., 2004), para detectar componentes de carboidratos presentes em superfícies de células normais e cancerígenas (SHARON e LIS, 1993; BELTRÃO et al., 2003; KOMATH et al., 2006). Estas proteínas podem ser também usadas para a produção dos chamados medicamentos inteligentes que diferem dos tradicionais por atuarem em células específicas do organismo evitando efeitos colaterais, do tipo

provocado pela quimioterapia (CLARK et al., 2000; TORCHILIN et al., 2001, WOODLEY, 2001).

Lectinas de plantas foram reconhecidas por inibir a replicação de HIV em cultura de células linfocíticas, bem como inibir a fusão do vírus à célula (HAMMAR et al., 1989; MATSUI et al., 1990; BALZARINI et al., 1991), também funcionam como potentes inibidoras de coronavírus associados com sérias doenças respiratórias (KEYAERTS, et al., 2007). Atividade anti-HIV também foi encontrada para uma galectina do invertebrado *Chaetopterus variopedatus* (WANG et al., 2006) e para a lectina n-acetyl-glicosamina específica de *Serpula vermicularis* (MOLCHANOVA et al., 2007).

O reconhecimento de carboidratos, expostos na superfície celular de patógenos potenciais, por lectinas é considerado um componente chave da resposta imune inata em animais (HOLMSKOV et al., 2003; MCGREAL et al., 2004). Em mamíferos, assim como em peixes, uma das vias de ativação do sistema complemento é a via das lectinas, ativada por uma lectina que liga o carboidrato manose (MBL) presentes nos microorganismos (IKEDA et al., 1987; MATSUSHITA e FUJITA, 1995; HOLLAND e LAMBRIS, 2002). Por outro lado, algumas lectinas funcionam como agentes de reconhecimento e tráfico para promover o extravasamento de células para os locais de inflamação no sistema imune adquirido (WATANABE et al., 2009). Lectinas com afinidade para galactose parecem ter um papel importante na modulação da resposta imune em peixes (YOUSIF et al., 1994; MISTRY et al., 2001; KURATA e HATAI, 2002).

Em vertebrados, o papel de lectinas como mediadores do reconhecimento entre o próprio e o não-próprio no início do desenvolvimento e na imunidade inata tem sido bem documentado (KILPATRICK, 2002; MATSUSHITA et al., 1996). O reconhecimento do não-próprio é a primeira linha de defesa imunológica (YU et al., 2002) sendo mediado por um grupo de proteínas denominadas *Receptores de Reconhecimento Padrão* (PRRs), as lectinas são consideradas um dos mais importantes PRRs. (BROWN et al., 2007). O crescente estudo sugere também, que lectinas são proteínas de defesa que podem proteger contra ataques de predadores como vírus, fungos e bactérias (CAVADA et al., 1998; RATANAPO et al., 2001; SACCHETTINI et al., 2001, TSUTSUI et al., 2006a).

Essas moléculas versáteis estão distribuídas extensamente em diversos organismos incluindo bactérias, fungos, plantas, vertebrados e invertebrados

(TSUTSUI et al, 2006a; LIENER et al, 1986, YOUNG et al., 2007). No reino das plantas, as sementes de leguminosas constituem a principal fonte de lectinas, mas estas também são abundantes em tecidos vegetais tais como: raiz, folha, talo, vagem, frutas, flores e casca (COELHO e SILVA, 2000; WU et al., 2000; COUTIÑO-RODRÍGUEZ et al., 2001).

1.5.1 Lectinas em Peixes

O sistema imune inato tem recebido crescente atenção como sendo de grande importância no estudo de resistência a doenças em peixes (MAGNADOTTIR, 2006; WHYTE, 2007). O motivo é basicamente a ineficiência intrínseca da resposta imune adquirida devido ao seu estado evolutivo e natureza pecilotérmica. Isso resulta em um repertório limitado de anticorpos, afinidade de maturação e de memória e uma lenta proliferação linfocitária. A resposta imunológica adquirida do peixe é, portanto, lenta (até 12 semanas) em comparação com a temperatura instantânea e relativamente independente da resposta imune inata (ALEXANDER e INGRAM, 1992; ELLIS, 2001).

O sistema imune de peixes ao contrário de vertebrados superiores é comparativamente simples e diferenciado. Os maiores órgãos linfomielóides dos peixes são timo, rim e baço (PRESS e EVENSEN, 1999; MULERO et al., 2007). Acreditava-se que os teleósteos sintetizavam apenas uma classe de imunoglobulinas, a IgM, no entanto, a presença de outros isotipos de Ig como IgD, quimeras IgT/IgZ e IgM-IgZ também tem sido registrada em uma grande variedade de espécies (ELCOMBE et al., 1985; BAG et al., 2008), IgD em *Ictalurus punctatus* (WILSON et al., 1997; BENGTEEN et al., 2002), *Salmo salar* (HORDVIK et al., 1999), *Gadus morhua* (STENVIK e JORGENSEN, 2000), *Paralichthys olivaceus* (HIRONO et al., 2003; SRISAPOOME et al., 2004) e IgT/IgZ em *Siniperca chuatsi*, *Danio rerio*, e *Oncorhynchus mykiss* (SAKAI e SAVAN, 2004; TIAN et al., 2009). Além destes isotipos de Ig, quimera IgM-IgZ é também relatada em *Cyprinus carpio* (SAVAN et al., 2005). Várias proteínas agem na resposta imune inata de peixe (EWART et al, 2001), algumas têm sido bem caracterizadas, incluindo as proteínas antimicrobianas bem como a lisozima (HANCOCK e LEHRER, 1998; JIMÉNEZ-CANTIZANO et al., 2008).

Recentemente, pesquisas veterinárias e médicas descobriram que as lectinas estão envolvidas na imunidade inata (RUSSELL & LUMSDEN, 2005; KUBITZA e KUBITZA, 2004; TSOI et al., 2004; CASTELLANA et al., 2007) sendo por isso consideradas como a primeira linha de defesa imunológica dos peixes. Segundo Ewart et al. (2001), essas lectinas podem se ligar a um conjunto de estruturas de carboidratos na superfície celular de microorganismos (bactéria, vírus, levedura e protozoário parasitário) mediando um efeito antibacteriano, ou atuando pela destruição direta via complemento através de um complexo de ataque da membrana lítica, ou promovendo fagocitose.

A descoberta de lectinas em peixes adicionou uma nova dimensão na biologia e imunologia dos peixes. Desde então, lectinas têm sido isoladas a partir dos ovos, muco da pele, plasma e também do soro de várias espécies de peixes (JENSEN et al., 1997; OTTINGER et al., 1999; HONDA et al., 2000; FOCK et al., 2001; CAMMARATA et al., 2001; BUCHMANN e LINDENSTROM, 2002; DONG et al., 2004; TASUMI et al., 2004; JIMBO et al., 2007). Entre alguns tipos de lectina animal, galectina compreende uma das maiores famílias e são bastante encontradas em peixes como *Conger myriaster*, *Arius thalassinus* e *Oncorhynchus mykiss* (INAGAWA et al., 2001; NAKAMURA et al., 2001; SUZUKI et al., 2003; FUKUMORI et al., 2007). Têm sido encontradas também lectinas tipo-C (BAYNE et al., 2001, NIKOLAKOPOULOU e ZARKADIS, 2006, OURTH et al., 2008), MBL (NIKOLAKOPOULOU e ZARCADIS, 2006), lectina que reconhece L-ramnose (OKAMOTO et al., 2005, WATANABE et al., 2009) e fucolectinas, lectinas que reconhecem fucose e galactose (HONDA, 2000; ODOM, 2004; ODOM e VASTA, 2006; CAMMARATA et al., 2007; ARGAYOSA e LEE, 2009; SALERNO et al., 2009).

A importância fisiológica e imunológica das lectinas em peixe ainda não está bem esclarecida (NAKAMURA et al., 2001), embora pouco se saiba sobre seu significado biológico, parecem desempenhar papéis importantes na fertilização, na morfogênese e na defesa contra microorganismos (ALEXANDER e INGRAM, 1992; ARASON, 1996; EWART et al., 2001; DONG et al., 2004; TASUMI et al., 2004).

1.6 Peixe Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

1.6.1 Características Gerais

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818, uma das espécies aquáticas de maior expressão na alimentação da Região Norte, apresenta ampla distribuição nos rios desta região (VAL e ALMEIDA-VAL, 1995). Nas últimas décadas, vem se tornando uma das principais espécies nativas para a piscicultura brasileira, apresentando um ótimo padrão de crescimento e produtividade, fato que torna abundante a sua oferta no mercado consumidor. Esta espécie conta também com grande interesse de piscicultores de outros países da América do Sul, devido à sua rusticidade, qualidade da carne e o fato de poder chegar a 1 m de comprimento total e 30 kg de peso corporal no seu ambiente natural (GOUDING e CARVALHO, 1982). É o segundo maior peixe de escamas nas águas sul-americanas, perdendo apenas para o gigante pirarucu (*Arapaima gigas*). Essas características fazem do *C. macropomum* a terceira espécie mais cultivada no Brasil e a mais cultivada na região amazônica.

Apesar de seu cultivo ser possível em todo o Brasil, o risco de alta mortalidade durante os meses de inverno tem desencorajado o cultivo nos estados das regiões Sul e Sudeste, particularmente, em locais onde as águas podem atingir temperaturas abaixo de 17 °C (KUBITZA e KUBITZA, 2004); a temperatura ideal é em torno dos 25 °C a 30 °C (SILVA e GURGEL, 1999). Desse modo, o cultivo do tambaqui tem se concentrado nas regiões Norte, Nordeste e Centro Oeste do País, onde além do clima favorável, o tambaqui desfruta de grande aceitação no mercado (KUBITZA e KUBITZA, 2004).

O tambaqui (Figura 5), da palavra tupi *tãba'ki*, que significa resíduo de ostra (*tãba* – concha, *ki* – amontoado), foi a primeira espécie de peixe amazônico que atraiu um número relativamente grande de pesquisadores, como engenheiros de pesca, biólogos, fisiologistas e aqüicultores, pois ele incorpora, em uma única espécie, a maioria dos problemas que precisam ser resolvidos para se manejar a pesca e ao mesmo tempo desenvolver a aqüicultura.



Figura 5: Peixe tambaqui (*Colossoma macropomum*).

A idade média na qual o tambaqui atinge a maturidade sexual é de 3 a 4 anos. O tambaqui é um peixe reofílico, portanto não desova naturalmente em cativeiro; peixes dessa natureza precisam vencer as correntezas dos cursos de água para maturar as suas gônadas, fenômeno denominado piracema (PROENÇA e BITTENCOURT, 1994). Na região Nordeste, a reprodução do tambaqui ocorre do período de outubro a março, sendo observada uma maior concentração das desovas no período de novembro a fevereiro (KUBITZA e KUBITZA, 2004).

Comparando com a maioria das outras espécies de peixes amazônicos, o tambaqui possui lábios muito carnosos; possui dentes molares afiados e fortes (Figura 6). Esta característica permite que a alimentação do tambaqui seja onívora e as preferências dietéticas do tambaqui mudam do zooplâncton às sementes e frutas conforme o peixe cresce. Adultos e subadultos continuam comendo zooplâncton, mas este item alimentar progressivamente se torna secundário. O tambaqui possui muitos rastros branquiais e o número destes rastros aumenta à medida que o peixe cresce. As estruturas altamente desenvolvidas dos rastros branquiais são associadas com a filtragem de zooplâncton (LIMA e GOULDINNG, 1998).

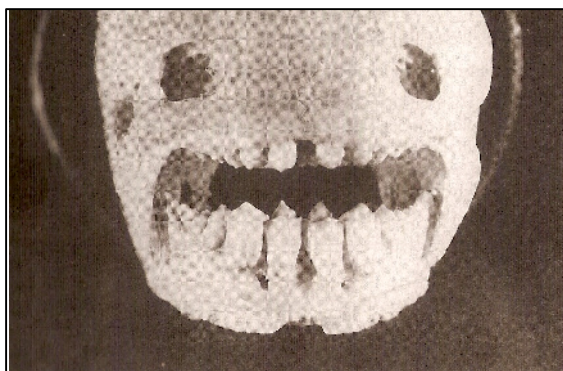


Figura 6: Dentição do tambaqui adulto.

Fonte: Lima e Goulding, 1998.

1.6.2 Doenças em tambaqui

Doenças são o maior problema que a aquicultura enfrenta atualmente, pois é prejudicial para sua rentabilidade (DUNHAM, 2009), portanto, a proteção contra doenças é primordial para a aquicultura e a resistência à doenças é também uma questão de bem-estar animal. Até o momento nenhuma doença endêmica foi registrada para o tambaqui cultivado ou silvestre, e isto tem contribuído para sua reputação de ser uma espécie robusta (LIMA e GOULDING, 1998). É de extrema importância investir no controle de doenças e isto pode ser alcançado através de medidas preventivas, tais como manutenção de estoques não infectados, dietas apropriadas para que os peixes estejam bem nutridos e deste modo mais resistentes à doenças, prescindindo, assim, do uso de remédios. O completo isolamento de adultos e jovens é provavelmente o maior passo que poderia ser dado para reduzir o parasitismo (THATCHER, 1991).

Condições ambientais extremas, a idade e o estresse são os principais fatores determinantes da prevalência de doenças. Em geral peixes jovens são os mais suscetíveis, uma vez que não tiveram tempo de criar resistência. O estresse comumente causado por mau manuseio, excesso da população, alimentação inadequada, ou uma combinação destes fatores também aumentam muito as chances de parasitismo intenso (LIMA e GOULDING, 1998).

O número de macroparasitas registrados para o tambaqui é relativamente pequeno, quando comparado com o total para as espécies de peixes das regiões temperadas (WOOTTON, 1992). A sardinha, o esturjão e algumas espécies de pescadas são atacados por mais do que o dobro da quantidade de macroparasitas

registrados até agora para o tabaqui (CHOUDHURY e DICK, 1993; THONEY, 1993). As infecções do tabaqui por microparasitos, como fungos, bactérias e protozoários, foram menos estudados.

1.7 Purificação de lectinas

Para a purificação de lectinas em diferentes fontes tem sido realizada, como primeiro passo, a preparação de extratos com solução salina ou tampão (KAWAGISHI et al., 2001). Após a extração, muitos extratos com atividade lectínica são submetidos a purificações parciais através de técnicas convencionais para proteínas, incluindo fracionamento salino com sulfato de amônio e diálise exaustiva (COELHO e SILVA, 2000). O uso de técnicas cromatográficas é bastante comum para a purificação de lectinas; vários métodos cromatográficos podem ser usados para que se possa obter um elevado grau de pureza (CORREIA e COELHO, 1995).

A pureza de uma proteína é estabelecida a partir de parâmetros que, quando analisados em conjunto (eletroforese, cromatografia e outros), vão definir o grau de pureza em que as preparações lectínicas se encontram.

1.8 Referências

- ALEXANDER, J.B. & INGRAM, G.M. Noncellular nonspecific defense mechanisms of fish. **Annual Review. Fish Disease**, 2, 249–279, 1992.
- AHMED, H.; DU, S.J.; O'LEARY, N.; VASTA, G.R. Biochemical and Molecular Characterization of galectins from zebrafish (*Danio rerio*): notochord-specific expression of a prototype galectin during early embryogenesis. **Glycobiology**, 14(3), 219–32, 2004.
- ARASON, G.J. Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. **Fish Shellfish Immunology**, 6, 277–289, 1996.
- ARGAYOSA, A.M. & LEE, Y.C. Identification of L-fucose-binding proteins from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) serum. **Fish & Shellfish Immunology**, 1–8, 2009.
- BALZARINI, J.; SCHOLS, D.; NEYTS, J.; VAN DAMME, E.; PEUMANS, W.; DE CLERCQ, E. Alpha-(1-3)- and alpha-(1-6)-d-mannose-specific plant lectins are markedly inhibitory to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus infections in vitro. **Antimicrobial Agents Chemother.** 35, 410–416, 1991.
- BARONDES, S.H., COOPER, D.N.W., GITT, M.A., LEFFLER, H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. **Journal of Biological Chemistry**. 269, 20807–20810, 1994.
- BAG, M.R.; MAKESH, M.; RAJENDRAN, K.V.; MUKHERJEE, S.C. Characterization of IgM of Indian major carps and their cross-reactivity with anti-fish IgM antibodies. **Fish and Shellfish Immunology**, 26(2), 275–8, 2008.
- BAYNE, C.J.; GERWICK, L.; FUJIKI, K.; NAKAO, M.; YANO, T. Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization. **Developmental and Comparative Immunology**, 25, 205–217, 2001.
- BELTRÃO, E.I.C.; MEDEIROS, P.L.; RODRIGUES, O.G.; FIGUEREDO-SILVA, J.; VALENCA, M.M.; COELHO, L.C.B.B.; CARVALHO-JR, L.B. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningotheelial tumour. **European Journal Histochemistry**, 47(2), 139–142, 2003.
- BENGTON, E.; QUINIOU, S.M.A.; STUGE, T.B.; KATAGIRI, T.; MILLER, N.W.; CLEM, L.W. The IgH locus of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*, contains multiple constant region gene sequences: different genes encode heavy chains of membrane and secreted IgD. **Journal of Immunology**, 169, 2488–97, 2002.
- 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, 628–34, 2002.

BIES, C.; LEHR, C.M.; WOODLEY, J.F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 56(4), 425-35, 2004.

BOYD, W.C. & SHAPLEIGH, E. Separation of individuals of any blood group into secretors and non-secretors by use of a plant agglutinin (lectin). **Blood**, 9 (12), 1194-8, 1954.

BROWN, A.C.; HARRISON, L.M.; KAPULKIN, W.; JONES, B.F.; SINHA, A.; SAVAGE, A. Molecular cloning and characterization of a C-type lectin from *Ancylostoma ceylanicum*: evidence for a role in hookworm reproductive physiology. **Molecular Biochemistry Parasitology**, 151, 141-7, 2007.

BUCHMANN, K. & LINDENSTROM, T. Interactions between monogenean parasites and their fish hosts. **International Journal for Parasitology**, 32(3), 309-319, 2002.

CAMMARATA, M.; VAZZANA, M.; CHINNICI, C.; PARRINELLO, N. A serum fucoselectin isolated and characterized from sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1528, 196-202, 2001.

CAMMARATA, M.; BENENATI, G.; ODOM, E.; SALERNO, G.; VIZZINI, A.; VASTA, G.R. Isolation and characterization of a fish F-type lectin from gilt head bream (*Sparus aurata*) serum. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1770, 150-5, 2007.

CASTELLANA, B.; SEPULCRE, M.P.; MULERO, V.; NOVOA, B.; FIGUERAS, A.; KRASNOV, A.; TORT, L.; MACKENZIE, S.; GOETZ, F.W.; PLANAS, J.V. Transcriptomic analysis of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, Available online 2, 2007.

CAVADA, B.S.; SANTOS, C.F.; GRANGEIRO, T.B.; NUNES, E.P.; SALES, P.V.P.; RAMOS, R.L.; DE SOUZA, F.A.M.; CRISOSTOMO, C.V.; CALVETE, J.J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**, 49, 675-680, 1998.

CHOUDHURY, A. & DICK, T.A. Parasites o lake sturgeon, *Aspioner fulvescens* (Chondrostei: Aspioneridae), from Central Canadá. **Journal of Fish Biology**, 42, 571-584, 1993.

CLARK, M.A.; HIRST, B.H. & JEPSON, M.A. Lectin-mediated mucosal delivery of drugs and microparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews** 43, 207-223, 2000.

COELHO, L. C. B. B. & SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 295-300, 2000.

CORREIA, M. T. S. & COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, p. 261-273, 1995.

COMINETTI, M.R.; MARQUES, M.R.F.; LORENZINI, D.M.; LÖFGREN, S.E.; DAFFRE, S.; BARRACCO, M.A. Characterization and partial purification of a lectin

from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schmitti*. **Developmental & Comparative Immunology** 26(8):715-721, 2002.

COUTIÑO-RODRÍGUEZ, R.; HERNÁNDEZ-CRUZ, P.; GILES-RÍOS, H. Lectins in fruits having gastrointestinal activity: Their participation in the hemagglutinating property of *Escherichia coli* 0157:H7. **Archives of Medical Research**, 32, 251-257, 2001.

DAY, A.J. The C-type carbohydrate recognition domain (CRD) superfamily. **Biochemical Society Transactions** 22, 83–88, 1994.

DRICKAMER, K. Ca(2+)-dependent sugar recognition by animal lectins. **Biochemical Society Transactions**, (24), 146-50, 1996.

DRICKAMER, K. & TAYLOR, M.E. Evolving views of protein glycosylation. **Trends Biochemistry Science**, 23(9), 321-324, 1998.

DONG, C.H.; YANG, S.T.; YANG, Z.A.; ZHANG, L.; GUI, J.F. A C-type lectin associated and translocated with cortical granules during oocyte maturation and egg fertilization in fish. **Development Biology**, 265, 341–354, 2004.

DUMIC, J.; DABELIC, S.; FLOGEL, M. Galectin-3: an open-ended story. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1760(4), 616-635, 2006.

DUNHAM, R.A. Transgenic fish resistant to infectious diseases, their risk and prevention of escape into the environment and future candidate genes for disease transgene manipulation. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases** 32, 139–61, 2009.

DUTTA, S.; SINHA, B.; BHATTACHARYA, B.; CHATTERJEE, B.; MAZUMDER, S. Characterization of a galactose binding serum lectin from the Indian catfish, *Clarias batrachus*: Possible involvement of fish lectins in differential recognition of pathogens. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 141, 76-84, 2005.

ELCOMBE, B.M.; CHANG, R.J.; TAVES, C.J.; WINKELHAKE, J.L. Evolution of antibody structure and effector functions: comparative hemolytic activities of monomeric and tetrameric IgM from rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 80, 697–706, 1985.

ELLIS, A.E. Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria. **Development Comparative Immunology**, 25, 827-839, 2001.

EWART, K.V.; JOHNSON, S.C.; ROSS, N.W. Lectins of innate immune system and their relevance to fish health. **Journal of Marine Science**, 58, 380-385, 2001.

FLEXNER, S. & NOGUCHI, H. Snake venom in relation to haemolysis, bacteriolysis, and toxicity. **Journal Experimental. Medicine**, 6, 277– 301, 1902.

FOCK, W.L.; CHEN, C.L.; LAM, T.J.; SIN, Y.M. Roles of an endogenous serum lectin in the immune protection of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallus) against *Aeromonas hydrophila*. **Fish Shellfish Immunology**, 11(2), 101-113, 2001.

FUKUMORI, T.; KANAYAMA, H.O.; RAZ, A. The role of galectin-3 in cancer drug resistance. **Drug Resistance Updates**, 10(3), 101-108, 2007.

GABOR, F.; KLAUSEGGER, U.; WIRTH, M. The interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. **International Journal of Pharmaceutics**, 221(1,2), 19, 35-47, 2001.

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

GOLDSTEIN, I.J.; HUGHES, R.C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature** (Lond); 285:66, 1980.

GOLDSTEIN, I.J. & PORETZ, R.D. Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. **Academic Press, Orlando**, 2, 32-246, 1986.

GOUDING, M. & CARVALHO, M.L. Life history and management of the tambaqui, (*Colossoma macroporum*, Characidae): an important Amazonian food fish. **Revista Brasileira de Zoologia** 1, 107-133, 1982.

HAMMAR, L.; ERIKSSON, S.; MOREIN, B. Human immunodeficiency virus glycoproteins: lectin binding properties. **AIDS Research Humam. Retroviruses** 5, 495-506, 1989.

HANCOCK, R.E. & LEHRER, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. **Trends Biotechnology**, 16(2), 82-88, 1998.

HIRONO, I.; NAM, B.H.; ENOMOTO, J.; UCHINO, K.; AOKI, T. Cloning and characterization of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD. **Fish and Shellfish Immunology**, 15, 63-70, 2003.

HOLLAND, M.C.H. & LAMBRIS, J.D. The complement system in teleosts. **Fish Shellfish Immunology**, 12, 399-420, 2002.

HOLMSKOV, U.; THIEL, S.; JENSENIUS, J.C. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. **Annual Review Immunology**, 21, 547-578, 2003.

HONDA, S.; KASHIWAGI, M.; MIYAMOTO, K.; TAKEIS, Y.; HIROSE, S. Multiplicity structures, and endocrine and exocrine nature of eel fucose-binding lectins. **The Journal of Biological Chemistry**, 275(42), 33151-33157, 2000.

HORDVIK, I.; THEVARAJAN, J.; SAMDAL, I.; BASTANI, N.; KROSSOY, B. Molecular cloning and phylogenetic analysis of the Atlantic salmon immunoglobulin D gene. **Journal of Immunology**, 161, 202-210, 1999.

HOSONO, M.; KAWAUCHI, H.; NITTA, K.; TAKATANAGI, Y.; SHIOKAWA, H.; MINEKI, R.; MURAYAMA, K. Three rhamnose-binding lectins from *Osmerus eperlanus mordax* (Olive rainbow smelt) roe. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**;16, 239–43, 1993.

IKEDA, K.; SANNOH, T.; KAWASAKI, N.; KAWASAKI, T.; YAMASHITA, I. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. **Journal of Biological Chemistry**, 262, 7451-7454. 1987.

INAGAWA, H.; KURODA, A.; NISHIZAWA, T.; HONDA, T.; OTOTAKE, M.; YOKOMIZO, Y.; NAKANISHI, T.; SOMA, G.I. Cloning and characterisation of tandem-repeat type galectin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology**, 11(3) 217-231, 2001.

JENSEN, L.E.; THIEL, S.; PETERSEN, T. E.; JENSENIUS, J. C. A rainbow trout lectin with multimeric structure. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 116(4), 385-390, 1997.

JIMBO, M.; USUI, R.; SAKAI, R.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. Purification, cloning and characterization of egg lectins from the teleost *Tribolodon brandti*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B 147, 164–171, 2007

JIMÉNEZ-CANTIZANO, R.M.; INFANTE, C.; MARTIN-ANTONIO, B.; PONCE, M.; HACHERO, I.; NAVAS, J.I.; MANCHADO, M. Molecular characterization, phylogeny, and expression of c-type and g-type lysozymes in brill (*Scophthalmus rhombus*). **Fish & Shellfish Immunology**, 25(1-2), 57-65, 2008.

KASAI, K. & HIRABAYASHI, J. Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes. **Journal Biochemistry** 119, 1–8, 1996.

KAWAGISHI, H.; TAKAGI, J.; TAIRA, T.; MURATA, T.; USUI, T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. **Phytochemistry**. 56, 53-58, 2001.

KENNEDY, J.F.; PAIVA, P.M.G.; CORREIA, M.T.S.; CAVALCANTE, M.S.M.; COELHO, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polimers**, 26, 219-230, 1995.

KEYAERTS, E.; VIJGEN, L.; PANNECOUQUE, C.; VAN DAMME, E.; PEUMANS, W.; EGBERINK, H.; BALZARINI, J.; VAN RANST, M. Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle. **Antiviral Research**, 75, 179–187, 2007.

KILPATRICK, D.C. & GREEN, C. Lectins as blood typing reagents, In: H. Franz (Ed.), **Advances in Lectin Research**, Ullstein Mosby, Berlin, 5, 51–94. 1992.

KILPATRICK, D.C. **Handbook of Animal Lectins**. John Wiley and Sons, Chichester, pp. 468, 2000.

KILPATRICK, D.C. Animal lectins: a historical introduction and overview, **Biochimica et Biophysica. Acta**, 19, 187–97, 2002.

KISHORE, U.; EGGLETON, P.; REID, K.B. Modular organization of carbohydrate recognition domains in animal lectins. **Matrix Biological**, 15(8-9), 583-592, 1997.

KOMATH, S.S.; KAVITHA, M.; SWAMY, M.J. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. **Organic Biomolecular Chemistry**, 21;4(6), 73-88, 2006.

KONOZY, E.H.E.; MULAY, R.; FACA, V.; WARD, R.J.; GREENE, L.J.; ROQUE-BARRIERA, M.C.; SABHARWAL, S.; BHIDE, S.V. Purification, some properties of a D-galactose-binding leaf lectin from *Erythrina indica* and further characterization of seed lectin. **Biochimie**, 84(10) 1035-1043, 2002.

KORNFELD, S. Structure and function of the mannose 6- phosphateyinsulinlike growth factor II receptors. **Annual Review Biochemical**. 61, 307–330, 1992.

KUBITZA, F. & KUBITZA, L.M.M. **Principais parasitoses e doenças dos peixes Cultivados**. 4rt edn. Coleção Piscicultura Avançada, Acquaimagem Press, Jundiaí-SP, 2004.

KURATA, O. & HATAI, K.. Activation of carp leukocytes by a galactose binding protein from *Aphanomyces piscicida*. **Developmental & Comparative Immunology**, 26, 161–169, 2002.

LIENER, I.E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I.J. The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine. **Academic Press, Orlando**, 1–600,1986.

LIMA, C.A. & GOULDINNG, M. **Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia**. **Sociedade Civil Mamirauá**; Brasília: CNPq, pp. 8-20. Tefé, AM, 1998.

LIS, H. & SHARON, N. Lectin-carbohydrate interactions. **Current Opinion in Structural Biology**, 1(5), 741-749, 1991.

LITMAN, G.W.; DISHAW, L.J.; CANNON, J.P.; HAIRE, R.N.; RAST, J.P. Alternative mechanisms of immune receptor diversity. **Current Opinion in Immunology**, 19(5), 526-534, 2007.

MACHUKA, J.S.; OKEOLA, O.G.; VAN DAMME ELS, J.M; CHRISPEELS, M.J.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W.J. Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. **Phytochemistry**, 51(6), 721-728, 1999.

MACIEL, E.V.M.; ARAÚJO-FILHO, V.S.; NAKAZAWA, M.; GOMES Y.M.; COELHO L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**, 32(1), 57-60, 2004.

MAGNADOTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish Shellfish Immunology**, 20, 137–151, 2006.

MARGALIT, H., FISCHER, N., BEN-SASSON, S.A. Comparative analysis of structurally defined heparin binding sequences reveals a distinct spatial distribution of basic residues. **Journal Biological Chemistry** 268, 19228–19231, 1993.

MATSUSHITA, M. & FUJITA, T. Cleavage of the third component of complement (C3) by mannose-binding protein associated serine protease (MASP) with subsequent complement activation. **Immunobiology**, 194, 443-448, 1995.

MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; TAIRA, S.; SATO, Y.; FUJITA, T.; ICHIKAWA, N.; NAKATA, M.; MIZUOCHI, T. A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen like domains that functions as an opsonin. **Journal Biological Chemistry**, 271, 2448, 1996.

MATSUI, T.; KOBAYASHI, S.; YOSHIDA, O.; ISHII, S.; ABE, Y.; YAMAMOTO, N. Effects of succinylated concanavalina A on infectivity and syncytial formation of human immunodeficiency virus. **Immunology & Medical Microbiology**, 179, 225–235, 1990.

MATSUI, T.; HAMAKO, J.; OZEKI, Y.; TITANI, K. Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1525, 50-57, 2001.

MCGREAL, E.P.; MARTINEZ-POMARES, L.; GORDON, S. Divergent roles for Ctype lectins expressed by cells of the innate immune system. **Molecular Immunology**, 41, 1109–21, 2004.

MISTRY, A.C.; HONDA, S.; HIROSE, S. Structure, properties and enhanced expression of galactose-binding C-type lectins in mucous cells of gills from freshwater Japanese eels (*Anguilla japonica*). **Journal Biochemistry** 160, 107– 115, 2001.

MO, H.; WINTER, H.C.; GOLDSTEIN, I.J. Purification and characterization of a Neu5Acalpha2-6Galbeta1-4Glc/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. **The Journal of Biological Chemistry** 275, 10623-10629, 2000.

MOLCHANOVA, V.; CHIKALOVETS, I.; CHERNIKOV, O.; BELOGORTSEVA, N.; LI, W.; WANG, JIAN-HUA; YANG, DONG-YUN O.; ZHENG, YONG-TANG; LUKYANOV, P. A new lectin from the sea worm *Serpula vermicularis*: Isolation, characterization and anti-HIV activity. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, 145, 184–93, 2007.

MONZO, A.; BONN, G.K. & GUTTMAN, A. Lectin-immobilization strategies for affinity purification and separation of glycoconjugates. **Trends in Analytical Chemistry** 26(5), 23-43, 2007.

MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S.; DE OLIVEIRA, J.T.A.; AINOUEZ, I.L. Lectinas de plantas. In: **Proceedings of the First Brazilian Congress on Proteins**, pp. 71-96. Editora da Unicamp, SP, 1991.

MULERO, I.; GARCÍA-AYALA, A.; MESEGUER, J.; MULERO, V. Maternal transfer of immunity and ontogeny of autologous immunocompetence of fish: a minireview, **Aquaculture**, 268, 244–50, 2007.

NAKAMURA, O.; WATANABEA, T.; KAMIYAA, H.; MURAMOTOB K. Galectin containing cells in the skin and mucosal tissues in Japanese conger eel, *Conger myriaster*: an immunohistochemical study. **Developmental and Comparative Immunology**, 25, 431-437, 2001.

NAUTA, A.J.; CASTELLANO, G.; XU, W.; WOLTMAN, A.M.; BORRIAS, M.C.; DAHA, M.R.; VAN KOOTEN, C.; ROOS, A. Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. **The Journal of Immunology**. 173, 3044–3050, 2004.

NIKOLAKOPOULOU, K. & ZARKADIS, I.K. Molecular cloning and characterization of two homologues of Mannose-Binding Lectin in rainbow trout. **Fish & Shellfish Immunology**, 21, 305-314, 2006.

NITTA, K.; KAWANO, T.; SUGAWARA, S.; HOSONO, M. Regulation of globotriaosylceramide (Gb3)-mediated signal transduction by rhamnose-binding lectin. **Yakudaku Zasshi**, 127, 533–61, 2007.

NOMURA, K.; ASHIDA, H.; UEMURA, N.; KUSHIBE, S.; OZAKI, T.; YOSHIDA, M. Purification and characterization of a mannose/glucose-specific lectin from *Castanea crenata*. **Phytochemistry**, 49, 667-673, 1998.

ODOM, E.W. **F-type lectins: biochemical, genetic, and topological characterization of a novel lectin family in lower vertebrates [PhD Thesis]**. College Park: University of Maryland, 2004.

ODOM, E. & VASTA, G.R. Characterization of a binary tandem domain F-type lectin from striped bass (*Morone saxatilis*). **Journal of Biological Chemistry**, 281, 1698–1713, 2006.

OFFNER, H.; CELNIK, B.; BRINGMAN, T.S.; CASENTINI-BOROCZ, D.; NEDWIN, G.E.; VANDENBARK, A.A. Recombinant human b-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, 28, 177-84, 1990.

OKAMOTO, M.; TSUTSUI, S.; TASUMI, S.; SUETAKE, H.; KIKUCHI, K.; SUZUKI, Y. Tandem Repeat L-rhamnose lectin from the mucus of ponyfish, *Leiognathus nuchalis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 333, 463-469, 2005.

OTTA, Y.; AMANO, K.; NISHIYAMA, K.; ANDO, A.; OGAWA, S.; NAGATA, Y. Purification and properties of a lectin from ascomycete mushroom, *Ciborinia camelliae*. **Phytochemistry**, 60(2), 103-107 2002.

OTTINGER, C.A.; JOHNSON, S.C; EWART, K.V.; BROWN, L.L.; ROSS, N.W. Enhancement of anti-*Aeromonas salmonicida* activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages by a mannose binding lectin. **Comparative Biochemistry and Physiology. Comparative Pharmacology Toxicology**. 123, 53–59, 1999.

OURTH, D.D.; ROSE, W.; SIEFKES, M.J. Isolation of mannose-binding C-type lectin from sea lamprey (*Petromyzon marinus*) plasma and binding to *Aeromonas salmonicida*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 126, 407–12, 2008.

PAJIC, I.; KLJAJIC, Z.; DOGOVIC, N.; SLADIC, D.; JURANIC, Z.; GASIC, M. J. A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 132(2), 213-221, 2002.

PERILLO, N.L.; PACE, K.E.; SEILHAMER, J.J.; BAUM, L.G. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. **Nature**, 378, 736-739, 1995.

PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, 109:347-352, 1995.

PRESS, C.M.C.L. & EVENSEN, O. The morphology of the immune system in teleost fishes. **Fish and Shellfish Immunology**, 9, 309–18, 1999.

PROBSTMEIER, R. & PESHEVA, P. I-Type lectins in the nervous system. **Progress in Neurobiology**, 58(2), 163-184, 1999.

PROENÇA, C.E.M. & BITTENCOURT, P.R.L. **Manual de piscicultura tropical**. Ed. MMA/IBAMA, 195p. Brasília, 1994.

POWELL, L.D., VARKI, A. I-type lectins. **Journal of Biological Chemistry** 270, 14243–14246, 1995.

RABINOVICH, G.A.; RIERA, C.M.; SOTOMAYOR, C.E. Galectin-1, an alternative signal for T cell death, is increased in activated macrophages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 32, 557-567, 1999.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*. **Plant Science**, 160(4), 739-744, 2001.

RUSSELL, S.; LUMSDEN, J.S. Function and heterogeneity of fish lectins. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 108, 111-120, 2005.

SACCHETTINI, J.C.; BAUM, L.G.; BREWER, C.F. *Multivalent* protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction. **Biochemistry**, 40(10), 3009-3015, 2001.

SAKAI, M. & SAVAN, R. Characterization of zebra fish immunoglobulin heavy chain (IGH) locus. In: **Proceeding of JSPS-NRCT international symposium**. Thailand: Kasetsart University, ISBN 974-537-624-8; 2004.

SALERNO, G.; PARISI, M.G.; PARRINELLO, D.; BENENATI, G.; VIZZINI, A.; VAZZANA, M.; VASTA, G.R.; CAMMARATA, M. F-type lectin from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Purification, cDNA cloning, tissue expression and localization, and opsonic activity. **Fish & Shellfish Immunology**, pp. 1–11, 2009.

SATO, Y.; MURAKAMI, M.; MIYAZAWA, K.; HRI, K. **Purification and characterization of a novel lectin from a freshwater cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii***. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, 125, 169-177, 2000.

SAVAN, R.; AMAN, A.; NAKAO, M.; WATANUKI, H.; SAKAI, M. Discovery of a novel immunoglobulin heavy chain gene chimera from common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Immunogenetics**, 57, 458–63, 2005.

SCHWARTZ, F.P.; SUROLIA, A.; BHAT, R.G.; PURIT, K.D.. Thermodynamics of monosaccharide binding to concanavalin A Pea (*Pisum sativum*) lectin, and lentil (*Lens culinaris*) lectin. **The Journal of Biological Chemistry**, 268(11), 7668-7677, 1993.

SHARON, N. & LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Scientific American Magazine**, 268(1), 82-89, 1993.

SHIINA, N.; TATENO, H.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K.; SANEYOSHI, M.; KAMIYA, H. Isolation and characterization of L-rhamnose-binding lectins from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) eggs. **Fish Science**, 68, 1352–66, 2002.

SILVA, J.W.B. & GURGEL, J.J.L. Situação do cultivo de *Colossoma macropomum* no âmbito do Departamento Nacional de Obras Contra Secas (DNOCS). In: **Cultivo de Colossoma**. In R. Hernández. Ed. Guadalupe, Bogotá, 1999.

SRISAPOOME, P.; OHIRA, T.; HIRONO, I.; AOKI, T. Genes of the constant regions of functional immunoglobulin heavy chain of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Immunogenetics**, 56, 292–300, 2004.

SOUZA, S. R.; CORREIA, M. T. S.; PESSOA, M. A. M.; KENNEDY, J. F.; LIMA, J. L.; COELHO, L. C. B. B. A novel model to characterize the electric double layer of lectins from *Cratylia mollis* (Camaratu bean) and *Canavalia ensiformis* adsorbed on metallic surface. **Carbohydrate Polymers**, 46, 191-193, 2001.

STENVIK, J. & JORGENSEN, T.O. Immunoglobulin D (IgD) of *Atlantic cod* has a unique structure. **Immunogenetics**, 51, 452–61, 2000.

STEEL, D.M. & WHITEHEAD, A.S. The major acute phase reactant: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. **Immunology Today** 15, 81–88, 1994.

STOCKERT, R.J.; MORELL, A.G.; SCHEINBERG, I.H. Mammalian hepatic lectin. **Science**, 186, 365– 66, 1974.

SUZUKI, S.Y.; TASUMI, S.; TSUTSUI; OKAMOTO, M.; SUETAKE, H. Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, 136, 723-730, 2003.

TASUMI, S.; OHIRA, T.; KAWAZOE, I.; SUETAKE, H.; SUZUKI, Y.; AIDA, K. Primary structure and characteristics of a lectin from skin mucus of the Japanese eel (*Anguilla japonica*). **Journal of Biological Chemistry**, 277, 27305– 27311, 2002.

TASUMI, S.; YANG, WEI-JUN; USAMI, T.; TSUTSUI, S.; OHIRA, T.; KAWAZOE, I.; WILDER, M.N.; AIDA, K.; SUZUKI, Y. Characteristics and primary structure of a galectin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. **Developmental & Comparative Immunology**, 28 (4), 325-335, 2004.

TATENO, H.; SANEYOSHI, A.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H.; SANEYOSHI, M. Isolation and characterization of rhamnosebinding lectins from eggs of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) homologous to low density lipoprotein receptor superfamily. **Journal of Biological Chemistry**, (273), 19190–7, 1998.

TATENO, H.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, S.; SANEYOSHI, M. Rhamnose-binding lectins from steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs recognize bacterial lipopolysaccharides and lipoteichoic acid. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. 66, 604– 612, 2002a.

TATENO, H.; YAMAGUCHI, T.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K.; WATANABE, T.; KAMIYA, H. Immunohistochemical localization of rhamnose-binding lectins in the steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Development Comparative Immunology**, 26, 543–50, 2002b.

TATENO, H.; SHIBATA, Y.; NAGAHAMA, Y.; HIRAI, T.; SANEYOSHI, M.; OGAWA, T. Tissuespecific expression of rhamnose-binding lectins in the steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, 66, 1427–30, 2002c.

THATCHER, V. E. Amazon fish parasites. **Amazoniana**, 11, 263-572, 1991.

THONEY, D.A. Community ecology of the parasites of adult spot, *Leiostomus xanthurus*, and Atlantic croaker, *Micropogonias undulates* Scianidae in cape Hatteras region. **Journal of Fish Biology**, 43, 661-810, 1993.

TIAN, J.; SUN, B.; LUO, Y.; ZHANG, Y.; NIE, P. Distribution of IgM, IgD and IgZ in mandarin fish, *Siniperca chuatsi* lymphoid tissues and their transcriptional changes after *Flavobacterium columnare* stimulation. **Aquaculture**, 288(1–2), 14–21. 2009.

TSUTSUI, S.; OKAMOTO, M.; TASUMI, S.; SUETAKE, H.; KIKUCHI, K.; SUZUKI, Y. Novel mannose-specific lectins found in torafugu, *Takifugu rubripes*: A review. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, 1, 122-127, 2006a.

TSUTSUI, S.; TASUMI, S.; SUETAKE, H.; KIKUCHI, K.; SUZUKI, Y. Carbohydrate-binding site of a novel mannose-specific lectin from fugu (*Takifugu rubripes*) skin mucus. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 143, 514-519, 2006b.

TORCHILIN, V.P.; LEVCHENKO, T.S.; LUKYANOV, A.N.; KHAW, B.A.; KLIBANOV, A.L.; RAMMOHAN, R.; SAMOKHIN, G.P.; WHITEMAN, K.R. p-Nitrophenylcarbonyl-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p-nitrophenylcarbonyl groups. **Biochimica et Biophysica Acta –Biomembranes**, 1511, 397-411, 2001.

TSOI, S.C.; EWART, K.V.; PENNY, S.; MELVILLE, K.; LIEBSCHER, R.S.; BROWN, L.L. & DOUGLAS, S.E. Identification of immune-relevant genes from atlantic salmon using suppression subtractive hybridization. **Mar Biotechnology** (NY) 6(3), 199-214, 2004.

VAL, A.L. & ALMEIDA-VAL, V.M.F. **Fishes of amazon and their environment: Physiological and biological aspects**. Springer Verlag, 1995.

VIJAYAN, M.; CHANDRA, N. Lectins **Current Opinion in Structural Biology**, 9(6), 707-714, 1999.

VORNHOLT, W.; HARTMANN, M.; KEUSGEN, M. SPR studies of carbohydrate-lectin interactions as useful tool for screening on lectin sources. **Biosensors Bioelectronics**, 22(12), 2983-2988, 2007.

YAMAOKA, K.; OHNO, S.; KAWASAKI, H.; SUZUKI, K. Overexpression of a β -galactoside binding protein causes transformation of BALB3T3 fibroblast cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 179(1), 272-279, 1991.

YOUSIF, A.N.; ALBRIGHT, L.J.; EVELYN, T.P.T. Purification and characterization of a galactose specific lectin from the egg of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*, and its interaction with bacterial fish pathogens. **Disease Aquatic Organization**, 20, 127–136, 1994.

YOUNG, K.M.; RUSSELL, S.; SMITH, M.; HUBER, P.; OSTLAND, V.E.; BROOKS, A.S.; HAYES, M.A.; LUMSDEN, J.S. Bacterial-binding activity and plasma concentration of ladderlectin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology**, 23(2), 305-315, 2007.

YU, X.Q.; ZHU, Y.F.; MA, C.; FABRICK, J.A.; KANOST, M.R. Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. **Insect Biochemistry Molecular Biological**, 32, 1287-93, 2002.

WANG, JIAN-HUA; KONG, J.; LI, W.; MOLCHANOVA, V.; CHIKALOVETS, I.; BELOGORTSEVA, N.; LUK'YANOV, P.; ZHENG, YONG-TANG. A β -galactose-specific lectin isolated from the marine worm *Chaetopterus variopedatus* possesses anti-HIV-1 activity. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, 142, 111–117, 2006.

WATANABE, Y.; SHIINA, N.; SHINOZAKI, F.; YOKOYAMA, H.; KOMINAMI, J.; NAKAMURA-TSURUTA, S. Isolation and characterization of rhamnose-binding lectin, which binds to microsporidian *Glugea plecoglossi*, from ayu (*Plecoglossus altivelis*) eggs. **Development Comparative Immunology**, 32, 487–99, 2008.

WATANABE, Y.; TATENO, H.; NAKAMURA-TSURUTA, S.; KOMINAMI, J. HIRABAYASHI, J.; NAKAMURA, O.; WATANABE, T.; KAMIYA, H.; NAGANUMA, T.; OGAWA, T.; NAUDE, R.J.; MURAMOTO, K. The function of rhamnose-binding lectin in innate immunity by restricted binding to Gb3. **DPC Developmental and Comparative Immunology** 33, 187–97, 2009.

WHYTE, S.K. The innate immune response of finfish—a review of current knowledge. **Fish Shellfish Immunology**, 23, 1127–51, 2007.

WILSON, M.; BENG TEN, E.; MILLER, N.W.; CLEM, L.W.; DU, P.L.; WARR, G.W. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. **Proceedings of the National Academy of Science**, 94, 4593–7, 1997.

WOODLEY, J. Bioadhesion: New possibilities for drug administration? **Clinical Pharmacokinetics**, 40, 77-84, 2001

WOOTTON, R.J. Ecology of teleost fishes. **Netherlands Journal of Zoology**, 42, 291-303, 1992.

WU, A.M.; WU, J.H.; TSAI, M.S.; HERP, A. Carbohydrate specificity of agglutinin isolated from the root of *Trichosanthes kirilowii*. **Life Sciences**, 66, 2571-2581, 2000.

2 JUSTIFICATIVA

Operações em aquicultura esforçam-se para produzir peixes saudáveis através de recursos que sejam economicamente e biologicamente eficientes. Por esta razão, a prevenção de doenças é muito importante tanto para os piscicultores da Região, como também para a indústria. Muitas vacinas têm sido desenvolvidas, a nutrição dos peixes tem melhorado, com o objetivo de reduzir significativamente o impacto de doenças na aquicultura. Contudo, pouco se conhece a respeito da imunidade dos peixes.

O Brasil possui, talvez, a maior e mais variada ictiofauna do planeta. Só na Bacia Amazônica brasileira calcula-se que existam cerca de 2.000 espécies de peixes. Muitas destas espécies são de extrema importância para alimentação, e, absolutamente, nenhum estudo completo foi realizado com lectinas de peixe da Região Norte e Nordeste do Brasil (região tropical).

O tambaqui é uma das espécies aquáticas de maior expressão na alimentação da Região Norte, e nas últimas décadas vem se tornando uma das principais espécies nativas para a piscicultura brasileira, devido ao seu ótimo padrão de crescimento e produtividade, fato que torna abundante a sua oferta no mercado consumidor. Deste modo, o tambaqui foi o peixe de escolha para a nossa pesquisa. Com a purificação e caracterização da(s) lectina(s) presente(s) no soro de tambaqui novas ferramentas estarão disponíveis para uma melhor compreensão do sistema imune de peixes, o que permitirá a ampliação do desenvolvimento de aplicações para a prevenção de doenças.

Os resultados terão um enorme potencial para uso na aquicultura, visando aumentar a resistência dos peixes a uma determinada doença economicamente importante a fim de facilitar o manejo do tambaqui, melhorando, em última instância, a rentabilidade dos piscicultores da Região.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Purificar e caracterizar lectinas presentes no soro do tambaqui (*Colossoma macropomum*).

3.2 Objetivos Específicos

- Pré-purificar por fracionamento com sulfato de amônio o soro do tambaqui (*C. macropomum*);
- determinar o perfil da atividade hemaglutinante (AH) das diferentes frações obtidas;
- caracterizar a fração de maior rendimento por eletroforese, estabilidade térmica e influência de íons;
- isolar a lectina do soro do tambaqui (*C. macropomum*), a partir da fração de maior rendimento utilizando métodos cromatográficos;
- caracterizar a fração eluída por eletroforese e especificidade a carboidratos.

4 CAPÍTULO I

PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE LECTIN(S) PRESENT IN THE SERUM OF AMAZON FISH TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1888)

Maciel de Carvalho, E.V.¹; Bezerra, R.F.¹; Guerra, A.J.; Bezerra, R.S.; Carvalho
Júnior, L.B.; Correia, M.T.S. and Coelho, L.C.B.B.*.

To be submitted to the journal:

Acta Tropica

*Corresponding author.

E-mail: *luanacassandra@terra.com.br (Luana Cassandra B. B. Coelho)

¹ These authors contributed equally to this work

Purification and partial characterization of the lectin(s) present in the serum of Tambaqui Amazon fish (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1888)

Maciel de Carvalho, E.V.¹; Bezerra, R.F.¹; Guerra, A.J.²; Bezerra, R.S.¹; Carvalho Júnior, L.B.³; Correia, M.T.S.¹ and Coelho, L.C.B.B.¹.

1- Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, University City, Recife, Pernambuco, Brazil, CEP: 0670-420. 2- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Engenharia de Pesca, 3-Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)

Abstract

Animal lectins are a diverse group of proteins that recognize and bind specifically to carbohydrates. These proteins have a significant role in the immune responses of host; they bind specifically to carbohydrate molecules expressed on pathogens and help their opsonization and phagocytosis. The tambaqui (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1818) is a native fish from the Amazon Region, and it is one of the most important species in Brazilian pisciculture, presenting an excellent pattern of growing and high productivity. In the presente work, the tambaqui serum lectin was partially purified in three steps, saline precipitation of ammonium sulfate, affinity chromatography in Con A Sepharose 4B and ion exchange chromatography in DEAE Sepharose. Resulting in a partial purification of tambaqui serum lectin, an acidic protein able to recognize galactose and fucose, being member of the fuclectin group.

Keywords: *Colossoma macropomum*; Lectin; Tambaqui; Purification; Fuclectin.

4.1. Introduction

Lectins are proteins capable to bind specifically to carbohydrates expressed over cellular surface. Initially, these proteins were identified in plants but nowadays it is well known that they are broadly distributed in nature, including eukaryotic and prokaryotic organisms (Sato et al., 2000; Sun et al., 2008). Due to their ability to specifically recognize certain sugars on the surface of microorganisms, it has been suggested that animal lectins are involved in a variety of biological processes including the immune innate response through induction of bacterial agglutination or, like

opsonins, by the increase of microorganism phagocytosis by hemocysts (Jimbo et al., 2007; Sun et al., 2008, Watanabe et al., 2009). Fish lectins have been isolated from serum, plasma, mucus, skin and eggs (Honda et al., 2000; Jimbo et al., 2007). It seems that these lectins have an important role in fertilization, morphogenesis and embryogenesis, in addition to their role on the defense against microorganisms (Dutta et al., 2005, Ourth et al., 2008).

Tambaqui (*Colossoma macropomum*) is one of the most important fish species used as food by the population of the Northern Region of Brazil, showing a broad distribution along the rivers of this region (Val & Almeida-Val, 1995). In the last decades, this fish has become one of the major native species in the Brazilian aquaculture, presenting an excellent pattern of growing and high productivity, turning abundant its offer in the consumer market. This species has also aroused a high interest in the fish breeders of other Latin American countries, due to its rusticity, meat quality, being able to achieve 1 m length and 30 kg of body mass within its natural environment (Gouding & Carvalho, 1982). The main goal of the present work was to partially purify and characterize the lectins present in the tambaqui serum.

4.2. Material and methods

4.2.1. Blood collecting and serum separation

The tambaqui blood collecting was performed in the Continental Aquaculture Station Prof. Johei Koike, Departamento de Pesca da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). The blood from an adult tambaqui was collected using a 5 mL syringe (1.20 x 40 18G⁻¹, BD *Precision Galide*) through its caudal vein. After blood coagulation, the serum was removed with the aid of a Pasteur pipette being centrifuged at 1300 x g by 5 min at 4 °C and kept at -20 °C until the moment to be used.

4.2.2. Hemagglutinating activity (HA)

The HA was established following the work of Correia and Coelho (1995). For to verify if the HA is altered front of distinct salt concentrations was performed the evaluation of HA in the presence

of distinct concentrations of NaCl, ranging from 0.01 M to 0.1M, using rabbit erythrocytes. In order to establish the specific hemagglutinating activity (SHA), a quantitative evaluation of proteins was performed for all samples according to Bradford (1976).

4.2.3. Effect of pH and calcium on the bioactivity of the lectin

For determination of pH stability, a preparation of the serum with several buffers (citrate phosphate, sodium phosphate, HCl-Tris) was performed with distinct molarities (0.01 M, 0.1 M, 0.2 M and 0.4 M) and pH values (4.5 to 8.5). Following incubation, the hemagglutination assays were performed. To determine calcium (Ca^{2+}) dependence, the lectin was incubated in PBS (saline phosphate buffer) containing 25 mM EDTA overnight. Aliquots of the lectin solution were incubated with different concentrations of calcium (Ca^{2+}) in PBS and placed in 96 well microtiter plates and incubated overnight at room temperature. Following incubation, the pre-treated glutaradehyde erythrocytes were introduced into each well and the hemagglutination titres were determined.

4.2.4. Carbohydrate specificity, ions and thermal stability

The evaluation of hemagglutinating activity inhibition (HAI) against carbohydrates (200 mM to 1.56 mM), ions and thermal stability (40, 50, 60, 70, 80 and 90 °C, 30 min) was performed according to Correia and Coelho (1995). The influence of ions over the HA was established with the ions solutions: CaCl_2 , MgCl_2 and MnCl_2 (40 to 0.625 mM).

4.2.5. Purification of tambaqui serum lectin

The serum was precipitated with ammonium sulphate with 0-50% (F0-50) and 50-80% (F50-80) saturation according to Green and Hughens (1955). The fractions and final supernatant (FS80) were dialyzed extensively against Tris buffered saline (TBS, 20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 20 mM CaCl_2 , pH 8,0); HA and concentration proteins were obtained from these fractions. F0-50 showed maximum activity. The protein fraction was further loaded onto a ConA Sepharose 4B (Sigma, St. Louis) column (3mL) pre-equilibrated with 10 mM CaCl_2 and 10 mM MnCl_2 solutions. The column was eluted with equilibrating buffer containing 200 mM α -methyl glucose. Active fractions were pooled and dialyzed against TBS. This fraction was further purified by DEAE-Sepharose Fast Flow

(GE Healthcare, Canada) column chromatography. Proteins were eluted in a step wise manner from 150 to 500 mM NaCl. The fraction showing activity was pooled and the protein concentration was estimated (Bradford, 1976). The homogeneity of the protein was checked by 7.5% native PAGE.

4.2.6. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

PAGE were performed for native and acid proteins according to Davis (1964), SDS-PAGE at 7.5% was performed according to Laemmli (1970) in denaturing or reducing and denaturing conditions.

4.3. Results

4.3.1. Effect of pH, calcium and salinity on the bioactivity of the lectin

There was no difference in HA for the serum diluted in distinct tested buffers with distinct molarities and pH values (to see item 2.3) The HA was not changed with in the salt concentrations (0,01 to 0,1M). The addition of CaCl₂ or EDTA to individual sera did not significantly affect the HA.

4.3.2 Ammonium sulphate precipitation

F0-50 presented the highest HA (Table 1). SDS-PAGE under reducing conditions revealed differences among the fractions. F50-80 and FS80 showed less bands (Figure 1). However, F0-50 was chosen to continue with the purification process because showed highest specific hemagglutinating activity (SHA).

Table 1-Ammonium sulphate precipitation of tambaqui serum.

Samples	HA (title ⁻¹)	Protein (mg/mL)	SHA
Serum	2048	37.82	54.15
F0-50%	2048	34.03	60.18
F50-80%	4	14.4	0.27
FS80	0	0.57	0

HA: Hemagglutinating Activity; SHA: Specific Hemagglutinating Activity.

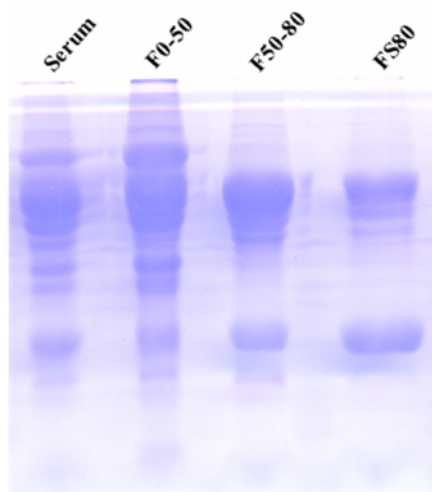


Fig. 1. Reducing SDS-PAGE 7.5%.
Analysis of serum and fractions.

4.3.3. Determination of the thermal stability and evaluation of the HA in the presence of ions

The HA of the serum and F0-50 decreased from 40 °C being totally abolished after heating at 70 and 60 °C (table 2), respectively. The tested ions (Ca^{2+} , Mg^{2+} and Mn^{2+}) did not affect the HA from serum and fractions.

Table 2- Thermal stability of serum and F0-50

Temperature	HA (Title ⁻¹)	
	Serum	F 0-50
30	2048	2048
40	1024	512
50	512	32
60	8	0
70	0	0
80	0	0
90	0	0
100	0	0

4.3.4. Hemagglutinating Activity Inhibition (HAI)

Fraction 0-50% was partially inhibited by sugars D-fucose, D-galactose, metil- α -D-galactopyranoside, D-raffinose, lactose and by glycoproteins from rabbit serum and fetuin. A summary of the inhibiton profile is given in Table 3.

Table 3-Hemagglutination activity inhibition (HAI) with sugars and glycoproteins.

Saccharides	IAH (Title ⁻¹)	Dissacharides	IAH (Title ⁻¹)
D-glucose	NI	Sacarose	NI
D-Fucose	16	Lactose	128
D-Galactose	32	Maltose	NI
Mannose	NI	D-cellobiose	NI
Metil- α -D-manopiranoside	NI	Trissacarides	IAH (Title ⁻¹)
Metil- α -D-glicopiranosíde	NI	D-raffinose	64
Xilose	NI	Glycoproteins	IAH (Title ⁻¹)
N-acetil-D-glucosamine	NI	Ovalbumin	NI
Arabinose	NI	Fetuin	128
Trealose	NI	Fetal bovine serum	NI
Fructose	NI	Rabbit serum	64
Metil-α-D-galactopiranoside	8	Casein	NI
N-acetilmannosamine	NI	Peroxidase	NI
D-glicuronic Acid	NI	NI, not inhibitory at a concentration of 200 mM for sugar and 1 mg/mL for glycoproteins.	
L-Rhamnose	NI		

4.3.5. Purification of the tambaqui serum lectin

The tambaqui serum lectin was purified the by three step purification process: ammonium sulphate precipitation, affinity chromatography on Con A Sepharose 4B (Sigma) using α -methyl glucose followed by ion exchange chromatography with DEAE-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) column. In each step was estimated the SHA and native acid proteins electrophoresis evaluating the level of purification (Table 4 and Figure 2).

Table 4 Purification of tambaqui serum lectin.

	HA (Title ⁻¹)	Protein concentration (mg / mL)	SHA
Serum	2048	37.82	54.15
Fraction 0-50%	2048	34.03	60.18
ConA Sepharose	64	0.979	65.37
DEAE Sepharose	8	0.285	28.07

HA: Hemagglutinating Activity; SHA: Specific Hemagglutinating Activity.

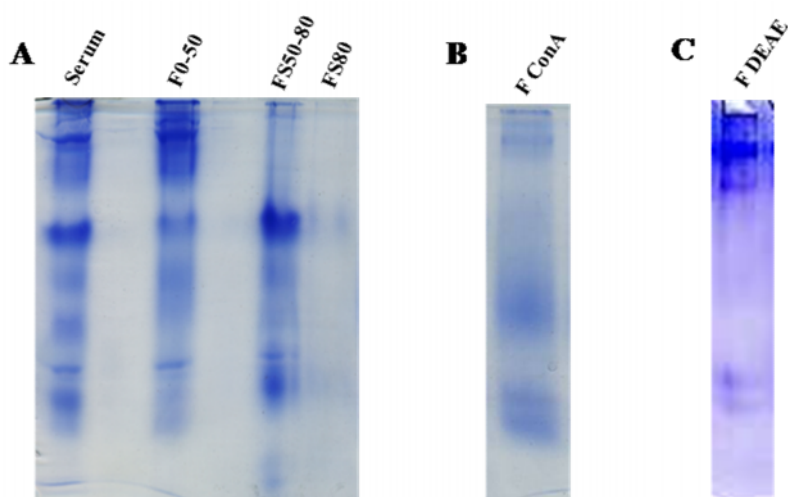


Fig. 2. Native acid PAGE (7.5%), serum and fractions (A), Con A-Sepharose fraction (B) and DEAE Sepharose fraction (C).

In ammonium sulphate precipitation, the fraction 0-50% showed highest SHA and, therefore, was the fraction chosen to next steps. Con A Sepharose column presented two peaks with activity (Figure 3A). The fraction adsorbed and eluted showing maximum activity was pooled and further purified by DEAE-Sepharose column chromatography (Figure 3B); the 200 mM fraction showing activity was pooled and the protein homogeneity was evaluated by 7.5% native PAGE (Figure 2C).

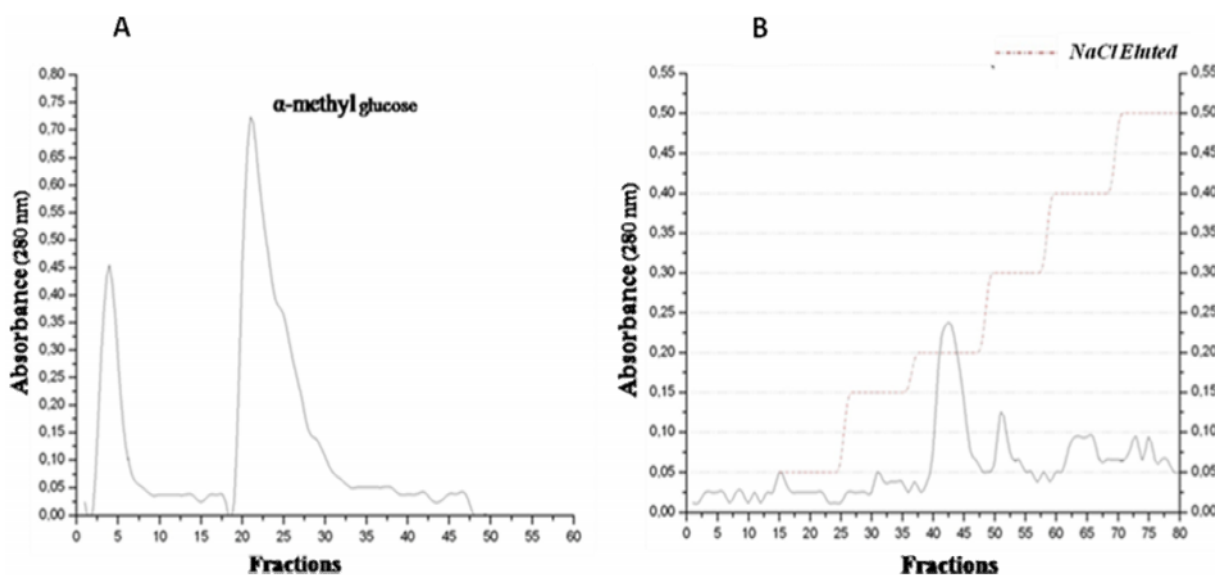


Fig. 3 (A) Profile of Con A Sepharose 4B chromatography, eluted with 200 mM α -methyl glucosamine in TBS showed a peak with activity. (B) Profile of DEAE Sepharose chromatography eluted with 150 to 500 mM NaCl showed a peak with activity in 200 mM.

4.4. Discussion

In this study, a lectin from serum of the tambaqui Amazon fish *Colossoma macropomum* was partially purified and characterized. Recently, a novel family of fucose-binding lectins was identified by Honda et al. (2000). These lectins possess characteristic L-fucose and D-Galactose-binding and calcium-binding sequence motifs. (Bianchet et al., 2002). The F-lectin sequence motif has a wide phylogenetic distribution being found in eubacteria, mollusks, arthropods, echinoderms, fish, and amphibians, but appears to be absent from protozoa, fungi, nematodes, ascidians and amniotes such as

birds and mammals (Odom and Vasta, 2006). In some species, the F-type carbohydrate-binding domain may be associated with other lectin domains such as C-type lectin (Odom and Vasta, 2006).

Teleost fishes present unique features, such as the dependence of the acquired immunity from the temperature and some limitations in antibody diversity, then some researchers suggested that the innate immune functions are much more important in these fishes than in other homeothermal animals (Kubitza & Kubitza, 2004).

Probably the greatest difficulty in isolating the tambaqui serum lectin was due to the fact that in teleost fish there are multiple F-lectin isoforms, such as in *Anguilla japonica* (Honda et al., 2000), *Anguilla anguilla* (Bianchet et al., 2002), and *Morone saxatilis* (Odom and Vasta, 2006), the induction of this lectins upon inflammatory challenge, together with the observation that fucose and fucose derivatives such as colitose, may be present on the surface of microbial pathogens, suggest a role as recognition factors in innate immune functions (Laemmli 1970; Listinsky et al., 1998).

Several chromatographic methods were available in the purification process of tambaqui fish serum lectin (affinity, ion exchange and molecular sieve) through distinct types of matrices (Guar gel; Sepharose 6B; Asialofetuin-Sepharose 4B; fetuin-Sepharose 4B; Cramoll Sepharose 4B; Sephadex G-25, G-50, G-75, G-100; CM-Cellulose; DEAE-Cellulose; Mono S HR 5/5; Mono Q HR 10/10; Hitrap SP XL; Con A Sepharose 4B; DEAE Sepharose fast flow) to find an efficient method in which the lectin hemagglutinating activity could be maintained.

The tambaqui serum lectin has several similar features to the serum lectin from Indian catfish *Clarias batrachus* (Dutta et al., 2005), and ConA Sepharose 4B followed by ion exchange chromatography on DEAE Sepharose were also used to tambaqui lectin purification steps. The saline fractionation of tambaqui serum was effective to select the protein of interest, since F0-50 showed the highest yield. Tambaqui lectin had no affinity for α -methyl glucose or α -methyl mannose but did bind to Con A; then fish serum lectin might have α -methyl glucose or α -methyl mannose like motifs for binding to Con A, suggesting therefore that it is a glycoprotein.

From all ion exchange assayed matrices the lectin did not lose its activity on DEAE-Sepharose Fast Flow, which provided an adequate environment for the partial purification of tambaqui serum

lectin, resulting in a peak in activity. This result may be inferred to the features of the matrix, a weak anion exchanger; strong anion exchanger matrices may destroy protein structure or make column desorption difficult. Although tambaqui is a freshwater fish, the HA of its serum was not affected by high concentrations of NaCl. Similar results were obtained with *A. japonica*, a catadrome fish that adapts well in both, saltwater and freshwater (Suzuki et al., 2003; Martinho et al., 2007). This is an important feature to this particular fish since it spends part of its lifecycle in freshwater and another part in saltwater, and, consequently, its proteins are very tolerant to salinity change. The HA of tambaqui serum lectin have shown to be stable for the pH values tested (4.5 to 8.5); this was also observed for the *C. batrachus* serum lectin (Dutta et al, 2005) and *Spaurus aurata* serum lectin (Cammarata et al., 2007). Tambaqui pH stability may be due to changes in pH of water from its natural environment (Amazon region) which range from 4.0 to 7.0 (Science and Culture, 2003).

Similar to *S. aurata* lectin, the tambaqui serum lectin showed good thermal stability and does not require calcium for binding to cells. However, it is not conclusive the presence or absence of a C type CDR motif in tambaqui serum lectin and further research is warranted to include it as a C type lectin. HAI of tambaqui serum lectin by fucose and galactose independent of Ca^{++} suggests that this lectin is included in the already identified family of fuclectins (Honda et al., 2000; Cammaratta et al., 2007). Calcium appears to serve as a role in stabilizing the fold in F-lectins (Bianchet et al., 2002) and is not affected by chelation. As a matter of fact, the lectin activity of tambaqui lingered active until 70 °C showing a certain degree of resistance of these proteins to high temperatures, despite the fact that tambaqui lives in relative warm waters.

The loss of ions during the purification process may cause a disturbance in the protein structure, leading to a loss of HA (Kennedy et al., 1995). No alteration was detected neither in the lectin activity of serum nor in the tambaqui serum fractions despite of their incubations with ions. Maybe, the tambaqui serum lectin CRD recognizes the carbohydrate in an ion independent manner (Suzuki et al., 2003).

Finally in the present paper it can be concluded that the tambaqui Amazon fish presents acidic thermo-stable serum lectins from the fuclectin family according with carbohydrate specificity.

Analysis of the functional aspects of the *Colossoma macropomum* F-type lectin in innate immunity are now in progress.

In the near future the authors intend to totally purify and characterize the lectin(s) from the tambaqui serum. The physiologic role of these lectins will be better understood, in the hope of improving the general comprehension of the immune system of the fishes; it is essential to understand the protective mechanisms involved in their immunity to successfully manage disease incidents in the aquaculture environment and implement disease prevention strategies for increased disease resistance.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for research grants and fellowship (LCBBC).

References

- Bianchet, M.A.; Odom, E.W.; Vasta, G.R.; Amzel, L.M., 2002. A novel fucose recognition fold involved in innate immunity. *Nat. Struct. Biol.*, 9, 628–34.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 72, 248-254.
- Cammarata, M., Benenati, G., Odom, E., Salerno, G., Vizzini, A., Vasta, G.R., 2007. Isolation and characterization of a fish F-type lectin from gilt head bream (*Sparus aurata*) serum. *BBA*, 1770, 150–155.
- Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B., 1995. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). *Appl. Biochem. Biotech.*, 55, 261-273.
- Davis, B. J., 1964. Disc eletrophoresis II: methods and applications to human serum protein. *Ann. of the new York Acad. of Science*, 121, 404-427.
- Dutta, S., Sinha, B., Bhattacharya, B., Chatterjee, B., Mazumder, S., 2005. Characterization of a galactose binding serum lectin from the Indian catfish, *Clarias batrachus*: Possible involvement of fish lectins in differential recognition of pathogens. *Comp. Biochem. and Physiol.*, 141, 76-84.
- Green, A. A., Hughes, W. L., 1955. Protein fraction on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organics solvents. In: Colowick, S. and Kaplan, N. – *Methods in Enzymol.* New York, Acad., pp. 67-90.
- Gouding, M., Carvalho, M.L., 1982. Life history and management of the tambaqui, (*Colossoma macroporum*, Characidae): an important Amazonian food fish. *Rev. Brasileira de Zool.* 1, 107-133.

Honda, S., Kashiwagi, M., Miyamoto, K., Takeis, Y., Hirose, S., 2000. Multiplicity Structures, and Endocrine and Exocrine Nature of Eel Fucose-binding Lectins. *The J. of Biol. Chemistry*, 275(42), 33151-33157.

Kennedy, J.F., Paiva, P.M.G., Correia, M.T.S., Cavalcante, M.S.M., Coelho, L.C.B.B., 1995. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polimers*, 26, 219-230.

Kubitza, F., Kubitza, L.M.M., 2004. *Principais Parasitoses e Doenças dos Peixes Cultivados*. 4th ed. Coleção Piscicultura Avançada, Acquaimagem Press, Jundiaí-SP.

Jimbo, M., Usui, R., Sakai, R., Muramoto, K., Kamiya, H., 2007. Purification, cloning and characterization of egg lectins from the teleost *Tribolodon brandti*. *Comp. Biochem. and Physiol., Part B* 147, 164–171.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227, 680-685.

Listinsky, J., Siegal, P., Listinsky, M., 1998. A potentially critical molecule in pathologic processes including neoplasia, *Am. J. Clin. Pathol.* 110, 425–440.

Martinho, F., Leitão, R., Viegas, I., Dolbeth, M., Neto, J.M., Cabral, H.N., Pardal, M.A., 2007. The influence of an extreme drought event in the fish community of a southern Europe temperate estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 20, 1-10.

Odom, E. & Vasta, G.R., 2006. Characterization of a binary tandem domain F-type lectin from striped bass (*Morone saxatilis*), *J. Biol. Chem.*, 281, 1698–1713.

Ourth, D.D., Rose, W., Siefkes, M.J., 2008. Isolation of mannose-binding C-type lectin from sea lamprey (*Petromyzon marinus*) plasma and binding to *Aeromonas salmonicida*. *Veterinary Immunol. and Immunopathology*, 126, 407–12.

Sato, Y., Murakami, M., Miyazawa, K., Hri, K., 2000. Purification and characterization of a novel lectin from a freshwater cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. *Comp. Biochem. and Physiol. Part B*, 125, 169-177.

Science and Culture, 2003. Gestão das águas. *Revista da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência*. Year 55th, n°4.

Suzuki, Y., Tasumi, S., Tsutsui, S., Okamoto, M., Suetake, H., 2003. Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. *Comp. Biochem. and Physiol. Part B: Biochem. and Mol. Biol.* 136(4), 723-730.

Sun, J., Wang, L., Wang, B., Guo, Z., Liu, M., Jiang, J., Tao, R., Zhang, R., 2008. Purification and characterization of a natural lectin from the plasma of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & Shellfish Immunol.* , 25, 290-297.

Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., 1995. *Fishes of amazon and their environment: Physiological and Biological Aspects*. Springer Verlag.

Watanabe, Y., Tatenno, H., Nakamura-Tsuruta, S., Kominami, J., Hirabayashi, J., Nakamura, O., Watanabe, T., Kamiya, H., Naganuma, T., Ogawa, T., Naude, R.J., Muramoto, K., 2009. The function of rhamnose-binding lectin in innate immunity by restricted binding to Gb3. *DPC Dev. and Comp. Immunol.* 33, 187–197.

5 CONCLUSÕES

- A lectina do soro de tabaqui foi purificada e caracterizada parcialmente;
- A proteína apresentou caráter ácido e mostrou-se termoestável;
- A Atividade Hemaglutinante da lectina não depende do íon cálcio;
- A lectina foi capaz de reconhecer os carboidratos fucose e galactose;
- A lectina apresenta características de Fuclectina.

ANEXO: Guide for Authors, Acta Tropica

Acta Tropica

Statistics: Impact Factor: 1.707 Issues per year: 12 (<http://ees.elsevier.com/actrop/>)

Guide for Authors

Acta Tropica publishes original research papers, short communications and review articles. Original papers should normally not exceed 10 printed pages including tables and figures. Short communications should not exceed 4 printed pages including tables and figures. Manuscripts must be accompanied by a letter signed by all the authors. Submission of a paper to Acta Tropica is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form), and that it is not being considered for publication elsewhere. The act of submitting a manuscript to Acta Tropica carries with it the right to publish the paper. Responsibility for the accuracy of the material in the manuscript, including bibliographic citations, lies entirely with the authors.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/actrop>. Please suggest 4-6 potential reviewers for your submission, providing contact details and specific reasons for your suggestions. Please note that the journal may not use your suggestions, but your help is appreciated and may speed up the selection of appropriate reviewers.

Journal Scope

The content of papers submitted must fall within the Journal's Scope. Manuscripts based on parasite/microbe or vector inhibition experiments with crude extracts or fractions, where the active ingredients are not defined, will normally not be accepted.

Original papers should be organized as follows: Abstract - Key words - Introduction - Material (or Patients) and Methods - Results - Discussion Acknowledgements - References.

(a) Manuscripts should be complete in all respects and be typewritten with double spacing and wide margins. The metric system is to be used throughout.

(b) Manuscripts must be checked carefully before submission. No changes will be allowed at the proof stage.

(c) The title page should include: title, the names, affiliations and complete postal addresses of all authors. One corresponding author is to be designated, with a telephone and e-mail address.

(d) An abstract, of not more than 5% of the length of the article, should be provided.

(e) Keywords (indexing terms), normally 3-6 items, should be provided.

References should be assembled alphabetically on a separate sheet. In the text they should be referred to by name and year (Harvard System), the year being placed in parentheses, e.g., (Jones, 1970). More than one paper from the same author in the same year must be identified by the letters a, b, c, etc., placed after the year of publication. In the text, when referring to a work by more than two authors, the name of the first author should be given followed by et al. Literature references must consist of names

and initials of all authors, year, title of paper referred to, abbreviated title of periodical, volume number and first and last page numbers of the paper. Periodicals, books and multi-author books should be in accordance with the following examples.

Musaka, R.A., Nayambati, V.M., Nantulya, V.M., Majiwa, P.A.O., Moloo, S.K., Musoke, A.J., 1988. The chromosome profiles of *Trypanosoma congolense* isolates from Kilifi, Kenya and their relationship to serodeme identity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30, 105-112.

Garcia, L.S., Bruckner, D.A., 1988. *Diagnostic Medical Parasitology. Histological Identification of Parasites.* Elsevier Sci. Publ. Co. Inc., New York, NY, pp. 326-334.

Scorza, J.V., Medina, R., Pérez, H., Hernández, A.G., 1985. Leishmaniasis in Venezuela. In: K.-P. Chang and R.S. Bray (Eds.), *Human Parasitic Diseases*, Vol. 1, Leishmaniasis, Elsevier, Amsterdam, pp. 283-296.

Journal titles should be abbreviated according to the List of Serial Title Word Abbreviations (available from International Serials Data System, 20 rue Bachaumont, 75002 Paris, France. ISBN 2-904938-02-8). References concerning unpublished data should not be cited in the reference list; work accepted for publication should be referred to as in press. Incomplete references can result in publication delay.

Artwork. Full details for electronic submission of artwork can be obtained from <http://authors.elsevier.com>.

Instructions for authors regarding GenBank/DNA sequence linking

DNA sequences and GenBank Accession numbers Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048M), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link.

In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

Example 3: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell

tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

Submission of a paper to Acta Tropica, including a revised version, implies the transfer of copyright from the author(s) to the publisher and therefore that the corresponding author has obtained the approval of all other authors to the text and that it does not contain information previously published (except as a meeting abstract or by submission of sequence data to an electronic database) and is not under consideration for publication elsewhere. Publication in Acta Tropica is taken to imply the authors' willingness to comply with reasonable requests to supply reagents such as recombinant clones and monoclonal antibodies, and sequence data in electronic form to persons lacking access to computer databases.

Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a "Journal Publishing Agreement" (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding authors confirming receipt of the manuscript together with a "Journal Publishing Agreement" form or a link to the online version of this agreement. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+44) 1865 843830, fax (+44) 1865 853333, e-mail permissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>).

Manuscripts returned for revision should be returned to the editor within 3 months.

Page charges. There will be no page charges.

Proofs. One set of page proofs will be supplied for the author to check for typesetting accuracy, to be returned to the Publisher within 3 days of receipt. No changes to the original manuscript will be allowed at this stage.

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a 'watermarked' version of the published article and includes a coversheet with the journal cover image and a disclaimer outlining terms and conditions of use. An order form will be sent to the author enabling further offprints to be ordered at prices listed on the form.

Author enquiries: Authors can keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature at <http://www.elsevier.com/trackarticle>.

Authors in Japan please note: Upon request, Elsevier Japan will provide authors with a list of people who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact our Tokyo office: Elsevier Japan, 1-9-15 Higashi-Azabu, Minato-ku, Tokyo 106; Tel. (03)-5561-5032; Fax: (03)-5561-5045.