



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



CÍNTIA DE ALMEIDA GONÇALVES

GLICODENDRÍMEROS COMO FERRAMENTAS PARA ESTUDOS DE MICROALGAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de Concentração: Ecologia/ Fisiologia vegetal

BELO HORIZONTE – MG
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



UFMG

CÍNTIA DE ALMEIDA GONÇALVES

GLICODENDRÍMEROS COMO FERRAMENTAS PARA ESTUDOS DE MICROALGAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de Concentração: Ecologia/ Fisiologia vegetal

Orientador: Prof. Dr. Cleber Cunha Figueredo

Universidade Federal de Minas Gerais

Coorientador: Profa. Dra. Rute Cunha Figueiredo

Universidade Federal de Ouro Preto

BELO HORIZONTE – MG

2016

043 Gonçalves, Cíntia de Almeida.
 Glicodendrímeros como ferramentas para estudos de microalgas
 [manuscrito] / Cíntia de Almeida Gonçalves. – 2016.

 55 f. ; il. ; 29,5 cm.

 Orientador: Prof. Dr. Cleber Cunha Figueredo. Coorientadora: Profa. Dra.
 Rute Cunha Figueiredo.

 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
 Ciências Biológicas.

 1. Alga - Teses. 2. Matriz extracelular - Teses. 3. Lectinas - Teses. 4. Fisiologia
 vegetal - Teses. I. Figueredo, Cleber Cunha. II. Figueiredo, Rute Cunha. III.
 Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV.
 Título.

 CDU: 581.1

Agradecimentos

A Deus. Parece estranho, mas tudo se encaixa.

À UFMG e ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal pela oportunidade do Mestrado e também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior - CAPES, pela bolsa concedida.

À FAPEMIG, pelo financiamento de dois projetos relacionados a esse trabalho, sendo um deles coordenado pela professora Rute Cunha Figueiredo e outro pelo professor Cleber Cunha Figueiredo.

Aos meus orientadores, Cleber e Rute, pelos ensinamentos, a atenção e a disponibilidade que tiveram comigo durante todo esse período. Pela orientação exemplar e dedicada que me deram, pela paciência e por contribuírem tanto para o meu crescimento profissional quanto pessoal. Agradeço também pela convivência e principalmente pela amizade dos dois. Tenho sorte em ter vocês como orientadores!

À professora Alessandra Giani, por ter disponibilizado praticamente toda a estrutura física necessária para o desenvolvimento desse trabalho: o laboratório, os equipamentos, as culturas do banco de algas e também seus conhecimentos e tempo, quando me foram necessários. Muito obrigada!

Ao professor Dr. Javier Rojo, parceiro desse projeto e à sua equipe: *Grupo Laboratório de Glicosistemas do Instituto de Investigaciones Químicas-CISIC*, Espanha, pela confecção e disponibilização dos glicodendrímeros utilizados nesse trabalho.

Ao professor Dr. João Aguiar Nogueira Batista e a Dra. Karina Proite pela imensa ajuda com a microscopia de epifluorescência no início desse projeto.

À Elenice, uma técnica de laboratório que mais parece uma mãe. Muito obrigada pelas ajudas, pelas conversas, pelos conselhos e pelo carinho. Ah, e também pelos cafezinhos no fim da tarde!

Aos meus colegas de laboratório: Scarlet, Lucas, Arthur, Gustavo, Priscila, Leandro Sales, Valquíria, Leandro Ambrózio e Laísa. Agradeço pela convivência, pelo apoio e amizade de vocês, pelos momentos divertidos, as risadas e o companheirismo. Para vocês, meu sincero e carinhoso muito obrigada.

As minhas amigas Poliana, Samantha e Solange, pela amizade e apoio.

Aos funcionários do Departamento de Botânica: por viabilizar o dia-a-dia e também pela convivência.

À professora Dra. Rosy Isaías e as doutoras Izabel Chaves, Anete Formiga e Elisa Bicalho que gentilmente se disponibilizaram para compor a banca examinadora e pelas contribuições que certamente farão a esse trabalho.

A professora Dra. Luzia Valentina Modolo pela disponibilização do leitor de microplacas, fundamental para realização de um experimento importante nesse trabalho. Muito obrigada!

Por fim, quero manifestar meus sinceros agradecimentos à minha família: Minha mãe Dulcinha, meu irmão Éverson, meu marido Éder e ao Mundinho, pelo apoio em todos os meus projetos. Esse foi só mais um de tantos outros em que estiveram comigo. Obrigada por acreditarem e sonharem comigo os meus sonhos, por apoiarem mesmo sem, às vezes, entenderem direito do que se trata, mas sempre considerarem que se

é importante para mim, então está tudo certo. Obrigada pelo amor, o carinho e a paciência nos momentos em que fiquei ausente, estressada, ansiosa e até mal-humorada. Muito obrigada para vocês é pouco!

Índice

RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iii
1- INTRODUÇÃO.....	7
2- OBJETIVOS E HIPÓTESE	18
2.1- Objetivos gerais.....	18
2.2- Objetivos específicos.....	18
2.3- Hipótese	19
3- MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1- Síntese dos dendrímeros.....	20
3.2- Condições de cultivo.....	21
3.3- Exposição das espécies aos glicodendrímeros.....	21
3.4-Análise em microscopia confocal.....	24
3.5- Quantificação de fluorescência	25
3.6- Análises estatísticas	27
4- RESULTADOS	27
4.1- Expressão de receptores de carboidratos.....	27
4.2- Diversidade molecular espécie-específica	28
4.3- Quantificação de Fluorescência.....	37
5- DISCUSSÃO	41
6 - CONCLUSÃO.....	48
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

RESUMO

A membrana plasmática e a matriz extracelular estão envolvidas em processos importantes de interação, como reconhecimento, adesão e reprodução. A matriz extracelular pode variar tanto em sua composição quanto em sua arquitetura molecular, diferindo entre grupos taxonômicos maiores ou até mesmo ao nível genérico ou específico. A composição dessa matriz extracelular é mais conhecida para animais, fungos e bactérias em comparação com as células fotossintetizantes (cianobactérias, algas e plantas). No caso das algas, principalmente as microscópicas, esse conhecimento é ainda menor, sendo que estudos sobre esse assunto são recentes e escassos. Em, praticamente todos os organismos vivos, os carboidratos presentes na membrana celular na forma de oligossacarídeos são reconhecidos com alta seletividade e especificidade por proteínas chamadas lectinas, também presentes em superfície celular. Até o momento, os estudos voltados para essa linha de pesquisa dedicaram-se a identificar a composição das biomoléculas presentes nas superfícies de células algais utilizando lectinas marcadas por fluorescência. De forma alternativa aos estudos realizados até o momento, nesse trabalho o objetivo foi verificar a similaridade das interações envolvendo três diferentes carboidratos numa apresentação dendrímica (glicodendrímeros) marcados por fluorescência e as superfícies celulares de doze espécies de microalgas. Desse modo foi detectada a especificidade das interações em uma via inversa, de modo a se conhecer as prováveis lectinas expressas nas superfícies desses organismos. Os resultados sugerem que os receptores encontrados nessas espécies tendem a ser diferentes tanto na composição quanto na quantidade.

Palavras-chave: Glicodendrímeros, interação celular, lectinas, membrana plasmática.

ABSTRACT

The plasma membrane and the extracellular matrix are involved in important cell interactions, such as recognition, adhesion and reproduction. The extracellular matrix may vary in both composition and molecular architecture, which can be different for higher taxonomic groups or even at the generic or specific level. The composition of the extracellular matrix is best known for animals, fungi and bacteria, but there is a lack of knowledge regarding to the photosynthetic cells (cyanobacteria, algae and plants). For algae, mainly the microscopic ones, this knowledge is even smaller and the studies are recent and rare. These studies have generally focused in the identification of the biomolecules present on the surface of algal cells by using labeled lectins, which are proteins that specifically interact with carbohydrates. They are found on cell surfaces of almost all living beings and their specificity to recognize and bind carbohydrates are the key for many cell interactions. Alternatively to the studies based on labeled lectins, this research was performed with three different labeled carbohydrate (glicodendrimers) to detect the presence of lectins on cell surfaces of twelve algal species. Thus the goal was to detect specificity of the interactions in a reverse way, so as to meet the probable lectins expressed on the surfaces of the cells. Based on the results, we suggest that the receptors found in the species tend to differ both in composition and quantity. The differences were mainly species-specific, since higher taxonomic groups did not presented any pattern of results.

Key words: Cell-interaction, glicodendrimers, lectins, Plasma membrane.

1- INTRODUÇÃO

A membrana celular separa o meio intracelular do extracelular e é a principal responsável pelo controle de entrada e saída de substâncias na célula (Junqueira & Carneiro, 2012). Todas as membranas celulares possuem uma organização básica, sendo constituídas por duas camadas lipídicas, fluidas e contínuas, onde se inserem moléculas protéicas, constituindo um mosaico fluido (Junqueira & Carneiro, 2012). A superfície das células é composta por lipídios, carboidratos e proteínas, sendo que os carboidratos (oligossacarídeos) podem se apresentar associados aos lipídios (glicolipídeos) ou às proteínas (glicoproteínas; Singer & Nicholson, 1972) (Figura 1).

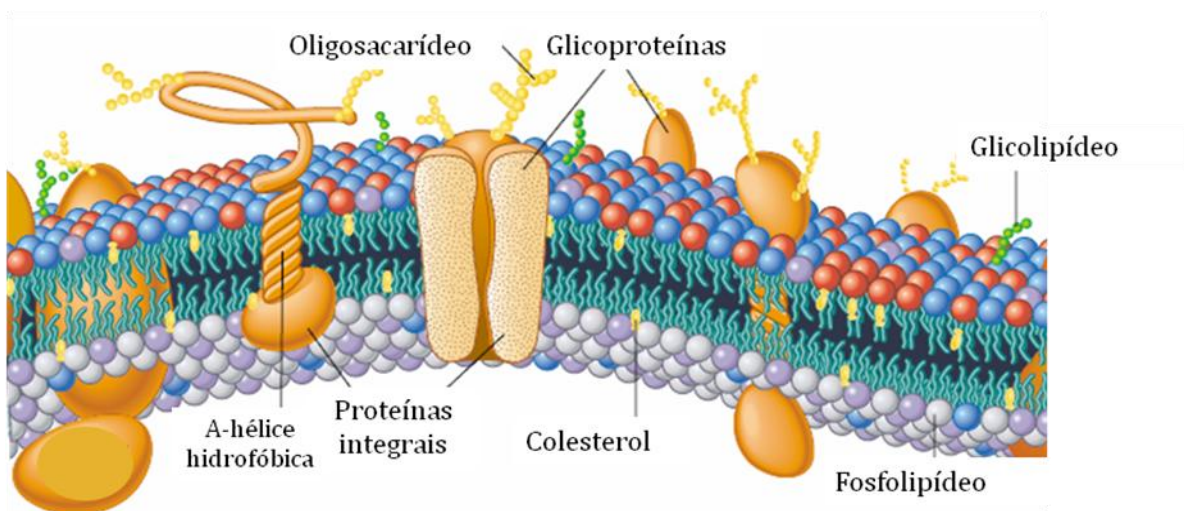


Figura 1- Representação esquemática da estrutura da superfície celular. (Fonte: Singer & Nicholson, 1972).

As proteínas da membrana celular podem ser integrais ou periféricas. As proteínas integrais caracterizam-se por estarem fortemente associadas aos lipídeos, enquanto que as periféricas são facilmente separadas destes (Cooper, 2000). As proteínas integrais representam cerca de setenta por cento das proteínas da membrana plasmática e nesse grupo estão incluídas as enzimas, as glicoproteínas, as

proteínas transportadoras e receptoras de hormônio e as lectinas. Algumas dessas moléculas são fundamentais na adesão entre superfícies celulares, sendo denominadas CAMs (*cell adhesion molecules*) (Homrich *et al.*, 2015). Algumas lectinas são representantes das CAMs. Essas proteínas estão também envolvidas em processos de reconhecimento celular, sendo que tanto a função de adesão quanto à de reconhecimento resultam de sua capacidade de interagir com carboidratos de modo seletivo e altamente específico (Sharon & Lis, 2004).

Na face externa da membrana celular dos animais encontram-se os resíduos glicídicos das glicoproteínas que juntamente com os glicídios complexos dos glicolipídeos e outras moléculas, como os proteoglicanos, formam uma camada de açúcares denominada glicocálice (Sheldon *et al.*, 2007) (Figura 2). O glicocálice é a primeira área de contato da célula e, por isso, é a primeira barreira de proteção a agressões químicas e mecânicas, possui função enzimática e, principalmente, participa do reconhecimento e adesão celular (Junqueira & Carneiro, 2012).

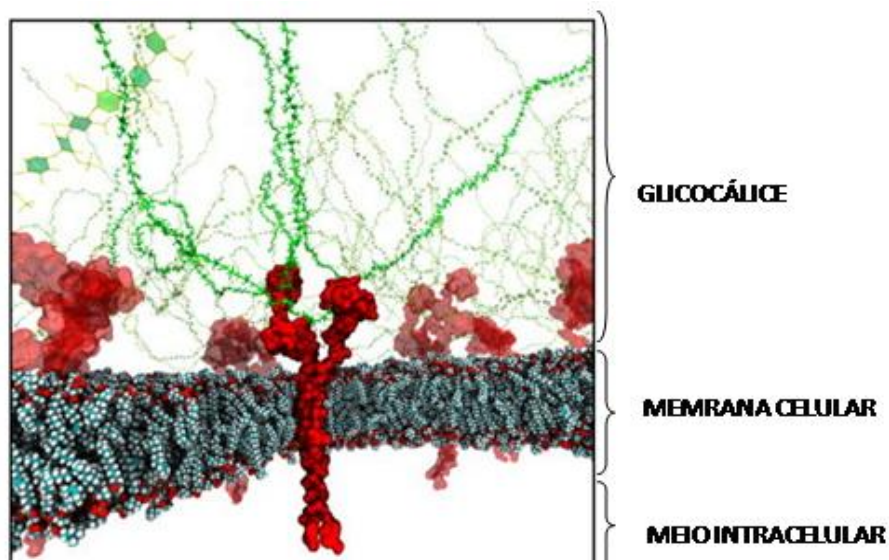


Figura 2- Representação esquemática do glicocálice. Resíduos de carboidratos (em verde). Proteínas integrais transmembranares (em vermelho) e bicamada lipídica (em azul). (Fonte: Cruz-Chu, 2014).

Assim como as células animais, as células fotossintetizantes apresentam uma membrana plasmática e uma matriz extracelular de natureza basicamente glicídica. Na célula fotossintetizante essa matriz é mais organizada, apresentando uma estrutura espessa, rígida e resistente, denominada parede celular (Rose, 2003; Caffall & Mohnen, 2009) (Figura 3).

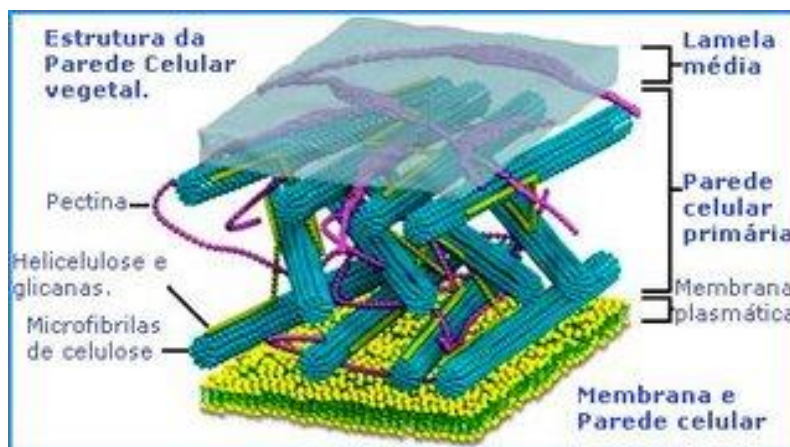


Figura 3- Representação esquemática da parede celular vegetal. (Fonte: <http://sobiologia.com.br>)

A parede celular é composta basicamente por polissacarídeos, proteínas estruturais e enzimas. A parede celular participa da aderência, da aglutinação celular, da interação com células vizinhas, influencia na defesa, no crescimento, na nutrição e reprodução da célula (Caffall & Mohnen, 2009; Junqueira & Carneiro, 2012; Rose, 2003). Assim como as plantas, várias algas também possuem parede celular, sendo que alguns grupos possuem ainda uma camada amorfa (mucilagem) ou, como nas bacilariófitas, um tipo especial de parede celular denominado frústula. Esta é composta por duas valvas protéicas, impregnadas com sílica, morfologicamente semelhantes e que se encaixam perfeitamente (Crawford *et al.*, 2001).

O fitoplâncton é uma comunidade muito diversa e importante na dinâmica dos ecossistemas aquáticos, sendo constituído pelas algas microscópicas e as

cianobactérias (Tundisi, 1986; Costa *et al.*, 2014). Além de ser a base da cadeia alimentar desses ambientes, o fitoplâncton possui outros papéis cruciais para o funcionamento dos ecossistemas (Santos, 2008). As algas são organismos eucarióticos (Lee, 2008) cujas paredes celulares contêm polissacarídeos e glicoconjugados, principalmente glicoproteínas (Muller *et al.*, 1983). Os organismos fitoplanctônicos (algas e cianobactérias) possuem diferenças na composição de polissacarídeos da parede celular e da mucilagem (Muller *et al.*, 1983). Em algumas clorófitas sifonáceas e em algumas rodófitas, os polissacarídeos da parede celular possuem resíduos de β -D-glicose e β -D-manose, enquanto L-fucose e polímeros de D-galactose podem ser encontrados na matriz mucilaginosa (Lee, 2008).

Essa diferença na composição glicídica encontrada na parede celular e na mucilagem sugere que os carboidratos possuam funções diferentes na célula, sendo que na mucilagem podem estar envolvidos com a fluabilidade dos organismos (Muller, 1983) enquanto que na parede celular a principal função deve ser interagir com lectinas em processos de reconhecimento celular (Knox, 1992).

Além da especificidade mencionada anteriormente, as interações lectina-carboidrato são reversíveis e podem ser monoméricas (um resíduo de carboidrato para um sítio receptor da lectina) ou ocorrer de forma multivalente (múltiplos resíduos de carboidratos para múltiplos receptores de lectinas) o que aumenta a afinidade e a especificidade da interação (Yamada, 2006). As lectinas são capazes de identificar carboidratos de células da própria espécie e também carboidratos de células de outras espécies, como por exemplo, de patógenos, predadores ou interações simbiotes (Wood-Charlson *et al.*, 2006; Sousa, 2010). De fato, algumas bactérias se ligam ao organismo hospedeiro, durante a infecção, por meio de interações lectina-carboidrato (Khowala *et al.*, 2008) e além disso, sabe-se que processos fisiológicos de

reprodução, como reconhecimento de gametas, são viabilizados por interações com lectina-carboidrato (Gabiús, 1997). Vários estudos sugeriram que essas interações são a chave para diversos processos celulares, tais como reconhecimento, adesão e reprodução (Brandley & Schnaar 1986; Espinosa, 2010; Sousa, 2010).

Toda célula contém uma matriz específica de marcadores protéicos em sua superfície, que permitem a identificação de cada tipo de célula de uma forma precisa (Alberts *et al.*, 2002). O reconhecimento entre as células, de uma maneira geral, se dá via biomoléculas que se encontram expostas na superfície das membranas celulares (Attias, 2010), resultando em uma composição molecular que pode ser única e típica para certas espécies ou mesmo linhagens em uma mesma espécie (Alberts *et al.*, 2002).

As diferenças na composição da superfície celular provavelmente são responsáveis pelas diferenças encontradas no reconhecimento interespecífico de células, na adesão celular e até mesmo na regulação da flutuabilidade dos organismos (White *et al.*, 2005). No entanto, pouco se sabe a respeito da composição e natureza das biomoléculas de superfície das células de algas e plantas e de como elas estão arranjadas nas superfícies das mesmas (Knox, 1992).

A detecção de diferentes lectinas e carboidratos na superfície de células de diferentes espécies fitoplanctônicas seria uma forma viável e eficiente de identificá-las, até mesmo distinguir linhagens tóxicas e não tóxicas (Lesley *et al.*, 1995). Entretanto, esses estudos são ainda raros e a arquitetura molecular das superfícies de algas permanece pouco esclarecida. Lectinas marcadas com fluoróforos vem sendo utilizadas por diversos pesquisadores como ferramentas para o exame das superfícies celulares de diversos organismos, incluindo os protistas (Schottelius & Muller *et al.*, 1983; Ghosh *et al.*, 1987). A presença da lectina WGA, por exemplo, foi utilizada para identificação de duas espécies morfológicamente semelhantes de dinoflagelados

(Andújar et al., 1997), sendo que uma das espécies é tóxica. Dessa forma, o conhecimento das lectinas presentes em um organismo é também uma ferramenta taxonômica promissora (Andújar et al., 1997), sendo consideradas excelentes ferramentas para estudos da arquitetura molecular das superfícies das células podendo estar envolvidas tanto na comunicação entre células de uma mesma espécie, como entre células de espécies diferentes (Muller et al., 1983).

Lectinas marcadas são ferramentas confiáveis de detecção e identificação rápida dos oligossacarídeos presentes na superfície celular, elucidando a diversidade desses carboidratos (Muller *et al.*, 1983). Muitos pesquisadores utilizam lectinas marcadas com fluorescência para avaliar interações dessas com a superfície das células estudadas. Muitos estudos de caracterização da superfície de células e interação entre elas vêm sendo realizados (Brandley & Schnaar, 1986; Fritz, 1992; Costas *et al.*, 1994; Roberts *et al.*, 2006). Trabalhos nessa área são promissores por contribuir para a elucidação da estrutura superficial das células e de como esta interage (Knox, 1991), além do desenvolvimento de ferramentas para a taxonomia (Lesley *et al.*, 1995).

De forma complementar às lectinas, os carboidratos também são muito importantes em processos de reconhecimento e interação celular, já que são os receptores alvos dessas proteínas. Os carboidratos compõem parte significativa das moléculas expostas na superfície celular e são protagonistas na comunicação intercelular dos organismos (Khowala *et al.*, 2008). A grande variedade estrutural apresentada por esses compostos e sua apresentação multimérica permitem também uma variedade de glicocódigos que tendem a ser específicos para cada célula. Diante disso, é confiável analisar a composição das superfícies celulares tanto por meio do estudo de lectinas como de carboidratos. Como mencionado anteriormente, os carboidratos são os receptores alvos das lectinas, por isso, podem ser também usados

para a detecção dessas proteínas nas superfícies celulares. Carboidratos marcados com fluorescência são ferramentas alternativas e inovadoras aos métodos até então utilizados em trabalhos nessa linha de pesquisa.

No presente trabalho foi avaliada a interação de carboidratos marcados com fluorescência com a superfície celular de doze espécies de microalgas. Esses carboidratos se apresentam de maneira multimérica, em moléculas chamadas glicodendrímeros. Dendrímeros são compostos macromoleculares que compreendem uma série de ramificações em volta de um núcleo interno (Cloninger, 2002). Dendrímeros que possuem carboidratos em suas estruturas são denominados glicodendrímeros. O uso desses compostos tem aumentado na pesquisa biológica, com aplicações diversas e relevantes (Roy *et al.*, 2013). Os glicodendrímeros têm sido usados principalmente em estudos de comunicação e reconhecimento celular que envolva interações entre carboidratos e lectinas (Cloninger, 2002). Esses compostos são ferramentas vantajosas para esse tipo de estudo devido ao seu tamanho (nanométrico), a facilidade de preparação e, principalmente, por apresentarem cópias múltiplas dos grupos da superfície (Cloninger, 2002) o que mimetiza os oligossacarídeos de membrana.

Três tipos diferentes de carboidratos marcados com um fluoróforo foram utilizados para avaliar suas interações com células de doze espécies de microalgas. Todos os glicodendrímeros utilizados nesse trabalho possuem uma estrutura em comum, diferenciando-se apenas nas extremidades onde se encontram os carboidratos. Esses glicodendrímeros são compostos, basicamente, por uma cadeia dendrítica, uma porção mais externa de carboidrato (D-manose, L-fucose ou *N*-acetilgalactosamina (GalNHAc)) e um fluoróforo (BODIPY) na posição focal (Figura 4). Como controle, foi sintetizado um dendrímero análogo, o qual apresenta uma porção dietilenoglicol em substituição ao carboidrato.

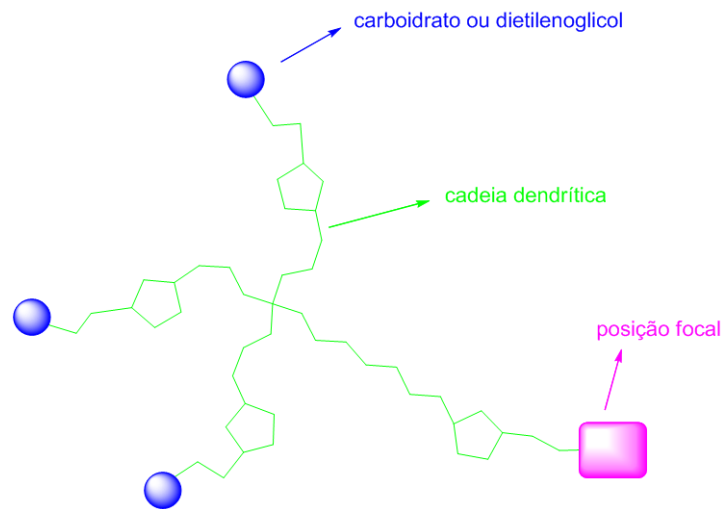


Figura 4- Estrutura dos glicodendrômeros. O carboidrato ou o dietilenoglicol (no caso do dendrômero controle) encontra-se nas extremidades dos dendrômeros (círculos azuis). O fluoróforo encontra-se inserido na posição focal, representada em cor de rosa. Em verde está representada a cadeia dendrítica, estrutura comum em todos os dendrômeros.

O fluoróforo utilizado nos glicodendrômeros foi o BODIPY R6G, cuja estrutura, faixas de excitação e emissão depois de ligado aos compostos estão representados na figura 5. Dentre as características desse fluoróforo, as principais são a sua estabilidade em meios aquosos, mesmo quando há variação de pH. Além disso, o tempo de vida desse fluoróforo em estado excitado é longo em comparação a outros marcadores (www.probes.com), o que representa uma vantagem para a realização de estudos de marcação de substâncias ou sistemas biológicos.

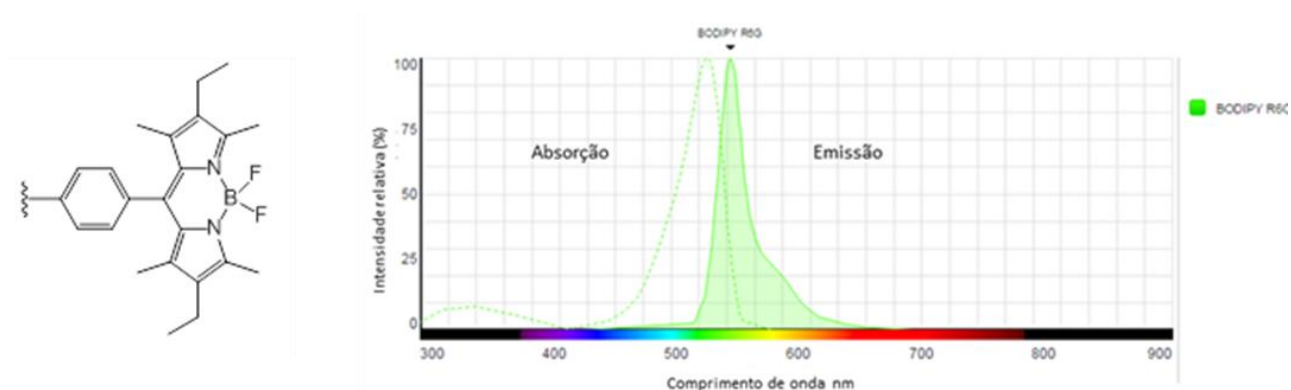


Figura 5- Estrutura e espectros de absorção e emissão do Bodipy. Fonte: www.probes.com

O fluoróforo (BODIPY) permitiu visualizar as interações entre os dendrímeros e as espécies testadas, que foram obtidas em um microscópio confocal. Confocal significa ter o mesmo foco. O microscópio confocal elimina a informação fora do foco por meio de uma abertura circular situada em frente ao plano da imagem. Essa abertura recebe o nome de *pinhole* e age como um filtro espacial que permite a passagem apenas da parte de luz proveniente do plano focal (Oliveira, 2012) (Figura 6). O tamanho da abertura do *pinhole* define o tamanho do plano focal, sendo que quanto menor for a abertura, menor o plano focal e melhor a qualidade da imagem (Sheppard *et al.*, 1997). Isso permite um controle da profundidade de campo, o que reduz a informação periférica ao plano focal, aumentando o contraste e, em consequência, a qualidade da imagem (Oliveira *et al.*, 2010). A técnica de microscopia confocal tem a vantagem de reduzir o ruído na imagem, permitindo uma alta resolução por meio de um balanço eficiente entre o sinal e o ruído (White *et al.*, 2005).

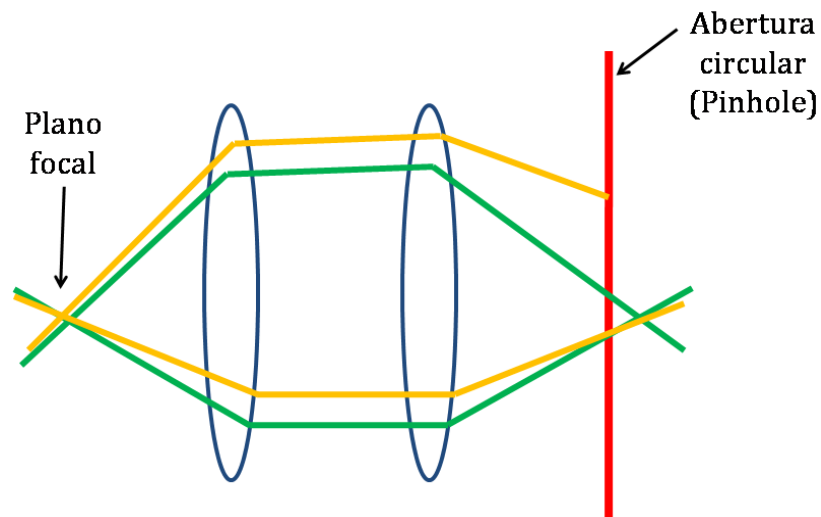


Figura 6-Esquema da função do pinhole. Fonte: Adaptado de Oliveira, 2012.

Além disso, essa técnica permite uma separação eficiente dos comprimentos de onda emitidos pelo objeto que está sob observação, o que permite a visualização de diferentes faixas de fluorescência. Utilizando essa técnica é possível, ainda, eliminar a autofluorescência das células, no caso dos organismos fitoplanctônicos, conferida pela clorofila, principalmente, e também por outros pigmentos acessórios, como os carotenoides e ficobilinas (Tang & Dobbs, 2007). As espécies de algas utilizadas nesse trabalho possuem basicamente clorofila *a* e clorofila *b* como pigmentos principais, e carotenóides como pigmentos acessórios. Na figura 7 estão representados os espectros de absorção e de emissão de fluorescência da clorofila *a*, que é o pigmento mais abundante nessas espécies. Nota-se que esse pigmento mostra baixa fluorescência na faixa entre 550 e 615 nm. Assim, o trabalho com essas algas por meio de um marcador que emita fluorescência justamente nessa faixa seria o ideal para evitar que a fluorescência dos pigmentos pudesse mascarar os resultados. Nesse estudo, esse aspecto permitiu uma separação eficiente da fluorescência emitida pelos pigmentos presentes e a fluorescência do fluoróforo dos glicodendrimeros (BODIPY).

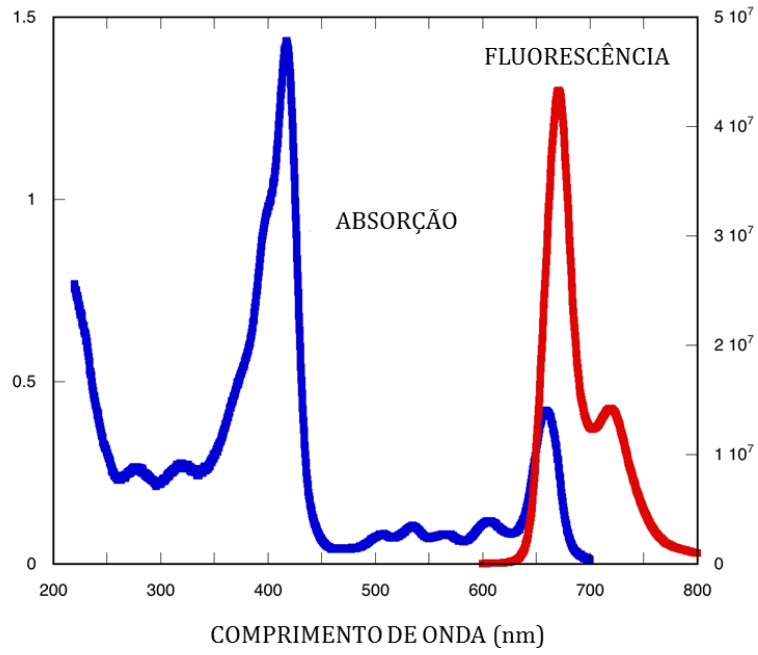


Figura 7- Espectros de absorção e de emissão da fluorescência da clorofila a.
Fonte: Adaptado de <http://www.photosynthesis.ch/fluorescence>.

2- OBJETIVOS E HIPÓTESE

2.1- Objetivos gerais

- Verificar a similaridade das interações envolvendo diferentes glicodendrímeros e as superfícies de células de doze espécies algais;
- Avaliar o potencial de glicodendrímeros marcados com fluorescência como ferramentas para estudos fisiológicos e taxonômicos do fitoplâncton.

2.2- Objetivos específicos

- Verificar a possível existência de padrões de interação diferentes entre as três classes algais testadas (Charophyceae, Chlorophyceae e Bacillariophyceae);
- Verificar a interação carboidrato-lectina em termos espécie-específicos para as diferentes algas testadas;
- Comparar estatisticamente a intensidade da interação entre os glicodendrímeros e cada espécie de alga avaliada através da quantificação da fluorescência dos mesmos;
- Comparar estatisticamente a intensidade da interação entre os glicodendrímeros segundo as diferentes partes de um mesmo indivíduo para espécies algais que apresentarem marcações aparentemente heterogêneas em sua superfície.

2.3- Hipótese

- Todas as espécies apresentarão interação positiva com pelo menos um dos carboidratos marcados (glicodendrímeros) e as possíveis combinações serão, até certo ponto, distintas entre espécies.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Síntese dos dendrímeros

Os compostos dendriméricos fluorescentes (glicodendrímeros e o controle) foram sintetizados em pureza analítica pela Professora Dra. Rute Cunha Figueiredo (UFOP-MG) em parceria com o Dr. Javier Rojo (IIQ-CSIC- Espanha). Esses dendrímeros foram obtidos utilizando-se metodologia clássica de síntese orgânica e caracterizados por análise de seus espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), obtidos em um espectrômetro Bruker DRX-300 e espectros de massas, por ionização *eletronspray*, em um espectrômetro Esquire 6000 Bruker Daltonics (ESI-MS) do *Instituto de Investigaciones Químicas do Consejo Superior de Investigaciones Científicas* (IIQ-CSIC), Sevilha, Espanha. Na figura 8 estão representadas as estruturas dos dendrímeros avaliados nesse trabalho.

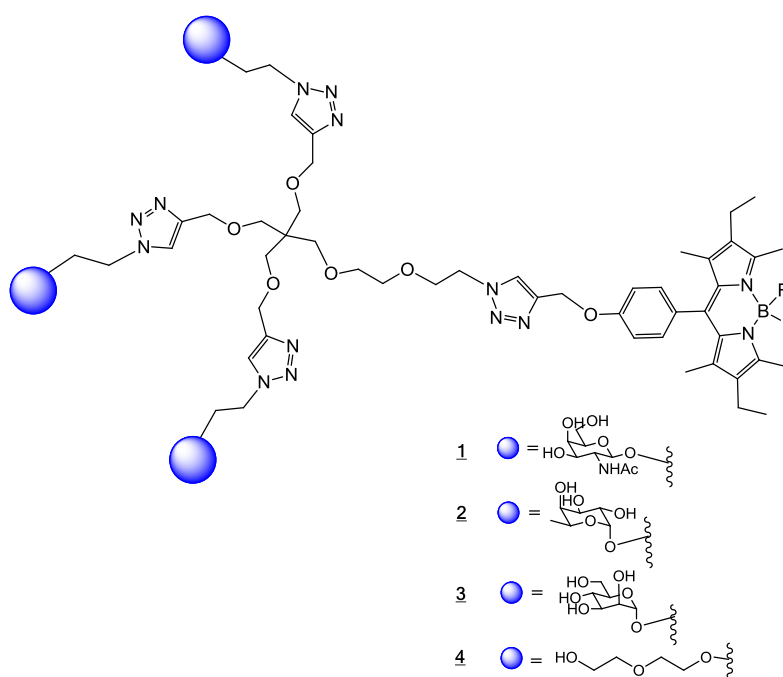


Figura 8- Esquema representando as estruturas químicas dos carboidratos dos glicodendrímeros e suas posições na molécula. 1) N-acetilgalactosamina; 2) L-fucose; 3) D-manose e 4) dietilenoglicol (controle).

3.2- Condições de cultivo

Os experimentos foram realizados com doze espécies fitoplanctônicas representando três classes taxonômicas: Bacillariophyceae (*Nitzschia* sp.), Charophyceae (*Staurastrum iotanun*, *Staurastrum leptocladum* e *Mougeoutia* sp.) e Chlorophyceae (*Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas* sp., *Pediastrum duplex*, *Pediastrum* sp., *Pediastrum boryanum*, *Coelastrum microporum*, *Coelastrum astroideum*, *Actinastrum hantzschii*) (Figura 9). As culturas fazem parte da coleção do Laboratório de Ficologia da UFMG e são mantidas em frascos de Erlenmeyer contendo 50 ml de meio WC em sala com temperatura (20 ± 1 °C) e luminosidade ($22 \pm 0,1$ μmol fótons $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) controladas. Os experimentos foram feitos com culturas na fase exponencial de crescimento, garantindo que os experimentos seriam realizados em condição de maior estabilidade quanto à estrutura e fisiologia dos organismos.

3.3- Exposição das espécies aos glicodendrímeros

Os experimentos seguiram o seguinte protocolo:

- 1- 1 mL de cada cultura foi retirado e centrifugado por 5 minutos a 13000 rpm em microcentrífuga (Eppendorf 5424). O sobrenadante foi descartado;
- 2- Em cada microtubo contendo o precipitado foram acrescentados 25 microlitros da solução aquosa do glicodendrímero utilizado. Todos os glicodendrímeros foram

solubilizados de forma que as soluções possuísem a mesma concentração (32 $\mu\text{mol/mL}$). O dendrímero controle foi preparado na mesma concentração;

3- Os microtubos contendo o precipitado e a solução do dendrímero foram mantidos a 24°C e ao abrigo da luz durante uma hora;

4- Após o período de exposição, o precipitado foi retirado e colocado em lâmina, coberto com lamínula, sendo as bordas da mesma vedada com o uso de resina. O processo de preparação das lâminas ocorreu sob baixa intensidade luminosa para evitar qualquer alteração ou degradação do fluoróforo;

5- As lâminas prontas foram analisadas em microscópio confocal.

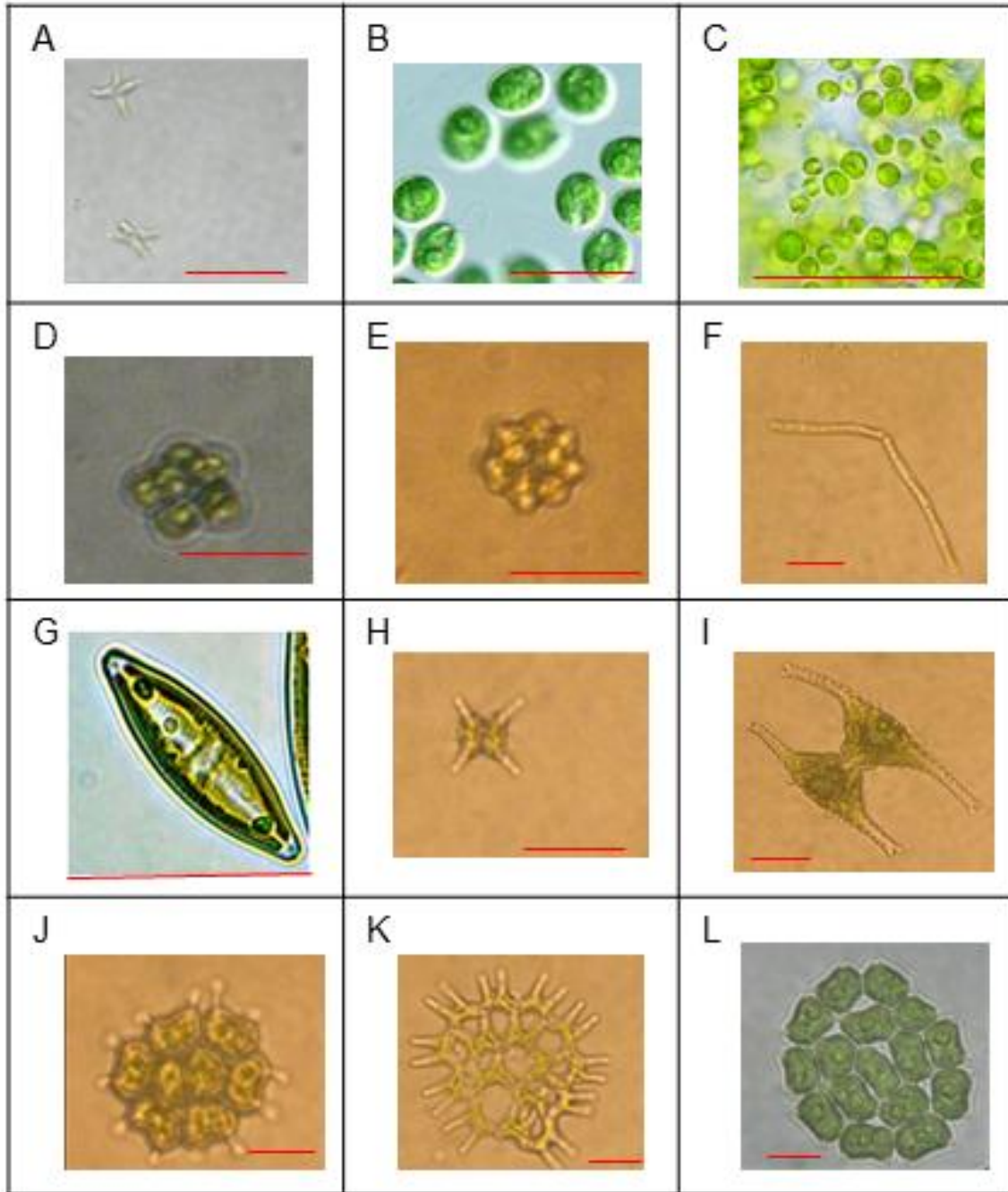


Figura 9- Aspecto geral das doze espécies estudadas sob microscopia óptica: *Actinastrum hantzschii* (A); *Chlamydomonas* sp. (B); *Chlorella vulgaris* (C); *Coelastrum astroideum* (D); *Coelastrum microporum* (E); *Mougeotia* sp. (F); *Nitzschia* sp. (G); *Staurastrum iotantum* (H); *Staurastrum leptocladum* (I); *Pediastrum boryanum* (J); *Pediastrum duplex* (K) e *Pediastrum* sp. (L). Escala: 20 μ m (linha vermelha). Fontes: <http://protist.i.hosei.ac.jp> (figuras b e g); <http://botany.natur.cuni.cz> (figura c); demais fotos: a autora.

3.4-Análise em microscopia confocal

As células expostas aos glicodendrímeros foram analisadas em um microscópio confocal Zeiss 5-live do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da UFMG (CAPI). O software utilizado para captura e processamento das imagens foi o ZEN-2009. Para processamentos adicionais às imagens, foi utilizado o software *LSM IMAGE BROWSER* (Zeiss).

Considerando os espectros de emissão e absorção do BODIPY-R6G mostrados anteriormente, foi utilizado o laser de 532 nm, que excita cerca de 80% desse fluoróforo (*Spectraviwer / Life Technologies*). Para separar as fluorescências do bodipy e da clorofila natural das células, foram utilizados dois filtros e dois canais. No canal utilizado para capturar a fluorescência do bodipy (canal 2), foi utilizado um filtro que recebe comprimentos de onda de 550 a 615 nm. Para captura da fluorescência da clorofila, foi necessário um segundo canal (Canal 3) que captura comprimentos de onda maiores. Para isso foi usado o filtro LP650. Na figura 10 estão representadas as faixas dos filtros utilizados para captura da autofluorescência das algas e da fluorescência do fluoróforo presente nos glicodendrímeros. Para ambos os canais, as fotografias confocais foram feitas sob *pinhole* de 1 *airyunits* (unidade de área).

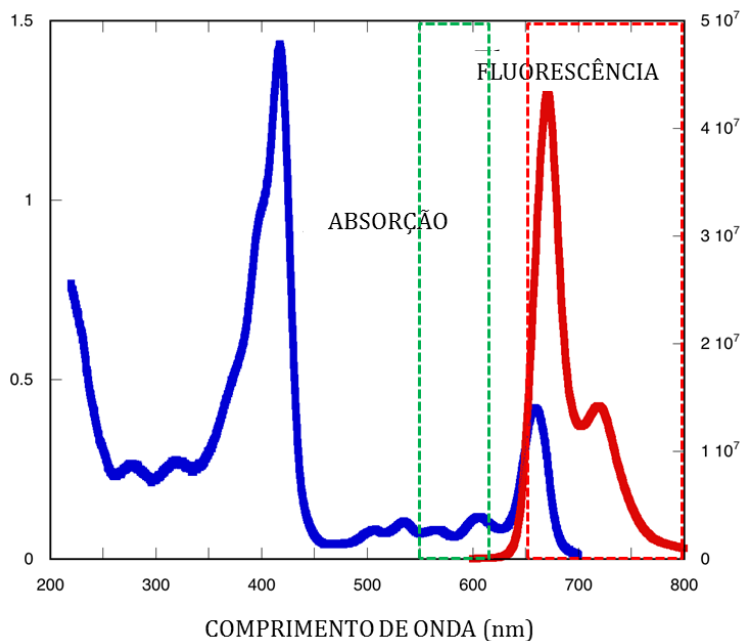


Figura 10- Representação esquemática das faixas dos filtros utilizados para captura da fluorescência do BODIPY R6G (linha tracejada verde: 550-615 nm) e da clorofila natural das células (linha tracejada vermelha: comprimentos igual e maiores que 650 nm).

3.5- Quantificação de fluorescência

Para comparar de modo mais preciso os resultados obtidos, foi feita a quantificação da fluorescência emitida pelas células marcadas. As medidas foram feitas no mesmo microscópio confocal utilizado na captura das imagens (5-live) e também no mesmo programa (ZEN- 2009). O programa permite a quantificação da fluorescência dentro de uma área demarcada. Para todas as espécies foram feitas medidas da emissão global do indivíduo, ou seja, a área demarcada para quantificação se limita ao tamanho de um indivíduo (Figura 11). Foram realizadas medidas em três indivíduos de cada espécie para cada glicodendrímico testado que apresentou marcação. Para espécies que apresentaram marcação heterogênea na superfície de um mesmo indivíduo, com regiões exibindo maior fluorescência do que outras, foram realizadas medidas separadas dessas áreas. Nesses casos, as medidas foram realizadas também em três indivíduos para cada glicodendrímico, sendo feitas três medidas de regiões

aparentemente mais marcadas e três regiões menos marcadas, totalizando seis medidas para cada indivíduo. As regiões delimitadas para essas quantificações foram definidas em um tamanho de $2 \mu\text{m}^2$, como mostrado na figura 12.

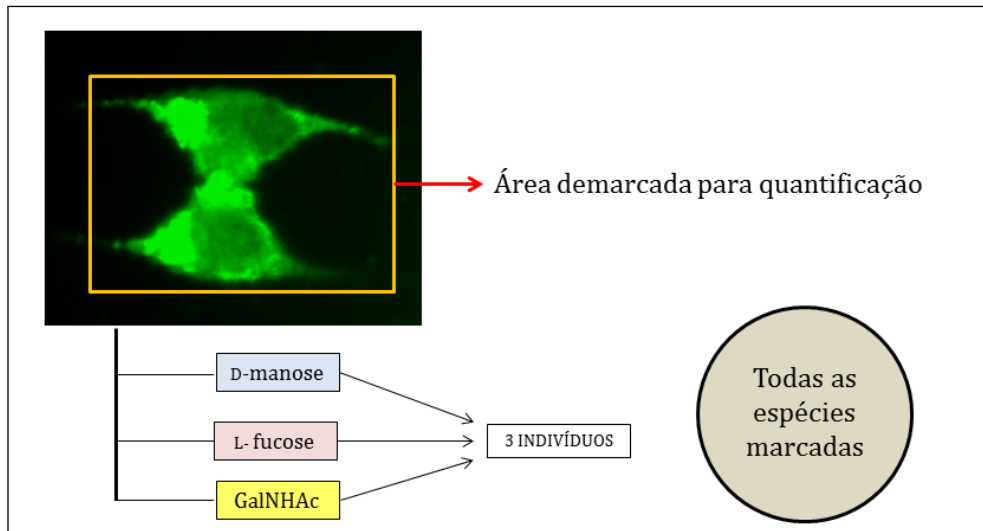


Figura 11-Esquema de quantificação de fluorescência para todo o indivíduo.

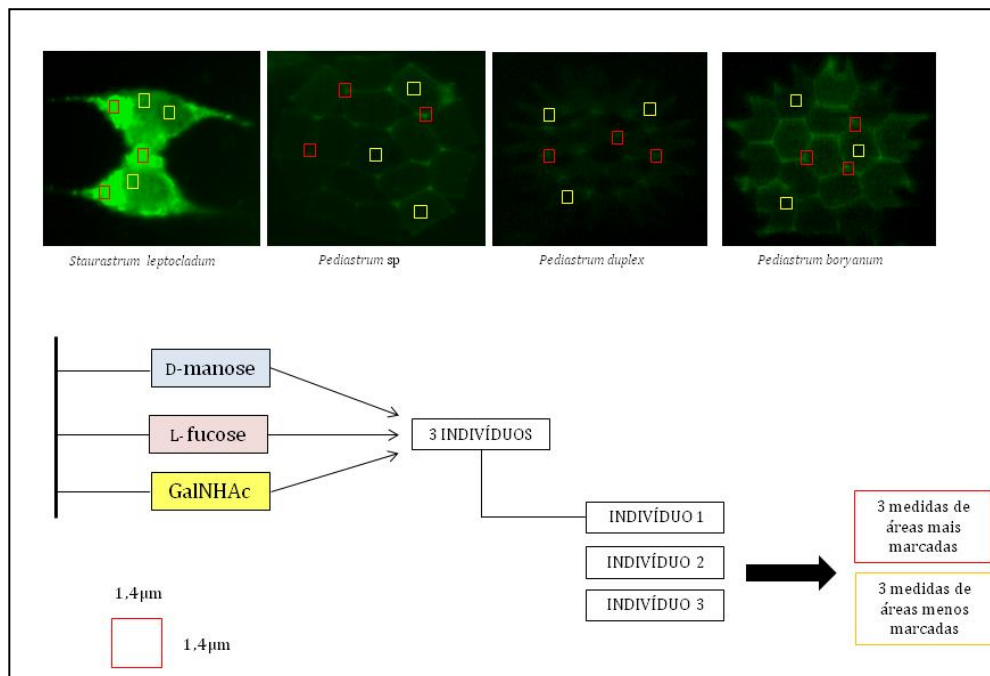


Figura 12-Esquema de quantificação de fluorescência de áreas mais marcadas (em vermelho) e menos marcadas (em amarelo) em *Staurastrum leptocladum*, *Pediastrum sp*, *Pediastrum duplex* e *Pediastrum boryanum*. A área demarcada possui medida de $\sim 2 \mu\text{m}^2$.

3.6- Análises estatísticas

As quantificações realizadas para todas as espécies (medida global da emissão de fluorescência por indivíduo) foram comparadas para verificar a existência de diferenças na intensidade de interação de cada espécie quanto aos glicodendrímeros testados. As quantificações foram comparadas para cada espécie por análise de variância de um fator (One-Way ANOVA). Nos casos em que foram verificadas diferenças significativas ($P < 0,05$), foi aplicado, *a posteriori*, o teste de comparação de médias de Tukey, permitindo verificar quais tratamentos distinguiram dos demais. Todas essas análises foram realizadas somente após avaliação e verificação de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade dos dados (teste de Brown-Forsythe). As quantificações em diferentes áreas para *S. leptocladum*, *Pediastrum* sp., *P. boryanum* e *P. duplex* foram comparadas por espécie e para cada glicodendrímero, por meio do teste-T de Student. Os testes foram realizados utilizando o programa estatístico Sigma stat, versão 3.5 de 2007.

4- RESULTADOS

4.1- Expressão de receptores de carboidratos

O glicodendrímero de *N*-acetilgalactosamina foi o que apresentou o maior número de interações positivas, enquanto L-fucose foi o que menos interagiu com as superfícies das células. O dendrímero controle não interagiu com nenhuma das doze espécies testadas.

4.2- Diversidade molecular espécie-específica

Foi evidenciada uma diversidade bioquímica expressa na superfície das células avaliadas. Nas classes das clorofíceas e carofíceas foram obtidos resultados variados entre as espécies (Tabela 1). *Staurastrum leptocladum* apresentou receptores para todos os carboidratos, mas de maneiras distintas. Para o dendrímero de D-manose houve uma cobertura completa de toda a superfície da célula, enquanto que os dendrímeros de *N*-acetilgalactosamina ou L-fucose interagem apenas com a parte mais central da célula, sendo que as extremidades (braços) não foram marcadas por esses carboidratos (Figura 13). Outra espécie do mesmo gênero, *Staurastrum iotantum*, apresentou um padrão de interação diferente. Dois glicodendrímeros (um de D-manose e outro de *N*-acetilgalactosamina) interagiram com toda a superfície da célula, no entanto, o dendrímero de L-fucose não apresentou interação (Figura 14). *Coelastrum microporum* apresentou receptores para dois dos três glicodendrímeros testados (de D-manose e de *N*-acetilgalactosamina) (Figura 15). Outra espécie do mesmo gênero, *Coelastrum astroideum*, não apresentou interação com nenhum dos glicodendrímeros (Figura 16). *Mougeotia* sp. também não interagiu com nenhum dos glicodendrímeros (Figura 17). *Chlamydomonas* sp. apresentou interação positiva com dois dos glicodendrímeros (o de *N*-acetilgalactosamina e o de D-manose) e não interagiu com o glicodendrímero de L-fucose (Figura 18). *Chlorella vulgaris* apresentou interação positiva apenas para o glicodendrímero de *N*-acetilgalactosamina (Figura 19), o mesmo resultado foi observado em *Actinastrum hantzschii* (Figura 20).

As espécies *Pediastrum duplex* e *Pediastrum boryanum* apresentaram interações apenas com os glicodendrímeros de *N*-acetilgalactosamina e de D-manose (Figuras 21 e 22), enquanto que *Pediastrum* sp. interagiu com todos os glicodendrímeros avaliados sp.(Figura 23).

A espécie *Nitzschia* sp., representante da classe das bacilariofíceas, apresentou interação positiva com o glicodendrímero de *N*-acetilgalactosamina ou de L-fucose, mas não interagiu com o glicodendrímero de D-manose (Figura 24).

As figuras 13 a 24 estão organizadas de forma que: na primeira linha são apresentados os resultados das interações para o dendrímero controle. Nas linhas seguintes estão os resultados para os glicodendrímeros de L-fucose, ou de D-manose ou de *N*-acetilgalactosamina, nessa ordem. A primeira coluna contém as fotografias da fluorescência natural das células conferida pela clorofila. Na segunda coluna é apresentada apenas a fluorescência do glicodendrímero aderido à superfície celular, conferida pelo fluoróforo BODIPY. Na terceira coluna encontram-se as fotografias mescladas para as duas fluorescências. A escala das fotografias é a mesma, aparecendo sempre na última fotografia da última linha.

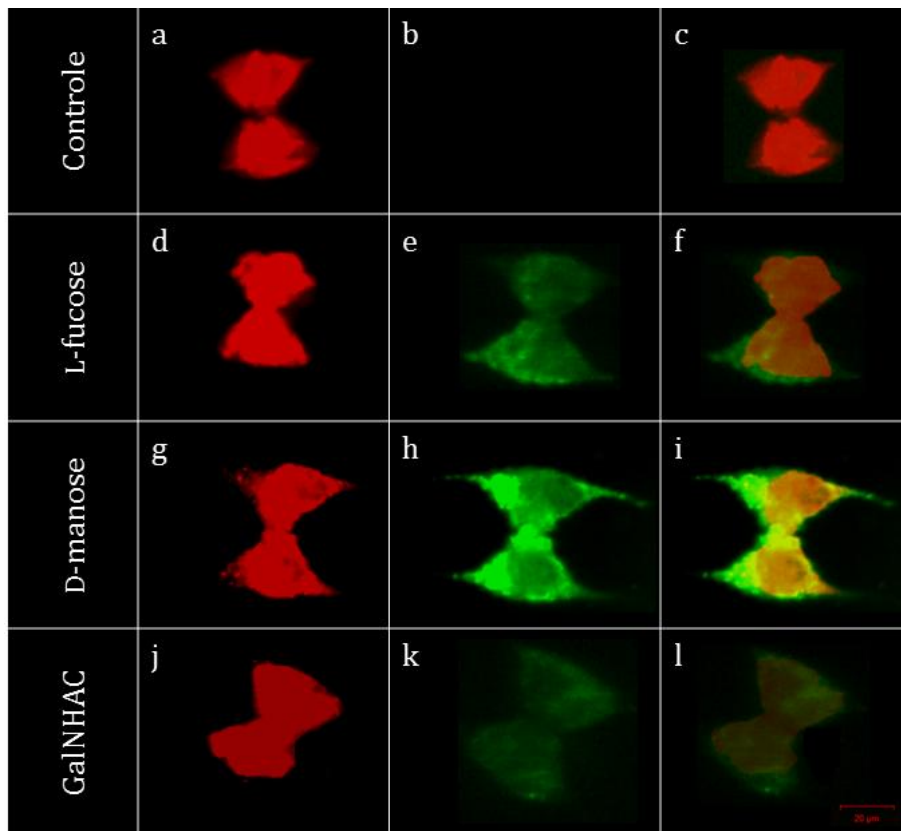


Figura 13- Fotografias de microscopia confocal de *Staurastrum leptocladum* mostrando a interação dessa espécie com os glicodendrímeros. Dendrímero controle (a,b,c). L-fucose (d,e,f). D-manose (g,h,i) N-acetilgalactosamina (j,k,l). Em vermelho: fluorescência da clorofila, em verde fluorescência dos dendrímeros.

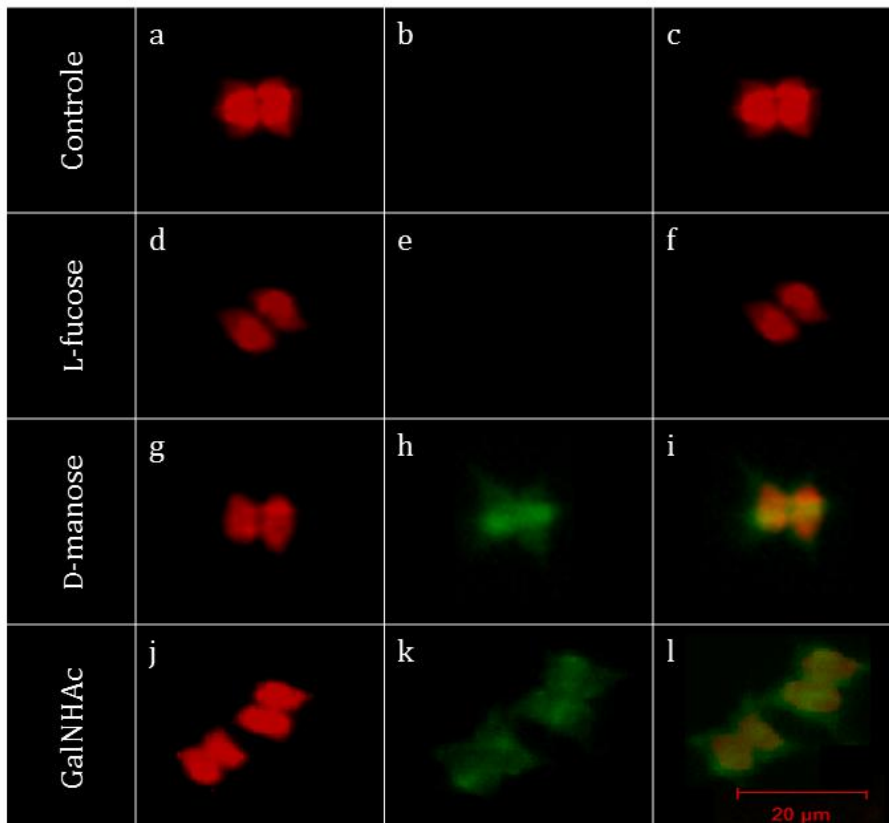


Figura 14- Fotografias de microscopia confocal de *Staurastrum iotatum* mostrando a interação dessa espécie com os glicodendrímeros. Dendrímero controle (a,b,c). L-fucose (d,e,f). D-manose (g,h,i) N-acetilgalactosamina (j,k,l). Em vermelho: fluorescência da clorofila, em verde fluorescência dos dendrímeros.

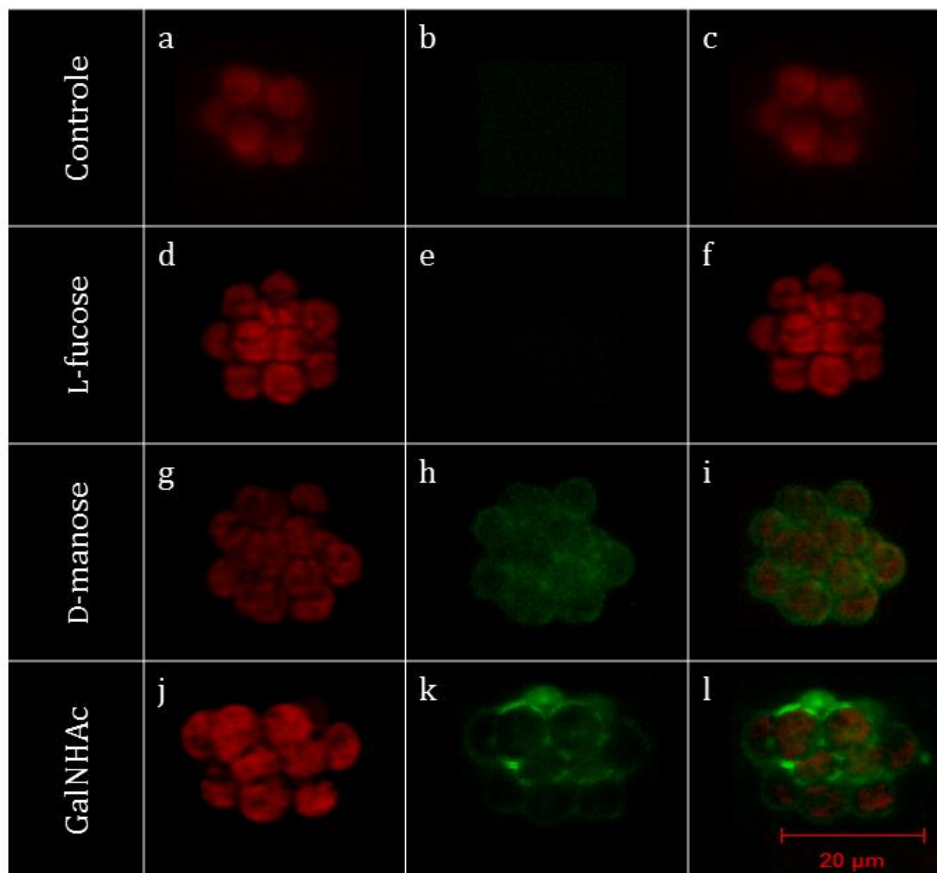


Figura 15-Fotografias de microscopia confocal de *Coelastrum microporum* mostrando a interação dessa espécie com os glicodendrímeros. Dendrímero controle (a,b,c). L-fucose (d,e,f). D-manose (g,h,i) N-acetilgalactosamina (j,k,l). Em vermelho: fluorescência da clorofila, em verde fluorescência dos dendrímeros.

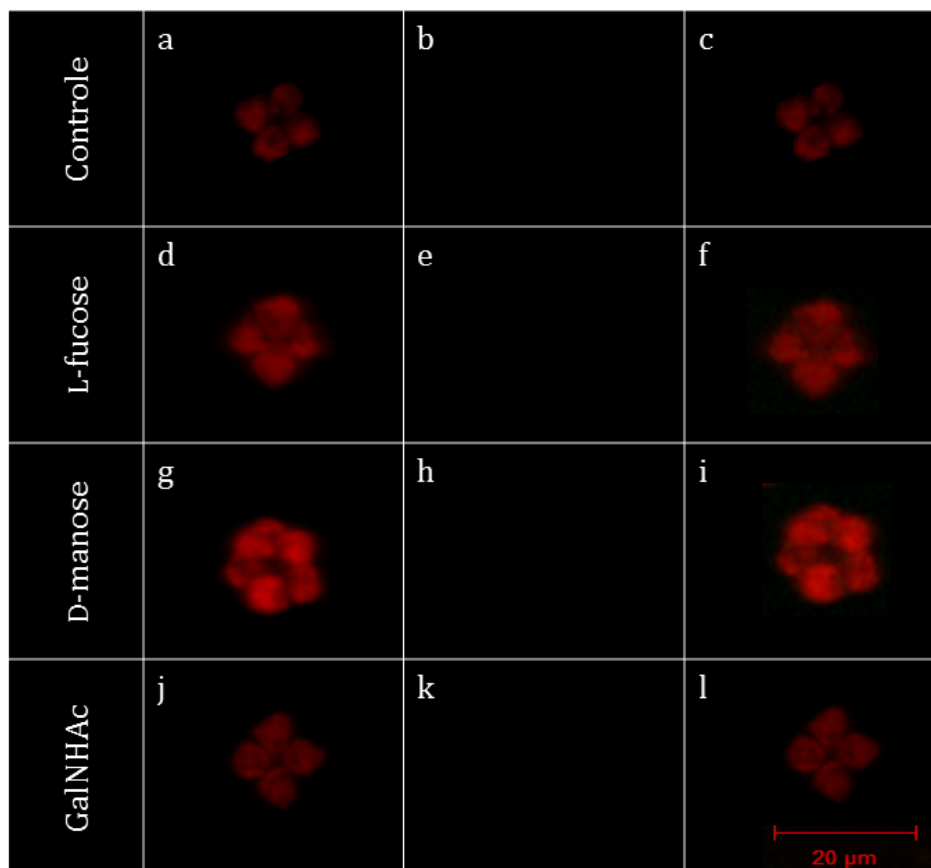


Figura 16- Fotografias de microscopia confocal de *Coelastrum astroideum* mostrando a interação dessa espécie com os glicodendrímeros. Dendrímero controle (a,b,c). L-fucose (d,e,f). D-manose (g,h,i) N-acetilgalactosamina (j,l,m). Em vermelho: fluorescência da clorofila, em fluorescência dos dendrímeros.

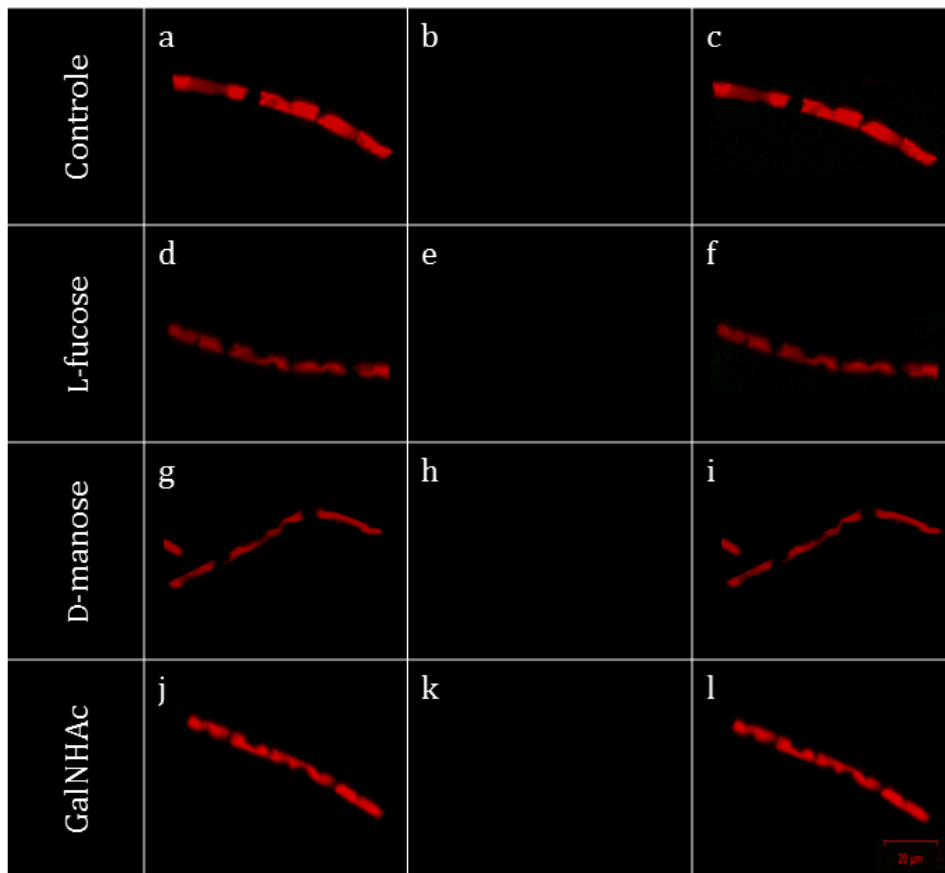


Figura 17- Fotografias de microscopia confocal de *Mougeotia* sp mostrando a interação dessa espécie com os glicodendrimeros. Dendrimeros controle (a,b,c). L-fucose (d,e,f). D-manose (g,h,i) N-acetilgalactosamina (j,k,l). Em vermelho: fluorescência da clorofila, em verde fluorescência dos dendrimeros.

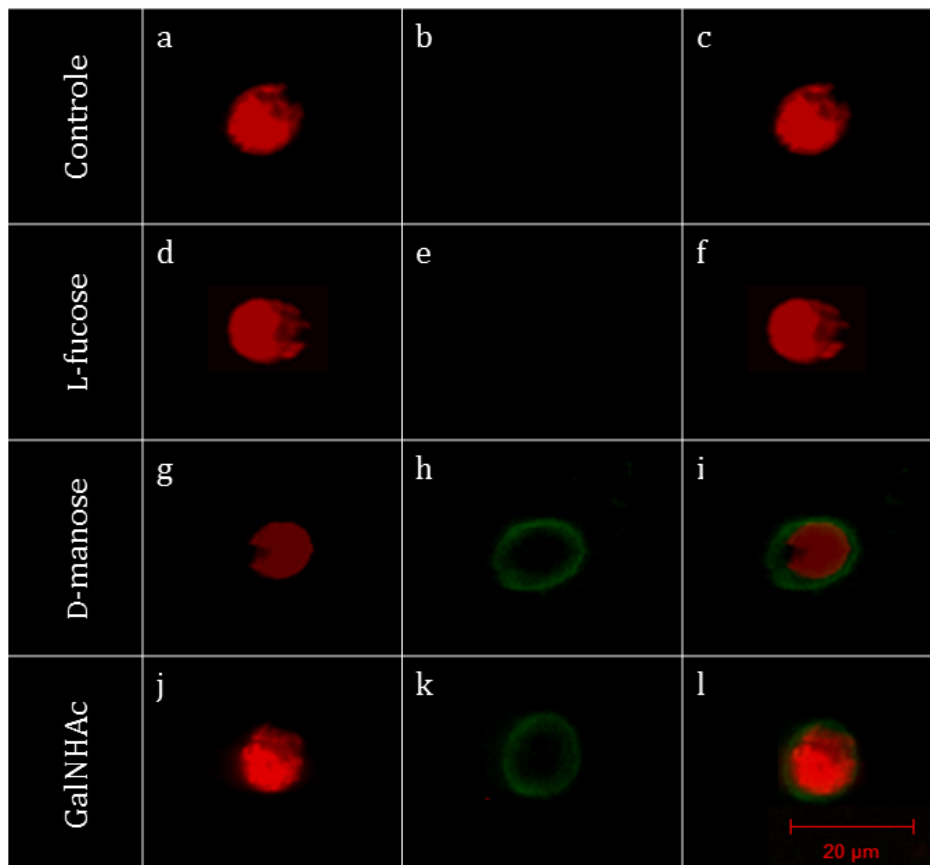


Figura 18- Fotografias de microscopia confocal de *Chlamydomonas* sp mostrando a interação dessa espécie com os glicodendrimeros. Dendrimeros controle (a,b,c). L-fucose (d,e,f). D-manose (g,h,i) N-acetilgalactosamina (j,k,l). Em vermelho: fluorescência da clorofila; em verde: fluorescência dos dendrimeros.

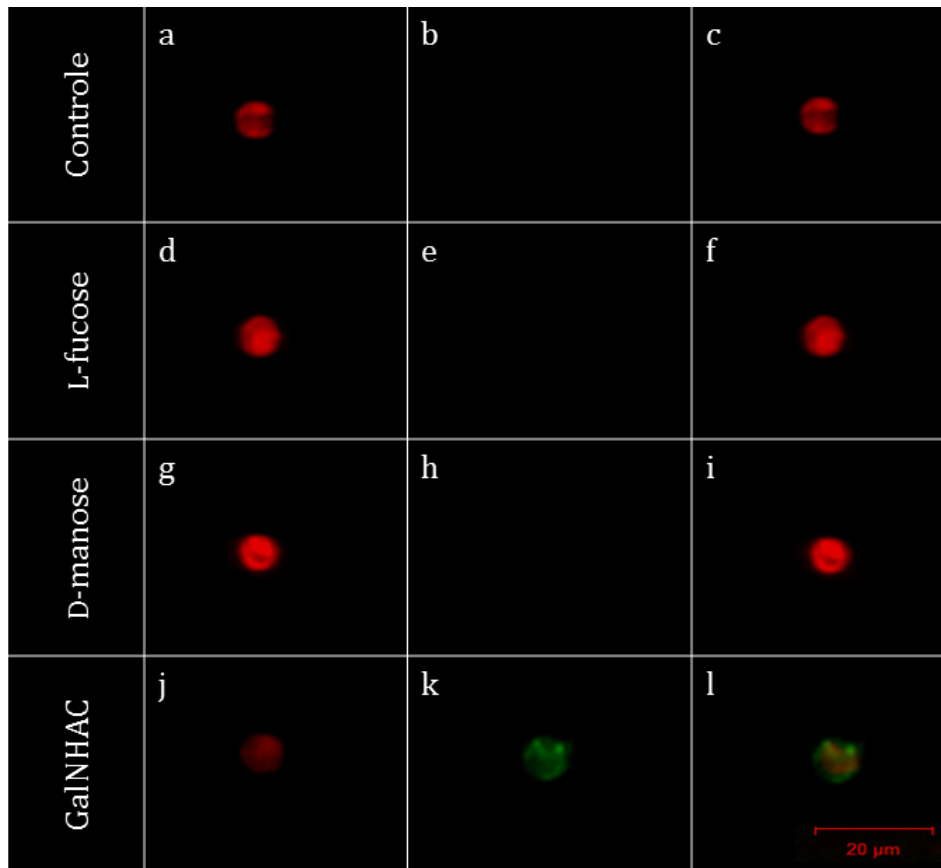


Figura 19- Fotografias de microscopia confocal de *Chlorella vulgaris* mostrando a interação dessa espécie com os glicodendrimeros. Dendrimeros controle (a,b,c). L-fucose (d,e,f). D-manose (g,h,i) N-acetilgalactosamina (j,k,l). Em vermelho: fluorescência da clorofila , em verde fluorescência dos dendrimeros.

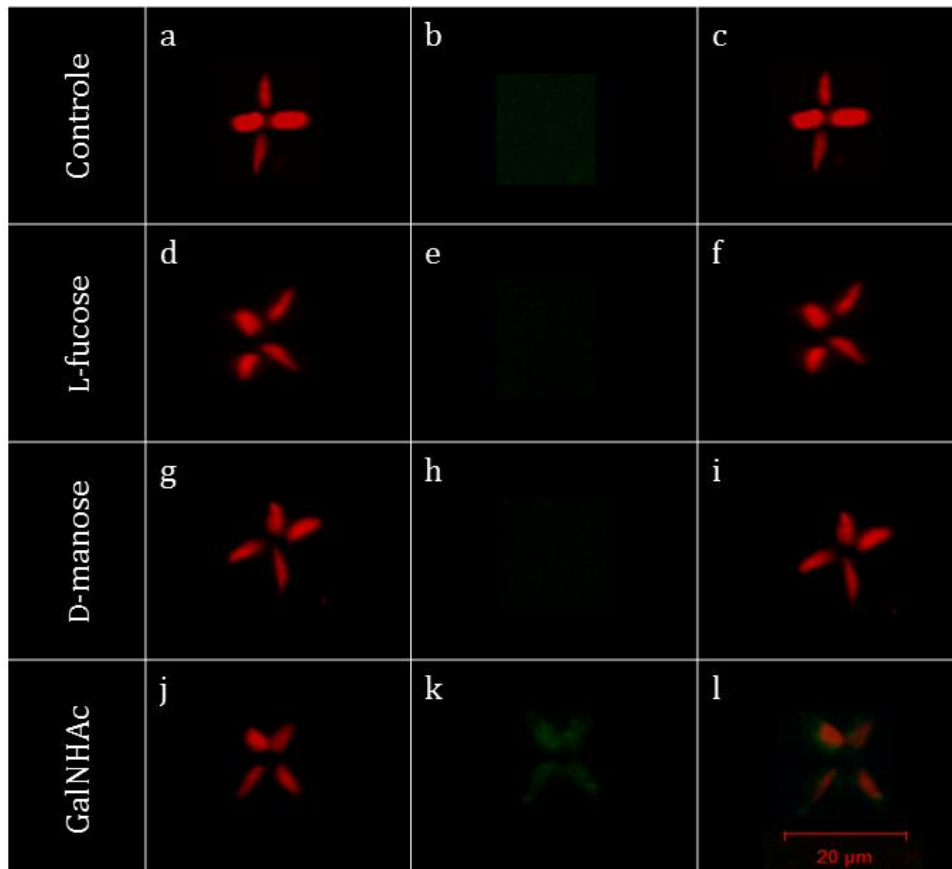


Figura 20- Fotografias de microscopia confocal de *Actinastrum hantzschii* mostrando a interação dessa espécie com os glicodendrimeros. Dendrimeros controle (a,b,c). L-fucose (d,e,f). D-manose (g,h,i) N-acetilgalactosamina (j,k,l). Em vermelho: fluorescência da clorofila , em verde fluorescência dos dendrimeros.

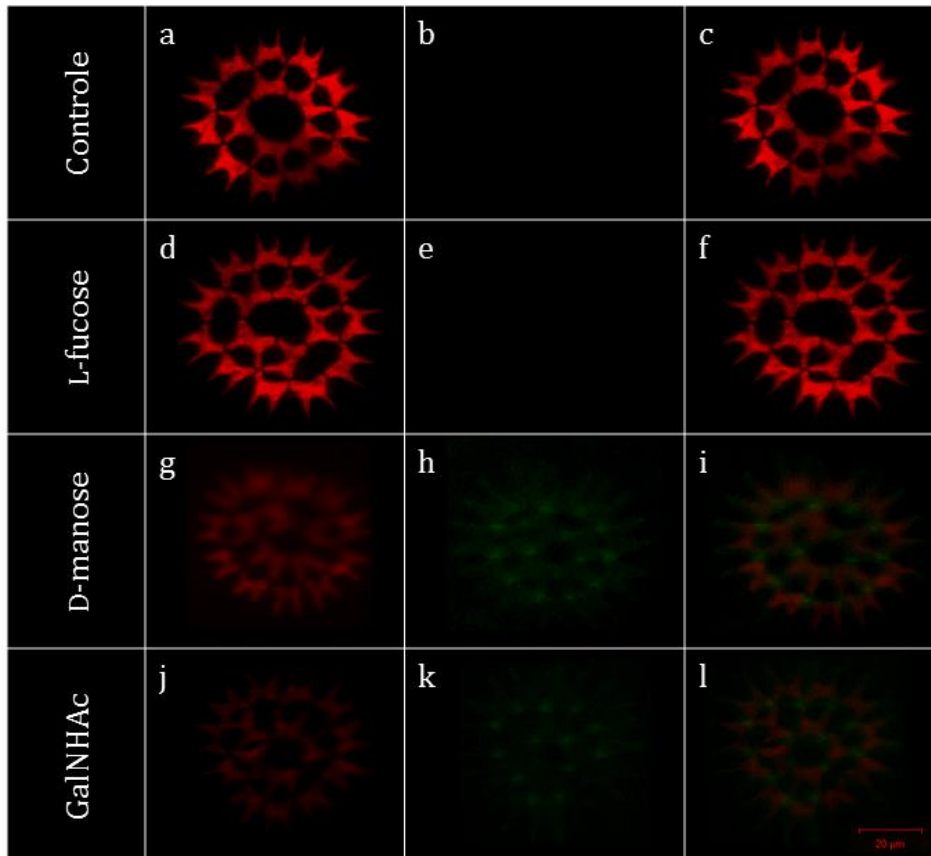


Figura 21- Fotografias de microscopia confocal de *Pediatrum duplex* mostrando a interação dessa espécie com os glicodendrimeros. Dendrimeros controle (a,b,c). L-fucose (d,e,f). D-manose (g,h,i) N-acetilgalactosamina (j,k,l). Em vermelho: fluorescência da clorofila; em verde: fluorescência dos dendrimeros.

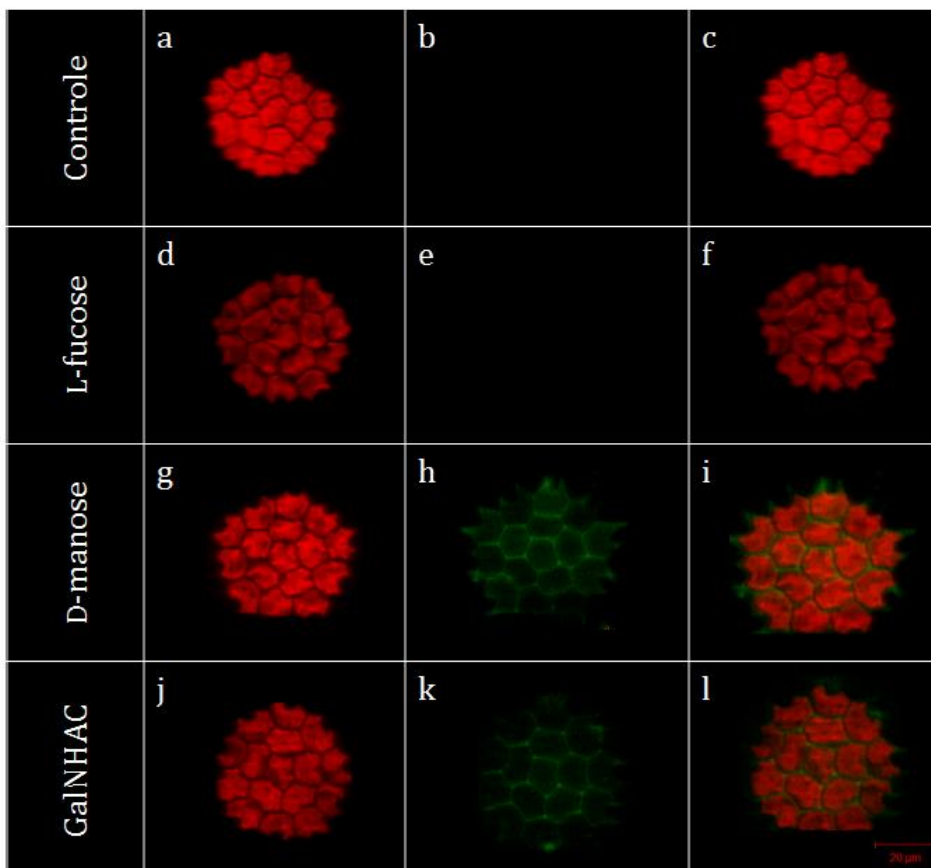


Figura 22- Fotografias de microscopia confocal de *Pediatrum boryanum* mostrando a interação dessa espécie com os glicodendrimeros. Dendrimeros controle (a,b,c). L-fucose (d,e,f). D-manose (g,h,i) N-acetilgalactosamina (j,k,l). Em vermelho: fluorescência da clorofila; em verde: fluorescência dos dendrimeros.

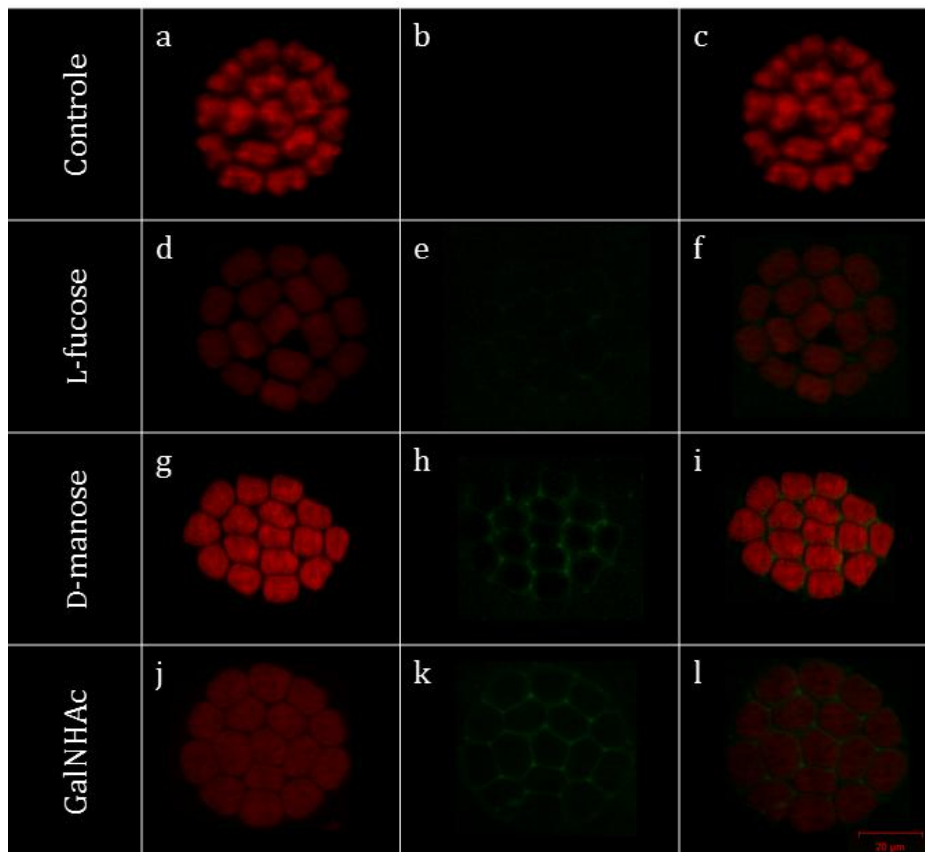


Figura 23- Fotografias de microscopia confocal de *Pediastrum* sp mostrando a interação dessa espécie com os glicodendrimeros. Dendrimeros controle (a,b,c). L-fucose (d,e,f). D-manose (g,h,i) N-acetilgalactosamina (j,k,l). Em vermelho: fluorescência da clorofila; em verde: fluorescência dos dendrimeros.

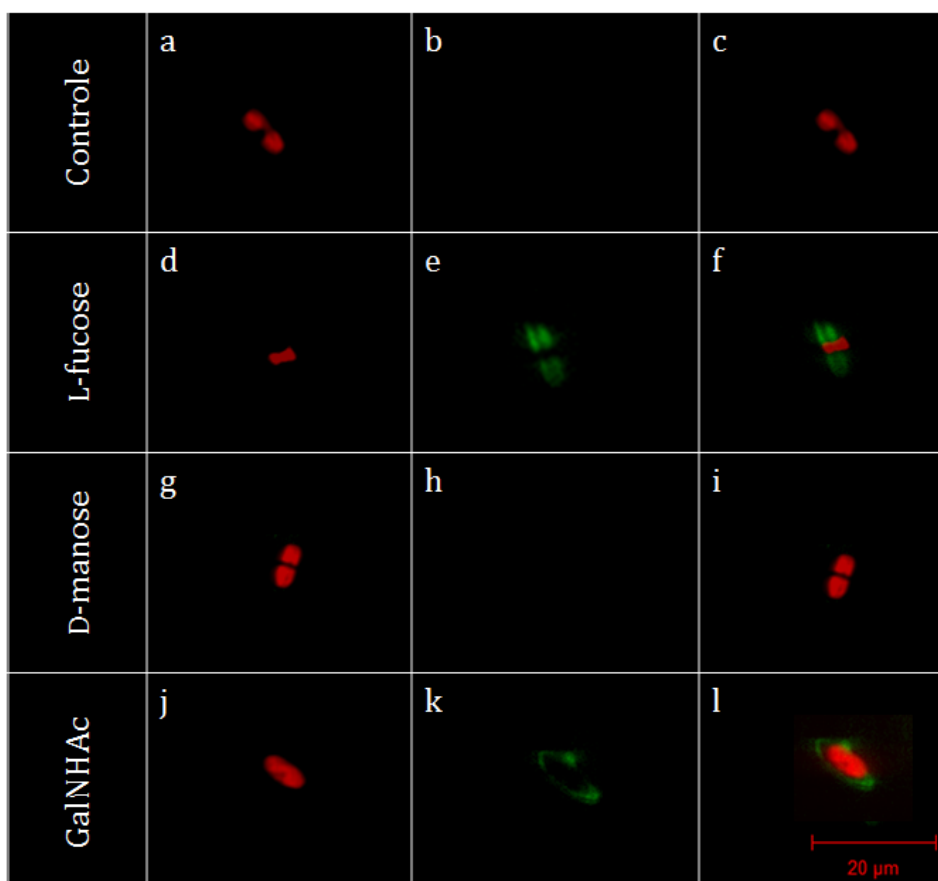


Figura 24- Fotografias de microscopia confocal de *Nitzschia* sp mostrando a interação dessa espécie com os glicodendrímeros. Dendrímero controle (a,b,c). L-fucose (d,e,f). D-manose (g,h,i) *N*-acetilgalactosamina (j,k,l). Em vermelho: fluorescência da clorofila; em verde: fluorescência dos dendrímeros.

Tabela 1- Resultados das interações entre os glicodendrímeros e as espécies.

Classe	Espécie	Glicodendrímero			Controle
		D-manose	GalNHAc	L-fucose	dietilenoglicol
Chlorophyceae	<i>Actinastrum hantzschii</i>	-	+	-	-
Chlorophyceae	<i>Chlorella vulgaris</i>	-	+	-	-
Chlorophyceae	<i>Chlamydomonas</i> sp.	+	+	-	-
Chlorophyceae	<i>Coelastrum microporum</i>	+	+	-	-
Chlorophyceae	<i>Pediastrum duplex</i>	+	+	-	-
Charophyceae	<i>Staurastrum iotantum</i>	+	+	-	-
Chlorophyceae	<i>Pediastrum boryanum</i>	+	+	-	-
Chlorophyceae	<i>Pediastrum</i> sp.	+	+	+	-
Charophyceae	<i>Staurastrum leptocladum</i>	+	+	+	-
Charophyceae	<i>Mougeotia</i> sp.	-	-	-	-
Chlorophyceae	<i>Coelastrum astroideum</i>	-	-	-	-
Bacillariophyceae	<i>Nitzschia</i> sp.	-	+	+	-

O símbolo + representa a presença de interação entre o dendrímero e a espécie testada, enquanto que o símbolo - indica ausência de interação. Espécies marcadas com as mesmas cores mostram resultados semelhantes entre as espécies.

GalNHAc: *N*-acetilgalactosamina.

4.3- Quantificação de Fluorescência

Os resultados obtidos com a quantificação da fluorescência dos glicodendrímeros aderidos na superfície celular estão sumarizados nas figuras 25 e 26. Considerando as quantificações da fluorescência global por indivíduo, nota-se que em *Staurastrum leptocladum* houve diferença significativa ($P = 0,013$) apenas entre o glicodendrímero de D-manose e o controle. Para os demais glicodendrímeros foram observados valores intermediários de fluorescência, não sendo significativamente diferentes tanto do controle, quanto dos valores registrados para o glicodendrímero de D-manose. Para *S. iotantum*, a interação com o glicodendrímero de GalNHAC diferiu do de L-fucose e do dendrímero controle ($P = 0,038$), mas não apresentou diferença em relação à interação com o glicodendrímero de D-manose. A interação de *C. microporum* com o glicodendrímero de GalNHAC ou de D-manose foram iguais entre si, mas ambos diferiram do glicodendrímero de L-fucose ($P = 0,002$). Para *C. vulgaris*, a interação com o glicodendrímero de GalNHAC foi significativamente diferente daquela observada com os outros glicodendrímeros ($P < 0,001$), os quais, por sua vez, foram iguais entre si e ao controle. O mesmo resultado foi obtido para *Chlamydomonas* sp. e *Actinastrum hantzschii* ($P < 0,001$, para ambos.). As interações de *P. duplex* mostraram-se significativamente diferentes para todos os três glicodendrímeros ($P < 0,001$) sendo L-fucose foi igual ao controle. Para *Pediastrum* sp., as interações com os glicodendrímeros de D-manose ou de L-fucose diferiram significativamente ($P = 0,009$) em relação ao glicodendrímero de GalNHAc, mas foram

iguais entre si e ao controle. As interações de *P.boryanum* mostraram-se significativamente diferentes para o glicodendrímero de L-fucose e os demais dendrímeros (GalNHAc e D-manose) que por sua vez se mostraram iguais entre si ($P < 0,001$). Para a bacilariofícea *Nitzschia* sp., as interações com todos os glicodendrímeros mostraram-se significativamente distintas ($P < 0,001$), sendo que D-manose foi igual ao controle.

Os resultados das análises de áreas mais e menos marcadas estão apresentados nos gráficos da figura 27. Em *Staurastrum leptocladum*, apenas o glicodendrímero de D-manose apresentou diferenças significativas ($P = 0,004$) entre áreas mais marcadas e menos marcadas. O mesmo padrão foi observado para *Pediastrum duplex* ($P < 0,001$). Por outro lado, para as interações de todos os glicodendrímeros foram detectadas diferenças significativas entre áreas mais marcadas e menos marcadas em *Pediastrum* sp. ($P < 0,001$; $P = 0,035$ e $P < 0,001$ para o glicodendrímero de D-manose, ou de L-fucose ou de GalNHAc, respectivamente). Em *P. boryanum* apenas para as interações do glicodendrímero de GalNHAc foram detectadas diferenças significativas entre as áreas mais e menos marcadas ($P = 0,001$).

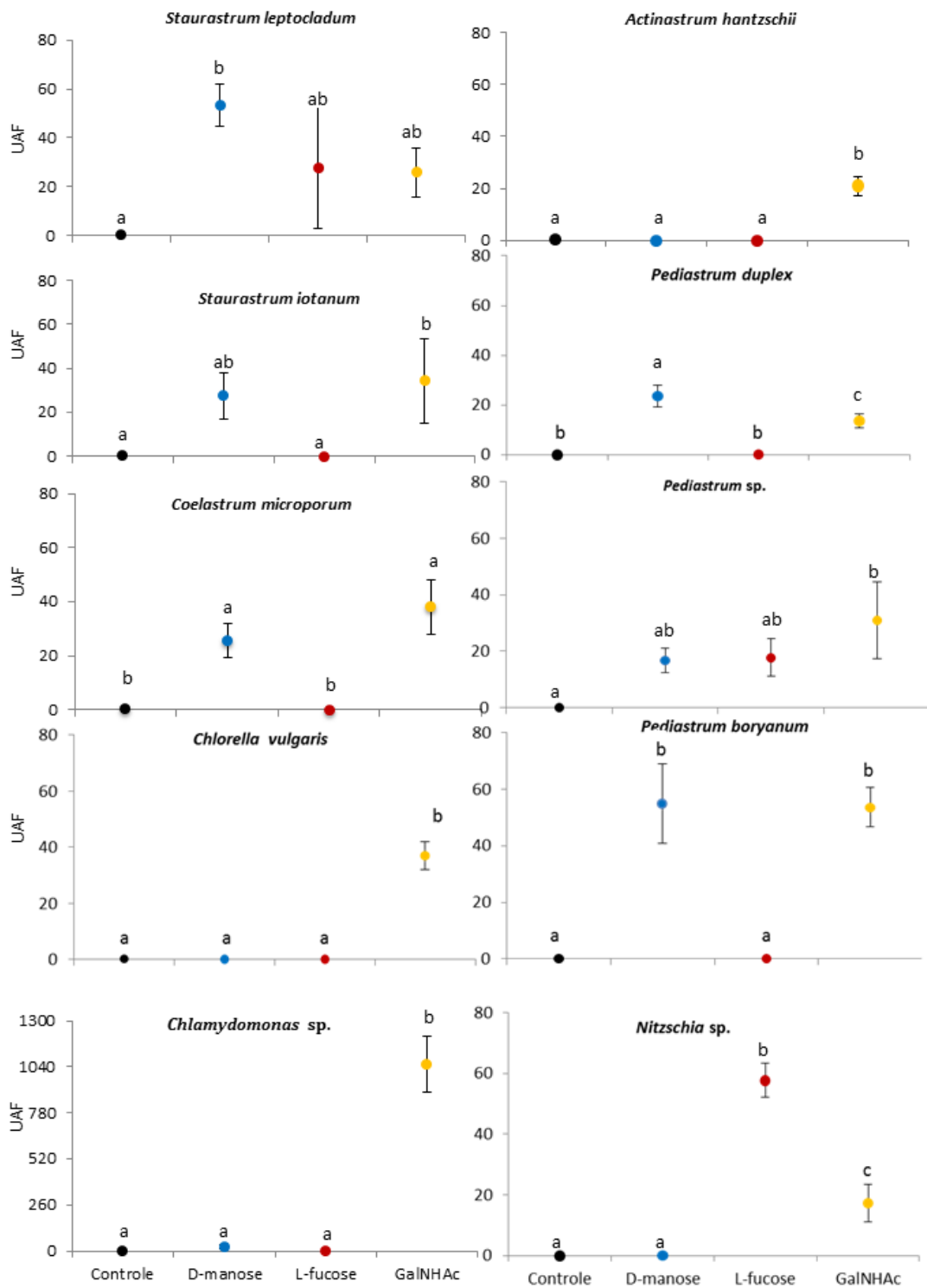


Figura 25- Comparação da fluorescência obtida para medidas global dos indivíduos. Os marcadores em preto representam o controle, os azuis representam o glicodendrímoro de D-manose, os vermelhos representam L-fucose e os amarelos o glicodendrímoro de GalNHAc. As barras indicam o desvio padrão enquanto que, as letras acima das barras indicam diferenças entre os dendrímoros de acordo com o teste de Tukey. UAF: Unidades arbitrárias de fluorescência.

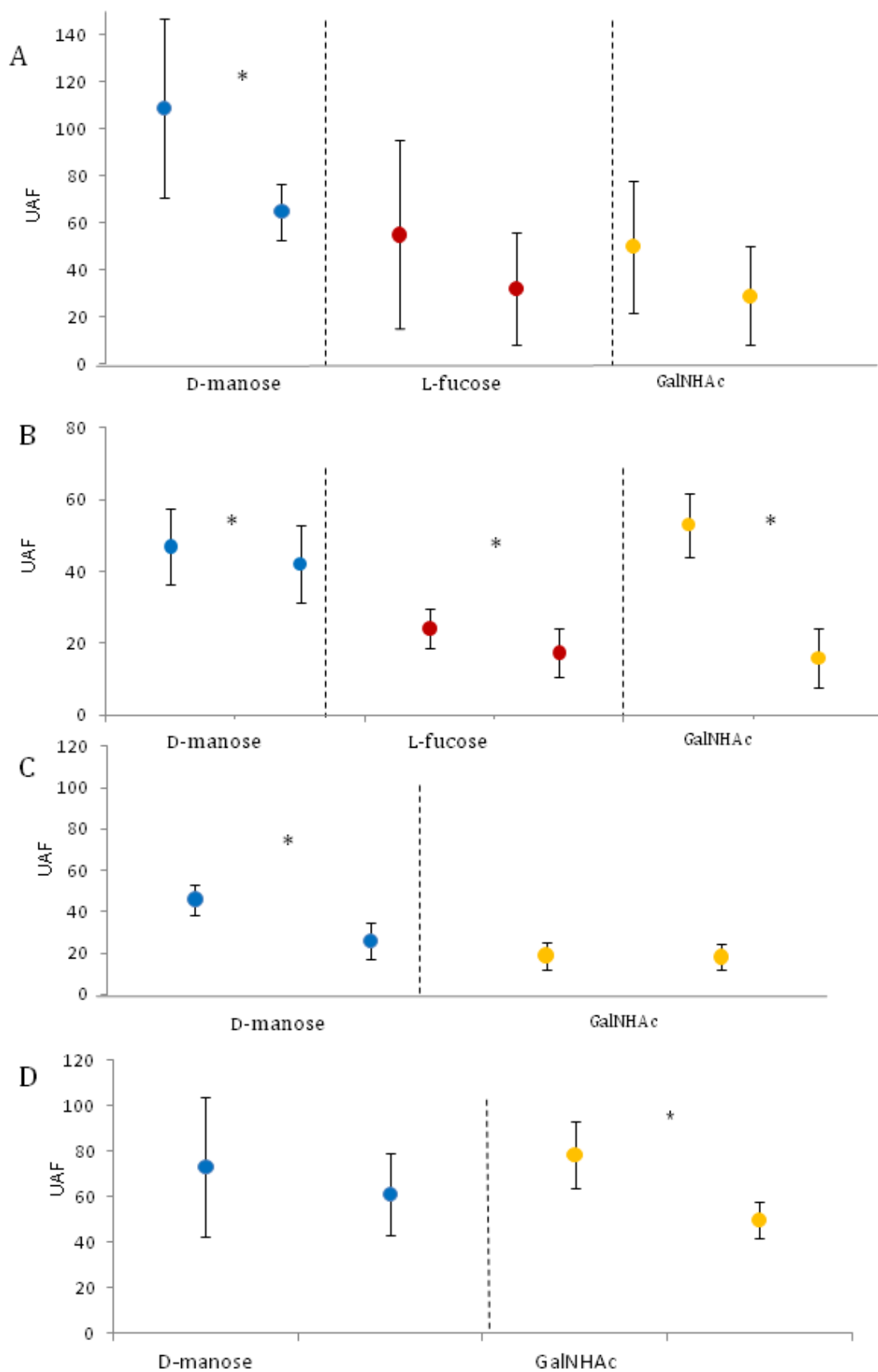


Figura 26- Comparação da quantificação de fluorescência obtida em áreas distintas dos mesmos indivíduos de *S. leptocladum* (A) *Pediastrum* sp (B), *P. duplex* (C) e *P. boryanum* (D). Os marcadores em azul representam o glicodendrîmero de D-manose, os vermelhos representam L-fucose e os amarelos o glicodendrîmero de GalNHAc. O asterisco indica que houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as áreas mais e menos marcadas pelo glicodendrîmero.

5- DISCUSSÃO

O dietilenoglicol é uma molécula que mimetiza os carboidratos na forma como estes são solvatados em meio aquoso, condição importante para a interação com as lectinas. A ausência de interações entre o dietilenoglicol e as espécies estudadas reforçou a utilidade desse dendrímero como controle, confirmando que as interações entre os glicodendrímeros e as espécies testadas se deram, de fato, pela porção glicídica dos mesmos e não por outra parte da molécula. O carboidrato *N*-acetilgalactosamina é encontrado na superfície celular de vários tipos de organismos e é conhecido por desempenhar funções importantes nos vertebrados. Essa molécula é comumente encontrada, por exemplo, em terminais de células nervosas de humanos e animais, onde participam da comunicação celular (Khowala *et al.*, 2008). A *N*-acetilgalactosamina é também encontrada nas células autotróficas, mas sendo considerada mais rara e com sua função exata ainda não esclarecida nesses organismos (Clarke & Wilson, 1988). Entretanto, das doze espécies estudadas, dez apresentaram interações positivas com o glicodendrímero de *N*-acetilgalactosamina e dessas, duas (*Chlorella vulgaris* e *Actinastrum hantzschii*) apresentaram interações positivas apenas para esse carboidrato. Portanto, considerando que este foi o carboidrato que apresentou o maior número de interações positivas com as espécies de microalgas testadas, é possível sugerir que a *N*-acetilgalactosamina desempenha funções importantes também nos organismos autotróficos, talvez sendo relacionadas ao reconhecimento e comunicação celular.

As interações menos comuns (três de doze espécies testadas) e geralmente menos intensas do glicodendrímero de L-fucose com as superfícies das espécies

estudadas podem estar relacionadas a uma menor importância deste carboidrato no reconhecimento via superfície de microalgas. Estudos anteriores com lectinas marcadas reforçam essa suposição por evidenciarem que, de maneira geral, as algas também não expressam esse carboidrato em sua superfície. A lectina TPA (*Tetragonolobus purpureus* agglutinin), específica em reconhecimento de resíduos de L-fucose, interagiu somente com uma de cinco espécies de protistas heterotróficos testadas em outro estudo (Roberts *et al.*, 2006) sugerindo que esse carboidrato não é comum nas superfícies celulares desse grupo de organismos. Considerando-se que tanto a L-fucose quanto a lectina que o reconhece são incomuns nas algas estudadas, nota-se que o papel dessa interação no reconhecimento e na comunicação entre células deve ser mínimo, principalmente para as relações intra-específicas.

É possível que as mesmas tendências sejam observadas também entre as algas, uma vez que estas tiveram origem a partir de endossimbioses envolvendo protistas heterotróficos fagocitando organismos autotróficos (Zimorski *et al.*, 2014). No entanto, em outros organismos, como bactérias, o carboidrato de L-fucose já foi descrito como tendo certa importância em processos de interação e reconhecimento celular. Em *Vibrio cholerae*, por exemplo, receptores de L-fucose são responsáveis por viabilizar a infecção em células humanas e de animais domésticos por meio do reconhecimento de resíduos de L-fucose nas superfícies celulares desses hospedeiros (Ofek & Beachey, 1978).

As interações envolvendo os dendrímeros de D-manose e as algas estudadas mostraram-se mais comuns (sete de doze espécies) do que as interações envolvendo os dendrímeros de L-fucose. Em *S. leptocladum* (Chlorophyta, Charophyceae), observou-se que a superfície da célula foi completamente coberta pelo glicodendrímero de D-manose, sugerindo que esse carboidrato deve participar do

reconhecimento entre células, já que até mesmo as extremidades foram marcadas. Embora não muito conhecida para as microalgas testadas nesse trabalho, a interação entre lectinas e resíduos de manose já foi descrita em muitos outros organismos, incluindo aqueles pertencentes a outras classes ou mesmo reinos. A aderência de *Escherichia coli* em tecidos de mamíferos, por exemplo, é viabilizada por receptores de D-manose (Iman *et al.*, 1984), bem como o reconhecimento do vírus HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) pelas células dendríticas humanas (Spear *et al.*, 2003).

Uma vez que as interações entre *S. leptocladum* e os outros glicodendrímeros, N-acetilgalactosamina e L-fucose, foram evidenciadas apenas nas partes mais centrais dos indivíduos, é possível sugerir que esses carboidratos tenham um papel menos importante no reconhecimento de outras células. Além disso, a intensidade das interações com esses carboidratos foram fracas ao ponto de, nas comparações estatísticas para a fluorescência global dos indivíduos, não diferirem significativamente do controle, sendo que essas análises evidenciaram também que o dendrímero de D-manose foi o único que apresentou diferença significativa em relação ao controle. Os resultados comparando a intensidade da interação em diferentes partes dos indivíduos mostraram que o dendrímero de D-manose também foi o único a apresentar diferenças significativas, sendo a intensidade da interação maior nos braços de *S. leptocladum*. Além disso, estas medidas separadas confirmam que o dendrímero de D-manose interage mais intensamente com as regiões mais periféricas da célula do que com sua região mais central. Em *Pediastrum* sp., as interações parecem se concentrar nos pontos de conexão entre células para todos os carboidratos testados, principalmente para o glicodendrímero de D-manose e o de N-acetilgalactosamina. De fato, as análises estatísticas comparando a intensidade de fluorescência em diferentes partes do indivíduo mostraram que esses carboidratos apresentaram interações mais fortes nessas regiões, resultado similar ao observado para L-fucose, ainda que este tenha

interagido em menor intensidade, o que foi observado pela menor intensidade de fluorescência global do indivíduo marcado. A maior intensidade das interações observadas nas regiões de conexão entre células sugerem que existe um maior número de receptores glicídicos nessas regiões. Como algumas lectinas são também CAMs (Cell adhesion molecules), sua interação com carboidratos pode estar relacionada com o reconhecimento de outras células do mesmo indivíduo. Isso permitiria a adesão entre as mesmas para viabilizar, por exemplo, a formação de colônias. Essa função ocorre em outros organismos multicelulares (Espinosa *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2007), como os líquens ou outros simbiotes, nos quais se observa que o reconhecimento entre as células ou indivíduos se dá via interação lectina-carboidrato (Vicente, 2009).

Muitos estudos identificaram D-manose e N-acetilgalactosamina como sendo carboidratos comuns na superfície de diversas espécies (Roberts *et al.*, 2006; Martin-Cereceda *et al.*, 2007). Considerando que das doze espécies avaliadas nesse estudo, dez interagiram com N-acetilgalactosamina e sete interagiram com D-manose, é possível que receptores para estes carboidratos também tenham uma distribuição ampla entre as algas. Para as espécies coloniais, as interações frequentemente foram mais intensas nos pontos de contato entre células, como observado para a interação entre o glicodendrímero de GalNHAC e *P. boryanum*. Isso sugere que os receptores para esse carboidrato são encontrados em maior quantidade nessas regiões. Com função mais conhecida, o carboidrato D-manose é comumente descrito em processos de interação e reconhecimento celular para uma grande variedade de organismos (East & Isacke, 2002), o que deve estar relacionado ao fato das interações deste carboidrato terem sido mais intensas nos pontos de contato entre as células das colônias de *P. duplex*. Resíduos de manose têm sido reportados em uma variedade de dinoflagelados, diatomáceas, primnesiófitas e outros protistas, detectados por meio de

interações com concanavalina A, uma lectina de reconhecimento específico para esse carboidrato (Kremp & Anderson, 2004; Wootton *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2006).

Nitzschia sp., a espécie representante da classe Bacillariophyceae, não apresentou interação com o glicodendrímico de D-manose, sugerindo que não há receptores para este carboidrato em sua superfície celular. É interessante notar que em um estudo de Martin-Cereceda e colaboradores (2007), os autores avaliaram a composição de carboidratos da superfície de outra Bacillariophyceae (*Extubocellulus* sp.) e não encontraram resíduos de D-manose na mesma. A ausência do carboidrato e também de seu receptor na superfície das células de uma dada espécie permite sugerir que este carboidrato não é importante na comunicação química envolvendo estes organismos. Caso a ausência de D-manose e de receptores deste carboidrato seja típica das bacilariófitas, o grupo não deveria interagir com outras espécies por essa via. Entretanto, os dados da literatura e deste trabalho são bastante restritos para a confirmação da proposta para todo o grupo. Por outro lado, *Nitzschia* sp. foi uma das poucas espécies que apresentaram interação positiva com o glicodendrímico de L-fucose, sendo este o carboidrato que mostrou as interações mais intensas comparadas às interações com GalNHAc, que também interagiu com a superfície celular dessa espécie. Deve-se considerar que *Nitzschia* sp. foi a única espécie que apresentou esse tipo de resposta aos glicodendrímeros, caracterizada pela interação positiva com L-fucose e GalNHAc e negativa para D-manose. Essa resposta diferenciada pode estar relacionada ao fato de as bacilariófitas serem um grupo muito particular dentre as algas estudadas, distinguindo-se até mesmo em sua origem evolutiva. As bacilariófitas surgiram de uma endossimbiose secundária (Keeling, 2010), sendo que as demais classes estudadas nesse trabalho resultam de uma endossimbiose primária. Tendo origem a partir da incorporação de um fotossintetizante por eucariotos heterotróficos distintos (Gould *et al.*, 2008), é

justificável que apresentem diferenças importantes na composição das biomoléculas de suas superfícies celulares.

As espécies *Coelastrum astroideum* e *Mougeotia* sp. provavelmente possuem receptores glicídicos para outros carboidratos que não L-fucose, D-manose e N-acetilgalactosamina, já que não apresentaram interação positiva com nenhum dos glicodendrímeros testados.

Nesse estudo, as interações entre as algas e os glicodendrímeros mostraram diferenças entre espécies, sugerindo que existe uma diversidade bioquímica expressa na superfície das células testadas. Essa diversidade era esperada, uma vez que as moléculas que compõem a superfície celular de um organismo tendem a ser específicas, fornecendo informações únicas dos mesmos (Alberts *et al.*, 2002). Dentro dos mesmos gêneros foram encontrados resultados muito diferentes, reforçando que a composição de receptores de superfície celular tende a ser espécie-específica e não típica de grupos taxonômicos maiores (grupo-específica). Em um trabalho semelhante, porém usando lectinas marcadas, Muller (1983) também não encontrou um padrão de interação entre os grupos de algas estudados, tendo sido observadas respostas de reconhecimento específicas para cada uma das espécies testadas.

Os resultados apresentados representaram as respostas de interação da maioria dos indivíduos, mas em todos os tratamentos foi verificado que uma pequena quantidade de indivíduos (menos que 10%) não apareceu com a mesma marcação. No entanto, deve-se considerar os poucos indivíduos que, por algum motivo, não interagiram com os carboidratos testados. Isso aconteceu para todos os glicodendrímeros e para dez das doze espécies avaliadas. Assim, é possível que a composição de receptores na superfície dos indivíduos de uma mesma espécie seja diferente ao longo do seu ciclo de vida (Kim *et al.*, 2007). Isso se torna possível quando se considera o momento

fisiológico das células. Sabe-se que, em geral, as proteínas expressas por um organismo podem variar de acordo com a fisiologia e as condições ambientais às quais esse organismo está submetido, uma característica geral do proteoma das células. Kim e colaboradores (2007) observaram que durante a reprodução, a clorófito *Zygnema cruciatum* apresenta diferenças na composição das superfícies de suas células. Outros pesquisadores vêm investigando mudanças nas superfícies celulares de protistas em diferentes *status* nutricionais (Ramoino, 1997; Kremp & Anderson, 2004). Considerando que podem haver células em diferentes estágios fisiológicos, é possível que essas células não marcadas por um glicodendrímero que visivelmente marcou tantos outros indivíduos, ainda estejam imaturas e com a sua matriz extracelular incompleta ou em formação. Em síntese, é possível que a célula ainda não possua todas as lectinas expressas na sua superfície. Além disso, deve-se considerar também que a estrutura da parede celular das algas pode estar interferindo na acessibilidade dos carboidratos à superfície da membrana plasmática. A parede celular pode apresentar maior ou menor porosidade dependendo da sua composição ou até mesmo de condições ambientais, como variação nos valores de pH, por exemplo (Zenke-White *et al.*, 2000). Assim, a parede pode se apresentar mais ou menos porosa, o que pode influenciar na interação dos glicodendrímeros e as lectinas da membrana celular.

6 - CONCLUSÃO

Os resultados obtidos se mostraram compatíveis e esclarecedores conforme os objetivos previstos nesse trabalho. Os padrões de interação encontrados entre as espécies testadas e os glicodendrímeros sugerem que há de fato uma diferenciação na composição das biomoléculas expressas nas superfícies celulares dessas espécies. O maior número de interações entre as espécies avaliadas e os glicodendrímeros de D-manose e *N*-acetilgalactosamina sugere que esses carboidratos e seus respectivos receptores, podem estar envolvidos em processos de comunicação celular já que foram encontradas interações positivas para a maioria das espécies.

De maneira geral, os glicodendrímeros se mostraram ferramentas úteis e confiáveis para esse tipo de estudo, pois permitiu verificar a existência desses receptores e com isso a identificação de diferenças nas superfícies das células avaliadas, que era o objetivo principal desse trabalho.

Estudos complementares de proteômica e metabolômica são necessários para esclarecimentos sobre a composição e organização das superfícies celulares algais, não possíveis de serem alcançados nesse trabalho, já que a técnica aqui utilizada (glicodendrímeros marcados com fluorescência) permite identificar a existência do receptor, mas não a sua composição e localização exatas.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts, B.; Jonhson, A. 2002. **Biology of the cell**.Capítulo 7: Cell-Cell interactions. Páginas 123-140.

Andújar, S.; Hevia, E.; Carretero, Y.; Fenoy, C.; Rowe A.; López-Rodas, V. 1997. **Fluorescent Lectins: The Way forward in Rapid Algal Identification**. Lagascalia. Volume 19. Páginas 479-484.

Attias, M., 2010. **Biologia celular** 1. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, 2010. 130p. Volume 2.

Blumreinsiger, M.; Meindl, D.; Loos, E., 1983. **Cell wall composition of chlorococcal algae**. *Phytochemistry* 22/7: 1603-1604.

Branco, A.T.; Bernabé, R.B.; Ferreira, B.S.; Oliveira, M.V.V.; Garcia, A.B.; Souza-Filho, G.A., 2004. **Expression and purification of the recombinant SALT lectin from rice (*Oryza sativa* L.)**. *Protein Expression & Purification* 33: 34-38.

Brandley, G.K.; Schnaar, R., 1986. **Cell surface carbohydrate in cell recognition and response**. *Journal of leukocyte Biology* 40: 97-111.

Caffal, H.K.; Mohnem, D., 2009. **The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides**. *Carbohydrate Research* 344: 1879-1900.

Clarke, A.E.; Wilson, I.A. 1988. **Carbohydrate-Protein Interaction**. Berlin: Springer-Verlag, c1988, vi, 152 p. : ill. ; 25 cm. Springer ISBN: 978-3-642-46641-0.

Cloninger, J.M., 2002. **Biological applications of dendrimers**. *Current Opinion in Chemical Biology* 6: 742–748.

Cooper, M.G. 2000.**The cell: A molecular approach**. Boston University. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. ISBN-10: 0-87893-106-6.

Costa, D.S.; Viana, R.C.; Silva, M.; Bicudo, C.E.M.; Barros, K.D. N.; Oliveira, M.E.C. 2014. **Algas e cianobactérias continentais no estado do Pará, Brasil**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental: 351.

Costas, E.; Lopes-Rodas, V.1994. **Identification of marine dinoflagellates using fluorescent lectins**. Journal of Phycology 30: 987-990.

Crawford, A.S.; Higgins, J.M.; Mulvaney, P.; Wheterbee, R. 2001. **Nanostructure of the diatom frustule as revealed by atomic force and scanning electron microscopy**. Journal of Phycology 37: 543-554.

Cruz-Chu, E.R.; Malafeev, A.; Pajarskas, T.; Koumoutsakos, P. 2014. **Structure and Response to Flow of the Glycocalyx Layer**. Biophysical Journal 106: 232-243.

Costa D.S, Viana R.C, Silva M, Bicudo C.E.M, Barros K.D. N, Oliveira. M. E. C. 2014- **Algas e cianobactérias continentais no estado do Pará, Brasil**. – Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 351.

Espinosa, P.E.; Perrigault, M.; Ward, E.J.; Shumway, E.S.; Allam, B. 2010. **Microalgal cell surface carbohydrate as recognition sites for particle sorting in suspension-feeding bivalves**. Marine Biological laboratory 218: 75-86.

East, L.; Isacke, M.C. 2002. **The mannose receptor family**. Biochimica et Biophysica acta 1572: 364-386.

Fritz, L. 1992- **The use of cellular probes in studying marine phytoplankton**. Korean Journal of Phycology 7: 319-324.

Gabius, H.J. 1997- **Animal lectins**. European Journal of Biochemistry 243 (3): 543-576.

Glick, G.D.; Toogog, P.L.; Wiley, D.; Skehel, J.J.; Knowles, J.R. 1991- **Ligand recognition by influenza virus. The binding of divalent sialosides**. Journal of Biological Chemistry 266 (35): 23660-23669.

Gould, S. B.; Waller, R. F.; McFadden, G. I. 2008. **Plastid evolution**. Plant Biology 59: 491–517.

Homrich, M.; Gotthard, I.; Wobst, H.; Diestel, S. 2015. **Cell Adhesion Molecules and Ubiquitination- Functions and Significance-** Biology 5: 5-41.

Imam, H.S.; Bard, R.F.; Tosteson, R.T. 1984. **Specificity of marine microbial surface interactions**. Applied and Environmental Microbiology.48/4: 833-839.

Lee, R.E. 2008. **Phycology. 4º Edição**. Editora Cambridge University Press. Online ISBN: 9780511812897. P.547.

Martin-Cereceda, M.; Williams, R.; Guinea, A.; Novarino, G. 2007- **An investigation of the fine structure, cells surface carbohydrates, and appeal of the diatom *Extubocellulus* sp. A prey for small flagellates**. Protoplasma 232: 69-78.

Junqueira, L.C.; Carneiro, J. 2012. **Biologia Celular e Molecular**. 9ª Edição. Editora Guanabara Koogan. ISBN: 9788527720786.

Khowala, S.; Verma, D.; Banik, P.S. 2008. **Biomolecules : Introduction, structure & function/ Carbohydrates**. Drug development and Biotechnology: 2-93.

Kim, G.H.; Minchul, Y.; John, A.W.; Klochkova, T.A.; Sung-Ho K. 2007. **Possible surface carbohydrates involved in signaling during conjugation process in *Zygnema cruciatum* monitored with fluorescein isothiocyanate-lectins (Zygnemataceae, Chlorophyta)**. Phycological Research 55: 135-142.

Kikkeri, R.; Faustin, K.; Tarkeshwar, G.; Laila, H.; Hossain, S.B.; Ganna, G. 2009. **Ru(II) Glycodendrimers as Probes to Study Lectin-Carbohydrate Interactions and Electrochemically Measure Monosaccharide and Oligosaccharide Concentrations**. Langmuir Letter 26:1520-1523.

Knox, P.J.1992. **Molecular probes of the plant cell surface** . Protoplasma167: 1-9.

Kremp, A.; Anderson, D.M. 2004. **Lectin binding patterns of *Scrippsiella lachrymosa* (Dinophyceae) in relation to cyst formation and nutrient conditions**. Journal Experimental Marine Biology and Ecology 307:165–181.

Lesley, L.R.; Allison, J.; Dawid, W.F.; 1995. **FITC- conjugated lectins as a toll for differentiating between toxic and no toxic marine dinoflagellates**, New Zealand of Marine freshwater Research 29 (3): 359-365.

Muller, U.; Sengbusch, V.P. 1983. **Distribution of glycoconjugates at algal cell surfaces as monitored by FITC- conjugated lectins. Studies on selected species from *Cyanophyta*, *Pyrrophyta*, *Raphidophyta*, *Euglenophyta*, *Chromophyta* and *Clorophyta***. Protoplasma 114: 103-113.

Ofek, I.; Beachey, H.E. 1978. **Mannose Binding and Epithelial Cell Adherence of *Escherichia coli***. Infection and immunity 22 (1): 247-254.

Oliveira R.F.A. 2012. **Desenvolvimento de um microscópio confocal de varredura laser para caracterização topográfica de superfícies**. Biblioteca digital de teses e dissertações da Universidade Federal de Uberlândia-MG.

Oliveira, R.F.A.; Mello, J.D.B; Monte, A.F.G. 2010. **Desenvolvimento de um microscópio confocal para análise de superfície**. 20^a POSMEC, PPGEM, Universidade Federal de Uberlândia.

Peumans, W.J.; Van Damme, E.J. 1995. **Lectins as plant defense proteins**. Plant Physiology 109: 347–352.

Ramoino, P. 1997. **Lectin-binding glycoconjugates in *Paramecium primaurelia*: changes with cellular age and starvation**. Histochemistry Cell Biology 107: 321–329.

Roberts, C.E.; Zubkov, V.M.; Martin-Cereceda, M.; Novarino, G.; Wootton, C.M. 2006. **Cell surface lectin-binding glycoconjugates on marine planktonic protists**. Microbiology letter 265: 202-207.

Rose, C.K.J. 2003. **The plant cell wall**. Editorial offices: Blackwell Publishing Ltd, 9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ, UK. ISBN: 1-84127-328-7.

Roy, R.; Tze, C.S.; Kate, R. 2013. **Glycodendrimers: versatile tools for nanotechnology**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Science 49: 85-108.

Santos, M.L.M.N. 2008- **Estrutura e dinâmica do fitoplâncton e bacterioplâncton em cultivos de camarão no Rio Grande do Norte-Brasil: Impacto sobre o ambiente natural** . Biblioteca digital de Teses e Dissertações da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, BR.

Sharon, N.; Lis, H. 2004. **History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules**. Glicobiology 14: 53R-62R.

Sheldon, W.; Tarbell, J.M.; Damiano, E.R. 2007. **The Structure and Function of the Endothelial Glycocalyx Layer**. The Annual Review of Biomedical Engineering 9:121–67.

Sheppard, C.J.R.; Wilson, T. 1997. **Confocal laser scanning microscopy**. Oxford, United Kingdom : BIOS Scintific Publishers. 58.

Singer, S.J.; Nicolson, G.L. 1972. **The Fluid Mosaic Model of the structure of cell membranes**. Science 175: 720-731.

Sousa, L.B. 2010. **Caracterização parcial de uma pro-Lectina funcional de sementes de *Dioclea grandiflora* Benth expressa em *Escherichia Coli***. Biblioteca digital de teses e dissertações da Universidade Federal do Ceará/BR.

Spear, T.G.; Zariffard, R.M.; Xin, J.; Mohammed, S. 2003. **Inhibition of DC-SIGN-mediated trans infection of T-cells by mannose-binding lectin**. Immunology 110: 30-35.

Tang, Z.Y.; Dobbs, C.F. 2007. **Green autofluorescence in Dinoflagellates, Diatoms and other microalgae and its implications for vital staining and morphological studies**. Applied and Environmental Microbiology 73: 2306-2313.

Tundisi, J.G. 1986. **Estudos ecológicos do fitoplâncton marinho e lacustre no Brasil: situação atual e perspectiva.** Em: BICUDO, C. E. DE M.; TEIXEIRA, C.; TUNDISI, J. G. (Org.). Algas: a energia do amanhã. São Paulo: Instituto Oceanográfico da USP. p. 27-48.

Vicente, C.M.E.; Legaz, M.S. 2009. **The Cell recognition model in chlorolichens involving a fungal lectin binding to an algal ligand can be extended to cyanolichens.** Plant biology 12: 615-621.

White, N.K.; Tien, C.J. 2005. **Characterization of sugars on algal cells with fluorescein isothiocyanate-conjugated lectins.** Protoplasma 225: 225-233.

Wood-Charlson, M.E.; Hollingsworth, L.L.; Krupp, A.D.; Wels, M.V. 2006. **Lectin/glycan interactions play a role in recognition in a coral/dinoflagellate symbiosis.** Cellular Microbiology 8: 1985-1993.

Wootton, E.C.; Zubkov, M.V.; Jones, D.H.; Jones R.H.; Martel, C.M.; Thornton, C.A.; Roberts, E.C. 2006. **Biochemical prey recognition by planktonic protozoa.** Environmental Microbiology 9: 212-222.

Yamada, A.; Hatano, K.; Matsuoka, K.; Koyama, T.; Esumi, Y.; Koshino, H.; Hino, K.; Nishikawa, K.; Natori, Y.; Terunuma, D. 2006. **Syntheses and Vero toxin-binding activities of carbosilane dendrimers periphery-functionalized with galabiose.** Tetrahedron 62: 5074-5083.

Zemke-White, W.L.; Clements, K.D.; Harris, P.J. 2000. **Acid lysis of macroalgae by marine herbivorous fishes: effects of acid pH on cell wall porosity.** Journal Experimental Marine Biology and Ecology 245: 57-68.

Zimorskii, V.; Chuan Ku, W.F.M.; Sven, B.G. 2014. **Endossymbiotic theory for organelle origins.** Current opinion in Microbiology 48: 22-83.

Parede celulósica vegetal. Disponível em: <http://www.sobiologia.com.br/conteúdos/citologia/cito4/php>. Acesso em 04 de abril de 2016.

Chlorophyll a fluorescence measurements in plant biology. Disponível em WWW.photosynthesis.ch/fluorescence. Acesso em 17 de maio de 2016.

Fluorescence spectra Viwer. Disponível em: www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html. Acesso em 17 de maio de 2016.

The Fluorophore BODIPY. Disponível em: www.probes.com. Acesso em 17 de maio de 2016.

Chlorella vulgaris e *Nitzschia* sp. Disponível em: <http://protist.i.hosei.ac.jp>. Acesso em 25 de agosto de 2016.

Chlamydomonas sp. Disponível em: <http://botany.natur.cuni.cz>. Acesso em 25 de agosto de 2016.