

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS

LECTINAS - CARACTERIZAÇÃO QUIMIOTAXINOMICA DE MICROALGAS DE
ÁGUA DOCE

Naiara Carolina Pereira Archanjo

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ecologia e Recursos Naturais, da
Universidade Federal de São Carlos,
como parte de requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Ecologia e
Recursos Naturais

Orientador: Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira
Co-orientadora: Dra. Inessa Lacativa Bagatini

SÃO CARLOS - SP
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A6691 Archanjo, Naiara Carolina Pereira
Lectinas : caracterização quimiotaxinômica de
microalgas de água doce / Naiara Carolina Pereira
Archanjo. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
66 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2016.

1. Lectinas. 2. Microalgas Verdes. 3.
Quimiotaxinomia. 4. Selenastraceae. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Naiara Carolina Pereira Archanjo, realizada em 02/02/2016:



Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira
UFSCar



Profa. Dra. Odete Rocha
UFSCar



Profa. Dra. Vanessa Colombo Corbi
UNIARA

“Por isso mesmo façam todo o possível para juntar a bondade à fé. A bondade juntem o conhecimento e ao conhecimento, o domínio próprio. Ao domínio próprio juntem a perseverança.”

2 Pe 1:5-6

Agradecimentos

Com muito carinho agradeço ao Prof Dr. Armando Augusto Henriques Vieira, por acreditar em mim, e me presentear com ensinamentos diários, estar sempre presente, me orientar e corrigir, em todos os momentos de trabalho no Laboratório de Ficologia.

Com muito carinho também à Dra Inessa Lacativa Bagatini, pela amizade, dedicação e paciência. Ela que participou de forma efetiva em todas as etapas do mestrado, desde o sonho até a dissertação, por ser inspiração e modelo, não só meu, mas de muitos. E é como meus amigos dizem “ *Isso que é co - orientadora*”.

Ao professor Dr Hugo Sarmento, por me ensinar os caminhos da Citometria de Fluxo e estar sempre pronto a contribuir, a ele agradeço também pelas contribuições durante o processo de qualificação.

À Professora Dra. Marcela B. da Cunha Santino pelas contribuições durante a qualificação, disponibilidade, contribuindo para a minha formação.

Aos amigos e colegas, 'do laboratório de Ficologia pelas conversas, discussões, ajuda e apoio: Luiz Sartori, Letícia Tessarolli, Fabrício Meccheri, Helena Vieira, Guilherme de Moraes, Ingritt Moreira, Cilene Mori, Thaís Garcia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de Mestrado concedidas.

À UFSCar e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais pela infraestrutura fornecida e pela formação acadêmica.

A todos os meus amigos do PPGERN pelas conversas, palavras de estímulo e apoio de sempre, especialmente a Júlia Gibertoni, que sempre me apoiou e me incentivou a prosseguir, por passarmos frequentemente pelas mesmas dificuldades, aprendemos a encará-las juntas.

Aos meus amigos de São Carlos, que não citarei nomes por medo de esquecer aos que me acompanharam desde a graduação Aline, Thaís e Barbie obrigada por me conhecerem tão bem, e estarem aqui. Ainda sobre os amigos quero agradecer a Aline em especial, que sempre esteve presente chorou, torceu, sorriu ao meu lado

Agradeço com muito amor a minha Vó Ivanilde que todos os dias de manhã pediu para Deus me guardar no caminho para a faculdade e me dar sabedoria, é muito amor saber que alguém cuida de você mesmo distante e não esquece um dia sequer.

E imensa gratidão as meus pais Amauri e Solange, pelo amor cuidado, não tenho palavras para agradecê-los, sem eles não chegaria até aqui, a eles todo amor do mundo.

Agradeço também aos meus irmãos que foram os primeiros a me ensinarem o que é uma sociedade, desde então dividimos tudo. Em especial a Ane minha irmã mais velha, que em muitos momentos lembra minha mãe, cuidando sempre de mim, junto ao seu esposo Daniel, que para mim é um irmão.

Ao Rafael meu namorado, que aguentou os maiores choros da minha vida, meus resmungos, minhas dificuldades e com amor e carinho sempre me ajudou a superar, me mostrando caminhos mais simples. E como diria Oswaldo Montenegro

“Quando a gente ama, simplesmente ama! E é impossível explicar.”

E por fim agradeço a Deus, por permitir que chegasse até aqui.

Resumo

As microalgas verdes de água doce compõem um dos grupos de grande complexidade para taxonomia morfológica clássica. Para grupos como a família Selenastraceae, as características morfológicas são ambíguas em nível de gênero e não refletem as relações filogenéticas. As abordagens taxonômicas polifásicas têm emergido como uma maneira de tentar ajudar a taxonomia clássica a resolver a classificação desses grupos. Considerando-se a relativa especificidade lectina/carboidrato e a grande diversidade na composição monomérica dos polissacarídeos extracelulares de microalgas, buscamos conhecer se alguns táxons de microalgas apresentam um conjunto de lectinas e monossacarídeos terminais específico o que poderia ser utilizado como característica quimiotaxonômica em uma abordagem taxonômica polifásica. Para tanto fizemos uma otimização dos métodos até hoje utilizados para taxonomia e analisamos o comportamento dos monossacarídeos terminais e das lectinas para dez espécies de diferentes gêneros das famílias Selenastraceae e Scenedesmaceae (Chlorophyceae), Botryococcaceae e Oocystaceae (Trebouphyceae), e Fragilariaceae, Stephanodiscaceae (Bacillariophyceae) em cultivos. Observamos que é possível por meio desta técnica separar cepas de mesma espécie de locais diferentes, além de encontrar monossacarídeos indicadores em regiões específicas para determinado táxon. Neste trabalho utilizamos seis tipos de lectinas e onze antilectinas sintéticas para reconhecer os monossacarídeos terminais e as lectinas.

Abstract

Freshwater green microalgae are a group which present great complexity for classical morphological taxonomy. For groups like Selenastraceae family, the morphological characteristics are ambiguous at genus level and do not reflect the phylogenetic relationships. Taxonomic polyphasic approaches have been emerged to assist the classical taxonomy in the classification of such groups. Taking into account the specific relation lectin-carbohydrate and the great diversity in monomer composition of extracellular polysaccharides from microalgae, we aim to understand if some microalgae taxa have specific terminal monosaccharides set, which could be used as chemotaxonomic feature within a polyphasic taxonomic approach. Thus, we performed an optimization of methods so far used in taxonomy, and analyzed the terminal monosaccharides and lectins behavior against ten species from different genera to the following families: Selenastraceae and Scenedesmaceae (Chlorophyceae), Botryococcaceae and Oocystaceae (Trebouphyceae), and Fragilariaceae, Stephanodiscaceae (Bacillariophyceae), all of them in crops. We noticed that is possible, using this technique, to separate strains from the same species isolated different from places. Furthermore, we found some indicator monosaccharides the microalgae of some taxa. In this work we use six types of lectins and eleven anti synthetic lectins to recognize the terminal monosaccharides and lectins.

Lista de figuras

Introdução

Figura 1. Representação esquemática da ligação da lectina a um carboidrato..... 4

Figura 2. Representação esquemática da aplicação da Lectina e Anti lectina marcados com FITC para a marcação de monossacarídeos terminais e lectinas, respectivamente FITC 7

Capítulo 1

Figure 1: Fluorescence os Blank and Controls fluorescence per cell, in arbitrary units (a.u.) for different concentrations and incubation time using glucose (G), mannose (M) and glucose+mannose (GM) as inhibitor sugars. B1, 2 and 3 are the blanks (without lectin) for each incubation time; G1, G2 and G3 represent different ConA concentrations of the controls: 5, 7.5 and 10 μgml^{-1} , respectively. The results account an average of 3 replicates \pm standard. The stars represent the significance values regarding to the blank obtained in Welch corrected t-Student test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) 25

Figure 2: Photomicrographs from *K. irregularis* cells under epifluorescence microscopy in different treatments using FITC-conjugated ConA with concentration of 5 μgml^{-1} and 0.5 h.26

Figure 3: Fluorescence per cell (arbitrary units – au) of *K. irregularis*, marked with ConA lectin. C1, C2 and C3 represent the treatments with the following ConA

concentrations: 5, 7.5 and 10 μgml^{-1} , respectively; GM1, GM2 and GM3 are the controls with ConA concentrations of 5, 7.5 and 10 μgml^{-1} , respectively, and after incubation with glucose + mannose. The blank fluorescence was discounted from treatments and controls. These results account an average of three experiments and the standard deviation. The fluorescence in all treatments was significantly higher than in the corresponding control. The concentrations were compared each other in each period. The letter "a" indicates the significantly similar concentrations 26

Figure 4: Fluorescence per cell, in arbitrary units (a.u.) of treatments samples marked with ConA, in relation to the incubation period. Where C1, C2 and C3 represent the concentrations of 5, 7.5 and 10 μgml^{-1} , respectively. The results represent an average of three replicates \pm standard deviation. For comparison of each concentration separately, the incubation periods that were statistically homogeneous were accounted by the letter "a". The samples of the same FITC-conjugated lectin concentration were compared in three different periods. The values of the respective controls were subtracted from the samples.27

Capítulo 2

Figura 1. Análise de agrupamento (Hierarchical Cluster Analysis) utilizando o algoritmo "complete-linkage" e distâncias de Bray-Curtis para o grupo Lec (lectinas usadas para marcar monossacarídeos) para as doze cepas estudadas 40

Figura 2. Análise de agrupamento (Hierarchical Cluster Analysis) utilizando o algoritmo "complete-linkage" e distâncias de Bray-Curtis para o grupo Ant (antilectinas usadas para marcar lectinas) para as doze espécies estudadas 41

Figura 3. Análise de agrupamento (Hierarchical Cluster Analysis) utilizando o algoritmo “complete-linkage” e distâncias de Bray-Curtis para o grupo LecAnt (lectinas e anti lectinas como marcadores) para as doze espécies estudadas 42

Figura 4. Análise de agrupamento (Hierarchical Cluster Analysis) utilizando algoritmo “complete-linkage” e distâncias de Bray-Curtis para o grupo Lec (lectinas) para a família Selenastraceae..... 44

Figura 5. Análise de agrupamento (Hierarchical Cluster Analysis) utilizando algoritmo “complete-linkage” e distâncias de Bray-Curtis para o grupo Ant (anti lectinas) para a família Selenastraceae..... 44

Figura 6. Análise de agrupamento (Hierarchical Cluster Analysis) utilizando algoritmo “complete-linkage” e distâncias de Bray-Curtis para o grupo LecAnt (lectinas e anti lectinas) para a família Selenastraceae..... 46

Figura 7. Fotomicrografias de células de *Monoraphidium contortum* (306) e *Botryococcus braunii* (399), sob microscopia de epifluorescência. (A) *M. contortum* tratada com a Anti-lectina ConA (B) *M. contortum* tratada com a Anti –lectina GNL ; (C) *B. braunii* tratada com lectina UEAI (D) *B. braunii* tratada com lectina ConA..... 47

Figura 8. Fotomicrografias de células do gênero *Ankistrodesmus* e *Desmodesmus* tratadas com a lectina conA, sob microscopia de epifluorescência. (A) *Ankistrodesmus densus* (239); (B) *Ankistrodesmus densus* (003); (C) *Desmodesmus* 48

Lista de tabelas

Capítulo 2

Tabela 1. Lista das microalgas utilizadas neste estudo, identificadas de acordo com a morfologia clássica e classificadas de acordo com Algaebase.	32
Tabela 2. Tabela das lectinas usadas no experimento	33
Tabela 3. Tabela das Anti lectinas usadas no experimento	36
Tabela 4. Coeficientes de determinação obtidos na Análise de PERMANOVA dos dados dos três grupos de marcadores (Lec, Ant e LecAnt) para cepas e espécies Para todas as análises $p < 0,001$	45
Tabela 5. Coeficientes de determinação obtidos na Análise de PERMANOVA dos dados dos três grupos de marcadores (Lec, Ant e LecAnt) para cepas e espécies. Para todas as análises $p < 0,001$	46

APRESENTAÇÃO DA TESE

A tese será apresentada da seguinte forma: (1) Introdução geral; (2) Hipóteses e Objetivos; (3) Capítulos (com Resultados e Discussão) (4) Considerações finais.

Cada capítulo será apresentado no formato de artigo científico: com resumo, introdução, material e métodos, resultados, discussão, referências bibliográficas. Esse formato foi escolhido para facilitar a publicação dos resultados obtidos. O primeiro capítulo está em inglês e o segundo em português. Uma vez que alguns capítulos estão em inglês, uma introdução geral, uma discussão geral e as conclusões em português foram necessárias.

A divisão neste formato torna a publicação dos dados mais rápida, no entanto, as repetições nos capítulos são inevitáveis.

O primeiro capítulo encontra-se formatado para a publicação na revista à qual foi submetido (*Algae*). Neste capítulo, apresentamos os resultados de uma das hipóteses sobre as diferentes concentrações e períodos de incubação, que podem refletir nas ligações das lectinas.

No capítulo 2, testamos a especificidade das lectinas e antilectinas pode ser uma ferramenta na discriminação de grupos e na identificação desse complexo grupo de microalgas.

Ao final, uma breve discussão geral e as conclusões foram elaboradas baseadas nos capítulos apresentados.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	1
	Microalgas	1
	Lectinas.....	2
	Identificação dos açúcares terminais das microalgas por meio das lectinas.....	6
	Hipóteses.....	11
	Objetivos específicos.....	12
2	Capítulo 1: Lectins as terminal monosaccharides markers in green freshwater microalgae: Method Optimization.....	14
2.1	Abstract	14
2.2	Introduction	15
2.3	Material and methods.....	17
2.3.1	Microalgae.....	17
2.3.2	Experimental design	17
2.3.3	Epifluorescence microscopy.....	18
2.3.4	Flow cytometry.....	19
2.3.5	Statistical analysis.....	19
2.4	Results	20
2.4.1	Efficiency of controls	20
2.4.2	Influence of ConA concentration in the fluorescence signal	21
2.4.3	Influence of incubation time in fluorescence signal	21
2.5	Discussion.....	22
2.6	Referências.....	25
2.7	Figure.....	27
3	Capítulo 2: O papel das lectinas na caracterização quimiotaxonômica de microalgas de água doce	30
3.1	Resumo.....	30
3.2	Introdução.....	31
3.3	Material e métodos.....	33
3.3.1	Microalgas	33
3.3.2	Lectinas.....	35
3.3.3	Antilectina	36
3.3.4	Desenho experimental.....	36

3.3.5	Microscopia de epifluorescência.....	38
3.3.6	Citometria de fluxo.....	39
3.3.7	Análises de multivariadas: agrupamentos e diagramas.....	39
3.4	Resultados.....	40
3.4.1	Análises: Microscopia de epifluorescência	48
3.5	Discussão.....	50
3.6	Referências.....	53
4	Considerações Finais.....	55
5	Anexos.....	56

1 INTRODUÇÃO GERAL

Microalgas

As microalgas são os principais produtores primários de todos os ambientes aquáticos por conta da sua atividade fotossintética (Harwood e Guschina 2009), a qual é o principal meio de produzir carbono orgânico pela fixação de carbono inorgânico (Léveillé et al. 1997).

Microalga é um termo não natural relacionado à taxonomia que define um grande grupo de microorganismos com clorofila *a* e outros pigmentos fotossintéticos (Hoek et al., 1995). Formam um grupo heterogêneo de organismos microscópicos, unicelulares, coloniais ou filamentosos, coloridos devido aos seus pigmentos fotossintéticos e fotoautotróficos (Raven et al., 2001; Olaizola, 2003). Podem desenvolver-se tanto em ambiente marinho, como em água doce e salobra (Chisti, 2004).

Estes microrganismos têm sido tradicionalmente classificados morfológicamente pela organização do talo, tipos de pigmentos, aspectos citológicos e morfológicos, tais como a ocorrência de células flageladas, a estrutura dos flagelos, a divisão celular, a presença e a caracterização dos envoltórios do cloroplasto e a possível conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana nuclear (Tomaselli, 2004).

De acordo com a classificação morfológica as microalgas podem ser procarióticas ou eucarióticas; as procarióticas encontram-se no grupo das Cyanobacteria (Cyanophyta), também conhecidas como algas azuis (Lindell, 2014). As microalgas eucarióticas pertencem principalmente às classes Bacillariophyceae (diatomáceas), Dinophyceae (dinoflagelados), Prymnesiophyceae (cocolitoforídeos) e

Cryptophyceae (criptomônadas), além Prasinophyceae e Chlorophyceae, Ulvophyceae e Klebsormidiophyceae e Zygnematophyceae (algas verdes), (Hoek et al, 1995)

A classe Chlorophyceae possui organismos que ocupam diversos habitats, desde águas doces, salobras e salgadas a ambientes terrestres, e possuem diversas organizações celulares (Hoek 1995; Lewis e McCourt 2004). Dentro desta classe, temos grupos importantes em águas continentais tropicais, como as Sphaeropleales que inclui algas verdes unicelulares, cenobiais, filamentosas, imóveis na fase vegetativa, com reprodução assexuada predominante, possuem formas com variações dentro de uma morfologia limitada. Essas características prejudicam a identificação das espécies dessa ordem (McManus and Lewis 2011).

Diversos trabalhos têm questionado a eficiência do sistema de classificação taxonômico morfológico das microalgas baseados em critérios fenotípicos. Desta forma, o desenvolvimento de uma abordagem polifásica para a identificação taxonômica envolvendo uma combinação de técnicas de biologia molecular e quimiotaxonomia tem sido proposta para melhor compreensão da diversidade biológica (Das et al, 2014).

Lectinas

As lectinas foram definidas como proteínas ou glicoproteínas com um ou mais sítio(s) de ligação a um açúcar por subunidade. Estas moléculas se ligam de forma seletiva e reversivelmente a carboidratos e precipitam polissacarídeos, glicoproteínas e glicolipídeos, desta forma, agem frequentemente como reconhecedoras de células (Singh *et al.*, 1999).

A primeira descrição da atividade atualmente atribuída às lectinas foi feita por Stillmark em 1888 (Kocourek e Horejsi, 1981). Ele descobriu que extratos de mamona,

Ricinus communis, continham uma proteína que aglutinava eritrócitos; essa proteína foi chamada de Ricina. Tais proteínas foram nomeadas hemaglutininas ou fitohemaglutininas por apresentarem atividade de hemaglutinação (Brilliantine A., 1969). Anos depois essas proteínas foram denominadas lectinas, o termo lectina provém do verbo latino *legere*, ou seja *lectus* que significa escolhido, e refere-se à habilidade dessas proteínas ligarem-se seletivamente e reversivelmente a carboidratos (Sharon e Lis 1990).

Inicialmente identificadas como proteínas tóxicas, as lectinas tornaram-se ferramentas indispensáveis em diagnósticos de doenças, de tipagem sanguínea e de identificação de cepas de microrganismos (Van Damme et al., 1998). Elas têm dado suporte a estudos moleculares, estruturais, genéticos e de fisiologia vegetal entre outros, através do detalhamento das interações proteína-proteína e proteína-carboidrato (Hou et al, 2008).

A definição de lectinas mais aceita atualmente, é que são proteínas que apresentam pelo menos um sítio de ligação não catalítico, pelo qual se ligam de forma reversível e específica a mono ou oligossacarídeos, sendo este sítio denominado domínio lectínico. Em geral, as lectinas são oligoméricas, e apresentam ligação reversível a carboidratos através de ligações fracas do tipo pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Vander Walls (Sharon & Lis, 2004), como ilustrado na Figura 1.

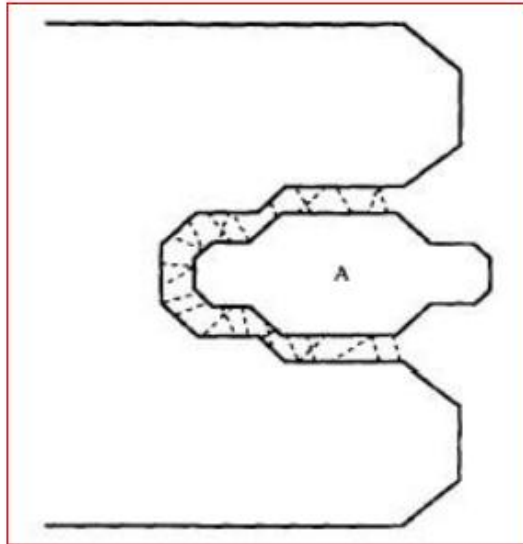


Figura 1. Representação esquemática da ligação da lectina a um carboidrato (A). As linhas pontilhadas representam pontes de hidrogênio. Fonte Kennedy et al (1995).

As lectinas constituem um grupo de proteínas presentes em organismos vivos desde vírus até mamíferos, sobretudo em vegetais. Por serem proteínas com altas taxas de expressão em plantas e que se caracterizam pela ação sobre outros organismos vivos, as lectinas são bastante estudadas, ganhando grande importância científica e prática em diversos campos do conhecimento em pouco mais de um século após seu descobrimento (Sharon e Lis 1993).

A hidrofobicidade é a força principal de interação entre lectinas e carboidratos através de sítios de ligação (Quioco, 1986), e com proteínas ou outras substâncias através de sítios hidrofóbicos (Roberts; Goldstein, 1983; Kella *et al.*, 1984). Na opinião de Peumans e Van Damme (1995) a presença de pelo menos um domínio de ligação não-catalítico que liga reversivelmente, mas especificamente um mono- ou oligossacarídeo, já é suficiente para uma proteína obter o nome lectina.

A grande maioria de lectinas de plantas apresenta especificidade por carboidratos simples (monossacarídeos) ou complexos (oligossacarídeos e glicanos),

os quais podem ser de origem vegetal ou não, como N-acetilglicosamina e ácidos N-glucurônico, galacturônico, xilurônico, Lidurônico, siálico e N-acetilmurâmico (Van Damme et al., 1998).

Com base na capacidade de aglutinação e com propriedades de precipitar glicoconjugados, as lectinas foram subdivididas em quatro classes segundo Povineli e Finardi (2002):

I. As merolectinas são proteínas contendo exclusivamente um único domínio ligante a carboidratos. São proteínas polipeptídicas simples, que devido à sua estrutura monovalente são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Exemplos bem conhecidos deste grupo são as heveinas, lectinas de *Hevea brasiliensis* (Van Parijs et al., 1991) e as proteínas ligantes monoméricas de orquídeas (Peumans e Van Damme, 1995).

II. As hololectinas também são formadas por um único domínio ligante a carboidratos, mas contêm dois ou mais desses domínios que podem ser idênticos ou muito homólogos. Este grupo compreende todas as lectinas que tem múltiplos sítios de ligação e, em função dessas características, são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Obviamente a maioria das lectinas de plantas conhecidas são hololectinas, por isso comportam-se como hemaglutininas.

III. As quimerolectinas são proteínas que, além do domínio ligante a carboidrato, possuem um outro domínio não relacionado com este. O segundo domínio pode ter uma atividade catalítica ou outra atividade biológica bem definida agindo independentemente do domínio de ligantes de carboidratos. Em função do número de sítios de ligações a açúcares, as quimerolectinas agem como merolectinas ou hololectinas (Peumans e Van Damme, 1995).

IV. Superlectinas consistem exclusivamente de pelo menos dois domínios de ligação a açúcares diferentes. Esse pode ser considerado um grupo especial de

quimerolectinas, consistindo de dois domínios estruturalmente e funcionalmente diferentes de ligação a carboidratos (Van Damme et al., 1996).

Identificação dos açúcares terminais das microalgas por meio das lectinas

Os carboidratos agem como intermediários na comunicação celular em vários sistemas biológicos, podendo influenciar fenômenos de diferenciação, proliferação e interações entre células (Sanz-Aparicio et al., 1997). Isso se deve, em parte, ao enorme potencial codificador de informações das estruturas dos glicanos, superior ao das proteínas, ácidos nucleicos e outras macromoléculas (Cavada et al., 2001). Eles criam um repertório amplo de isômeros a partir de poucos açúcares, assim, os polissacarídeos se constituem em moléculas de reconhecimento por excelência (Sol et al., 2006). As informações presentes na estrutura de oligossacarídeos conjugados a proteínas ou a lipídios na superfície das células são reconhecidas por um grupo especializado de proteínas, as lectinas (Breuker et al., 1997).

Na utilização de lectinas para identificar açúcares, elas são inicialmente purificadas e isoladas. Logo após, são marcadas com fluoresceína isotiocianato (FITC), o que permite sua observação por fluorescência após sua ligação com os monossacarídeos alvos (Fig. 2a). Sendo assim é possível observar os sítios através da fluorescência das lectinas marcadas.

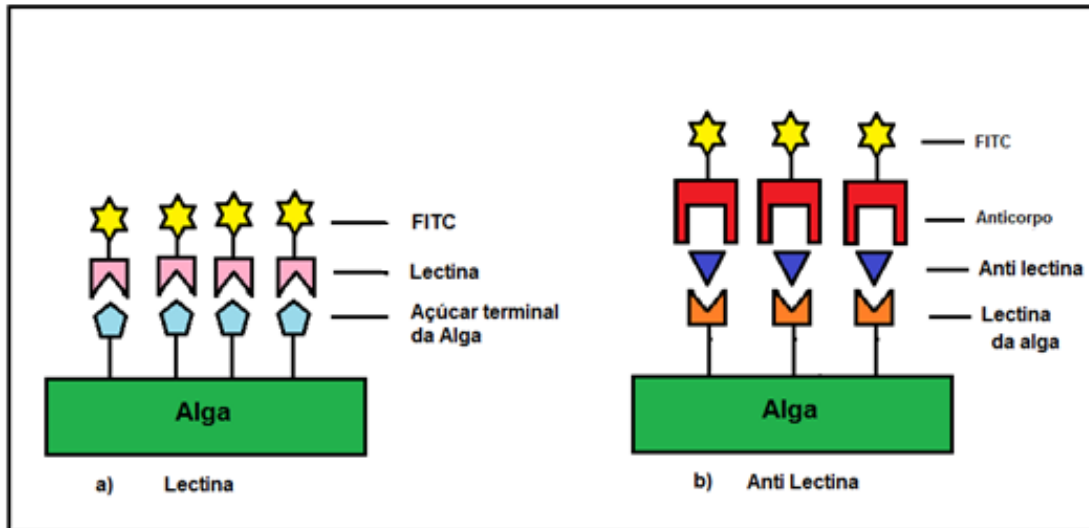


Figura 2. Representação esquemática do uso da Lectina e Anti lectina marcados com FITC.

As lectinas por sua vez podem ser identificadas por meio de um anticorpo específico chamado antilectina, que se liga a uma determinada lectina presente na parede celular. No entanto, a antilectina não é marcada diretamente com FITC, e sua ligação à lectina é identificada por meio de um segundo anticorpo marcado com FITC que se liga à antilectina. (Fig. 2b).

Desta forma, tanto os monossacarídeos terminais, como as lectinas presentes nas paredes das algas podem ser analisados e utilizados como uma possível característica quimiotaxonômica auxiliar para a identificação das microalgas.

Referências

Breukel, A.I.M.; Besselsen, E.; Ghijzen, W.E.J.M., 1997. *Synaptosomes: a model system to study release of multiple classes of neurotransmitters*. In: Rayne, R.C. (ed). *Methods in molecular biology*, v 72, p. 33-47.

Cavada, B.S.; Barbosa, T.; Arruda, S.; Grangeiro, T.B.; Barral-Netto, M., 2001. *Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity. Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins*. *Current Protein and Peptides Science*, v 2, p. 1-13.

Chisti, Y. *Microalgae: our marine forests*. *Biotechnology Advances*. v. 22. p. 565 – 567.

Das, S., Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J. & Kumari S. 2014. *Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms*. *Journal of Microbiological Methods* 80–100.

Harwood J.L, Guschina I.A., 2009 *The versatility of algae and their lipid metabolism*. *Biochimie* 91:679–684. doi: 10.1016/j.biochi.2008.11.004.

Hoek C. V. D., 1995. *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge University Press, Cambridge ; New York.

Hou, J., Huang, B., Hu J., Lin, L. & Hong, H. 2008. *Fourteen FITC-conjugated lectins as a tool for the recognition and differentiation of some harmful algae in Chinese coastal waters*. *Journal Applied Phycology* 20:35–46.

Kennedy, J. F. et al., 1995. *Lectins, versatile proteins of recognition: a review*. *Carbohydrate Polymers*, v. 26, n. 3, p. 219-30.

Kocourek, J., Horejsi, V., 1981. *Defining a lectin*. *Nature* 290: 188-190.

Léveillé J-C, Amblard C, Bourdier G., 1997. *Fatty acids as specific algal markers in a natural lacustrine phytoplankton*. *J Plankton Res* 19:469–490.

Lewis L.A, McCourt R. M., 2004 *Green algae and the origin of land plants*. *Am J Bot* 91: 1535–1556.

Lindell, D. ,2014. *The genus Prochlorococcus, phylum cyanobacteria*. In *The Prokaryotes* (pp. 829-845). Springer Berlin Heidelberg

McManus, H. & Lewis, L.A. 2011. *Molecular phylogenetic relationships in the freshwater family Hydrodictyaceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae), with an emphasis on Pediastrum duplex*. Journal of Phycology 47: 152-163]

Olaizola, M., 2004. *Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace*. Biomolecular Engineering, v. 20, p. 459-466, 2003.

Peumans, W. J.; Van Damme, E. J. M., 1995. *Lectins as plant defense proteins*. Plant Physiology, Rockville, v. 109, n. 2, p. 347-352.

Raven, P. H. ; Evert, R. F. ; Eichhorn, S. E. , 2001. Biologia Vegetal. Tradução de Antônio Salatino et al. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 31-36. Título original: Vegetal Biology.

Sanz-Aparício, J.; Hermoso, J.; Granjeiro, T.B.; Calvete, J.J.; Cavada, B.S., 1997. *The crystal structure of Canavalia brasiliensis lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct lectin biological properties from Concanavalin A*. FEBS Letters, v 405, p. 114-118.

Sharon, N., 1993. *Lectins- carbohydrates complexes of plants and animals*. Na atomic. Trends Biochemical Sciences, Oxford, v. 18, n. 6, p. 221-226.

Sharon, N.; Lis, H., 1990. *Legumes lectins a large family of homologous proteins*. Faseb J, v. 4, p. 3198-3208.

Sharon, N.; Lis, H., 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glycobiology, Cary, v. 14, n. 11, p. 53-62.

Singh, r. S.; tiwary a. K.; Kennedy, J. F., 1999. *Lectins: Sources, Activities and Applications*. Critical Reviews in Biotechnology, v. 19, n. 2, p. 145-178.

Tomasellil, L. , 2004. *The microalgal cell*. In: RICHMOND, A. (Ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science. p.3-19.

Van Dame., E. J. M.; Peumans, W. J.; Barre, A.; Rougé, P., 1998. *Plant Lectin: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles*. Critical Reviews in Plant Sciences, Boca Raton, v. 17, n. 6, p 575-692.

Van Parijs, J.; Broekaert, W. F.; Goldstein, I. J.; Peumans, W . J. , 1991. *Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (Hevea brasiliensis) latex*. Planta, Berlin, v. 183, n. 2, p. 258-262.

Povinelil, K.L.; Finard F., 2002 The multiple functions of plant lectins. *Nutrire; rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.= J. Brazilian Soc. Food Nutr.*, São Paulo, SP. , v.24, p.135-156.

Hipóteses

A) Trabalhos feitos com lectina em microalgas utilizaram diferentes concentrações e diferentes períodos de incubação. Entretanto tais variações nas concentrações e períodos de exposição, levam-nos a crer, com base nos resultados desses trabalhos que essas diferenças reflitam nas ligações das lectinas com os açúcares e interfiram no sinal de fluorescência do tratamento realizado com as células algais.

B) Considerando-se a relativa especificidade lectina/carboidrato e a grande diversidade na composição monomérica dos polissacarídeos extracelulares de microalgas, pode-se deduzir que um determinado táxon de microalgas apresente um conjunto de monossacarídeos terminais específico o que poderia ser utilizado como característica quimiotaxonômica em uma abordagem taxonômica polifásica. Além disso, devido à grande distribuição e diversidade de funções das lectinas nos seres vivos, pressupõe-se variações nas lectinas encontradas na parede de cada grupo de microalgas, o que também poderia ser utilizado na quimiotaxonomia.

Objetivos específicos

Utilizando as lectinas como marcadores de monossacarídeos terminais para caracterizar a diversidade na composição dos polissacarídeos extracelulares das microalgas, e/ou as antilectinas para identificar as lectinas presentes na parede celular, pretendeu-se:

1) Otimizar um método apropriado para a utilização de lectinas como marcadores quimiotaxonômicos em microalgas verdes de água doce, testando diferentes concentrações da lectina ConA e diferentes tempos de incubação em culturas da microalga verde *Kirchneriella irregularis*.

2) Verificar se os monossacarídeos terminais dos polissacarídeos e glicoproteínas e as lectinas que compõem as superfícies do complexo grupo de microalgas verdes são uma ferramenta útil na discriminação de grupos e na identificação desse complexo grupo de algas.

2 Capítulo 1: Lectins as terminal monosaccharides markers in green freshwater microalgae: Method Optimization

Naiara Archanjo¹, Inessa Lacativa Bagatini¹, Hugo Sarmento², Armando Augusto Henriques Vieira¹

¹ Laboratório de Ficologia, Departamento de Botânica, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, ² Departamento de Hidrobiologia (DHB)- Laboratório Biodiversidade e Processos Microbianos -UFSCar – São Carlos, SP

Artigo submetido à revista *Algae*

2.1 Abstract

FITC-Lectins have been widely used as molecular markers, since the lectins have the property to binding on specific carbohydrates. Such property allows us to obtain information regarding to the diversity of terminal monosaccharides on the polysaccharides present on microalgae cell surfaces. Among those lectins, the Concanavalin (ConA) is one of the most used with a great cost-benefit. In our work, we aimed to optimize a suitable methodology to use FITC-lectins as chemical markers for freshwater green microalgae. We have tested different concentrations of Concanavalin (ConA) in different incubation times in cultures of the green microalgae *Kirchneriella irregularis*. Afterwards, to identify the binding lectin-sugar, we performed fluorescence measurements by flow cytometry. We have shown that the best results for fluorescence intensity occurs for the lowest concentration, 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, and incubation time, 0.5 h, and that the time and concentration influence in the lectin-sugar binding analysis.

2.2 Introduction

Freshwater green microalgae present a high complexity to morphological taxonomy. Among them, the Family Selenastraceae (Order Sphaeropleales) has a high morphological diversity and includes some of the most common planktonic freshwater algae (McCourt and Lewis, 2004). Taxonomical complexity derives from the occurrence of several morphotypes for a single filotype, what makes difficult to identify them in phytoplankton diversity surveys (Krienitz and Bock 2012).

The need to overcome these difficulties has encouraged many studies and development of new techniques to help identify and classify those organisms. Thus, using a polyphasic approach, which combines morphological identification, molecular biology techniques and chemotaxonomy, has been proposed to better understand the biological diversity of microorganisms (Das et al, 2014), as the Selenastraceae. Among the techniques used for chemotaxonomy of microalgae are, for example, fatty acids profiles (Taipale et al, 2013) and monosaccharides from cell wall (Takeda, 1991), usually determined by chromatographic techniques and mass spectrometry, and even spectrometry of FTIR-ATR (Moraes and Vieira, 2014).

Another approach that has been employed as chemotaxonomical tool for microalgae is the use of FITC (fluorescein isothiocyanate)-conjugated lectin. Lectins are proteins which have the ability to bind selectively and reversibly to different types of monosaccharides (Coelho and Silva, 2000). Because of their specific binding ability, they have been used as molecular markers to show the diversity of terminal monosaccharides of the polysaccharides on the cell surfaces of microalgae. Such data allows species differentiation (Cho et al., 2003, Hou et al, 2008) and discrimination of toxic and non-toxic strains (Rhodes et al, 1995, Cho et al, 1998).

Among the most commonly used lectins, Concanavalin A (ConA), obtained from *Canavalia ensiformis* seeds (Family: Leguminosae), is specific for D-glucose / D-mannose (Dug et al, 2001), which are common terminal sugars in microalgae polysaccharides of different orders (Cho et al, 1998). Although the potential use of lectins as chemotaxonomic characteristics, few phytoplankton groups were studied so far, for example, Dinophyceae (Back et al, 1993; Cho et al, 1998, 2002, Hou et al, 2008), cyanobacteria and Conjugatophyceae (Back et al, 1993). Furthermore, most of these studies have used epifluorescence microscopy, which is time consuming, and usually suitable only to determine the presence and absence of terminal monosaccharides (Cho et al., 1998 and Rhodes, 1995). Some studies have used spectrofluorometry to obtain a relative quantitation of these monosaccharides by the fluorescence of FITC-conjugated lectins (Sharon and Lis 2001) and few have used flow cytometry (Hou et al., 2008).

Flow cytometry can be used successfully in the measurement of FITC-conjugated lectins to help in the morphological differentiation of similar microalgae species (Hou et al., 2008). Although it is an easier technique with simultaneous results, low cost and high reproducibility, since it provides fluorescence values per cell, it still remains a poorly explored technique for this purpose in microalgae, and therefore with few methodological tests available in the literature.

Thus, in this work we aimed to optimize a suitable methodology to use lectins as chemotaxonomic markers in freshwater green microalgae. Therefore, we tested different concentrations of ConA lectin, as a model, and different incubation times for the green microalgae *Kirchneriella irregularis*.

2.3 Material and methods

2.3.1 Microalgae

The microalga *Kirchneriella irregularis* (Chlorophyceae) (UFSCar CCMA-UFSCar 348) used in this study was kept under axenic conditions and stored in the Freshwater Microalgae Culture Collection from the Botanical Department, Federal University of São Carlos (World Data Center for Microorganisms, WDCM No. 835).

The *K. Irregularis* cells were cultured in triplicates, in WC medium pH 7.0 (Guillard and Lorenzen 1972) at 23 ± 2 °C under illumination of 108 ± 2.0 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in 12:12h light:dark cycles until the exponential phase (23 days). Then the cells were fixed with 4% of formaldehyde, and centrifuged at 1380 xg for 4 minutes, and the supernatant was removed to obtain the cells.

2.3.2 Experimental design

For the test with lectins, fixed cells were washed three times with sterile WC medium (WC medium for washing was used without vitamins and micronutrients), centrifuged at 1380 xg for 14 minutes at 4 °C. After centrifugation, the supernatant was removed and $\sim 1 \times 10^6$ cells were mixed with WC buffer solution. The WC buffer consists in WC medium (Guillard & Lorenzen, 1972) without micronutrients and vitamins, added with TRIS base (6 g.L⁻¹), BSA (1%), CaCl₂ (0.111 g.L⁻¹) and MgCl₂ (0.203 g.L⁻¹), pH 7.8.

We evaluated the fluorescence of *K. irregularis* cells after incubation with three concentrations of FITC-ConA (Vector Laboratories): 5, 7.5 and 10 μgml^{-1} . Each

concentration was used for incubation for three periods: 0.5 h, 1 h and 2 h, totalizing 9 different treatments. After the incubation time, the cells were washed twice using the WC medium for washing to remove the unbound lectins.

In addition to the blanks, three negative controls were prepared with the target monosaccharides for each of the nine treatments: 1) Negative Control G: only glucose (Dextrose 500 mg - Mallinckrodt Gen) as an inhibitor sugar and final concentration of 200 mM; 2) Negative Control M only mannose (D - (+) Mannose 100 mg - Sigma Aldrich) as an inhibitor sugar and final concentration of 200 mM; and 3) Negative Control GM: glucose and mannose as inhibitors sugars at a final concentration of 200 mM (100mM of each sugar). Sugars were mixed and incubated with ConA lectin for 30 minutes before the addition of algal cells. The cells were treated in the same way as those treated with lectin.

All treatments were analyzed in triplicates and followed by a reference sample, the blank (cells treated with the same methodology, but without adding sugars and lectin).

2.3.3 Epifluorescence microscopy

We observed the *K. irregularis* cells using an epifluorescence microscope (Zeiss Axioplan 2, Jena, Germany) to demonstrate the FITC-ConA lectin binding pattern. The visualizations were made with the filter 09 (FITC, green fluorescence). The images were captured with a Zeiss AxioCam HRc camera and the software Axiovision release 4.5 (Zeiss).

2.3.4 Flow cytometry

The sample analyses were performed using a FACSCalibur™ flow cytometer (Becton Dickinson, USA), Model 2111D 015SLBD-laser emission 488 nm. The fluorescence measurements were performed through the BD CellQuest™ Pro software and the cytograms were acquired in the FL3-H channel for chlorophyll fluorescence signals, and the FL1-H channel for green fluorescence (FITC) and side scatter 90°, in the channel Side Scatter (SSC-H). Fluorescent beads with 6 µm, (Fluoresbrite carboxylate Microspheres, Polysciences Inc., WarriGton, PA, USA) with known densities and internal standards, were added as performed by Sarmento et. al. (2008). The sample settings were prepared with *K. irregularis* cells without treatment with lectin (the blanks described above), which quantified the natural fluorescence of the cell and were subtracted from the fluorescence values of the controls and treatments. These analyses were made in Flow Jo _ v.10.08 program in cytograms SSC-H: FL1-H (FITC fluorescence) and FL1-Hcélulas: FL3-Hbeads (beads fluorescence). The fluorescence values are shown in arbitrary units (a.u.) per cell and relative to the fluorescence of the beads.

2.3.5 Statistical analysis

The statistical significance between two groups of treatments and/or controls was obtained through the Student t test ($\alpha = 0.05$) corrected by Welch.

2.4 Results

2.4.1 Efficiency of controls

The fluorescence signals from the negative controls: G, M and GM were evaluated in different concentrations of FITC-ConA and incubation periods and compared with the reference sample (blank). The controls using only one of the inhibitors sugars demonstrated that an effective control requires using both sugars. As we can see in Figure 1a, the relative fluorescence from blank was below 0.4 a.u. (arbitrary units) , whereas the controls using glucose presented values from 0.8 to ~ 1.6 a.u. The same trend was observed for mannose, Figure 1b, where all M controls reached values above 1.3 a.u. However, for GM control (Figure 1c), we observed values in intervals between 0.45 and 0.65 a.u.

Moreover, we could demonstrate the different proportions of each terminal monosaccharide when inhibiting the binding sites of each sugar separately. The relative amount of one sugar could be calculated by subtracting the control using the respective sugar (G or M) from the treatments (cells + FITC-ConA). In case of *K. irregularis*, the concentration of glucose sites was lower than mannose.

For GM control, at any incubation time, the differences were significant when compared to the blank (Figure 1c). Incubation of 2 h showed the smallest difference between controls and blank, and the concentration 2 was the only one that did not show statistically significant difference compared to the blank. However, the mean fluorescence values and standard deviations were very similar for different concentrations (Figure 1c). Nevertheless, for the incubation of 0.5 h, which showed the greatest differences between control and blank, the largest difference was only 0.22 a.u.

These differences between blank, controls G, M and GM, and treatment with FITC-ConA could also be shown by epifluorescence microscopy (Figure 2), even using the shorter incubation time (0.5 h) and lowest concentration of lectin ($5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). However, the difference between the control GM and blank was not evident by using this technique.

2.4.2 Influence of ConA concentration in the fluorescence signal

For the analyses of different concentrations and incubation times, the values of fluorescence for the blanks were subtracted from those values obtained in different treatments. Thus, we obtained only the fluorescence from FITC-conjugated ConA lectin without influence of natural fluorescence of cells. The fluorescence values for the treatments were compared to their respective controls GM (Figure 3).

The concentrations 1 and 2 incubated for 0.5 h showed higher fluorescence values than the other concentrations and incubation times (Figure 5). The different concentrations, C1 (2.9 a.u.), C2 (2.8 a.u.) and C3 (2.9 a.u.), for 1 h did not show significant differences in fluorescence intensity, the same trend was observed period, of 2 h, that was, C1 (2.1 a.u.), C2 (1.9 a.u.) and C3 (2.2 a.u.).

2.4.3 Influence of incubation time in fluorescence signal

Incubating the samples for 0.5 h presented the highest fluorescence signals (Figure 4). For this period, the fluorescence of the concentrations 1 (3.9 a.u.) and 2 (4.2 a.u.) were significantly higher when compared to the incubation period of 2 h (2.2 and 1.9 a.u., respectively). However, concentration 1 and concentration 2 for 0.5h were not statistically different.

2.5 Discussion

Although some studies have presented advances in the use of lectin as a taxonomic tool, they showed different parameters regarding to the concentration and the incubation time. Thus, we proposed to test the influences of different concentrations and incubation periods on fluorescence signals. Rhodes et al (1995) used concentration of FITC-ConA of $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for a period of 15 minutes. Cho et al (1998) used concentrations of $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for 1 hour, whereas Hou et al (2006) used concentrations of $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for 1 hour. All these works used the FITC-conjugated lectins ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Sigma Chemical Co.), whose recommendation time varies from 15 minutes to 2 h, and the lectin concentration from 50 to $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

The instructions of the manufacturer of the lectin used in our study (Vector Labs) lectinas to use concentrations from 5 to $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ and incubation times from 30 min to 2 h. Thus, we aimed to find out what were the best concentration and time to optimize the use of lectins as cell markers in microalgae.

We found that concentration and the incubation time alter the intensity of the fluorescence signals for FITC-ConA. We have obtained the highest fluorescence values for the concentration of $7.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in 0.5 h period. However, there was no statistically significant difference when compared with the concentration of $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for the same incubation time.

Regarding to the controls, we noticed the importance of using both inhibitors sugars to ensure a good control. Furthermore, we found that it is possible to use the controls with a single inhibitor sugar to indirectly measure each sugar, mannose or glucose, using lectin ConA. Rhodes et al (1995) could separate the binding sites of

mannose and glucose, but could not quantify the differences, since they used the epifluorescence and the results were not quantitative. On the other hand, we showed that is possible to differentiate the fluorescence of FITC-ConA for each terminal sugar, mannose and glucose, using flow cytometry technique.

In a previous taxonomic study using seaweed, the only control used was the autofluorescence of cells without the addition of lectins as quantitative measurements, which were analyzed with flow cytometry (Hou et al., 2006). Our results showed that, at least for the lectin ConA, the differences between control (GM) and blanks, although statistically significant, were a very low value, indicating that blanks could be used as controls, as performed by Hou et al (2006). Nevertheless, we can state that the controls with separate inhibitors sugars can be important regarding to its use as a tool to differentiate species, since they indicate the differences in proportions of binding sites for each specific sugar. Thus, they increase the quantity of taxonomic data to differentiate species.

Employing lectins to identify the terminal monosaccharides using flow cytometry has advantages when compared with chromatographic techniques HPLC (high-performance liquid chromatography) and GC-MS (Gas Chromatography - Mass Spectrometry), as cost and analysis time (Rhodes 1995; Hou et al., 2006).

Despite the advantages in terms of cost, lectins are still expensive and some are toxic. However, we found that the lowest concentration presented higher fluorescence intensity for FITC-ConA in the shortest period of incubation tested. Thus, it makes possible to save reagents and time, as well as, reduce waste.

In summary, the results indicate that (1) the use of lectins may be useful as a quick tool for microalgae taxonomic studies; (2) In the case of ConA, the use with two separate inhibitors sugars as a control can contribute by giving one more specific information about cell terminal sugars. Furthermore, the use of inhibitors sugars

together is a good control; (3) the incubation time and lectin concentration could interfere on the fluorescence signals of the lectin-sugar binding. However, between the treatments, the shortest incubation time and the lowest lectin concentration ($5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) provided satisfactory results.

2.6 Referências

- Cho E. & Seo G. & Lee S., Kim H., Lee S., Rhodes L., Hong Y. 1998. *Application of FITC-conjugated lectin probes for the recognition and differentiation on some Korean coastal red tide microalgae*. Journal of Plankton Researchs, 1:250–254.
- Cho E. & Hur H. J. & Byun H. & Lee S. & Rhodes L. & Jeong C. & Park J. 2002. *Monthly monitoring of domoic acid producer Pseudonitzschia multiseries (Hasle) using species-specific DNA probes and WGA lectins and abundance of Pseudo-nitzschia species (Bacillariophyceae) from Chinhae Bay, Korea*. Botanica Marina 45:364–372.
- Cho, E. & Costas E. 2004. *Rapid monitoring for the potentially highly toxic dinoflagellate Cochlodinium polykrikoides in Korean coastal waters using fluorescent probe tools*. Journal of Plankton Researchs, 175–180.
- Cho, E. 2003. *Cluster analysis on the lectin binding patterns of marine microalgae*. Journal of Plankton Researchs 309–315.
- Cho, E., Choi, B., Cho Y., Kim T. & Kim H. 2001. *Discrimination of three highly toxic Alexandrium tamarens (Dinophyceae) isolates using FITC-conjugated lectin probes*. Journal of Plankton Researchs 23:89–95.
- Coelho, L.C.B.B. & Silva, M.B.R. 2000. *Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of Bauhinia monandra*. Phytochem Anal 1–6.
- Costas E & Rodas V. L. 1994. *Identification of marine dinoflagellates using fluorescent lectins*. Journal Phycology 30:987–990.
- Costas E. 1990. *Genetic variability in growth rates of marine dinoflagellates*. Genetica 83:99–102.
- Costas, E. , González-Chavarri. E., Aguilera A., González-Gil S. & López-Rodas V. 1993. *Use of Lectins to Recognize and Differentiate Unicellular Algae*. Botanica Marina 36:1-4.
- Das, S., Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J. & Kumari S. 2014. *Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms*. Journal of Microbiological Methods 80–100

Hou, J., Huang, B., Hu J., Lin, L. & Hong, H. 2008. *Fourteen FITC-conjugated lectins as a tool for the recognition and differentiation of some harmful algae in Chinese coastal waters*. Journal Applied Phycology 20:35–46.

Krienitz, L. & Bock, C. 2002. *Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters*. Hydrobiologia 698:295-326.

Lewis, L. & McCourt, R. 2004. *Green algae and the origin of land plants*. American Journal of Botany 91: 1535-1556.

Moraes, G. P.; Vieira, A. A. H. 2014. *Fourier Transform Infrared with Attenuated Total Reflectance Applied to the Discrimination of Freshwater Planktonic Coccoid Green Microalgae*. Plos One. 9:e114458

Sarmiento, H., Unrein F., Isumbiso M., Stenuite S., Gasol J. M. & Descy J. P., 2008. *Abundance and distribution of picoplankton in tropical, oligotrophic Lake Kivu, eastern Africa*. Freshwater Biology 53:756-771.

Sharon, N. & Lis, H. 2001 *The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. In The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates*. The Molecular Limonology of Complex Carbohydrates 491:1-16.

Taipale, S., Strandberg, U., Peltomaa, E., Galloway, A. W., Ojala, A., & Brett, M. T. 2003. *Fatty acid composition as biomarkers of freshwater microalgae: analysis of 37 strains of microalgae in 22 genera and in seven classes*. Aquatic Microbial Ecology 71:165-178.

Takeda, H. 1991. *Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of Chlorella (Chlorophyceae)*. Journal of Phycology 27:224-232.

2.7 Figure

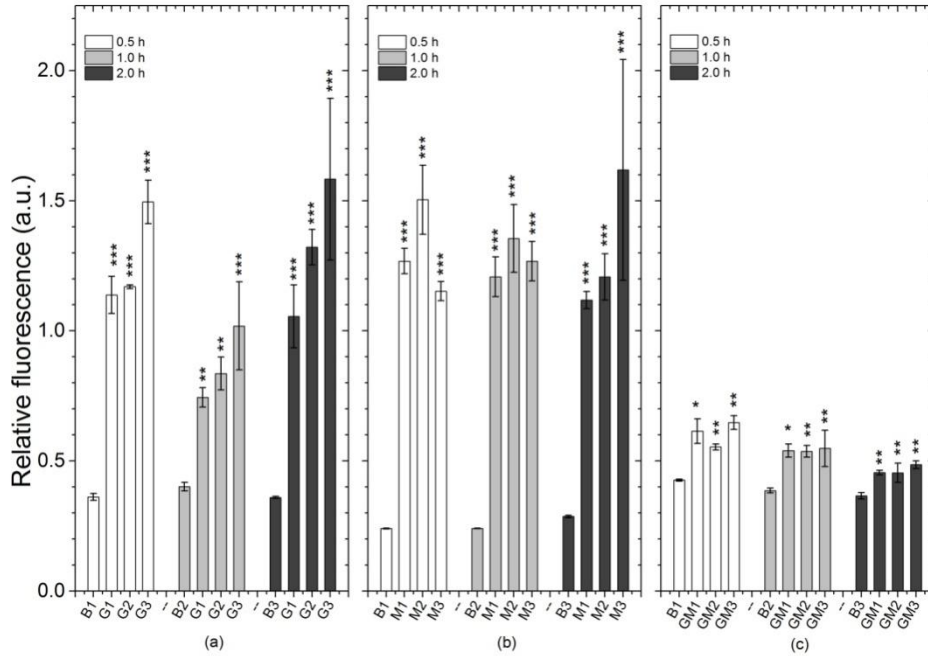


Figure 1: Fluorescence os Blank and Controls fluorescence per cell, in arbitrary units (a.u.) for different concentrations and incubation time using glucose (G), mannose (M) and glucose+mannose (GM) as inhibitor sugars. B1, 2 and 3 are the blanks (without lectin) for each incubation time; G1, G2 and G3 represent different ConA concentrations of the controls: 5, 7.5 and 10 μgml^{-1} , respectively. The results account an average of 3 replicates \pm standard. The stars represent the significance values regarding to the blank obtained in Welch corrected t-Student test (* p < 0,05 ; ** p < 0,01; ***p < 0,001)

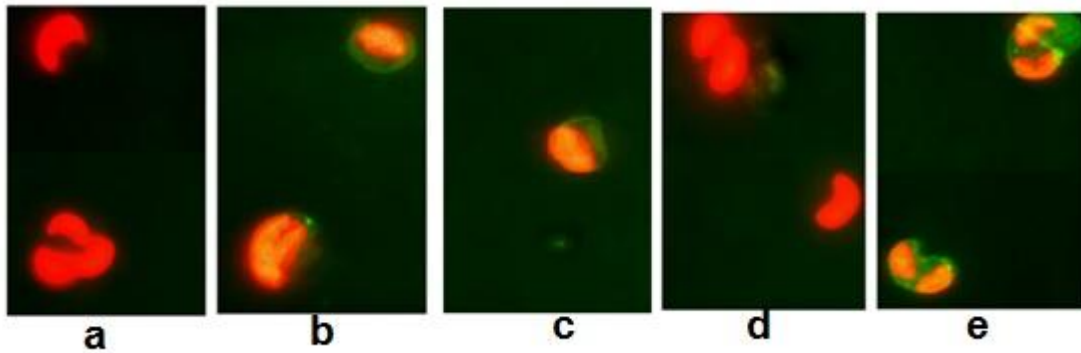


Figure 2: Photomicrographs from *K. irregularis* cells under epifluorescence microscopy in different treatments using FITC-conjugated ConA with concentration of 5 μgml^{-1} and 0.5 h. A) blank; B) G Control (only glucose as sugar inhibitor); C) M control (only mannose as sugar inhibitor); D) Control GM (glucose + mannose sugars as inhibitors); and E) treating (alga + lectin, without inhibitor sugar).

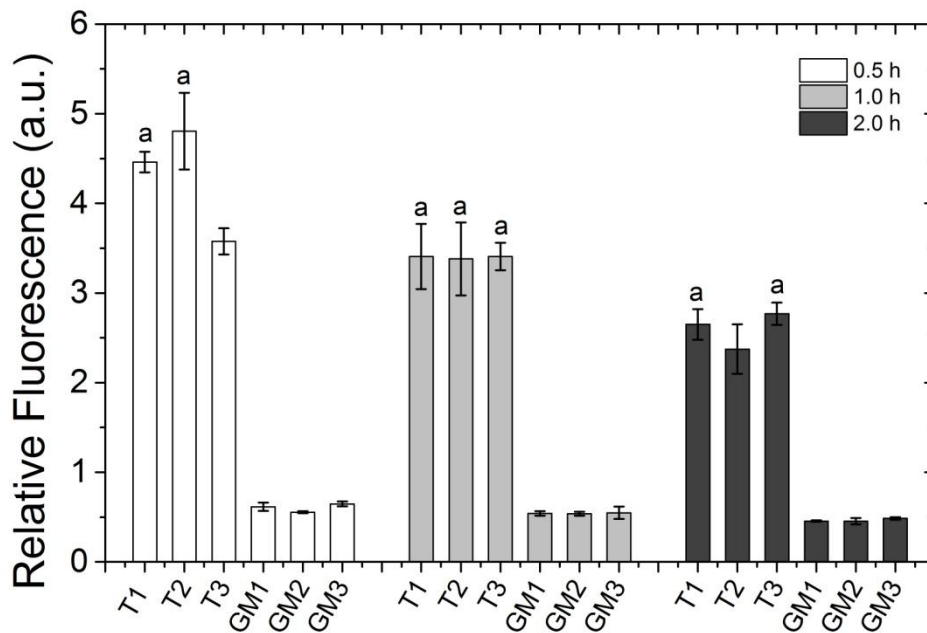


Figure 3: Fluorescence per cell (arbitrary units – au) of *K. irregularis*, marked with ConA lectin. C1, C2 and C3 represent the treatments with the following ConA concentrations: 5, 7.5 and 10 μgml^{-1} , respectively; GM1, GM2 and GM3 are the controls with ConA concentrations of 5, 7.5 and 10 μgml^{-1} , respectively, and after incubation with glucose + mannose. The blank fluorescence was discounted from

treatments and controls. These results account an average of three experiments and the standard deviation. The fluorescence in all treatments was significantly higher than in the corresponding control. The concentrations were compared each other in each period. The letter "a" indicates the significantly similar concentrations.

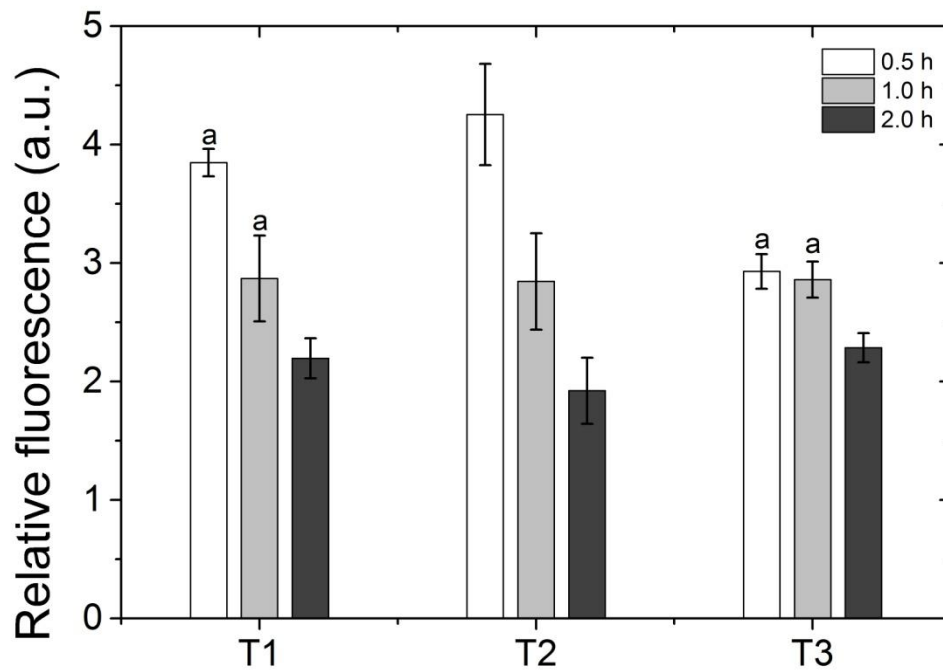


Figure 4: Fluorescence per cell, in arbitrary units (a.u.) of treatments samples marked with ConA, in relation to the incubation period. Where C1, C2 and C3 represent the concentrations of 5, 7.5 and 10 μgml^{-1} , respectively. The results represent an average of three replicates \pm standard deviation. For comparison of each concentration separately, the incubation periods that were statistically homogeneous were accounted by the letter "a". The samples of the same FITC-conjugated lectin concentration were compared in three different periods. The values of the respective controls were subtracted from the samples.

3 Capítulo 2: O papel das lectinas na caracterização quimiotaxonômica de microalgas de água doce

Naiara Archanjo, Inessa Lacativa Bagatini, Armando Augusto Henriques Vieira

Laboratório de Ficologia, Departamento de Botânica, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil,

3.1 Resumo

A classificação morfológica com critérios fenotípicos das espécies de microalgas tem sido substituída por uma nova classificação filogenética, devido à variação morfológica, de certo modo restrita para alguns grupos, nos quais ocorrem muitas espécies crípticas, além da plasticidade fenotípica, resultando em vários morfotipos para um único filotipo, o que dificulta sua identificação em levantamentos de diversidade fitoplanctônica. Além da biologia molecular outras técnicas tem sido proposta para melhor compreensão da diversidade biológica das microalgas, sendo uma delas a quimiotaxonomia. Entre as técnicas utilizadas para quimiotaxonomia de microalgas temos detecção de monossacarídeos terminais por lectinas, que podem ser analisadas, por exemplo, utilizando lectinas marcadas com FITC (fluoresceína isotiocianato.), sendo a quantidade de sítios de ligação (monossacarídeos terminais) disponíveis, proporcional à fluorescência medida na célula. Este estudo propôs testar lectinas e antillectinas como ferramentas taxonômicas, para elucidar se os monossacarídeos e as lectinas das ficosfera algais são específicos para taxa inferiores, como ordens, famílias, gêneros e espécies. Para isso prospectaremos se ocorrem, e quais são, em várias espécies de vários gêneros das famílias Selenastraceae, Scenedesmeceae (Chlorophyceae) e Fragilariaceae, Stephanodiscaceae (Bacillariophyceae) e (Trebouxiophyceae) em cultivos.

3.2 Introdução

As microalgas são definidas por um grupo de organismos fotossintetizantes, microscópios, eucarióticos e procarióticos, que não possuem estruturas diferenciadas, apresentando geralmente organização unicelular ou colonial, mas sem especialização de células para diferentes funções, com algumas exceções (Hoek 1995, Pulz e Gross 2004).

Devido à variação morfológica de certo modo restrita para alguns grupos, ocorrem muitas espécies crípticas, além de plasticidade fenotípica (Treviño 2008), resultando frequentemente em alguns taxons vários morfotipos para um único filotipo, o que dificulta sua identificação em levantamentos de diversidade fitoplanctônica (Krienitz et al 2001).

Assim, atualmente a classificação das espécies de microalgas vem passando por uma fase de revisões. O sistema de classificação morfológico com critérios fenotípicos tem sido substituído por uma nova classificação filogenética (Krienitz e Bock, 2012), em alguns casos auxiliados por características fisiológicas e ecológicas (Lindell, 2014).

A introdução de uma metodologia molecular filogenética para a sistemática de algas verde passou por uma revisão fundamental dos conceitos de linhagens taxonômicos superiores, tais como divisões, classes e ordens (Melkonian e Surek, 1995; Friedl, 1997; Chapman et al., 1998; Leliaert et al., 2012). Após estas novas concepções filogenéticas as ordens que contêm algas verdes têm sido consideravelmente alteradas.

A dificuldade para a identificação dessas microalgas tem encorajado muitos estudos e desenvolvimento de novas técnicas auxiliares para sua identificação e taxonomia. Desta forma, o uso de uma abordagem polifásica envolvendo uma

combinação de técnicas de biologia molecular e quimiotaxonomia tem sido proposta para melhor compreensão da diversidade biológica (Das et al, 2014). Entre as técnicas utilizadas para quimiotaxonomia de microalgas estão, por exemplo, os perfis de ácidos graxos (Taipale et al, 2013) e de monossacarídeos da parede celular (Takeda, 1991), geralmente determinados por técnicas de cromatografia e espectrometria de massas.

Alguns trabalhos sugerem que os monossacarídeos terminais das microalgas podem funcionar como ferramentas taxonômicas. Rhodes et al (1995) e Cho (2003) diferenciaram espécies de microalgas tóxicas das não tóxicas, comparando os monossacarídeos terminais, utilizando FITC-lectinas e microscopia de epifluorescência, possibilitando a análise de presença e ausência de determinado monossacarídeo, que foram identificadas através de lectinas marcadas com FITC. No entanto eles não utilizaram os resultados obtidos para separar taxa inferiores.

As lectinas constituem um grupo de proteínas presentes em todas as formas de vida desde os vírus até os mamíferos (Kennedy et. Al., 1995). São proteínas de origem não imunológica que apresentam sítios de ligações para açúcares específicos, capazes de aglutinar células e precipitar polissacarídeos ou glicoproteínas (Singh *al.*, 1999).

Sendo a principal característica das lectinas a capacidade de se ligar com especificidade a carboidratos, as lectinas podem ser utilizadas, por exemplo, como ferramentas para a detecção, o isolamento e a caracterização de glicoconjugados, sendo essenciais para o entendimento de mudanças nas superfícies celulares em processos fisiológicos e patológicos (Sharon e Lis, 2004).

A detecção de monossacarídeos terminais por lectinas pode ser analisada, por exemplo, utilizando lectinas marcadas com FITC (fluoresceína isotiocianato.), sendo a quantidade de sítios de ligação (monossacarídeos terminais) disponíveis, proporcional à fluorescência medida na célula. Há várias lectinas disponíveis comercialmente

marcadas com FITC, que se ligam especificamente a carboidratos simples ou complexos. Como exemplo de lectinas que se ligam a carboidratos simples, podemos citar a ConA, que se liga à manose e glicose, a UEA-I, que se liga à fucose, à DBA que se liga à N-Acetil- D-galactosamina .

Assim, as lectinas podem ser utilizadas como marcadores moleculares para mostrar a diversidade de açúcares terminais dos polissacarídeos das superfícies celulares de microalgas verdes de água doce, possivelmente mostrando padrões distintos nos diferentes grupos de microalgas.

Além de serem utilizadas para marcar açúcares terminais, como estão presentes em em praticamente todos os seres vivos, as próprias lectinas presentes na parede celular também podem ser utilizadas como característica quimiotaxonomica.

Sendo assim, com o objetivo de testar a utilização das lectinas e antilectinas como dados quimiotaxonômicos auxiliares na identificação de microalgas, analisamos um grupo de lectinas e anti lectinas marcadas com FITC, para elucidar se os monossacarídeos e as lectinas das ficosfera algais são específicos para taxa inferiores, como ordens, famílias, gêneros e espécies. Para isso prospectamos se ocorrem, e quais são, em várias espécies de vários gêneros das famílias Selenastraceae, Scenedesmeceae (Chlorophyceae) e Fragilariaceae, Stephanodiscaceae (Bacillariophyceae) e (Trebouxiophyceae) em cultivos.

3.3 Material e métodos

3.3.1 Microalgas

As microalgas usadas neste estudo (Tabela 1) foram axenizadas e mantidas na Coleção de Culturas do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (Centro de Dados Mundial de Microorganismos, WDCM No. 835).

As algas foram cultivadas em trélicas em meio WC com pH 7,0 (Guillard e Lorenzen 1972) a $23\pm 2^\circ\text{C}$ e sob iluminação de $108\pm 2,0 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em ciclos de 12h:12h claro:escuro até a fase exponencial (para cada alga foi feita previamente uma curva de crescimento). As culturas foram, então, fixadas com formaldeído a 4%, foram centrifugadas a 1380 *xg* por 4 minutos para a obtenção das células.

Tabela1. Lista das microalgas utilizadas neste estudo, identificadas de acordo com a morfologia clássica e classificadas de acordo com Algaebase (Mc Guiry, 2013).

ESPÉCIE	Local e ano de isolamento	CEPA
<i>Chlorophyta</i>		
<i>Selenastraceae</i>		
<i>Monoraphidium komarkovae</i>	Baia das Pedras - Pantanal MT, 2011	CCMA-UFSCar 353
<i>Monoraphidium contortun</i>	Represa de Guarapiranga SP, 2010	CCMA-UFSCar306
<i>Ankistrodesmus densus</i>	Represa do Broa SP, 1979	CCMA-UFSCar 003
<i>Ankistrodesmus densus</i>	Represa Matão SP, 2010	CCMA-UFSCar 239
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	Rio Madeira RO, 2011	CCMA-UFSCar 333
<i>N.I (Não identificada)</i>	Rio Madeira RO, 2011	CCMA-UFSCar 261
<i>Scenedesmaceae</i>		
<i>Desmodesmus spinosus</i>	Tanque de peixe Jaboticabal SP, 1983	CCMA-UFSCar 046
<i>Desmodesmus spinosus</i>	Lagoa do Infernã (EE Jataí), 1987	CCMA-UFSCar 062
<i>Oocystaceae</i>		
<i>Nephrocytium lunatum</i>	Lagoa do Infernã (EE Jataí), 1987	CCMA-UFSCar 065
<i>Botryococcaceae</i>		
<i>Botryococcus braunii</i>	UTEX-Culturas em placas, 2012	CCMA-UFSCar 399
<i>Bacillariophyta</i>		
<i>Stephanodiscaceae</i>		
<i>Cyclotella sp.</i>	Lagoa da Esalq SP, 2010	CCMA-UFSCar 157
<i>Fragilariaceae</i>		
<i>Fragilaria sp.</i>	Reservatório de Ibatinga SP, 2010	CCMA-UFSCar 410

3.3.2 Lectinas

Para a análise com as lectinas (Tabela 2), as células fixadas foram lavadas por três vezes com meio WC (Guillard e Lorenzen 1972) estéril para lavagem sem vitaminas e micronutrientes, centrifugadas a 1380 xg por 4 minutos a 14°C.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e alíquotas com cerca de 1×10^6 células em trélicas, foram misturadas às soluções de WC *buffer*, que consiste em meio WC (Guillard & Lorenzen, 1972), sem adição de micronutriente e vitaminas, adicionado de Tris base, BSA 1%, CaCl_2 e MgCl_2 , pH 7,8 para incubação.

Cada réplica foi incubada com uma das lectinas marcada com FITC (Tabela 2) concentração de 5µg/ml (5mg ml; Vector Laboratories) e incubada por 30 minutos no escuro. Após este período, foram lavadas por duas vezes com meio WC sem nutrientes e ressuspendidas em 200 µl de WC sem vitaminas e micronutrientes, o processo de lavagem elimina as lectinas marcadas com FITC que não foram ligadas aos monossacarídeos específicos.

Tabela 2. Tabela das lectinas usadas no experimento.

Lectina	Fonte	Especificidade
ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	Methyl α - manopiranosida; D-manose; D-glicose
UEAI	<i>Ulex europaeus (gorse)</i>	L-Fucose
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	N-Acetil- D-galactosamina
WGA	<i>Triticum vulgaris</i>	N-Acetilgucosamina
GNL	<i>Galanthus nivalis</i>	α -1,3 manose
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	α -Lactose; D-galactose

3.3.3 Antilectina

As células fixadas foram lavadas três vezes com meio WC (Guillard e Lorenzen 1972) estéril sem vitaminas e micronutrientes, centrifugadas a 1380 xg por 4 minutos a 14°C.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e alíquotas com cerca de 1×10^6 células em trélicas, foram misturadas às soluções de WC *buffer* pH 7,8 para incubação.

O processo de incubação das anti lectinas foi feito em duas etapas. Na primeira etapa foram adicionada as células uma solução de antilectina em WC *buffer*, concentração final de 5 µg/ ml (Vector Laboratories). As células com antilectinas foram incubadas por 2h, no escuro e posteriormente lavadas apenas uma vez com meio WC sem vitaminas e micronutrientes. Na segunda etapa, essas células lavadas foram incubadas novamente por 2 horas, no escuro, com o WC *buffer* pH 7,8 e o anticorpo para antilectina (Anti-GOAT, IgG H+L, Vector Laboratories), com concentração final de 5 µg/ml.. Posteriormente foram lavadas por duas vezes e ressuspendidas em 200 µl de WC sem vitaminas e micronutrientes.

3.3.4 Desenho experimental

3.3.4.1 Lectina

Avaliamos o comportamento das algas listadas na Tabela 1, em relação a seis lectinas (Tabela 2). Para cada alga foram feitas três réplicas submetidas ao tratamento com as lectinas, e três controles.

Para os controles negativos, utilizamos para cada lectina o açúcar específico correspondente como inibidor do sítio de ligação, todos os açúcares foram utilizados a uma concentração final 200 mM. Os açúcares dos controles foram misturados

incubados com as lectinas por 30 minutos antes da adição das células algais. As células foram tratadas da mesma forma que aquelas tratadas com lectina.

Para a lectina ConA utilizamos dois controles negativos, um com apenas glicose (Dextrose - Maliinckrodt Gen) como açúcar inibidor a uma concentração final de 200 mM e outro com glicose e manose como açúcares inibidores a uma concentração final de 200 mM, sendo a concentração de cada açúcar 100 mM.

Além dos controles negativos foram feitas trélicas de células das algas sem o tratamento com lectina, mas que passaram pelos mesmos processos das células tratadas, essas amostras foram utilizadas como o branco das análises.

3.3.4.2 Antilectina

Avaliamos o comportamento das 12 microalgas listadas na Tabela 2, em relação a 11 Anti lectinas (Tabela 3), também em trélicas de cultivo. A ligação de cada antilectina foi analisada em cada uma das três réplicas. Uma alíquota de cada cultura foi utilizada como controle. O controle passou pelos mesmos processos do tratamento, com exceção da adição de antilectina, apenas com adição do anticorpo marcados com FITC.

Tabela 3. Tabela das Anti lectinas usadas no experimento.

Anti Lectina	Fonte
Anti ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>
Anti DBA	<i>Dolichos biflorus</i>
Anti GNL	<i>Galanthus nivalis</i>
Anti GSL	<i>Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia</i>
Anti LCA/PSA	<i>Lens-culinaris/ Pisum sativum</i>
Anti PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Anti PNA	<i>Peanult arachis hypogaea</i>
Anti RCA	<i>Ricinus communis</i>
Anti SBA	<i>Soybean</i>
Anti UEAI	<i>Ulex europaeus</i>
Anti WGA	<i>Weat germ</i>

3.3.5 Microscopia de epifluorescência

Para melhor demonstrar a fluorescência das células marcadas com a lectina foram analisadas em microscópio Zeiss Axioplan 2, Jena, Germany, equipado com epifluorescência. As lâminas foram observadas no filtro 09 (para FITC, verde fluorescência). As imagens foram capturadas com uma câmera Zeiss AxioCam HRc e

tratadas com o auxílio do software de análise de imagens Axiovision release 4.5 (Zeiss).

3.3.6 Citometria de fluxo

As análises das amostras foram realizadas utilizando um citômetro de fluxo FACSalibur™ (Becton Dickinson, USA), modelo 2111D-015SLBD com laser de 488 nm de emissão. As leituras foram feitas através do software BD CellQuest™ Pro, e os citogramas foram adquiridos no canal FL3-H para sinais de fluorescência da clorofila, e no canal FL1-H para fluorescência verde (FTIC) e a dispersão lateral 90°C, no canal Side Scatter (SSC-H).

Foram adicionados esferas fluorescentes, também chamadas de *beads* (Microesferas carboxilato Fluoresbrite, Polysciences Inc., WarriGton, PA, EUA) de 6 µm, com densidades conhecidas e padrões internos, como feito por Sarmento et. al., (2008). Os ajustes das amostras foram feitos com células das dozes cepas estudadas sem o tratamento com a lectina, que quantificou a fluorescência natural das células e serviu como branco para serem subtraídos dos valores de fluorescência das amostras marcadas. As análises foram feitas no programa Flow Jo _ v.10.08, em citogramas de SSC-H : FL1-H (fluorescência de FITC), e FL1-H_{células} : FL3-H_{beads} (fluorescências das beads). Os valores de fluorescência são apresentados em unidades arbitrárias (u.a.) por célula e relativos à fluorescência das esferas.

3.3.7 Análises de multivariadas: agrupamentos e diagramas

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o programa estatístico R (R Core Team). A significância estatística das diferenças no padrão de ligação de lectinas e antilectinas entre as cepas e espécies foi obtida por meio da análise de

variância multivariada permutacional (PERMANOVA) utilizando o método de distância de Bray-Curtis. As comparações ocorreram entre o grupo com as doze microalgas estudadas e somente entre as espécies da família Selenastraceae.

Para verificar de forma mais conclusiva a discriminação das cepas, e realizar uma comparação utilizamos a análise HCA (Hierarchical Cluster Analysis), usando algoritmo “complete-linkage” com distância de Bray-Curtis. Utilizamos a análise INDVAL (pacote labdsv), para mostrar a presença de possíveis monossacarídeos ou lectinas indicadoras de táxons.

Os dados foram analisados separadamente para três grupos: 1) lectinas (Lec); 2) anti lectinas (Ant); 3) lectinas e anti lectinas (LecAnt). A leitura de fluorescência por célula para cada lectina ou Anti lectina foi utilizada como variável.

3.4 Resultados

Lectinas e antilectinas como marcadores quimiotaxonômicos

As análises relativas às doze espécies a princípio não apresentaram resultados satisfatórios em relação à separação para filo, classe, ordem, família e gênero para nenhum dos grupos de dados: Lec, Ant e LecAnt. Utilizando apenas os dados de monossacarídeos terminais (Lec) não ocorreu separação dos filós Chlorophyta e Bacillariophyta.

Na análise de agrupamento utilizando apenas os grupos de dados Lec (Figura 1) as duas espécies do filo Bacillariophyta (*Cyclotella*, 157 e a *Fragillaria*, 410) ficaram distantes entre si e misturadas às espécies do filo Chlorophyta. Não houve também agrupamento destas microalgas em ordem, exceto para as espécies da ordem *Trebouxiales*: *Nephrocytium lunatum*, cepa 065 e *Botryococcus braunii*, cepa 399. Três

cepas de Sphaeropleales (Chlorophyceae, Chlorophyta), as *A. densus* 003 e 239 e uma *D. spinosus* 042, não se agruparam ao clado maior desta ordem.

Os dados referentes à família agruparam apenas três das cepas da família Selenastraceae, sendo estas *Monoraphidium contortum* 306, *Monoraphidium Komarkovae* 353, e *Ankistrodesmus fusiformis* 333. Para a separação das espécies as análises também não agruparam as espécies *Ankistrodesmus densus* (cepas 003 e 239) e as *Desmodesmus spinosus* (cepas 046 e 62). No entanto, houve agrupamento entre todas as cepas das espécies estudadas.

Os dados apresentados os dados referentes ao grupo Lec, o qual foi similar aos grupos Ant (Figura 2) e LecAnt (Figura 3) em relação a separação dos táxons inferiores. No grupo Ant, as espécies da ordem *Trebouxiales* não se agruparam, apenas duas espécies da família Selenastraceae se agruparam, a *M. contortum* (306) e N.I (261).

Já para o grupo LecAnt, as espécies da ordem *Trebouxiales* se agruparam. No entanto a análise de agrupamento também não separou os diferentes filos. As espécies da família Selenastraceae não se agruparam, exceto a *M. komarkovae* (353) e *A. fusiformis* (333), que por sua vez apresentam gêneros diferentes. As espécies *A. densus* (003 e 239) e *D. spinosus* (046 e 062) ficaram distantes no agrupamento.

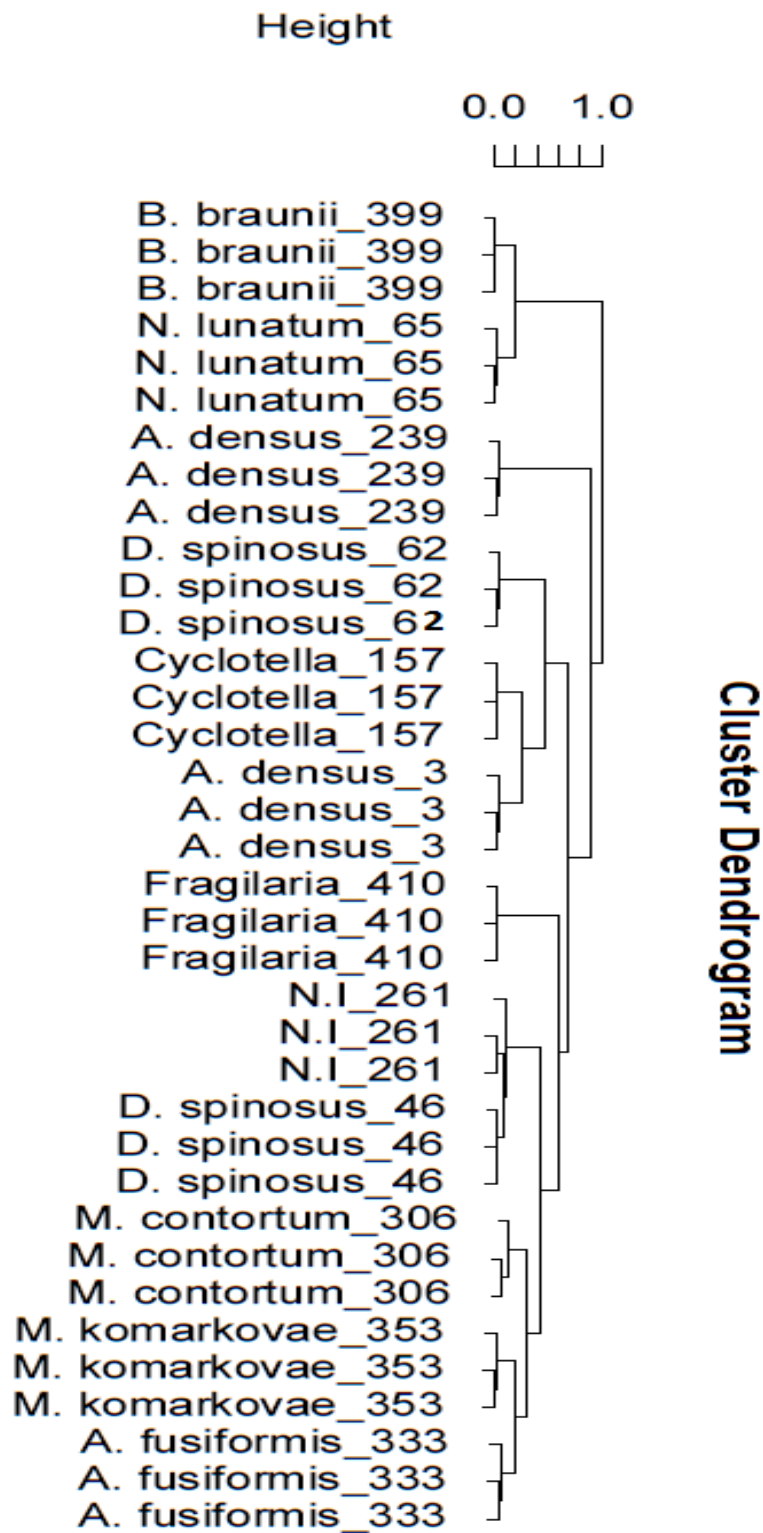


Figura 1. Análise de agrupamento (Hierarchical Cluster Analysis) utilizando o algoritmo “complete-linkage” e distâncias de Bray-Curtis para o grupo Lec (lectinas usadas para marcar monossacarídeos) para as doze cepas estudadas

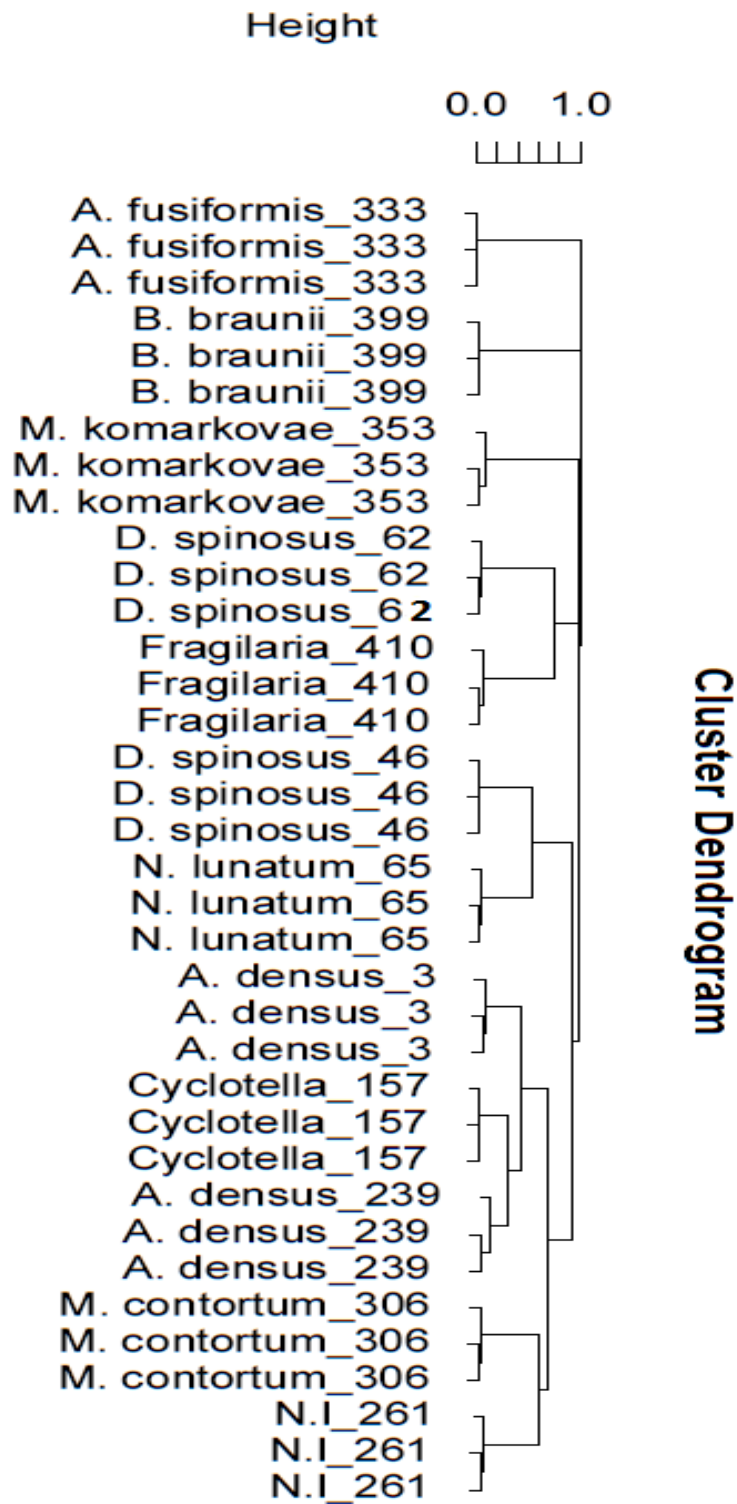


Figura 2. Análise de agrupamento (Hierarchical Cluster Analysis) utilizando o algoritmo “complete-linkage” e distâncias de Bray-Curtis para o grupo Ant (antilectinas usadas para marcar as lectinas) para as doze cepas estudadas

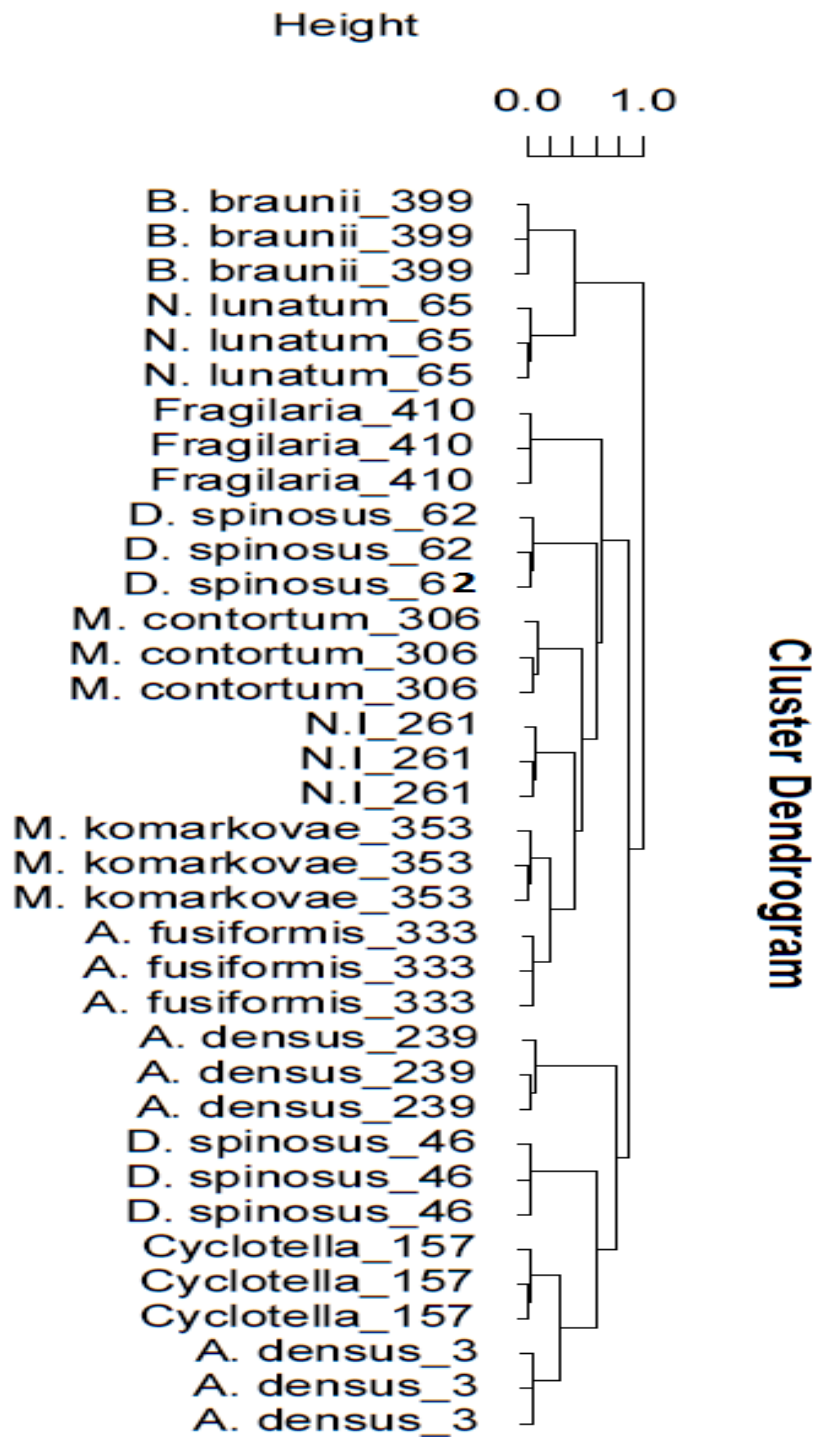


Figura 3. Análise de agrupamento (Hierarchical Cluster Analysis) utilizando o algoritmo “complete-linkage” e distâncias de Bray-Curtis para o grupo LecAnt (lectinas e anti lectinas como marcadores) para as doze cepas estudadas.

O mesmo padrão foi obtido em testes comparando PERMANOVA, para as espécies e cepas, considerando os dados relativos ao grupo Lec a separação entre cepas explica 99% da variação dos dados e 91% para as espécies. Para os dados com o grupo Ant, a separação entre as cepas explica 100% da variação dos dados e 96% para a separação entre as espécies. Os dados do grupo LecAnt mostrou que a separação por cepas explica 99% da variação dos dados, enquanto que a separação por espécies explica 92% da variação dos dados. Segundo a PERMANOVA o melhor resultado para separação entre a as cepas está no grupo Ant (Tabela 4).

Tabela 4. Coeficientes de determinação obtidos na Análise de PERMANOVA dos dados dos três grupos de marcadores (Lec, Ant e LecAnt) para cepas e espécies Para todas as análises $p < 0,001$.

PERMANOVA- Variação dos Dados			
	Lec	Ant	LecAnt
CEPAS	99%	100%	99%
ESPÉCIES	91%	96%	92%

As análises feitas com as espécies da família Selenastraceae, para o grupo Lec agruparam as espécies *A. densus*, (003); e *A. densus*, (239). No entanto, houve uma distância significativa destas espécies com a *A. fusiformis* que pertence ao mesmo gênero, além da distância que houve entre os gêneros, esta ficou misturada com *M. contortum* (306), sendo assim, as espécies do gênero *Monoraphidium* não se agruparam (Figura 4).

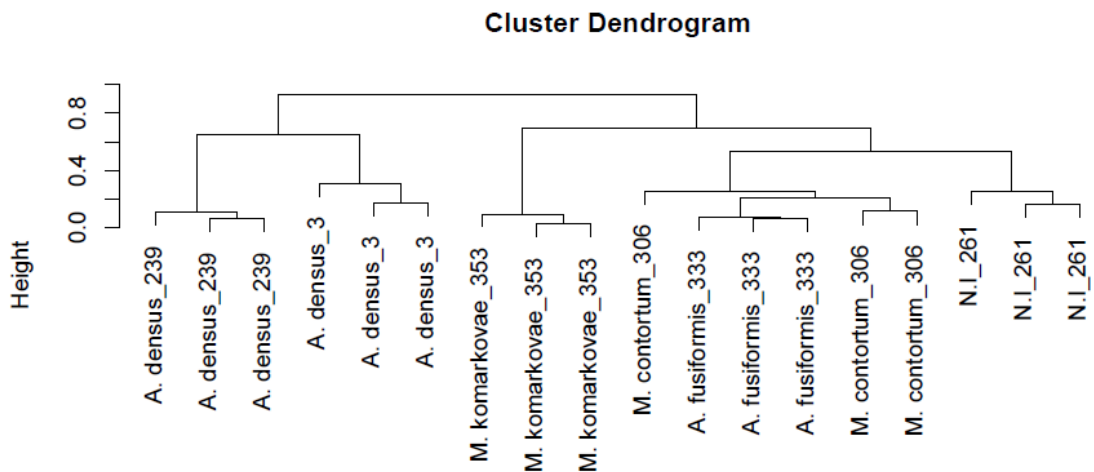


Figura 4. Análise de agrupamento (Hierarchical Cluster Analysis) utilizando algoritmo “complete-linkage” e distâncias de Bray-Curtis para o grupo Lec (lectinas) para a família Selenastraceae.

Para o grupo de Ant, houve uma separação de todas as cepas, e das espécies *A. densus* (239 e 003), mas não houve separação de gêneros (Figura 5).

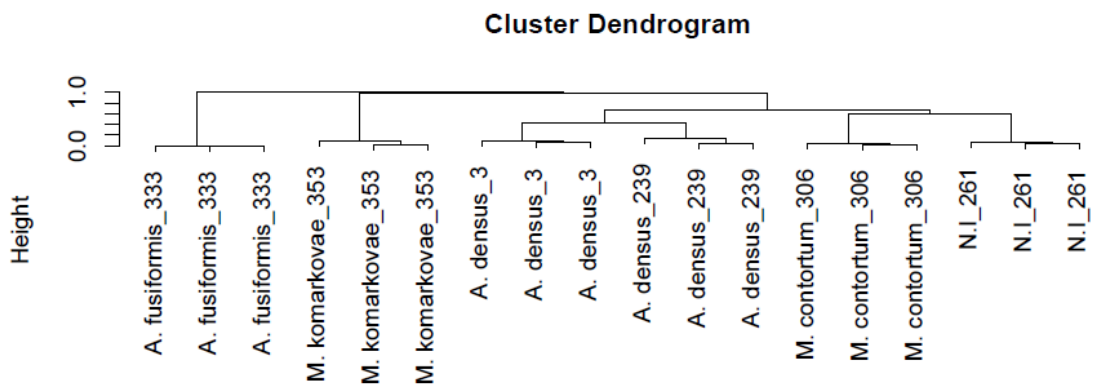


Figura 5. Análise de agrupamento (Hierarchical Cluster Analysis) utilizando algoritmo “complete-linkage” e distâncias de Bray-Curtis para o grupo Ant (anti lectinas) para a família Selenastraceae.

Os dados obtidos para o grupo de AntLec, apresentou resultados similares ao do grupo Lec, nos quais foi possível verificar a separação entre as espécies, mas não a separação dos gêneros (Figura 6).

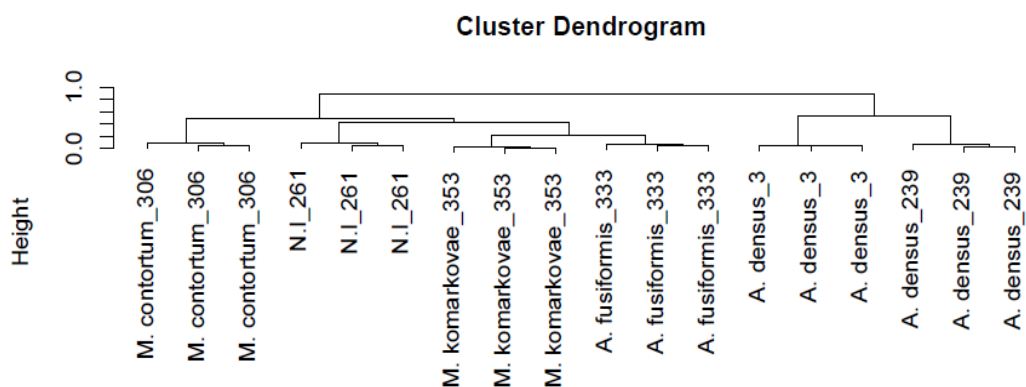


Figura 6. Análise de agrupamento (Hierarchical Cluster Analysis) utilizando algoritmo “complete-linkage” e distâncias de Bray-Curtis para o grupo LecAnt (lectinas e anti lectinas) para a família Selenastraceae.

Segundo os resultados da PERMANOVA para a família Selenastraceae, o grupo Lec mostrou que a separação entre as cepas explica 99% da variação dos dados. O grupo Ant obteve o melhor resultado quando comparado com os outros grupos, a separação entre as cepas e as espécies explica 99% da variação dos dados (Tabela 5). Já o grupo AntLec embora tenha apresentado 100% de separação entre os dados para cepa, a separação entre as espécies foi de 91%, melhor que a do grupo Lec. No entanto podemos considerar que os baixos resultados para separação entre as espécies podem estar relacionados com a quantidade de cepas da mesma espécie

Tabela 5. Coeficientes de determinação obtidos na Análise de PERMANOVA dos dados dos três grupos de marcadores (Lec, Ant e LecAnt) para cepas e espécies Para todas as análises $p < 0,001$.

PERMANOVA- Variação dos Dados			
	Lec	Ant	LecAnt
CEPAS	99%	100%	99%
ESPÉCIES	91%	96%	92%

Os dados das análises INDVAL, mostraram que apenas a *Nephrocytium lunatum* (065) e a *Botryococcus braunii* (399) têm monossacarídeos indicadores em maiores concentrações, sendo estes manose e glicose.

3.4.1 Análises: Microscopia de epifluorescência

As análises no microscópio demonstraram visualmente as interações entre os carboidratos e lectinas. Por meio deste tipo de análises é possível obter resultados de presença e ausência dos carboidratos específicos e das lectinas presentes no polissacarídeo e na parede celular das células algais, como demonstrado na Figura 7.

A presença e ausência dos carboidratos e das lectinas foram detectadas através do filtro 09 (FITC, fluorescência verde), neste filtro as células que não estão ligadas a lectinas ou a anti lectinas marcadas com FITC, apresentam uma coloração avermelhada, que representa a fluorescência natural das células, ou seja, a clorofila. Já as células marcadas com o FITC apresentam uma coloração esverdeada.

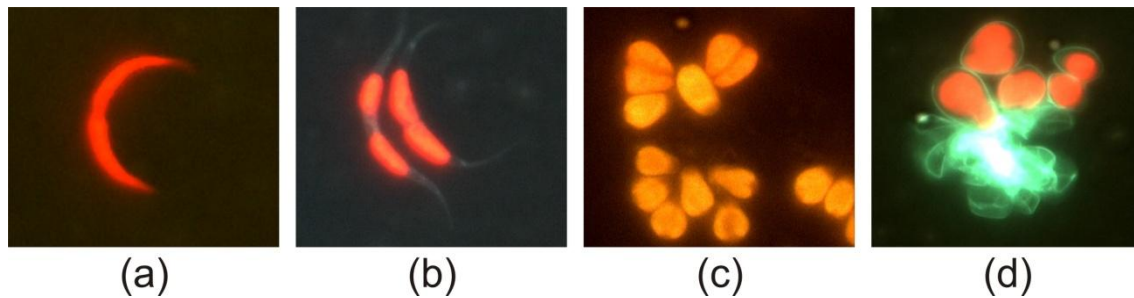


Figura 7: Fotomicrografias de células de *Monoraphidium contortum* (306) e *Botryococcus braunii* (399), sob microscopia de epifluorescência. (A) *M. contortum* tratada com a Anti-lectina ConA (B) *M. contortum* tratada com a Anti -lectina GNL ; (C) *B. braunii* tratada com lectina UEAI (D) *B. braunii* tratada com lectina ConA.

As células de *Monoraphidium contortum* não apresentaram ligações visíveis quando tratadas com a Anti lectina ConA (Fig 7a). Quando tratada com a Anti Lectina GNL apresentou sinais pouco intensos de fluorescência nas células, principalmente nas extremidades (Fig 7b), de maneira geral esta microalga apresentou sinais pouco intensos de fluorescência para as onze antilectinas testadas. Já a *Botryococcus braunii* apresentou fortes sinais de fluorescência para as seis lectinas testadas, principalmente para a Lectina ConA como demonstrado na Figura 7d, os sinais mais fracos apresentados nesta microalga foram observados com o tratamento da lectina UEAI (Figura 7c).

Com a microscopia também observamos algumas semelhanças entre as microalgas do gênero *Ankistrodesmus* e *Desmodesmus*, da ordem Sphaeropleales estas algas apresentaram em regiões específicas sinais de fluorescência indicando a presença de glicose e manose, localizadas através da lectina ConA (Fig 8).

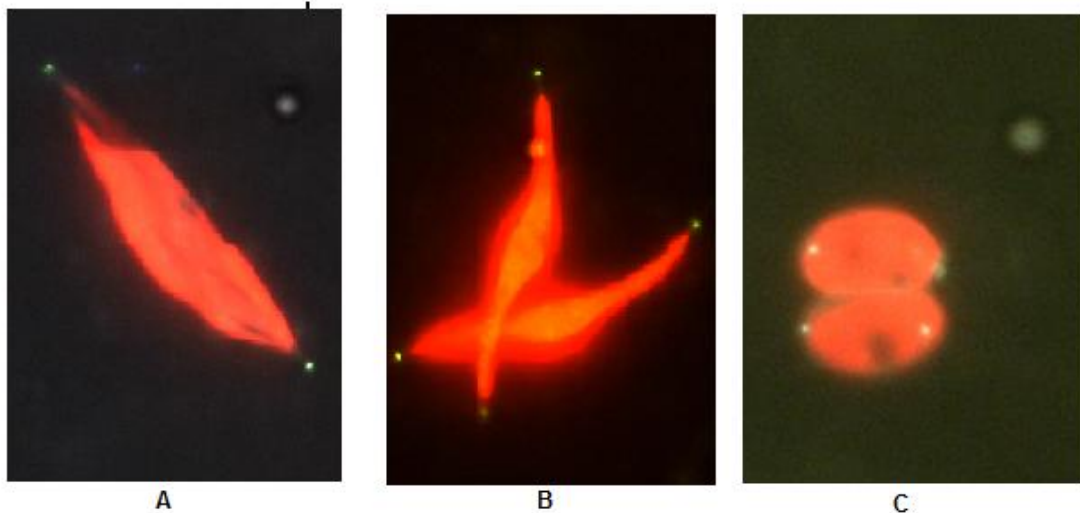


Figura 8: Fotomicrografias de células do gênero *Ankistrodesmus* e *Desmodesmus* tratadas com a lectina conA, sob microscopia de epifluorescência. (A) *Ankistrodesmus densus* (239); (B) *Ankistrodesmus densus* (003); (C) *Desmodesmus*

3.5 Discussão

O uso de lectinas marcadas com FITC tem sido frequentemente relatado como ferramenta útil para diferenciação de espécies de microalgas morfologicamente semelhantes (Rhodes et al 1995;. Cho et al., 1998). Nós utilizamos seis lectinas e onze anti lectinas para estudar doze microalgas, além de uma técnica mais precisa para quantificação de fluorescência, o citômetro de fluxo.

Os resultados de microscopia de epifluorescência mostraram visualmente as ligações entre as lectinas e os monossacarídeos, desta forma, observamos a presença e ausência do monossacarídeo ou lectina mucilagem ou parede celular das espécies de microalgas. No entanto, utilizando microscopia, não foi possível quantificar exatamente os sinais de fluorescência. Contudo, esta técnica nos permitiu verificar os locais de ligação de cada marcador. Verificamos que dois gêneros apresentam manose e glicose em regiões específicas, *Ankistrodesmus* e *Desmodesmus*, na

mucilagem das extremidades. Esta observação poderia ser uma característica indicadora de gênero e família, mas são necessários mais estudos para comparar tal observação.

Com os dados da citometria de fluxo observamos que a glicose é uma característica constante em todas as espécies, notamos que a quantidade desse monossacarídeo é variável entre as espécies estudadas. Nas espécies da ordem *Trebouxiales* os valores referentes à glicose terminal são maiores quando comparados com as outras espécies.

Para as análises multivariadas com as doze espécies, não tivemos êxito com a separação dos táxons, no entanto conseguimos separar satisfatoriamente todas as cepas. Cho (2003) em seu trabalho com base nos padrões de ligações de lectinas, mostrou através de um dendograma usando o método Dollop (dados de presença e ausência) que é possível distinguir microalgas geograficamente distintas, como por exemplo, cepas da Coreia, Nova Zelândia e Espanha. Mas também não conseguiu discriminar as espécies em níveis de táxon como classe, família, ordem e filo. As cepas de *A. densus*, deste estudo, foram isoladas de locais diferentes, embora próximos, sendo que a cepa 003 é mantida em cultura desde 1979. O mesmo ocorre com as cepas *D. spinosus* que foram isoladas de lugares distintos.

Segundo Krienitz e Bock (2012) a família Selenastraceae representa um grupo de grande complexidade para a taxonomia, não apenas pelas diferenças morfológicas, mas pela proximidade genética que as espécies apresentam, o mesmo ocorre com as espécies das famílias Scenedesmaceae, e Trebouxiophyceae.

Notamos também que as espécies *Botryococcus* e *Nephocytium*, ambos da ordem Trebouxiales, têm monossacarídeos ou lectinas indicadoras, obtidos pela análise de INDVAL. Com os dados obtidos na análise de agrupamento, observamos

que apenas no grupo Ant não houve agrupamento das espécies da ordem Trebouxiales.

Em resumo nosso trabalho mostrou que: 1) Existem regiões específicas de concentração de monossacarídeos comuns aos gêneros e família; 2) Ao quantificar os monossacarídeos e lectinas, obtivemos informações que podem ser características indicadoras de táxons; 3) As análises estatísticas separadas por família podem ser mais indicadas para análise de separação de espécies e cepas; 4) É possível separar as cepas de uma espécie provenientes de diferentes locais.

3.6 Referências

Chapman, R. L., M. A. Buchheim, C. F. Delwiche, T. Friedl, V. A. R. Huss, K. G. Karol, L. A. Lewis, J. Manhart, R. M. McCourt, J. L. Olsen & D. A. Waters, 1998. *Molecular systematics of the green algae*. In Soltis, D. E., P. S. Soltis & J. J. Doyle (eds), *Molecular Systematics of Plants II. DNA Sequencing*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London: 508–540.

Cho E., 2003. *Cluster analysis on the lectin binding patterns of marine microalgae*. J Plankton Res; 309–315.

Cho E., Seo G., Lee S., Kim H., Lee S., Rhodes L., Hong Y., 1998. *Application of FITC-conjugated lectin probes for the recognition and differentiation on some Korean coastal red tide microalgae*. J Fish Sci Technol, 1:250–254.

Das, S., Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., Kumari S. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 2014; 80–100

Friedl, T., 1997. *The evolution of the green algae*. *Plant Systematics and Evolution* 11: 87–101.

Guillard RRL & Lorenzen C. J., 1972 *Yellowgreen Algae with Chlorophyllide*. J. Phycol. 8, 1014.

Hoek C. V. D., 1995. *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge University Press, Cambridge ; New York

Hou, J., Huang, B., Hu J., Lin, L. & Hong, H. 2008. *Fourteen FITC-conjugated lectins as a tool for the recognition and differentiation of some harmful algae in Chinese coastal waters*. *Journal Applied Phycology* 20:35–46.

Kennedy, J. F. et al., 1995. *Lectins, versatile proteins of recognition: a review*. *Carbohydrate Polymers*, v. 26, n. 3, p. 219-30.

Krienitz, L., I. Ustinova, T. Friedl, e V. A. Huss. 2001. *Traditional generic concepts versus 18S rRNA gene phylogeny in the green algal family Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta)*. *Journal of Phycology* 37:852-865.

Leliaert, F., D. R. Smith, H. Moreau, M. D. Herron, H. Verbruggen, C. F. Delwiche & O. De Clerck, 2012. *Phylogeny and molecular evolution of the green algae*. Critical Reviews in Plant Sciences 31: 1–46.

Lindell, D. ,2014. *The genus Prochlorococcus, phylum cyanobacteria*. In *The Prokaryotes* (pp. 829-845). Springer Berlin Heidelberg

Melkonian, M. & B. Surek, 1995. *Phylogeny of the Chlorophyta – congruence between ultrastructural and molecular evidence*. Bulletin de la Societe Zoologique de France 120: 191–208.

Pulz, O.; Gross, W. *Valuable products from biotechnology of microalgae*. Applied Microbiology Biotechnology, v.65, p.635-648, 2004.

Sarmiento, H., Unrein F., Isumbisho M., Stenuite S., Gasol J. M. & Descy J. P., 2008. *Abundance and distribution of picoplankton in tropical, oligotrophic Lake Kivu, eastern Africa*. Freshwater Biology 53:756-771.

Sharon, N.; Lis, H., 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glycobiology, Cary, v. 14, n. 11, p. 53-62.

Singh, r. S.; tiwary a. K.; Kennedy, J. F., 1999. *Lectins: Sources, Activities and Applications*. Critical Reviews in Biotechnology, v. 19, n. 2, p. 145-178.

Taipale,S.,Strandberg,U.,Peltomaa,E., Galloway, A. W., Ojala, A., & Brett, M. T. 2003. *Fatty acid composition as biomarkers of freshwater microalgae: analysis of 37 strains of microalgae in 22 genera and in seven classes*. Aquatic Microbial Ecology 71:165-178.

Takeda, H. 1991. *Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of Chlorella (Chlorophyceae)*. Journal of Phycology 27:224-232.

Treviño, I. F. 2008. Estudios taxonómicos en algas verdes cocales del sur de España.

4 Considerações Finas

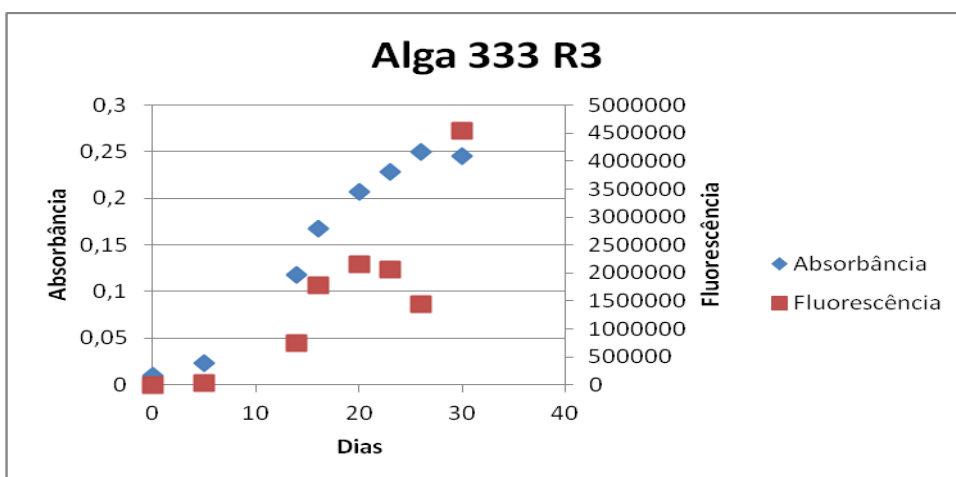
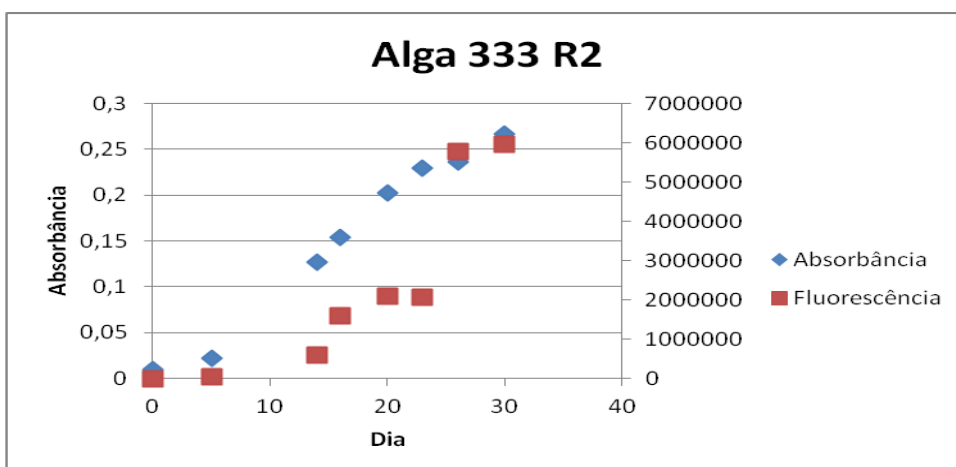
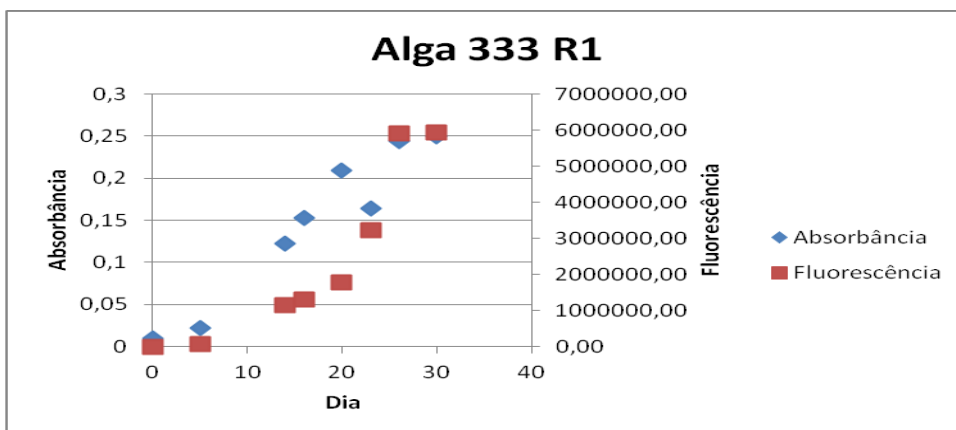
Na introdução buscamos apresentar uma visão geral das microalgas e das lectinas, para construção de uma abordagem polifásica para a classificação taxonômica de microalgas.

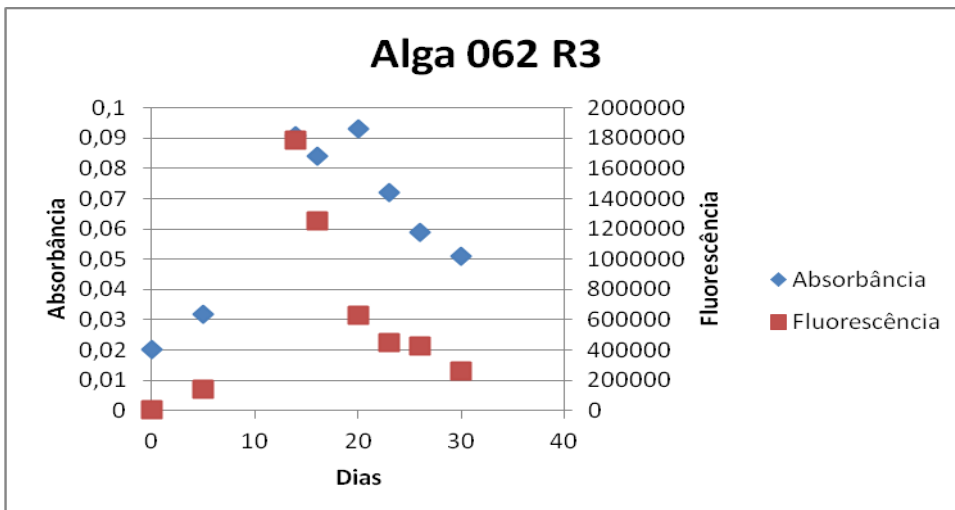
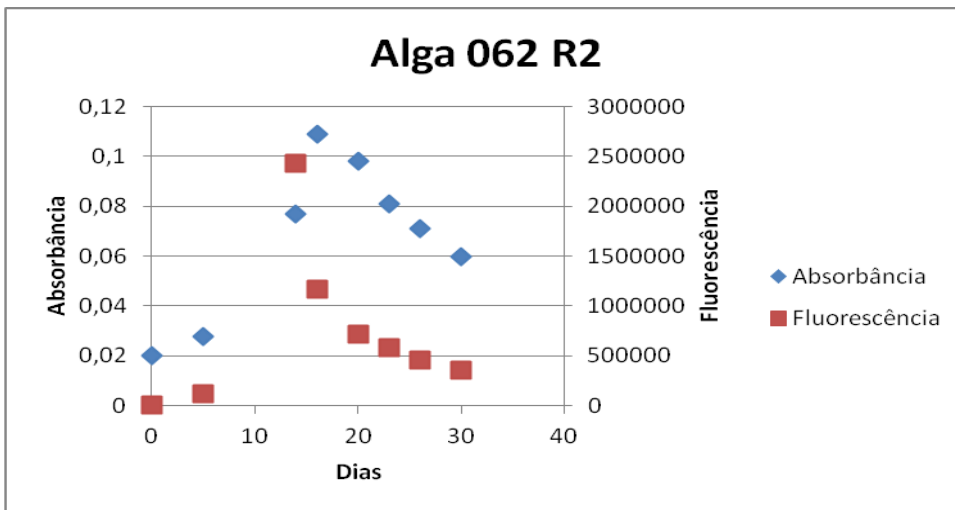
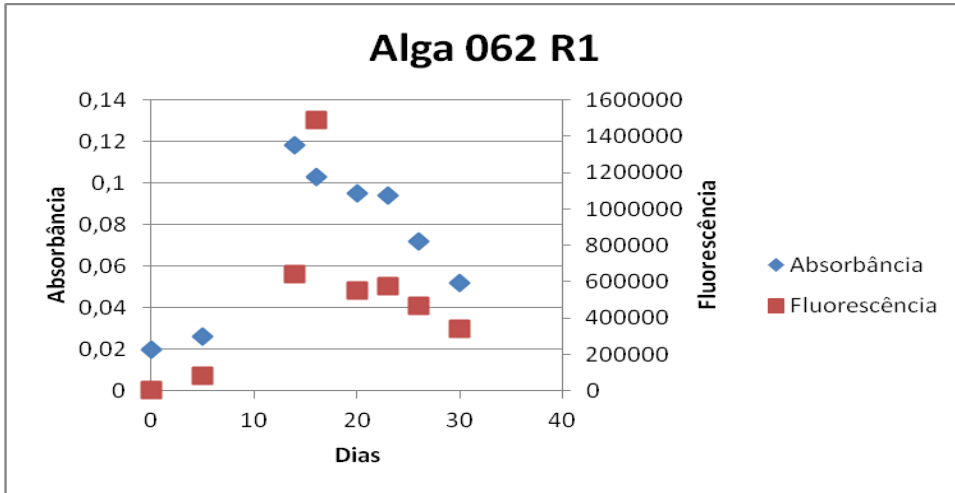
Ao longo do primeiro capítulo, buscamos otimizar uma metodologia apropriada para a utilização das lectinas como ferramentas taxonômicas. Os resultados mostraram a importância das análises diante das diferentes metodologias utilizadas até o momento, indicando que a menor concentração de lectina e menor período são os mais eficientes.

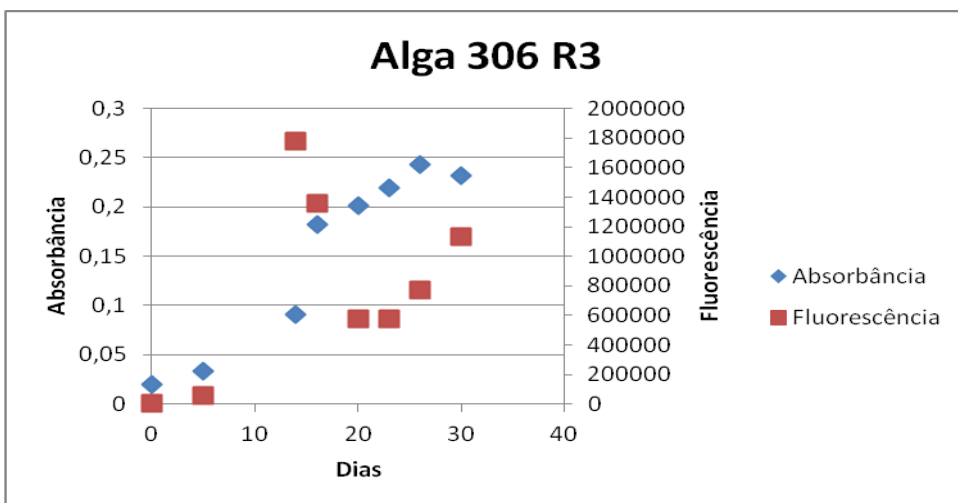
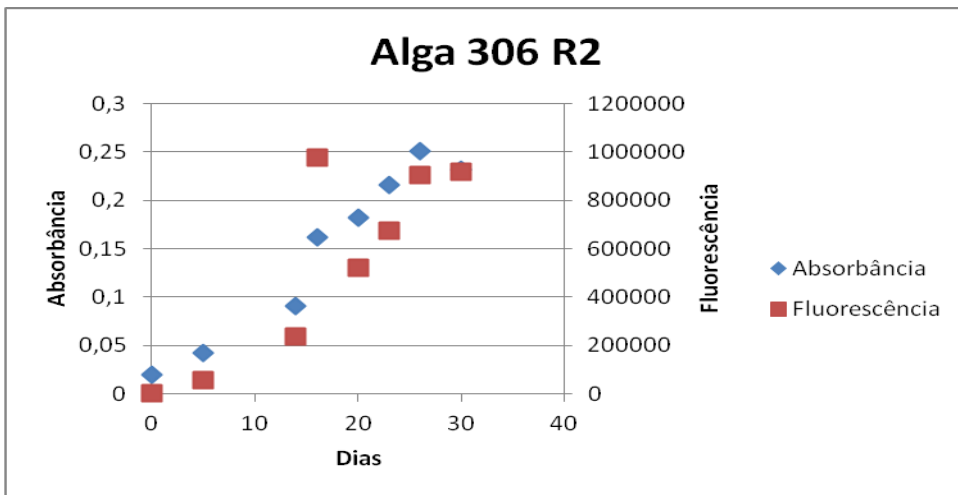
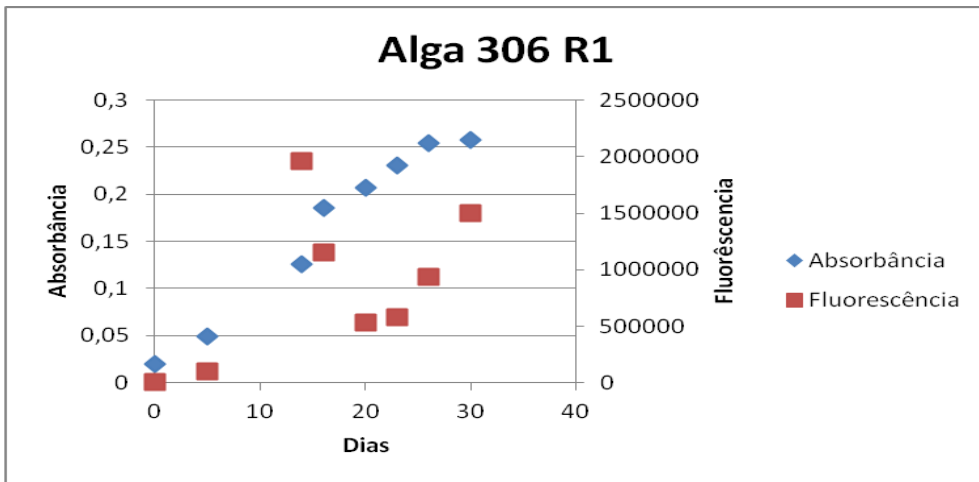
No segundo capítulo testamos o uso da lectina para doze microalgas de água doce, como indicadores de taxa, percebemos a individualidade de cada espécie, através da separação de cepas, mas percebemos que tais individualidades, ainda não permite a classificação para táxons inferiores.

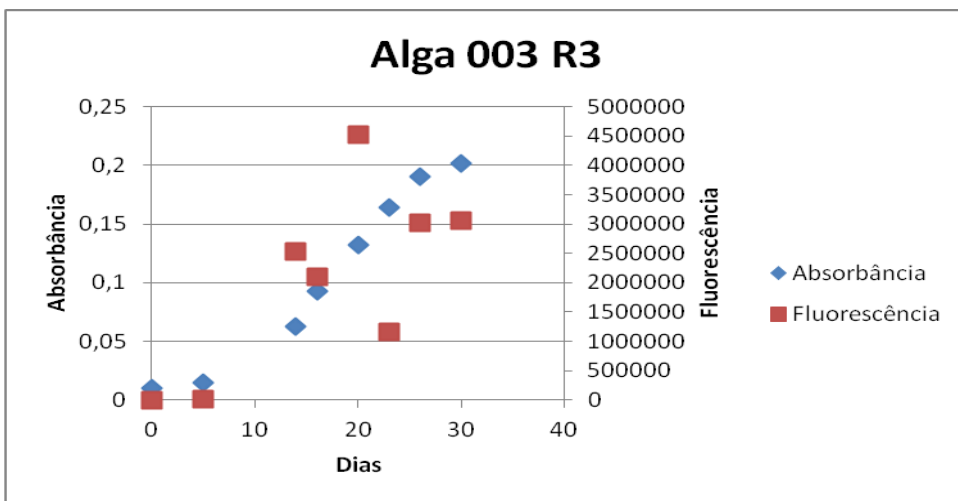
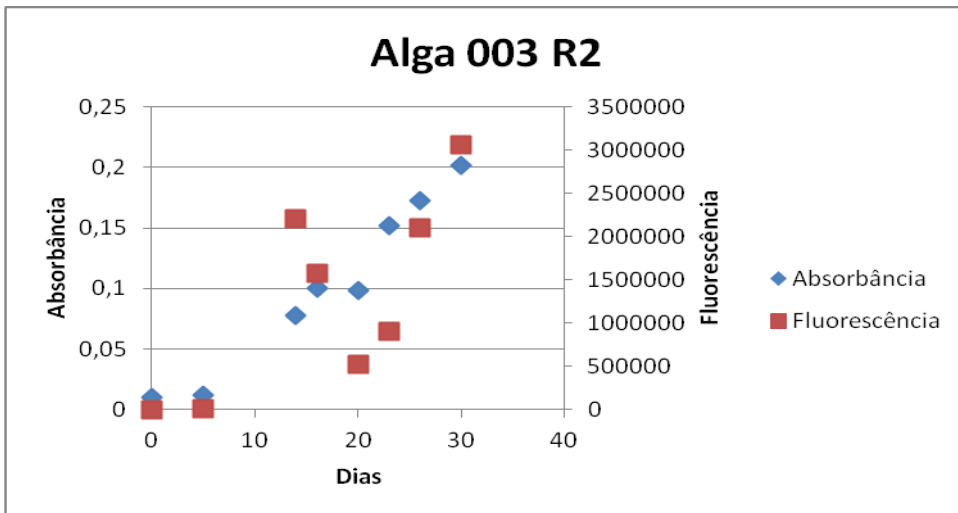
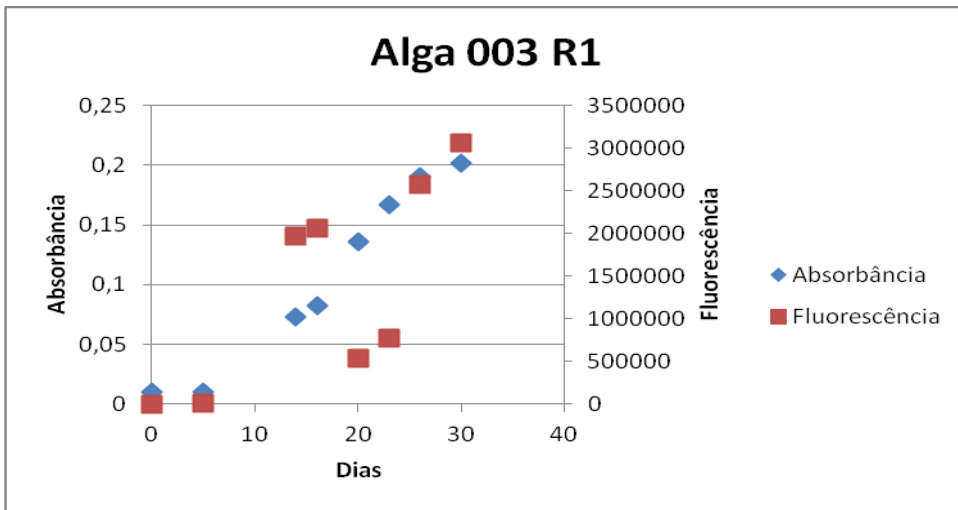
5 Anexos

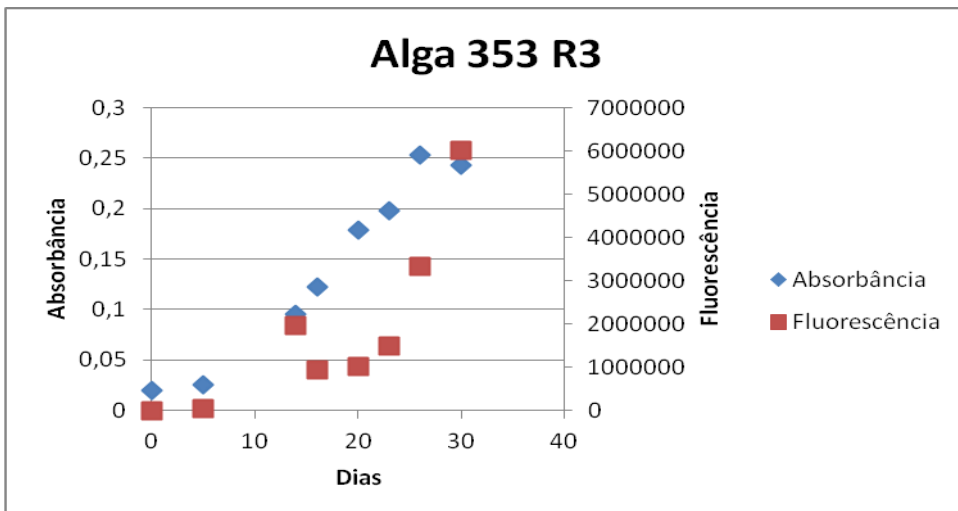
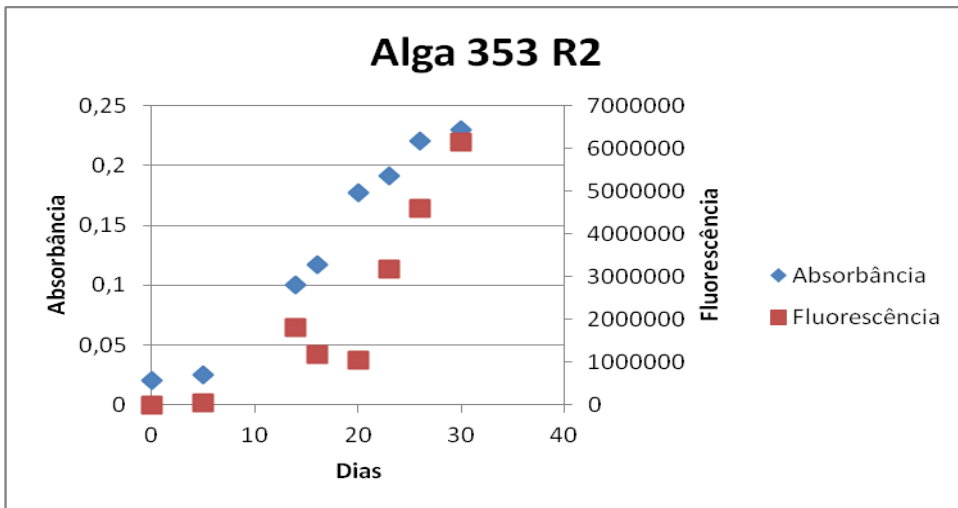
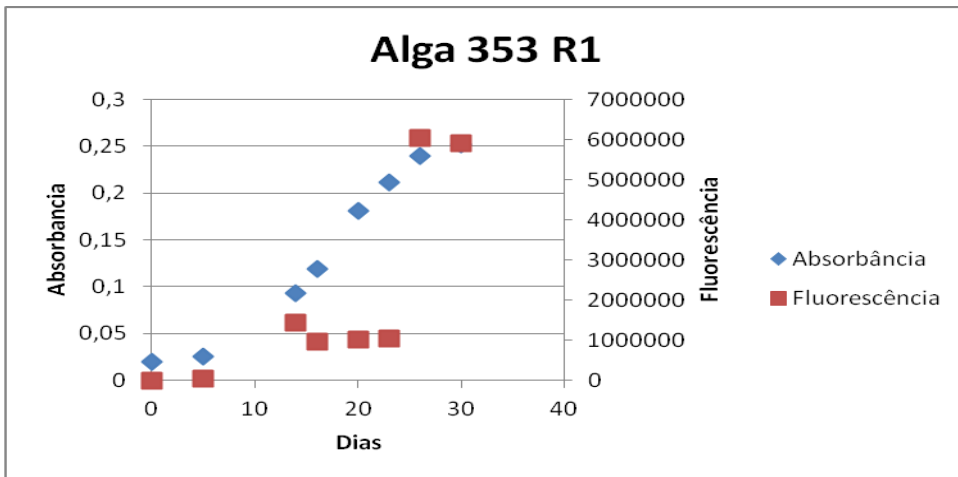
Curvas de Crescimento

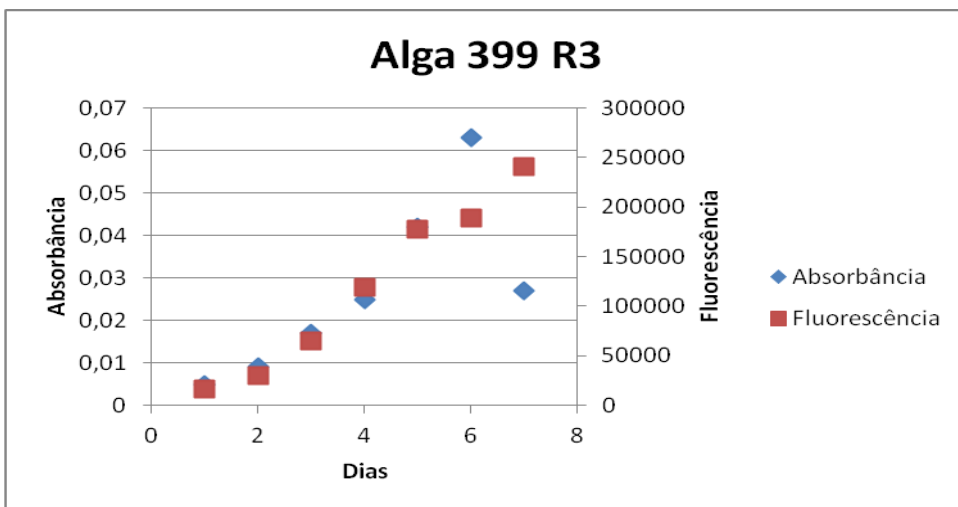
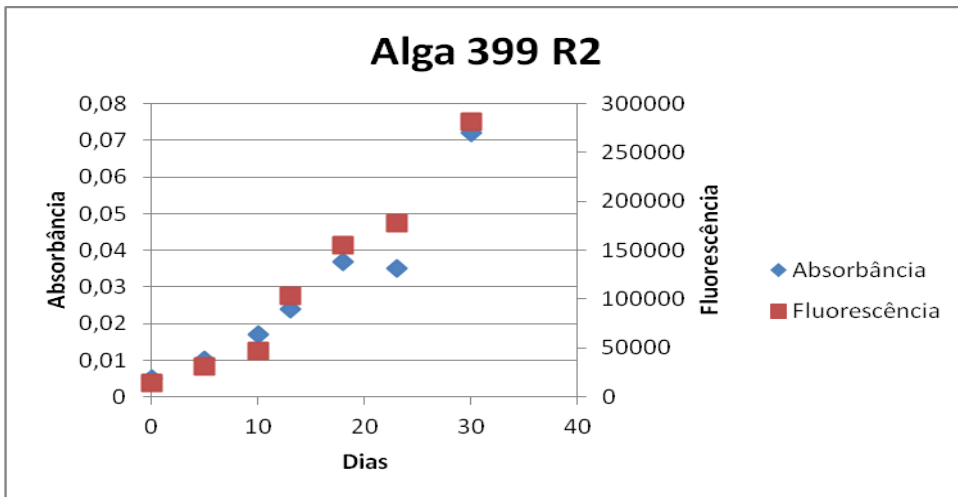
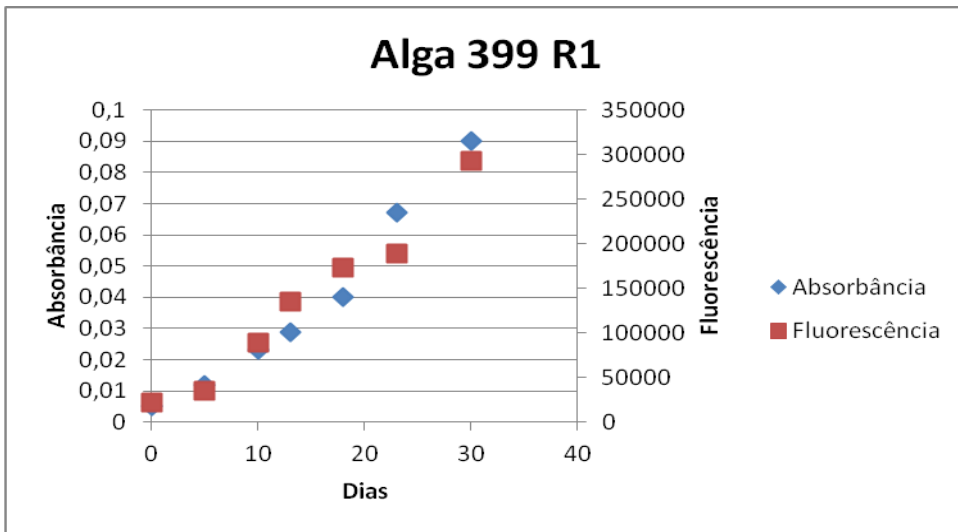


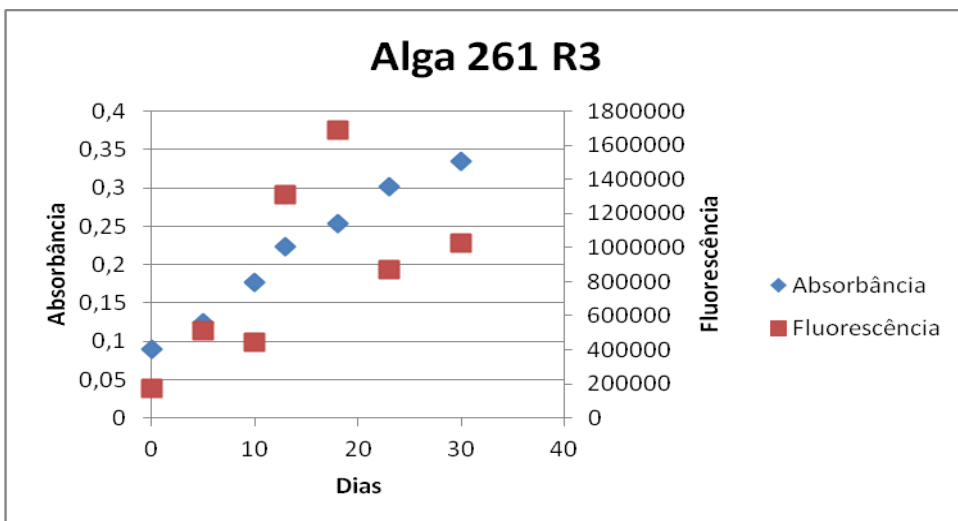
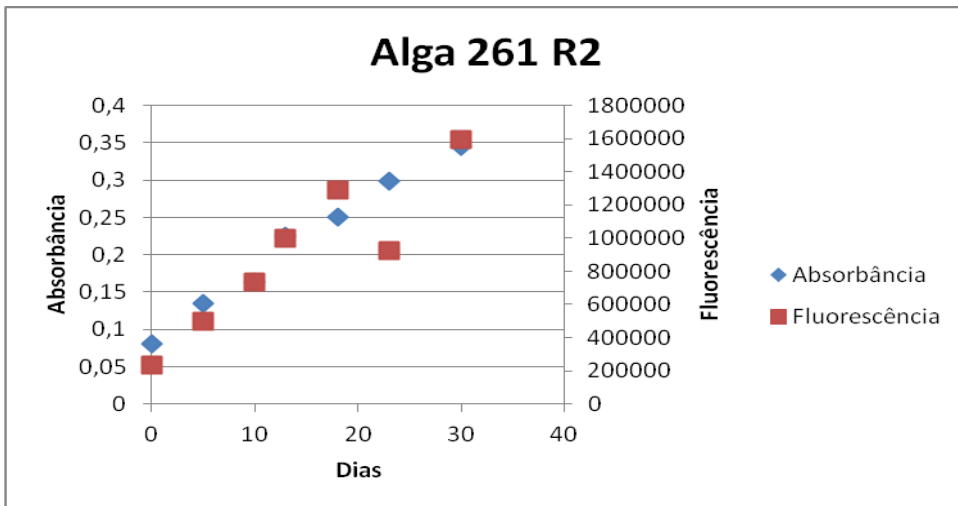
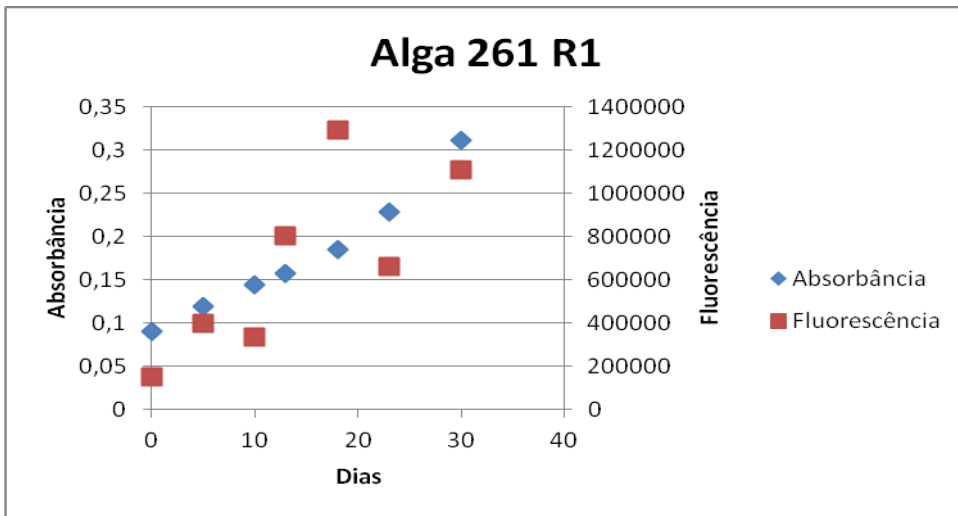


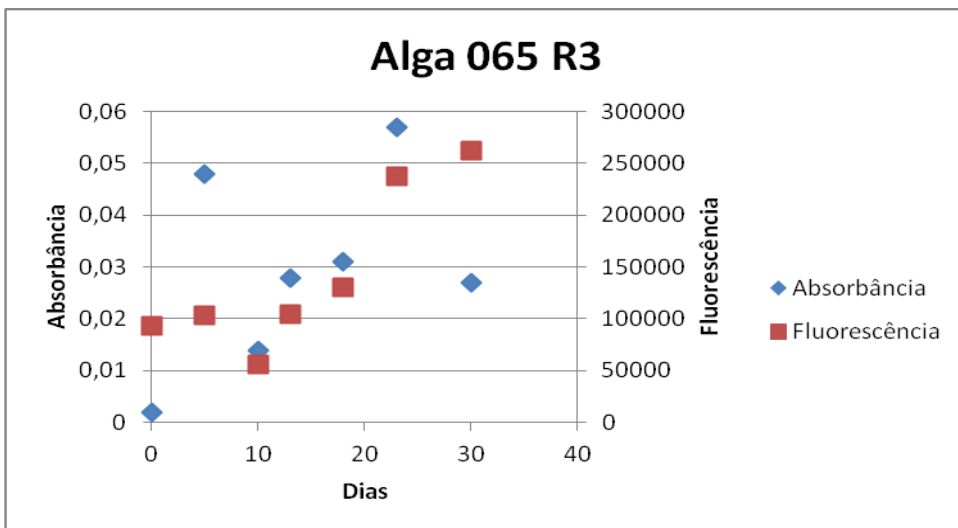
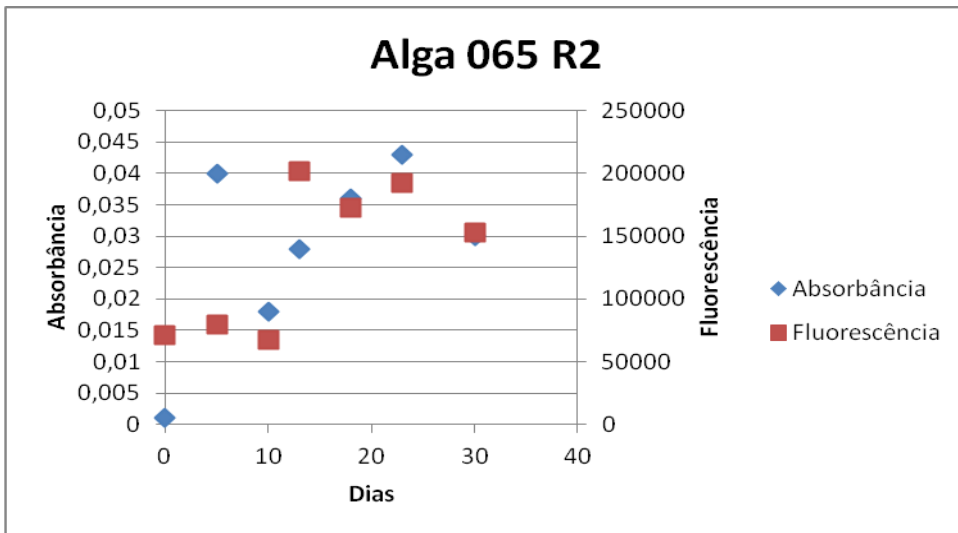
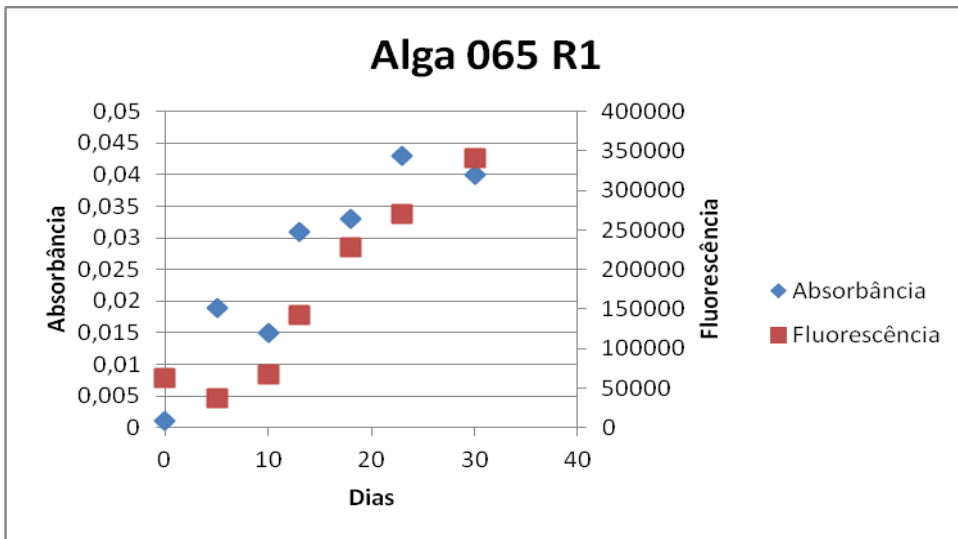


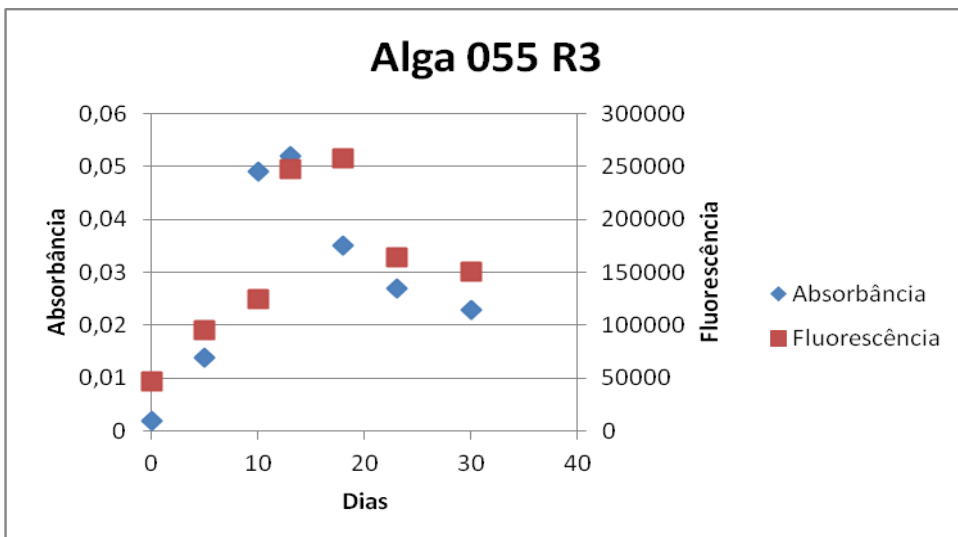
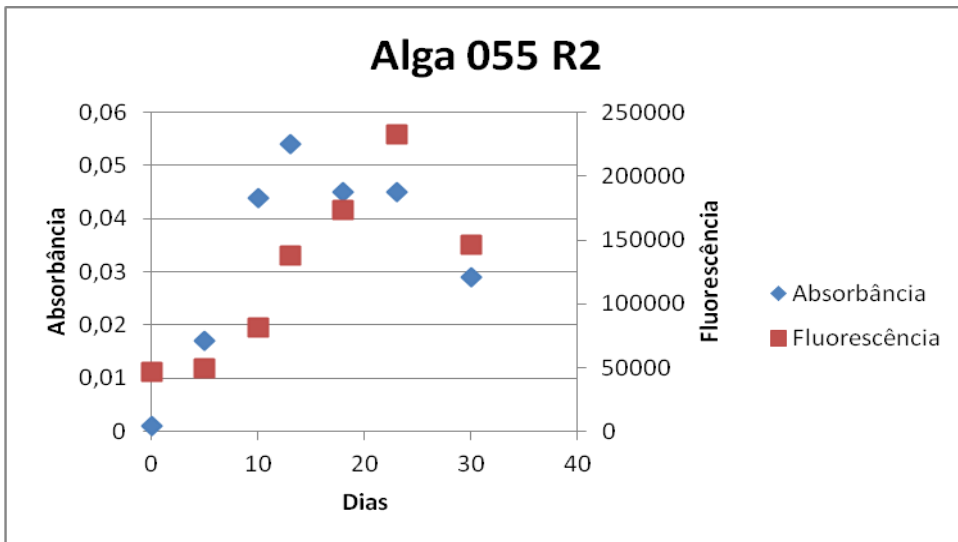
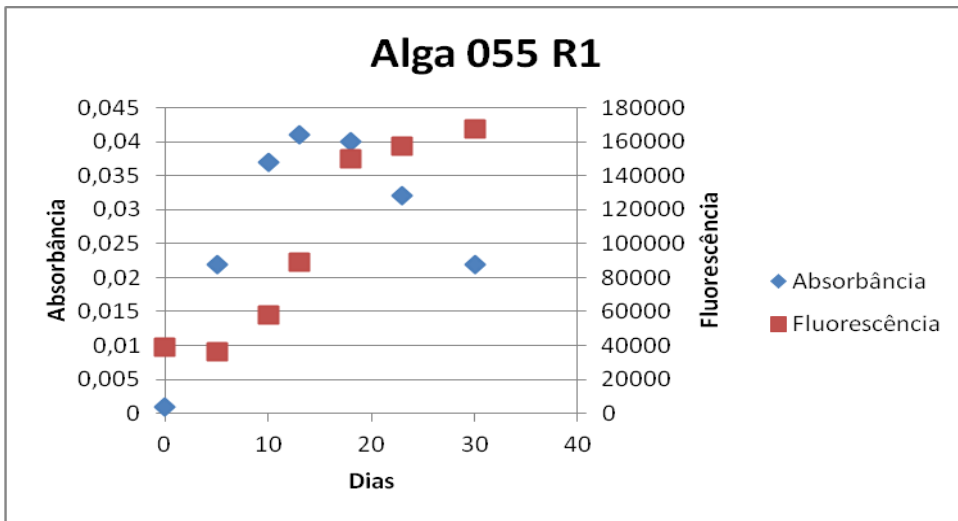






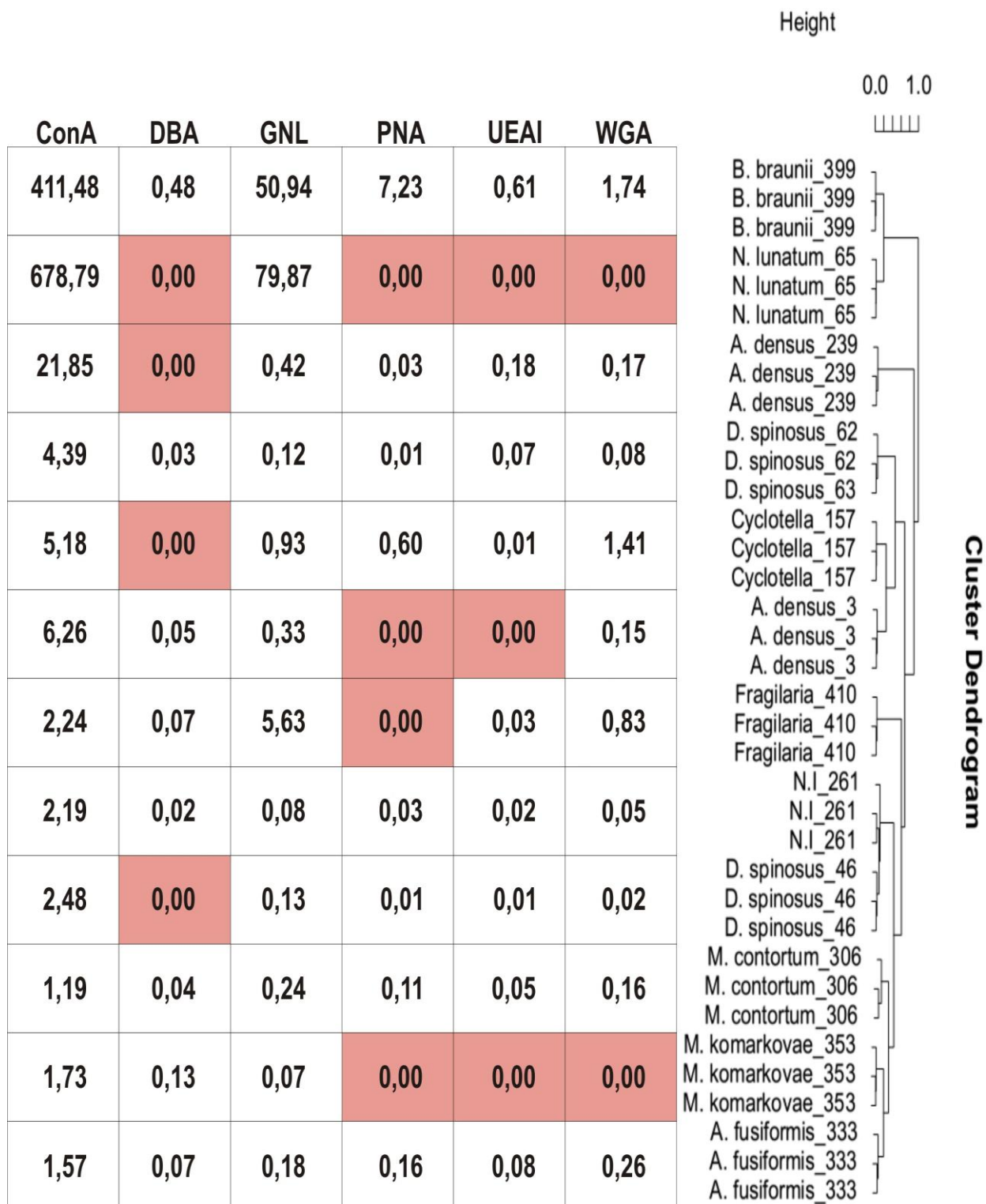






Cluster com a média das três réplicas para cada tratamento analisado via citometria de fluxo:

1 Lectina: Dados das 06 lectinas testadas.



2 Antilectina: Dados das 11 lectinas testadas.

