



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

PEDRO ARTHUR SOUSA TABOSA

**ANÁLISE ESTRUTURAL, AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBIOFILME E
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE HGA-2, LECTINA DE *Holothuria grisea*, EM
COMBINAÇÃO COM ANTIBIÓTICOS**

FORTALEZA

2024

PEDRO ARTHUR SOUSA TABOSA

ANÁLISE ESTRUTURAL, AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBIOFILME E
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE HGA-2, LECTINA DE *Holothuria grisea*, EM
COMBINAÇÃO COM ANTIBIÓTICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T117a

Tabosa, Pedro Arthur Sousa.

Análise estrutural, avaliação do potencial antibiofilme e atividade antibacteriana de HGA-2, lectina de *Holothuria grisea*, em combinação com antibióticos. / Pedro Arthur Sousa Tabosa. – 2024.
64 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.

1. Lectina. 2. Sinergismo. 3. Atividade antibifilme. I. Título.

CDD 639.2

PEDRO ARTHUR SOUSA TABOSA

ANÁLISE ESTRUTURAL, AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBIOFILME E
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE HGA-2, LECTINA DE *Holothuria grisea*, EM
COMBINAÇÃO COM ANTIBIÓTICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Pesca.

Aprovada em: 15/02/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Francisco Regivânio Nascimento Andrade
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ao criador.

À minha família e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradecer ao Criador e à minha família, que sempre estiveram ao meu lado ao longo dessa longa caminhada. Em especial, agradeço aos meus pais, Ednaldo e Vanderlúcia, ao meu irmão, Pedro Matheus, e à minha cunhada, Thais Borges, que sempre estiveram comigo me apoiando a cada momento da minha vida.

Um agradecimento especial ao meu orientador Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro, que me orientou ao longo dessa caminhada. Muito obrigado pela paciência e pelos conselhos que me ajudaram a desenvolver minha pesquisa e aprimorar meu trabalho.

Agradeço também ao Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano, pelos momentos de aprendizado e ensinamentos ao longo da minha jornada no laboratório.

Agradeço também a Dra. Renata Pinheiro Chaves, pelos momentos de ensino sobre a vivência de bancada e conhecimento laboratorial.

Aos meus amigos que foram um pilar importante para meu sustento durante essa caminhada. Muito obrigado Cândido, Andressa, Jéssica, Thiffany, Juliana, Vinícius, Aldeni Ellen e Bianca. Muito obrigado pela paciência, por me suportarem, pelos risos e pelos ensinamentos de bancada e de vida.

Às demais pessoas que também foram importantes para o percurso dessa jornada. Ao inesquecível Prof. Manuel de Andrade Furtado Neto, eterna inspiração. Aos meus professores da graduação e da Pós-Graduação... Prof. Alexandre Sampaio, Profa. Silvana Saker, Profa. Gleire Menezes e dentre outros que foram importantes para meu desenvolvimento como Engenheiro de Pesca.

Aos demais colegas de laboratório, antigos e atuais, pelo convívio e conversas.... Philippe, Israel, Elany, Samile, Regi, Karol, Victória, Alexandra e dentre outros que também foram importantes nesses últimos anos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Se a educação sozinha não transforma a sociedade, sem ela tampouco a sociedade muda.”

(Paulo Freire).

RESUMO

Os equinodermos (do grego *echinos*, “espinhoso”; *derma*, “pele”) são um grupo de animais que pertencem ao filo Echinodermata. Este filo compreende cerca de 7.000 espécies vivas e cerca de 13.000 espécies fósseis. Diversas substâncias naturais, com propriedades bioativas, foram isoladas de equinodermos, incluindo: polissacarídeos sulfatados, glicoproteínas, peptídeos, lectinas e outros. Os invertebrados não possuem sistema imunológico adaptativo. Nos equinodermos é normalmente aceito que as lectinas possam desempenhar um papel importante no sistema imunológico, funcionando como moléculas-chave na resposta imune do organismo. HGA-2 foi purificada com sucesso através de cromatografia de afinidade em goma de guar e eluída com EDTA. HGA-2 apresentou maior afinidade por carboidratos e glicoproteínas que apresentam resíduos de galactose em suas conformações estruturais. Além dos sacarídeos, a atividade hemaglutinante de HGA-2 também foi inibida por glicoproteínas como mucina de estômago de porco tipo II, asialofetuína e tiroglobulina. Além de CEL-IV, a análise dos aminoácidos conhecidos de HGA-2, mostrou maior similaridade com uma lectina putativa de *Holothuria leucospilota*. HGA-2 também apresentou maior relação filogenética com lectinas de equinodermos. A partir do modelo tridimensional de KAJ8044242.1 é possível sugerir que HGA-2 seja uma lectina que contenha o motivo conservado EPN. HGA-2, quando combinada a tetraciclina, apresentou um efeito aditivo e efeito sinérgico contra *S. aureus* ATCC 700698 e *E. coli* ATCCC 11303, respectivamente. HGA-2 é uma proteína com potencial antibacteriano, quando em associação com a tetraciclina a lectina potencializou o efeito do antibiótico. Além disso, a lectina foi capaz de reduzir a formação de biofilme bacteriano de *S. aureus* e *E. coli*. Sendo assim, HGA-2 mostra um potencial uso para o desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos.

Palavras-chave: lectina, sinergismo, atividade antibiofilme.

ABSTRACT

Echinoderms (from the Greek *echinos*, “thorny” ; *derma*, “skin”) are a group of animals that belong to the phylum Echinodermata. This phylum comprises approximately 7,000 living species and about 13,000 fossil species. A lot of natural substances with bioactive properties have been isolated from echinoderms, including: sulfated polysaccharides, glycoproteins, peptides, lectins and others. Invertebrates do not have an adaptive immune system. In echinoderms, it is accepted that lectins can be an important role in the immune system, functioning as key molecules in the body's immune response. HGA-2 was purified by affinity chromatography on guar gum and the protein was eluted with EDTA. HGA-2 showed greater affinity for carbohydrates and glycoproteins that present galactose residues in their structural conformations. In addition to saccharides, the hemagglutinating activity of HGA-2 was also inhibited by glycoproteins such as porcine stomach mucin type II, asialofetuin and thyroglobulin. With the exception of CEL-IV, analysis of the known amino acids of HGA-2 showed greater similarity with a putative lectin from *Holothuria leucospilota*. HGA-2 also showed a greater phylogenetic relationship with echinoderm lectins. Based on the three-dimensional model of KAJ8044242.1, it is possible to suggest that HGA-2 is a lectin that contains the conserved EPN motif. HGA-2 in association with tetracycline, showed an additive effect and synergistic effect against *S. aureus* ATCC 700698 and *E. coli* ATCCC 11303, respectively. HGA-2 is a protein with antibacterial potential, when in association with tetracycline the lectin potentiated the effect of the antibiotic. Moreover, the lectin was able to reduce the formation of bacterial biofilms of *S. aureus* and *E.coli*. Thus, HGA-2 shows a potential use for the development of new antibacterial drugs.

Keywords: lectin; synergistic; antibiofilm activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Representantes das cinco classes de equinodermos	13
Figura 2	– Esquema de formação do biofilme bacteriano	27
Figura 3	– Cromatografia de afinidade em Goma de Guar do extrato de <i>Holothuria grisea</i>	38
Figura 4	– SDS-PAGE de HGA-2	39
Figura 5	– Alinhamento da sequência de aminoácidos de CEL-IV com os peptídeos conhecidos de HGA-2	42
Figura 6	– Alinhamento da sequência de aminoácidos da lectina putativa de <i>Holothuria leucospilota</i> (KAJ8044242.1) com os peptídeos conhecidos de HGA-2	42
Figura 7	– Árvore filogenética de lectinas do tipo-C presentes em equinodermos	43
Figura 8	– Modelo tridimensional de KAJ8044242.1 gerado pelo servidor I-TASSER ...	45
Figura 9	– Efeito de HGA-2 sobre biofilmes de <i>S. aureus</i> ATCC 700698, <i>S. aureus</i> ATCC 25923 e <i>E.coli</i> ATCC 11303	50
Figura 10	– Número de células viáveis de <i>S. aureus</i> ATCC 700698, <i>S. aureus</i> ATCC 25923 e <i>E.coli</i> ATCC 11303 na presença de HGA-2	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Lectinas isoladas de equinodermos	21
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Carboidratos e glicoproteínas capazes de inibir a atividade hemaglutinante de HGA-2	39
Tabela 2 – Efeito da lectina HGA-2 combinada aos antibióticos Oxacilina e Tetraciclina sobre <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>E. coli</i>	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Equinodermos	13
1.2	Lectinas	17
<i>1.2.1</i>	<i>Definição e aplicações.....</i>	<i>17</i>
<i>1.2.2</i>	<i>Lectinas de animais</i>	<i>19</i>
<i>1.2.3</i>	<i>Lectinas de equinodermos</i>	<i>20</i>
<i>1.2.4</i>	<i>Aspectos estruturais das lectinas de equinodermos</i>	<i>24</i>
1.3	Biofilme bacteriano e resistência antimicrobiana	26
<i>1.3.1</i>	<i>Biofilme bacteriano</i>	<i>27</i>
<i>1.3.2</i>	<i>Aspectos importantes da resistência bacteriana a antibacterianos</i>	<i>28</i>
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivo geral	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	METODOLOGIA	32
3.1	Coleta dos animais	32
3.2	Purificação de HGA-2	32
3.3	Eletroforese em SDS-PAGE	32
3.4	Atividade hemaglutinante	33
3.5	Inibição da atividade hemaglutinante	33
3.6	Identificação de proteínas similares a HGA-2	34
3.7	Atividade de HGA-2 combinada com antibióticos	35
3.8	Atividade antibiofilme	35
<i>3.8.1</i>	<i>Microrganismos e condições de crescimento</i>	<i>35</i>
<i>3.8.2</i>	<i>Efeito da lectina na formação de biofilme bacteriano</i>	<i>36</i>
<i>3.8.3</i>	<i>Quantificação de massa de biofilme</i>	<i>36</i>
<i>3.8.4</i>	<i>Quantificação do número de células viáveis no biofilme bacteriano</i>	<i>36</i>
<i>3.8.5</i>	<i>Análise estatística</i>	<i>37</i>
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Purificação da lectina	38
4.2	Inibição da atividade hemaglutinante	39
4.3	Identificação de proteínas similares a HGA-2	41

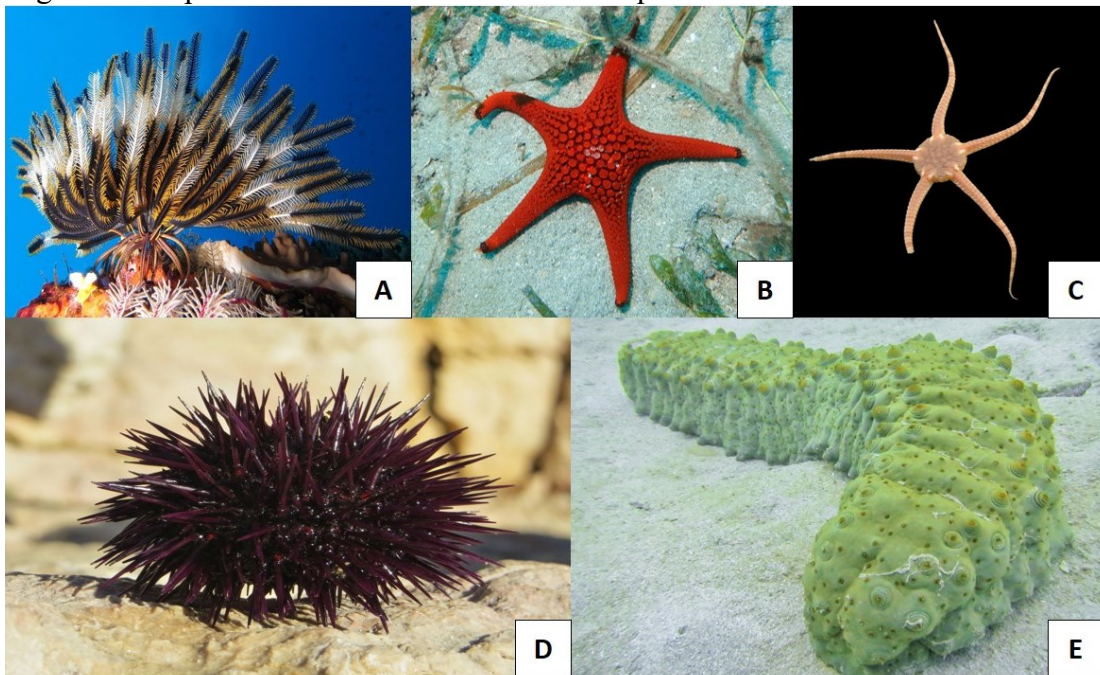
4.4	Atividade de HGA-2 combinada com antibióticos	45
4.5	Ação de HGA-2 sobre a formação de biofilmes bacterianos	49
5	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Equinodermos

Os equinodermos (do grego *echinos*, “espinhoso”; *derma*, “pele”) compreendem um filo de aproximadamente 7.000 espécies vivas e cerca de 13.000 espécies fósseis. Dentre as espécies vivas, os principais representantes desse filo são: os lírios do mar, as estrelas do mar, os ofiuroides, os ouriços-do-mar e os pepinos-do-mar (Ceccolini; Cianferoni, 2023; Kalinin; Silchenko, 2022). Na figura 1, podem ser observados os principais representantes das cinco classes de equinodermos.

Figura 1 – Representantes das cinco classes de equinodermos.



A) lírios do mar (fonte: <https://www.mundoecologia.com.br/wp-content/uploads/2019/10/Crinoidea-Articulata-no-Fundo-do-Mar-Branca-Amarela-e-Negra.jpg>)

B) Estrela do mar (fonte: <https://inaturalist-open-data.s3.amazonaws.com/photos/52858409/original.jpg>)

C) Ofiuroides (fonte: <https://static.inaturalist.org/photos/108603901/large.jpg>)

D) Ouriço-do-mar (fonte: https://idfg.idaho.gov/species/sites/default/files/taxa/15621_orig.jpg)

E) Pepino-do-mar (fonte: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4c/Stichopus_herrmanni_%28Ma-yotte%29.jpg)

Equinodermos são organismos marinhos e podem ser encontradas desde a região entremarés até zonas abissais. Eles são normalmente habitantes do fundo oceânico, mas há ocorrência de espécies pelágicas (Fransozo; Negreiros-Fransozo, 2016; Hickman; Roberts; Keen, 2016).

Morfológicamente, os equinodermos são caracterizados pela existência de um esqueleto calcário interno, do qual se projetam espinhos na maioria das espécies atuais. Além disso, eles também são caracterizados por uma série de canais cheios de fluidos (sistema vascular aquífero), que derivou de um par de compartimentos celomáticos e que se conectam aos apêndices alimentares e locomotores. Estes animais apresentam simetria radial de cinco pontas na fase adulta, ossículos calcários e um tecido conjuntivo mutável (Pechenik, 2016).

No Filo Echinodermata não há presença de uma região corporal específica na qual ocorra uma concentração de células nervosas, portanto, o sistema nervoso é difuso, com nervos se espalhando pelo corpo desses animais (Fransozo; Negreiros-Fransozo, 2016).

O arranjo corporal dos equinodermos - com seus cinco eixos de simetria - está relacionado a um sistema de canais internos desde a fase embrionária. Esse sistema é conhecido como sistema hidrovascular, ou sistema aquífero. Ele estende-se a partir da superfície do corpo como uma série de projeções no formato de tentáculos (pés tubulares ou pódios) (Fransozo; Negreiros-Fransozo, 2016, Hickman; Roberts; Keen, 2016). O sistema aquífero é exclusivo dos equinodermos e pode funcionar de forma variada na locomoção, preensão e, em algumas espécies de equinodermos, na captura e manipulação de presas alimentares (Newton; Dennis, 2021; Harms, 2022).

As espécies vivas do filo Echinodermata se encontram divididas em 5 classes (Crinoidea, Asteroidea, Ophiuroidea, Echinoidea e Holothuroidea). A existência de indivíduos do Filo Echinodermata remonta ao período Cambriano, mais de 520 milhões de anos atrás. Devido à grande quantidade de achados fósseis, que mostram um plano corporal de cinco raios, variações de padrões morfológicos, e alta diversidade no ambiente marinho (tanto para fósseis e espécies vivas), alguns autores reconhecem esse filo com até 25 classes (Vargas; Zardoya, 2012).

Este grupo pode ser dividido, pelas suas características morfológicas, em dois subfilos: Eleutherozoa e Pelmatozoa. O subfilo Eleutherozoa, o grupo mais antigo, inclui os animais de vida livre com a boca voltada para o substrato, compreendendo quatro grupos (Echinoidea, Asteroidea, Holothuroidea e Ophiuroidea). O subfilo Pelmatozoa possui os organismos do grupo Crinoidea como os únicos representantes atuais, onde estes vivem presos ao substrato com a boca voltada para cima quando atingem a fase adulta (Vargas; Zardoya, 2012).

A classe Crinoidea divergiu do ancestral em comum com os outros equinodermos há cerca de 500 milhões de anos e os membros desse grupo parecem possuir características

morfológicas primitivas, que foram preservadas ao longo de sua evolução. Os lírios do mar são os principais representantes desse grupo que pode ser dividido em dois grupos informais: os pedunculares (que apresentam o pedúnculo na fase adulta) e os não pedunculares (que perdem o pedúnculo na fase pós-larval) (Ezhova; Malakhov, 2020; Wright, 2017).

O grupo Asteroidea compreende cerca de 1.900 espécies vivas de estrelas-do-mar, o que torna este o segundo maior do filo Echinodermata (Moreau *et al.*, 2020). A estrutura corporal básica dos animais desse grupo é tipicamente pentâmera, sendo composta pelo disco e pelos "braços" (cinco ou mais). Espécies que apresentam muitos braços (multirradiadas), normalmente os apresentam curtos, unidos numa porção lateral e pouco distintos do disco. Ao longo da estrutura corporal, tanto na superfície aboral quanto oral, há uma variedade de espinhos e placas calcárias. Estas estruturas podem sofrer variação quanto a forma e arranjo. Essas variações podem ocorrer de acordo com a região do corpo ou com a variação de espécie (Fransozo; Negreiros-Fransozo, 2016).

Os representantes da classe Echinoidea não possuem braços na sua estrutura corporal. Esse grupo é constituído principalmente pelas bolachas-do-mar e ouriços-do-mar, e a classe é composta por quase 1.000 espécies vivas (Mongiardino Koch, 2021). Nos ouriços-do-mar são encontrados cinco pares de placas ambulacrais intercaladas com outros cinco pares de placas interambulacrais que se convergem da região oral para região aboral. Na região oral, as placas de encontram e forma uma abertura que contém a boca do animal. Já na região aboral, o ânus é circundado por uma membrana circular (periprocto), além da presença de 10 placas especializadas (genitais e oculares) que formam o sistema apical dos ouriços (Newton; Dennis, 2021).

A classe Ophiuroidea compreende o maior grupo de equinodermos, com mais de 2.000 espécies vivas. A estrutura corporal básica dos ofiuroides é pentâmera, composta por um disco e braços individualizados (Goharimanesh *et al.*, 2022; Silva; Prata; Christoffersen, 2023). Todos os organismos possuem um plano corporal comum, composto por um disco central de onde partem cinco ou mais braços articulados e flexíveis. Estes braços são variados, possuem ornamentações diversas e são articulados por ossículos que preenchem todo o espaço celômico dos braços. O disco é relativamente comprimido no sentido oral-aboral, com a superfície aboral virada. Os ofiuroides normalmente possuem cinco longos braços, que irradiam simetricamente de um disco central do corpo. Em determinadas espécies, o braço pode se ramificar diversas vezes (Fransozo; Negreiros-Fransozo, 2016; Silva; Prata; Christoffersen, 2023).

Indivíduos da classe Holothuroidea são caracterizados pela presença de tentáculos

orais (bucais), um anel calcário em sua estrutura corporal e simetria bilateral dos estágios larvais, além de possuírem ossículos minúsculos dispersos e embutidos na parede do corpo (Guerrero; Forero, 2018; Smirnov, 2021). Esse grupo compreende mais de 1.200 espécies, e, assim como os membros da classe Echinoidea, os indivíduos não possuem braços. O corpo dos animais desse grupo tem formato vermiforme, bastante alongado no eixo oral/aboral. Os ossículos calcários são reduzidos em tamanho e incorporados na parede corporal (Ellis *et al.*, 2021; Pechenik, 2016; Yunita *et al.*, 2022).

Os equinodermos são considerados importantes recursos marinhos de alto valor econômico e biotecnológico. Tendo um profundo significado nos setores de conservação, biológico, nutricional e farmacêutico. Na pesca, os ouriços-do-mar e pepinos-do-mar são explorados comercialmente. Produtos oriundos do ouriço-do-mar são utilizados como iguaria alimentar em muitos países asiáticos. Espécies da classe Holothuroidea são abundantes na região do Pacífico que cerca o lado do continente asiático, onde muitas espécies são pescadas e cultivadas para consumo humano. O pepino-do-mar japonês, *Stichopus (Apostichopus) japonicus*, é considerado um pescado de alto valor nutricional e é amplamente consumido na China, Japão e em outros países do sudeste da Ásia (Rahman *et al.*, 2022; Zhukova, 2022).

No Sri Lanka e nas Ilhas Salomão, a pesca de pepinos-do-mar é a principal fonte de renda de muitas comunidades costeiras. A característica mais importante dessa pescaria é que esta é uma atividade econômica não centralizada. Pois, embora o valor global do pepino-do-mar seja baixo em comparação com outros pescados, os benefícios dessa pesca são observados em nível de pequenas comunidades pesqueiras. Os lucros obtidos são mais distribuídos, em contraste com pescarias de alto valor (por exemplo: pesca do atum) que possuem custos iniciais mais elevados e beneficiam um grupo mais centralizados (Rahman *et al.*, 2022).

Durante séculos, as cascas calcárias de ouriços-do-mar foram utilizadas na medicina tradicional chinesa para o tratamento de inflamações e problemas de expectoração (Telmer *et al.*, 2024; Shang *et al.*, 2014). As conchas e espinhos dos ouriços-do-mar *Anthocardia crassispina*, *Pseudocentrotus depressus* e *Hemicentrotus pulcherrimus* são uma boa fonte de compostos com propriedades antioxidantes que auxiliam na proteção contra radicais livres nocivos ao organismo. Carotenoides, sulfolipídeos e xantofilas são alguns dos compostos extraídos de espécies de ouriços-do-mar e possuem uma alta variedade de aplicações farmacológicas (Sibiya *et al.*, 2021).

Além disso, diversas classes de substâncias naturais, com propriedades bioativas, foram isoladas de equinodermos, incluindo: polissacarídeos sulfatados, glicoproteínas, peptídeos, lectinas e outros. Os compostos orgânicos encontrados nos equinodermos podem apresentar propriedades terapêuticas e medicinais diversas, tais como: anti-inflamatórios, antitumorais e antimicrobianos. (Khotimchenko, 2018; Rahman *et al.*, 2022).

1.2 Lectinas

1.2.1 Definição e aplicações

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas capazes de reconhecer e interagir com carboidratos específicos, sem participação do metabolismo dos mesmos. Além de não pertencerem a nenhuma das principais classes de imunoglobulinas e o domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC) das mesmas não apresenta atividade catalítica (Kilpatrick, 2000). Lectinas podem, normalmente, ser detectadas através de ensaios de hemaglutinação, interagindo com diferentes carboidratos presentes na superfície celular. Essas proteínas são classificadas de acordo com a sua estrutura e especificidade para carboidratos (Santos *et al.*, 2014).

Os primeiros registros a respeito de proteínas com capacidade de aglutinar eritrócitos são provenientes do século XIX. Por volta de 1860, S. W. Mitchell observou as primeiras evidências de aglutinação sanguínea ocasionada por extratos proteicos do veneno de cobra (Kaltner; Gabius, 2019; Kilpatrick, 2002).

Em 1888, atividades semelhantes foram observadas por P. H. Stillmark, em que extratos de sementes, da planta *Ricinus communis*, foram capazes de aglutinar eritrócitos (Cummings *et al.*, 2022a). Identificadas, principalmente, a partir de extratos de plantas, essas moléculas foram definidas como hemaglutininas ou fitoaglutinina (Sharon; Lis, 2004).

Tendo em vista a especificidade das aglutininas vegetais e sua capacidade de distinguir os eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos, Boyd e Shapleigh, em 1954, propuseram um novo termo para designar essas proteínas: “lectina”, (do latim *legere*, escolher ou selecionar). Mais tarde, o termo passou a abranger todas as aglutininas específicas a carboidratos, de origem não imune (Mishra *et al.*, 2019).

No decorrer das décadas de 1960 e 1970, com a observação de que lectinas poderiam ser ferramentas úteis para o estudo de carboidratos, simples e complexos, muito

entusiasmo foi criado para pesquisas futuras. Lectinas com capacidade de aglutinação de células malignas sem afetar as células normais foram evidências para cientistas da época de que as lectinas teriam possíveis aplicações farmacológicas (El-Maradny *et al.*, 2021; Sharon, 2008).

O ritmo de isolamento de lectinas aumentou drasticamente no início da década de 70 com a introdução da cromatografia de afinidade para isolamento de biomoléculas com especificidade a componentes da superfície celular, tais como: receptores celulares ou glicoproteínas. Goldstein e Agrawal introduziram a cromatografia de afinidade para purificação de lectinas utilizando a propriedade de Concanavalina A se ligar a moléculas de dextranos (Rodriguez *et al.*, 2020; Sharon; Lis, 2004).

Com o aumento do número de lectinas isoladas ao final do século XX, o interesse por essas proteínas foi sendo estimulado pela demonstração de que estas podem ser ferramentas para detecção e caracterização de glicoconjugados, especialmente glicoproteínas. A partir daí, lectinas têm sido utilizadas em pesquisas promissoras da bioquímica de novos compostos, no desenvolvimento de novas terapias, como biomarcadores e na pesquisa por novos medicamentos (Gupta, 2020; Meiers *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019).

Devido a capacidade de reconhecimento específico à carboidratos, lectinas têm sido altamente utilizadas para análise e elucidação do estado de glicosilação de amostras. Esta afinidade serviu de embasamento para aperfeiçoamento de técnicas analíticas no passado. Dentre estas estão: lectinas ligadas a enzimas, *western blotting*, ensaios de *microarray* e outros (Dan; Wenlong; Tzi, 2016; Hashim; Jayapalan; Lee, 2017; Hendrickson; Zherdev, 2018). Metodologias mais avançadas também foram desenvolvidas com base na interação lectina-carboidrato. Lectinas imobilizadas são utilizadas para facilitar a extração em fase sólida de amostras com resíduos de glicanos. Tanto as técnicas clássicas, quanto as modernas, servem para o fornecimento de avaliações quantitativas e/ou qualitativas de um perfil de glicosilação de uma amostra (Goumenou; Delaunay; Pichon, 2021).

As células M, são células especializadas responsáveis pela coleta de amostras de antígenos, além de transporta-las às células imunes da mucosa. O transporte de antígenos até as placas de Peyer, através das células M, é uma abordagem atrativa para o desenvolvimento de vacinas orais mais eficazes. Além da utilização como biomarcadores, lectinas também estão sendo utilizada para o desenvolvimento de vacinas orais. Nanopartículas compostas por um antígeno patogênico são revestidas com lectinas específicas direcionadas às placas de Peyer do intestino. As lectinas estão sendo utilizadas como ligantes em novas formulações direcionadas às células M, devido a especificidade destas pelas porções de α -L-fucose expressas na superfície

apical das células M, gerando um aumento da resposta imunológica do organismo (Kianfar, 2021; Zhang *et al.*, 2021).

A utilização de lectinas como ligantes em cromatografias de afinidade se tornou uma técnica conhecida, além de ser comumente utilizada para fracionamento e purificação de compostos que contêm carboidratos na sua estrutura. Na área da saúde, as lectinas podem desempenhar papéis importantes no setor de diagnósticos e manutenção de tratamentos experimentais relacionados ao câncer. (Chettri *et al.*, 2021). A utilização de lectinas para o direcionamento de medicamentos no organismo é uma excelente forma de promover um tratamento com um local de atuação específico. Esse tipo de tratamento pode ocorrer de duas formas: de maneira passiva (o medicamento conjugado atinge a o local alvo de maneira passiva) ou de maneira ativa (O agente terapêutico associado a um ligante específico de tecido ou célula (ex: lectina)) (Bies; Lehr; Woodley, 2004; Gupta, 2020). Sendo assim, as principais vantagens do uso de lectinas nesse tipo de sistema são: maior exposição do medicamento em locais alvo e diminuição dos efeitos colaterais nos tecidos saudáveis (Chettri *et al.*, 2021; Plattner *et al.*, 2009).

1.2.2 Lectinas de animais

Nos primeiros estudos de lectinas de animais e suas estruturas, Drickamer propôs que, até o momento da publicação de seu trabalho, essas proteínas de origem animal conhecidas poderiam se encaixar somente em duas classes: as lectinas dependentes de cálcio (Lectinas do Tipo C) e as lectinas dependentes do grupo sulfidrila (Lectinas do Tipo S). Posteriormente, com o aprofundamento sobre a estrutura primária de novas lectinas de animais ficou evidente que nem toda lectina cálcio dependente possuía uma estrutura de Lectina do Tipo C, e, nem toda Lectina do tipo S seria dependente do grupo tiol (Drickamer, 1988; Kilpatrick, 2000).

Com progressos na área da bioquímica e biologia molecular, diversas novas lectinas foram isoladas e classificadas em novos grupos. Essas proteínas podem ser classificadas em várias famílias com base na sua estrutura molecular, domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC), especificidade de ligação e relação evolutiva (Radhakrishnan *et al.*, 2022). Atualmente, as lectinas de animais estão distribuídas em cerca de 19 famílias distintas (Carneiro, 2017).

As lectinas de animais podem ter uma ampla variedade de funções. A atividade dessas proteínas está associada à sua alta diversidade estrutural. Loh e colaboradores (2017)

citam que os papéis de reconhecimento das lectinas de animais incluem ativação do sistema complemento, reconhecimento celular, adesão celular, sinalização celular e morfogênese.

Lectinas de animais podem participar do sistema de defesa do organismo, principalmente no reconhecimento do carboidrato presente na parede celular de patógenos. As lectinas, ou fragmentos das mesmas, podem atuar na formação de poros na parede celular de microrganismos, facilitando a morte celular determinados grupos bacterianos (Li *et al.*, 2015). Sendo assim, lectinas de animais são fontes de biomoléculas com potencial uso biotecnológico e estão chamam atenção devido a sua aplicabilidade em áreas da biomedicina.

1.2.3 Lectinas de equinodermos

Os invertebrados não possuem sistema imunológico adaptativo. A capacidade de produzir moléculas diversificadas para o reconhecimento de antígenos foi de imensa importância evolutiva para esses animais (Hanington *et al.*, 2010). Nos equinodermos é normalmente aceito que as lectinas possam desempenhar um papel importante no sistema imunológico, funcionando como moléculas-chave na resposta imune do organismo (Smith *et al.*, 2010).

Atualmente, cerca de 37 lectinas foram isoladas de equinodermos marinhos (Quadro 1). Dentre as cinco classes vivas desse filo, a classe Holothureoidea, representada pelos pepinos-do-mar, é a mais diversificada em se tratando de lectinas isoladas. Na classe Echinoidea, lectinas foram isoladas apenas de ouriços-do-mar, com ausência de lectinas isoladas de bolachas-do-mar. Esta classe é a segunda mais diversificada em quantidade de lectinas isoladas de equinodermos. Ainda referente ao número de lectinas de equinodermos descritas na literatura, as classes Crinoidea e Ophiuroidea são as representantes com o menor número de lectinas isoladas, possuindo apenas uma lectina descrita em cada classe.

Na classe Crinoidea, OXYL, de *Oxycomanthus japonicus*, é uma lectina dimérica formada por duas subunidades idêntica de 14 kDa. Esta possui afinidade para oligossacarídeos que contêm resíduos de *N*-Acetilactosamina e que contenham ácido siálico (Matsumoto *et al.*, 2011).

Quadro 1 - Quadro 1 - Lectinas isoladas de equinodermos (Continua).

Lectinas de equinodermos					
Classe	Espécie	Lectina	Especificidade	Massa estimada	Referência
Holothuroidea	<i>Apostichopus (Stichopus) japonicus</i>	SJL-I	Galactosídeos	13 kDa	Hatakeyama <i>et al.</i> , 1993
		SJL-II	Galactosídeos	15kDa	Hatakeyama <i>et al.</i> , 1993
		SPL-I	Galactosídeos	17 kDa	Matsui <i>et al.</i> , 1994
		SPL-II	Galactosídeos	17 kDa	Matsui <i>et al.</i> , 1994
		MBL-AJ	Manana	17 kDa	Bulgakov <i>et al.</i> , 2007
		AJCTL	Galactosídeos	22,5 kDa	Han <i>et al.</i> , 2012
		AJCTL-2	Galactosídeos	36,83 kDa	Wang <i>et al.</i> , 2018
		AjGBCL	Galactose	16 kDa	Taguchi <i>et al.</i> , 2021
		AjFL-1	Fucose	20 kDa	Wang <i>et al.</i> , 2018
	<i>Cucumaria echinata</i>	CEL-I	Galactosídeos	27 kDa	Hatakeyama <i>et al.</i> , 1994
		CEL-II	Galactosídeos	35 kDa	Hatakeyama <i>et al.</i> , 1994
		CEL-III	Galactosídeos	45 kDa	Hatakeyama <i>et al.</i> , 1994
		CEL-IV	Galactosídeos	68 kDa	Hatakeyama <i>et al.</i> , 1994
	<i>Holothuria grisea</i>	HGA	Mucina	105 kDa	Moura <i>et al.</i> , 2013
		HGA-2	Galactosídeos	17 kDa	Melo <i>et al.</i> , 2014
		HGL	Mucina	17 kDa	Moura <i>et al.</i> , 2015
	<i>Holothuria arenicola</i>	HaL	Mucina	220 kDa	Torres, 2017
	<i>Cucumaria japonica</i>	MBL-C	Manana	44 kDa	Bulgakov <i>et al.</i> , 2000
	<i>Holothuria scabra</i>	HSL	Antígeno T	182 kDa	Gowda; Goswami; Khan, 2008a
Echinoidea	<i>Strongylocentrotus nudus</i>	MBL-SN	Manana	17 kDa	Bulgakov <i>et al.</i> , 2013
	<i>Echinometra lucunter</i>	ELA	Mucina	45 kDa	Duarte, 2018
		ELL	Mucina e tireoglobulina	30 kDa	Duarte <i>et al.</i> , 2022
		ELEL	Ramnose	11 kDa	Carneiro <i>et al.</i> , 2015
	<i>Anthocidaris crassispina</i>	Equinoidina	O-glicanos	13 kDa	Giga; Sutoh; Ikai, 1985
		SUEL	Galactosídeos	11,5 kDa	Ozeki <i>et al.</i> , 1991

Quadro 1 – Lectinas isoladas de equinodermos (Conclusão).

Lectinas de equinodermos					
Classe	Espécie	Lectina	Especificidade	Massa estimada	Referência
Echinoidea	<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	<i>Sperm lectin</i>	GalNAc	15 kDa	Seike; Shibata; Suyemitsu, 1992
	<i>Lytechinus variegatus</i>	CBP-LV	Galactosídeos	118 kDa	Strumski, 1985
	<i>Toxopneustes pileolus</i>	SUL-I	Galactosídeos	32 kDa	Nakagawa <i>et al.</i> , 1996
		SUL-II	Galactosídeos	23 kDa	Nakagawa <i>et al.</i> , 1999
		SUL-III	Galactosídeos	28 kDa	Sakai <i>et al.</i> , 2013
		TGL-I	Heparina	23 kDa	Nakagawa <i>et al.</i> , 2003
	<i>Pseudocentrotus depressus</i>	PdMBCLs 1	Manose	22 kDa	Iiyama <i>et al.</i> , 2021
		PdMBCLs 2		22 kDa	
Asteroidea	<i>Asterina pectinifera</i>	<i>Starfish lectin</i>	Galactosídeos	19 kDa	Kakiuchi <i>et al.</i> , 2002
	<i>Asterias amurensis</i>	AMUL	Ácidos neuramínicos	14 kDa	Imamichi; Yokoyama, 2013
Ophiuroidea	<i>Ophioplocus japonicus</i>	OJA	Glicose	17 kDa	Imamichi <i>et al.</i> , 2022
Crinoidea	<i>Oxycomanthus japonicus</i>	OXYL	Fetuína	14 kDa	Matsumoto <i>et al.</i> , 2011

Fonte: revisado pelo autor.

Recentemente, foi descrita a primeira lectina isolada de um ofiuroide. OJA, de *Ophioplocus japonicus*, é uma lectina dependente de íons de cálcio, que possui maior afinidade por glicose e consiste em um oligômero formado por subunidade de 17 kDa (Imamichi *et al.*, 2022).

O fluido celomático pode ser principal fonte de lectinas em equinodermos (Bulgakov *et al.*, 2007; Bulgakov *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2018; Giga; Sutoh; Ikai, 1985; Gowda; Goswami; Khan, 2008a; Imamichi; Yokoyama, 2013; Moura *et al.*, 2015). Contudo, algumas dessas proteínas foram isoladas a partir de outros fluidos, ou, estruturas corporais (Carneiro *et al.*, 2015; Kakiuchi *et al.*, 2002; Melo *et al.*, 2014; Moura *et al.*, 2013; Ozeki *et al.*, 1991; Seike; Shibata; Suyemitsu, 1992).

Uma característica comumente encontrada nas lectinas de equinodermos é a afinidade e especificidade para galactose ou sacarídeos que apresentam resíduos de galactose em sua estrutura, tais como: lactose ou GalNAc. Contudo, já foram descritas lectinas que possuem especificidade restrita para outros sacarídeos ou carboidratos complexos (Bulgakov *et al.*, 2007; Carneiro *et al.*, 2015; Gowda; Goswami; Khan, 2008b; Moura *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018; Imamichi; Yokoyama, 2013).

As lectinas de equinodermos podem apresentar organizações estruturais diversificadas. Já tendo sido relatadas proteínas com subunidades entre 11.000 e 220.000 Da, podendo ocorrer, de forma comum, a formação de oligômeros através de pontes dissulfeto entre subunidades iguais (Carneiro *et al.*, 2015; Imamichi *et al.*, 2022; Melo *et al.*, 2014; Torres, 2017).

Lectinas de equinodermos marinhos podem apresentar atividade de aglutinação de células bacterianas, favorecendo o processo posterior de fagocitose. Isso representa um forte indício de atuação dessas proteínas no sistema imunológico desses organismos. Lectinas com essa atividade foram isoladas das espécies *Echinometra luclucunter*, *Holothuria grisea* e *Holothuria scabra* que exibiram atividade de aglutinação celular contra cepas Gram-positivas, Gram-negativas ou ambas as cepas (Carneiro *et al.*, 2015; Melo *et al.*, 2014; Gowda; Goswami; Khan, 2008b).

É comum lectinas encontradas em equinodermos apresentarem efeito antibacteriano, devido ao fato de que estas proteínas podem estar diretamente ligadas à primeira linha de defesa desses organismos (Bulgakov *et al.*, 2007). A aglutinação bacteriana pode ser realizada por lectinas e outras biomoléculas capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Estas moléculas desencadeiam um mecanismo de defesa para

evitar a dispersão de patógenos no organismo hospedeiro (Kvennefors *et al.*, 2008). Característica observada em HSL, lectina de *H. scabra*, que exibiu forte atividade antibacteriana contra um amplo espectro de bactérias gram-positivas e gram-negativas (Gowda; Goswami; Khan, 2008b).

1.2.4 Aspectos estruturais das lectinas de equinodermos

As lectinas de animais podem ser divididas em cerca de 19 grupos distintos, tais como: lectinas do tipo P, lectinas tipo R, lectinas do tipo RBL (Lectina de ligação à ramnose), Lectinas do tipo C, lectinas do tipo I, galectinas, lectinas tipo F e outras. Nos equinodermos podem ser encontradas lectinas de diferentes grupos. Dentre as famílias de lectinas isoladas desse filo, as principais são: lectinas do tipo R, lectinas do tipo RBL e lectinas do tipo C (Carneiro, 2017).

As lectinas tipo R representam uma superfamília de lectinas que são caracterizadas por DRC que seja estruturalmente semelhante ao DRC de um da ricina, proteína tóxica encontrado nas sementes de *Ricinus communis*. A análise estrutural da ricina, realizada cerca de cem anos após sua descoberta, revelou que essa proteína possui um CRD que contém um dobramento β -trevo com um motivo Q-x-W (Cummings *et al.*, 2022b; Varki, *et al.*, 2022.). CEL-III, lectina isolada de *Cucumaria echinata*, apresenta domínios de ligação a carboidratos semelhantes aos domínios de ligação a carboidratos da lectinas do tipo R (Hatakeyama *et al.*, 2007). Essa lectina é composta por 432 resíduos de aminoácidos e que apresentou três domínios distintos, sendo dois deles β -trevo. Após análises cristalográficas, CEL-III se tornou uma das primeiras lectinas de equinodermos com estrutura tridimensional elucidada (Uchida *et al.*, 2004).

As lectinas ligantes de ramnose (RBLs) são uma família de lectinas de animais que exibem ligação a L-ramnose e D-galactose (Carneiro *et al.*, 2015). As RBLs são compostas de dois a três CRD repetidos em tandem, que consistem em cerca de 95 resíduos de aminoácidos e compartilham quatro pontes dissulfeto conservadas em sua estrutura (Ogawa *et al.*, 2011). Essas proteínas foram encontradas principalmente em ovos ou células do ovário de peixes e invertebrados, incluindo os equinodermos (De Lorgeril *et al.*, 2011; Gasparini *et al.*, 2008; Naganuma *et al.*, 2006; Ozeki *et al.*, 1991). SUEL, lectina isolada a partir de ovos não fecundados do ouriço-do-mar *Anthocidaris crassispina*, foi a primeira constituinte da família das RBLs (Ogawa *et al.*, 2011; Ozeki *et al.*, 1991; Thongda *et al.*, 2014). Esta lectina é um

homodímero composta por duas subunidades idênticas, de 11,5 kDa, ligadas por ponte dissulfeto, onde cada subunidade da proteína apresenta um CRD com 105 resíduos de aminoácidos (Ozeki *et al.*, 1991).

Além de SUEL, a análise de SUL-I, lectina de *Toxopneustes pileolus*, identificou que esta possui uma homologia aparente com as RBLs. Após a elucidação de sua estrutura por cristalografia de raios X, foi observado que SUL-I é composta por três domínios distintos com características semelhantes a RBL CSL3, de *Onchorhynchus keta* (Hatakeyama *et al.*, 2015; Hatakeyama *et al.*, 2017). No domínio 1, as moléculas de L-ramnose se ligam à lectina recombinante (rSUL-I) através de ligações de hidrogênio com Glu, Asn e Asp nos grupos 4-,3-,2-hidroxi, que correspondem aos grupos 2-,3-,4-hidroxi de D-galactose ligadas na mesma orientação. Além disso, o C6 de L-ramnose faz contato com os resíduos Tyr e Ser nos domínios 1 e 2, intensificando reconhecimento desse carboidrato pela lectina (Hatakeyama *et al.*, 2017).

Dentre as lectinas isoladas de equinodermos, as lectinas do tipo C (CTLs) possuem destaque. Estas foram inicialmente nomeadas assim pela sua capacidade de se ligarem a carboidratos, de uma forma dependente de íons de cálcio, devido a motivos conservados no DRC de lectinas do Tipo C (CTLD). No entanto, os CTLDs de muitas lectinas do tipo C não apresentam componentes dependentes de cálcio para o reconhecimento a carboidratos (Brown; Willment; Whitehead, 2018). Dentre esses motivos estão os resíduos EPN (que promove a ligação a manose, GlcNAc, fucose e glicose) e QPD (que promove ligação a galactose e GalNAc) (Cummings *et al.*, 2022a).

O CTLD é caracterizado pelas posições das cisteínas, além da sequência de alguns aminoácidos conservados e pela sua estrutura enovelada. O DRC das lectinas desse grupo é caracterizado por uma região compacta de aminoácidos com uma dupla fita formada por resíduos amino e carboxi-terminais. Além disso, o CTLD possui duas pontes dissulfeto conservados que auxiliam na estabilização da estrutura. (Cummings *et al.*, 2022a; Wang; Vasta; Wang, 2020).

Muitas lectinas do tipo C já foram isoladas de equinodermos marinhos, incluindo: *Holothuria grisea* (HGA-2), *Cucumaria echinata* (CEL-I, CEL-II e CEL-IV), *Apostichopus japonicus* (AJCTL, AJCTL-2 MBL-AJ, AjGBCL e SJL-1), *Cucumaria japonica* (MBL-C), *Anthocidaris crassispina* (equinoidina) e *Strongylocentrotus nudus* (SN-MBL), *Asterina pectinifera* (Starfish lectina) e *Asterias amurensis* (AMUL), *Ophioplocus japonicus* (OJA) e *Pseudocentrotus depressus* (PdMBCLs 1 e PdMBCLs 2) (Bulgakov *et al.*, 2000; Bulgakov *et al.*, 2013; Datta; Talapatra; Swarnakar, 2016; Giga; Sutoh; Ikai, 1985; Han *et al.*, 2012;

Hatakeyama *et al.*, 1995; Hatakeyama *et al.*, 2002; Himeshima; Hatakeyama; Yamasak, 1994; Iiyama *et al.*, 2021; Imamichi; Yokoyama, 2013; Imamichi *et al.*, 2022; Kakiuchi *et al.*, 2002; Melo *et al.*, 2014; Taguchi *et al.*, 2021 Zhang *et al.*, 2019;).

Equinoidina, primeira lectina isolada de *Anthocidaris crassispina*, é uma proteína dimérica, composta por subunidades idênticas de 13 kDa. A determinação da sequência de aminoácidos foi um ponto importante para o estudo de lectinas, tendo em vista que foi um dos estudos iniciais e de alta relevância sobre lectinas do tipo C. Equinoidina possui de uma sequência tripeptídica (Arg-Gly-Asp) na região N-terminal que foi sugerida como uma unidade funcional proteínas para o reconhecimento celular (Giga; Ikai; Takahashi, 1987).

Cucumaria echinata apresenta três lectinas do tipo C (CEL-I, CEL-II e CEL-IV). A partir de ensaios de cristalografia de raios X de CEL-I foi observado que o dobramento estrutural da lectina apresenta alta semelhança a outros DRCs tipo C (Sugawara *et al.*, 2004).

Apostichopus (Stichopus) japonicus possui ao menos cinco lectinas do tipo C descritas na literatura (AJCTL, AJCTL-2 MBL-AJ, AjGBCL e SJL-1). SJL-I, teve sua sequência de aminoácidos determinada pela sobreposição de peptídeos obtidos por meio de digestão enzimática e química. Sua maior homologia ($\approx 26\%$) foi relacionada a lectina do tipo-C do ouriço-do-mar *Anthocidaris crassispina*. A análise da sequência revelou resíduos de aminoácidos conservados quando comparados com lectinas do tipo C. Indicando sua relação estrutural com lectinas do tipo C (Himeshima; Hatakeyama; Yamasaki, 1994).

MBL-SN, lectina isolada do plasma celômico do ouriço-do-mar *Strongylocentrotus nudus*, apresenta 144 resíduos de aminoácidos e contém um único domínio de reconhecimento de carboidratos de lectina do tipo C (Bulgakov *et al.*, 2013).

Holothuria grisea possui três lectinas isoladas (HGL, HGA e HGA-2). (Melo *et al.*, 2014; Moura *et al.*, 2013; Moura *et al.*, 2015). HGA é um dímero, formado por duas subunidades de 114 kDa. Esta foi a primeira lectina de invertebrado marinho com efeito anti-inflamatório descrito na literatura.

Já HGA-2, segunda lectina de *H. grisea*, é uma lectina do tipo C, com especificidade para galactosídeos e é formada por duas subunidades idênticas de 17 kDa ligadas por ponte dissulfeto. HGA-2 foi capaz de aglutinar células bacterianas de *Escherichia coli*, sugerindo um possível papel da lectina no sistema imune do pepino-do-mar (Melo *et al.*, 2014).

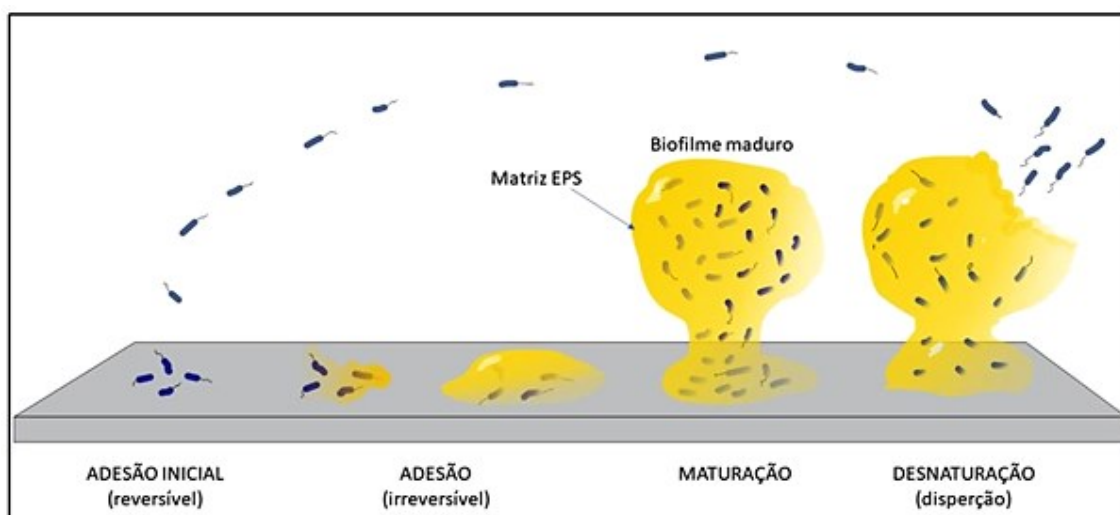
1.3 Biofilme bacteriano e resistência antimicrobiana

1.3.1 Biofilme bacteriano

Os biofilmes bacterianos são agregados polimicrobianos anexados a uma matriz extracelular produzida, normalmente, pelos próprios microrganismos que se encontram no biofilme. Geralmente, os biofilmes possuem uma composição variada de exopolissacarídeos, ácidos teicóicos e proteínas, DNA extracelular e enzimas. (Bose *et al.*, 2016). Essa estrutura é composta por diferentes tipos de biopolímeros, também conhecidos como Substâncias Poliméricas Extracelulares (EPS). As EPS permitem a ligação entre as células bacterianas, o desenvolvimento de altas densidades celulares além do reconhecimento célula-célula (Flemming; Wingender, 2010).

Na formação do biofilme, no processo de síntese da matriz pode haver o envolvimento de fatores inespecíficos e específicos. Dentre os inespecíficos, a hidrofobicidade, forças eletroestáticas e interações fracas (interações de Van der Waals), podem auxiliar a adesão inicial. Quanto aos fatores específicos, pode haver uma expressão coordenada de genes que codificam e sintetizam moléculas adesivas que facilitam a agregação do microrganismo. Com isso, o micróbio inicia a produção de biofilme, que pode ser resumida em cinco etapas: adesão inicial, adesão irreversível, maturação, desnaturação e liberação dos microrganismos desenvolvidos (Figura 2) (Pavão *et al.*, 2021).

Figura 2 – Esquema de formação do biofilme bacteriano.



Fonte: adaptado pelo autor. (Pavão *et al.*, 2021)

Dentre as características dos biofilmes bacterianos, a sua resistência ao sistema imune do hospedeiro e a antimicrobianos tornam esta estrutura um fator preocupante para os

profissionais da saúde. Em testes laboratoriais, algumas cepas bacterianas são suscetíveis a determinados fármacos, contudo, podem apresentar resistência quando estão na presença do biofilme. Além disso, nas EPS ocorrem a transferência de informações genéticas facilitando a transferência horizontal de genes de virulência ou de resistência antimicrobiana (Flemming; Wingender, 2010). Ensaios experimentais indicam que a concentração de um composto bactericida contra células bacterianas encontradas em biofilmes é de até 10.000 maiores do que suas células planctônicas convencionais. A depender do antibiótico, essas doses seriam de alto risco, devido aos seus efeitos colaterais e a sua toxicidade em altas concentrações (Miquel *et al.*, 2016).

O uso indevido de compostos antimicrobianos, com o intuito de tratar a infecção, pode gerar uma persistência, ou, resistência antimicrobiana, podendo ocorrer o aumento de subpopulações bacterianas com uma maior taxa de resistência aos tratamentos futuros. Essa presença inadequada de antibióticos também pode ocasionar o aumento da formação de biofilme bacteriano (Dörr *et al.*, 2010; Kwan *et al.*, 2013; Miquel *et al.*, 2016).

Sendo assim, o biofilme bacteriano é responsável por um papel crucial no desenvolvimento e na patogenicidade de bactérias (Bose *et al.*, 2016; Silva Trentin; Giordani; Macedo, 2013).

Chiaramonte e Russo (2015) afirmam que lectinas podem atuar nos mecanismos de defesa de equinodermos. De maneira semelhante aos vertebrados, lectinas identificadas no fluido de equinodermos auxiliam em atividades fisiológicas importantes, tais como: opsonização, citotoxicidade, efeito antibacteriano, efeito antibiofilme, formação de coágulos e reparo de feridas (Chiaramonte; Russo, 2015; Duarte *et al.*, 2022).

Devido as diversas propriedades de ligação a carboidratos, e possíveis atividade biológicas, as lectinas de invertebrados marinhos poderão ser exploradas objetivando a descoberta de novos fármacos, para tratamento de doenças causadas por patógenos microbianos, ou desenvolvimento de novas ferramentas no diagnóstico de biologia celular (Hasan *et al.*, 2019).

1.3.2 Aspectos importantes da resistência bacteriana à antibióticos

A resistência antimicrobiana (RAM) crescente é um problema de escala global que ameaça diversos setores da sociedade. A problemática associada ao RAM ameaça principalmente sistemas de saúde, aumentando seriamente os riscos de operações cotidianas

(WHO, 2023a). A descoberta de novos antibióticos vem se tornando cada vez mais difícil, as bactérias estão desenvolvendo novos mecanismos de defesa, o que leva a novas infecções causadas por bactérias resistentes (Palacios *et al.*, 2020). Estima-se que, em 2019, cerca de 1,27 milhão de pessoas morreram devido à resistência bacteriana a antimicrobianos. Uma pesquisa realizada pelo Reino Unido estima que esse número chegue a 10 milhões de mortes anuais até 2050 (De Kraker; Stewardson; Harbarth, 2016; Murray *et al.*, 2022; Shi *et al.*, 2020; WHO, 2023b).

Agentes patogênicos que normalmente são causadores de infecções, incluem vírus, parasitas fúngicos e bactérias. A origem da infecção pode variar de acordo com a origem do patógeno, podendo ocorrer em ambientes hospitalares ou até mesmo no ambiente em que o hospedeiro habita. Com o prolongamento do tratamento de uma infecção microbiana aumenta o risco da resistência do micróbio ao fármaco utilizado no tratamento. Sendo assim, não há um impedimento do desenvolvimento de resistência destes ao fármaco utilizado (Khan; Baig; Mehboob, 2017).

Dentre os desafios encontrados associados a resistência antimicrobiana, o surgimento de cepas de *S. aureus* resistentes à antibióticos vem ganhando grande atenção. Normalmente, as cepas de *S. aureus* podem ser encontradas em humanos saudáveis. Não são capazes de causar danos quando são encontradas na pele saudável. Contudo, ao penetrar nos tecidos ou na corrente sanguínea, pode causar graves doenças. As infecções por *S. aureus* podem ser leves, tais como: impetigo, espinhas, furúnculos e outras, ou graves, causando por exemplo: meningite, pneumonia, sepse e outras (Nandhini *et al.*, 2022). Esse microrganismo, se adaptou parcialmente aos humanos e se espalhou no ambiente social e hospitalar (Robinson, 2014).

As “superbactérias” correspondem a um dos principais problemas de saúde em países desenvolvidos ou em desenvolvimento. Além do *S. aureus* que foi citado anteriormente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) destaca algumas espécies de bactérias que apresentam resistência a algum tipo de antibiótico, dentre elas estão: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* e outras. Tendo em vista isso, as indústrias farmacêuticas buscam novos fármacos, estratégias e tratamentos para sanar essa problemática de saúde global (Silva; Aquino, 2018). Uma solução viável para essa problemática seria a combinação de antibióticos com diferentes compostos, ou mecanismos, que levem a morte do patógeno causador da infecção (Miquel *et al.*, 2016).

Apesar da baixa quantidade de trabalhos na literatura, algumas lectinas de organismos marinhos apresentaram efeito sinérgico quando combinadas com antibióticos. Quando combinada com ampicilina, ALL, lectina de *Aplysina lactuca*, apresentou efeito sinérgico contra cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* (Duarte, 2022). AFL, lectina de *Aplysina fistularis*, apresentou efeito sinérgico contra cepas de *S. epidermidis* e *E. coli*, quando combinada, respectivamente, com ampicilina e tetraciclina (Oliveira Neto, 2023). ACL, de *Aplysina cauliformis*, exibiu atividade sinérgica contra cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* (Oton, 2023).

Apesar da escassez de estudos de lectinas em combinação com antibióticos, a combinação dessas proteínas com diferentes classes antibióticos é uma alternativa eficaz para o estudo e desenvolvimentos de novas terapias contra infecções bacterianas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar estruturalmente os peptídeos conhecidos de HGA-2, lectina de *Holothuria grisea*, avaliar os efeitos de HGA-2 sobre a formação de biofilme de diferentes cepas bacterianas e avaliar os efeitos antibacterianos da mesma em combinação a antibióticos.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a análise estrutural dos peptídeos conhecidos de HGA-2.
- Avaliar o efeito inibitório da lectina sobre biofilmes bacterianos.
- Avaliar o efeito antibacteriano da lectina em combinação com os antibióticos oxacilina e tetraciclina.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta dos animais

Todos os espécimes de *Holothuria grisea* foram coletadas na praia de Bitupitá, no município da Barroquinha, Ceará, Brasil. Após a coleta, os animais foram colocados em caixas térmicas e transportados para o laboratório. A coleta dos organismos e o acesso ao patrimônio genético foram autorizados pelos órgãos competentes (SISBIO ID: 33913-12 e SISGEN ID: A1792FE).

3.2 Purificação de HGA-2

O isolamento de HGA-2 foi baseado no método estabelecido por Melo e colaboradores (2014), com algumas modificações. Os espécimes foram cortados em pequenos pedaços, transferidos para um processador, embebidos em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6; contendo NaCl 150 mM, CaCl₂ 20 mM (TBS/Ca⁺²) e PMSF 1 µM na proporção 1:2 (p/v). Após o processamento, o material foi filtrado em tecido de nylon, em seguida, foi centrifugado a 9000 × g, por 30 minutos. O precipitado foi descartado, o sobrenadante foi denominado de extrato bruto (E.B) e armazenado a -20 °C para uso posterior.

O E.B foi aplicado em uma coluna de goma de guar, previamente equilibrada com TBS/Ca⁺², pH 7,6. As frações não adsorvidas foram lavadas com tampão de equilíbrio até que a absorbância a 280 nm fosse inferior a 0,020. As frações adsorvidas foram eluídas com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6; contendo NaCl 150 mM e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 20 mM. As frações adsorvidas foram reunidas após a eluição, dialisadas sucessivamente contra solução de CaCl₂ 20 mM e água destilada. Em seguida, as amostras foram liofilizadas para experimentos futuros. A avaliação de pureza da proteína, na presença e ausência de β-mercaptoetanol, foi determinada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

3.3 Eletroforese em SDS-PAGE

Tanto o grau de pureza quanto a estimativa da massa molecular da lectina foram avaliados por SDS-PAGE, na presença e ausência de β-mercaptoetanol (Laemmli, 1970). O gel

de 15% foi submetido a uma tensão de 150 V e corrente elétrica de 25 mA, durante 1 hora. Para estimativa da massa molecular, a migração de HGA-2 no gel foi comparada com a migração das proteínas de peso molecular conhecido (albumina sérica humana (HSA) – 66 kDa, lectina recombinante de *Solieria filiformis* (rSfL) – 30 kDa e lectina de *Chondrilla caribensis* (CCL) – 15 kDa).

3.4 Atividade hemaglutinante

Os testes de hemaglutinação foram realizados utilizando de eritrócitos de coelho obtidos no setor de cunicultura, localizado do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará. A utilização dos animais foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção (CEUAP) da Universidade Federal do Ceará sob a seguinte numeração: 2211202101.

Os ensaios de hemaglutinação foram realizados em placas de microtitulação de fundo cônico (“V”). Para obtenção das suspensões de hemácias, o sangue foi lavado 6 vezes em NaCl 150 mM na proporção de 1:10 (v/v). Em seguida as hemácias foram suspensas e os volumes aferidos para atingir uma concentração de eritrócitos a 3% em NaCl (v/v).

Os ensaios de hemaglutinação foram baseados de acordo com a metodologia já descrita por Sampaio, Rogers e Barwell, (1998). Foram adicionados 50 µl de TBS/Ca⁺², 50 µl de amostra, que foram diluídas serialmente em cada fileira de poços, e posteriormente, 50 µl da suspensão de eritrócitos. A amostra ficou incubada por 1 hora em temperatura ambiente e a atividade hemaglutinante foi observada macroscopicamente e expressa em Unidades de Hemaglutinação por mililitro (UH.mL⁻¹), que representa o inverso da maior diluição capaz de aglutinar eritrócitos.

3.5 Inibição da atividade hemaglutinante

O ensaio de inibição foi baseado na metodologia descrita por Sampaio, Rogers e Barwell (1998), utilizando uma solução de HGA-2 em TBS/Ca²⁺ com concentração capaz de aglutinar eritrócitos com título igual a 4 UH.mL⁻¹.

Para o ensaio de inibição da atividade hemaglutinante, utilizou-se placas de microtitulação de fundo V, onde foram adicionados em cada poço 50 µL da solução de HGA-2 em TBS/Ca⁺² e 50 µL da solução de carboidratos ou glicoproteínas, diluídos serialmente no

mesmo tampão. A placa foi mantida em repouso por 1 (uma) hora em temperatura ambiente, e posteriormente, um volume igual de suspensão de eritrócitos a 3% foram adicionados. Após 1(uma) hora, as placas foram observadas e os resultados foram expressos em concentração mínima de inibidores capazes de impedir a hemaglutinação. Foram utilizados carboidratos e glicoproteínas a uma concentração inicial de 100 mM e 1 mg/mL, respectivamente.

Os carboidratos utilizados nos ensaios foram: D-xilose, D-ribose, L-fucose, L-arabinose, L-ramnose, D-galactose (Gal), D-manose, D-glicose (Glc), D-glucosamina, D-galactosamina, *N*-acetil-D-glicosamina (GlcNAc), *N*-acetil-D-galactosamina (GalNAc), *N*-acetil-D-manosamina, ácido D-galacturônico, D-frutose, D-sacarose, D-melibiose, α -lactose, β -lactose, D-lactulose, D-maltose, D-rafinose, metil- α -D-galactopiranosídeo, metil- β -D-galactopiranosídeo, metil- β -D-tiogalactose, α -metil-manosídeo, fenil- β -D-galactopiranosídeo, fenil- β -D-galactose, 4-nitrofenil- α -D-galactose, 2-nitrofenil- β -D-galactose, fetuína, asialofetuína, manana de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), transferrina, tireoglobulina, mucina submaxilar bovina (BSM), mucina de estômago de porco tipo II e mucina de estômago de porco tipo III.

3.6 Identificação de proteínas similares a HGA-2

As sequências de aminoácidos obtidas por Melo e colaboradores (2014) foram utilizadas para identificar em bancos de dados proteínas semelhantes à HGA-2. Inicialmente, uma busca individual com cada peptídeo foi realizada no banco de dados do NCBI, através da ferramenta BLASTp. Com base na similaridade de sequência, mapas peptídicos foram montados por alinhamento entre os peptídeos de HGA-2 e as sequências de proteínas identificadas como semelhantes, usando o Multalin (Corpet, 1988).

A seguir, as sequências que apresentaram similaridade com HGA-2 foram alinhadas entre si e o alinhamento resultante foi usado para criar uma árvore filogenética, através do algoritmo neighbor-joining (NJ) usando o pacote MEGA X (Kumar, 2018). A análise de *bootstrap* foi realizada com 1000 replicatas.

A proteína putativa de *Holothuria leucospilota* KAJ8044242.1, que apresentou similaridade com HGA-2, teve modelo tridimensional gerado usando o servidor on line I-TASSER (Zheng *et al.*, 2021). O servidor COACH foi usado para predição do sítio de ligação (Yang; Roy; Zhang, 2019).

3.7 Atividade de HGA-2 combinada com antibióticos

A avaliação do efeito da lectina HGA-2 combinada aos antibióticos foi realizada através do método *checkerboard*, descrito nos trabalhos realizados por Lechartier, Hartkoom e Cole (2012) com adaptações.

Para este estudo, foram avaliadas as combinações de HGA-2 com os antibióticos oxacilina e tetraciclina, contra as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698 e *Escherichia coli* ATCC 11303. Para cada combinação testada foram usados 25 poços da microplaca de 96 poços de fundo em "U", das linhas A a E, sendo o antibiótico diluído no sentido vertical da placa, das linhas A a E nas concentrações da CIM, 1/2 x CIM, 1/4 x CIM, 1/8 x CIM e 1/16 x CIM, e a lectina na concentração constante de 125 µg/mL nas colunas 1 a 5.

Tanto os antibióticos quanto a lectina foram diluídos separadamente em placas de microtitulação, e logo em seguida foram misturados em nova placa, que foi preenchido com 50 µL do antibiótico, 50 µL da lectina e 100 µL do inóculo bacteriano previamente ajustado (5×10^5 UFC/mL). A linha F foi usada como controle da CIM do antibiótico, e a linha G como controle do crescimento bacteriano.

Logo após a montagem das placas, estas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e para a determinação da nova CIM em combinação, a densidade óptica (D.O) foi mensurada no comprimento de onda de 620 nm em leitor de microplacas (Spectramax). Para bactérias que apresentaram valores iguais a 1/2x CIM, consideramos efeito aditivo; valores entre 1/4 e 1/16, efeito sinérgico, valores 1x CIM, 2x CIM, consideramos como não interação ou efeito antagônico.

3.8 Atividade antibiofilme

3.8.1 Microrganismos e condições de crescimento

Para realizar os ensaios sobre a formação de biofilme, foram utilizadas três cepas de referência da American Type Culture Collection (ATCC) e as mesma fazem parte da coleção do Laboratório Integrado de Biomoléculas (LIBS), são elas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698 e *Escherichia coli* ATCC 11303.

As bactérias foram cultivadas em Agar Triptona de Soja (TSA) a 37 °C por 24 h. Após o crescimento, as colônias bacterianas foram inoculadas em 5 mL de caldo de Triptona de Soja (TSA) por 18 h a 37 °C sob agitação constante. A suspensão bacteriana foi ajustada, posteriormente, para densidade de 2×10^6 células/mL através de turbimetria com o auxílio de um espectrofotômetro (620nm).

3.8.2 Efeito da lectina na formação de biofilme bacteriano

Para avaliação do efeito da lectina sobre a formação de biofilmes bacteriano, foram utilizadas placas de 96 poços, baseados no protocolo estabelecido por Vasconcelos e colaboradores (2014). Tanto a quantificação de biomassa do biofilme quanto a enumeração de células viáveis foram analisadas em placas de poliestireno de 96 poços.

As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h em agitação constante para o desenvolvimento do biofilme. Após o crescimento do biofilme, os biofilmes foram submetidos a duas lavagens com 200 µL/poço de água estéril, tendo como objetivo a remoção das células fracamente aderidas.

3.8.3 Quantificação de massa do biofilme

A biomassa dos biofilmes formados foi avaliada por meio de um método de colorimetria, utilizando de cristal de violeta. Os biofilmes foram fixados com a adição de 200 µL de metanol a 99% em cada poço por 15 minutos. Em seguida, o metanol foi removido e as placas secaram a uma temperatura de 25 °C. Após isso, 200 µL de cristal de violeta foram aplicados em cada poço e o excesso foi removido após 5 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas com água ultrapura.

Após a lavagem, foi adicionado 200 µL de solução de ácido acético 33% (v/v) tendo como objetivo, solubilizar o cristal de violeta. Em seguida, foi realizada a leitura da densidade óptica a 590 nm, em um leitor de microplacas (SpectraMax® I3).

3.8.4 Quantificação do número de células viáveis no biofilme bacteriano

Para realizar a quantificação de células viáveis, foram adicionados aos poços que contenham biofilme, 200 µL de água ultrapura, e em seguida, as placas foram colocadas em

banho ultrassônico operando a 50 kHz por 10 minutos, objetivando a liberação das células bacterianas do biofilme. Após esse processo, foi realizada uma diluição seriada com as suspensões obtidas dos poços e em seguida, as mesmas foram inoculadas em TSA. Após a incubação de 24 h a 37 °C, os números de unidade formadoras de colônias (UFC/mL) foram quantificados por unidade de área de poços.

3.8.5 Análise estatística

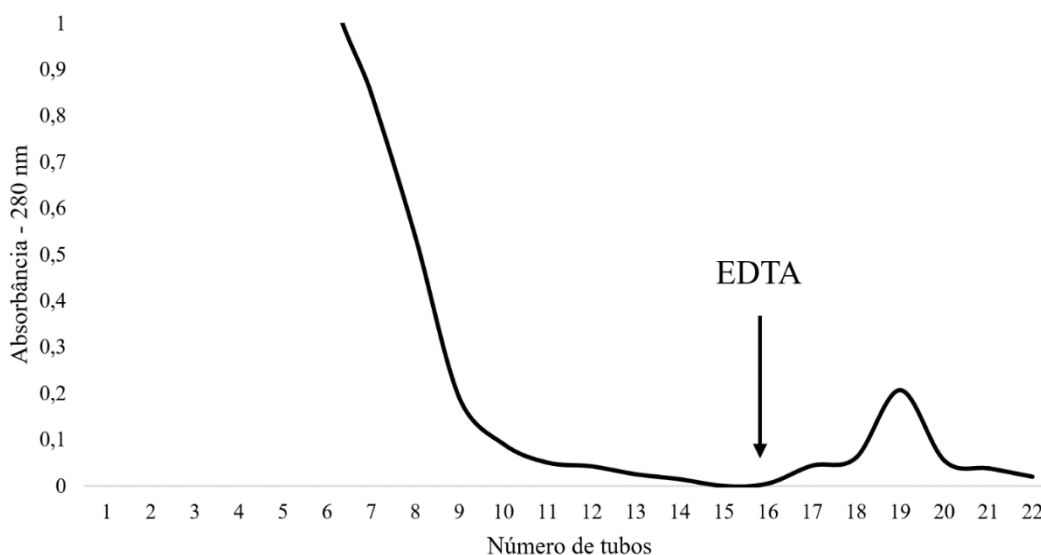
As análises estatísticas dos resultados obtidos foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism® versão 5.0 para Microsoft Windows®. Os dados de todos os ensaios comparados utilizaram análise de variância (ANOVA), com teste de Bonferroni post-hoc. Foi considerado um nível de significância de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação da lectina

HGA-2 foi purificada com sucesso por cromatografia em coluna de goma de guar. A proteína adsorvida à coluna cromatográfica foi eluída após a adição do tampão contendo EDTA 20 mM (Figura 3). A Goma de guar é um heteropolissacáideo composto por uma cadeia linear de unidades de β -(1 $\rightarrow$ 4)-D-manopiranosil com unidades laterais de α -(1 $\rightarrow$ 6)-D-galactopiranosil (Liyanage *et al.*, 2015). A separação de proteínas ocorre devido a afinidade destas pelos resíduos de galactose presentes na estrutura da goma de guar (Melo *et al.*, 2014).

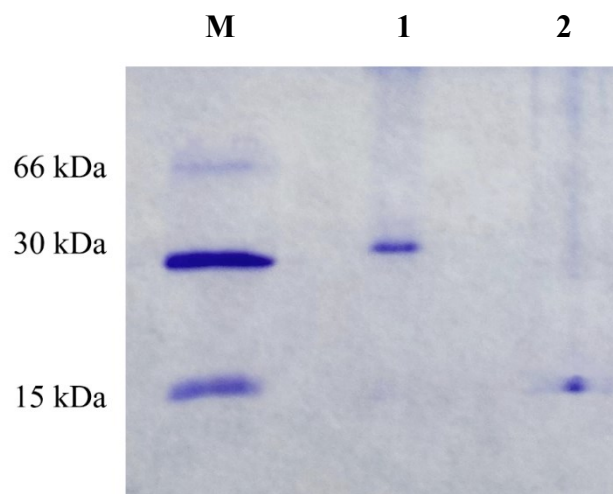
Figura 3 – Cromatografia de afinidade em Goma de Guar do extrato de *Holothuria grisea*.



Fonte: o Autor. Foram aplicados 45 mL de extrato em matriz de Goma de Guar, a mesma foi equilibrada e lavada com tampão Tris 20 mM, pH 7,6 contendo NaCl 150 mM e CaCl₂ 20 mM. As frações adsorvidas foram eluídas com tampão Tris 20 mM, pH 7,6 contendo NaCl 150 mM e EDTA 20 mM.

As frações adsorvidas foram reunidas, dialisadas e liofilizadas. Em SDS-PAGE, sob condições não redutoras e redutoras, HGA-2 apresentou uma banda única de aproximadamente 34 kDa e 17 kDa, respectivamente (Figura 4). Indicativo de que HGA-2 é uma proteína dimérica e suas cadeias polipeptídicas são mantida devido à presença de ligações dissulfeto intercadeia, corroborando com os dados obtidos por Melo e colaboradores (2014).

Figura 4 – SDS-PAGE de HGA-2



Fonte: o Autor. SDS-PAGE 15%. (M) Marcador molecular (HSA- 66 kDa, rSfL – 30 kDa e CCL – 15 kDa). (1) HGA-2 na ausência de β -mercaptoetanol. (2) HGA-2 na presença de β -mercaptoetanol 5%.

4.2 Inibição da atividade hemaglutinante

Os resultados obtidos no ensaio de inibição da atividade hemaglutinante de HGA-2 podem ser observados na Tabela 1. A lectina foi capaz de reconhecer galactose, carboidratos que apresentam resíduos de galactose ou semelhanças em suas conformações estruturais, tal como a localização das hidroxilas. Isso é válido para a ramnose, um monossacarídeo que apresenta semelhanças estruturais com a galactose (Carneiro *et al.*, 2015).

Tabela 1 – Carboidratos e glicoproteínas capazes de inibir a atividade hemaglutinante de HGA-2 (Continua).

INIBIDORES	MIC*
D-xilose	N.I
D-ribose	N.I
L-fucose	N.I
L-arabinose	N.I
L-ramnose	50 mM
D-galactose	25 mM
D-manose	N.I
N-acetil-D-glicosamina	N.I
D-glicose	N.I
D-glucosamina	N.I
D-galactosamina	N.I
N-acetil-D-galactosamina	12 mM

Tabela 1 – Carboidratos e glicoproteínas capazes de inibir a atividade hemaglutinante de HGA-2 (Conclusão).

INIBIDORES	MIC*
<i>N</i> -acetil-D-manosamina	N.I
Ácido D-galacturônico	N.I
D-frutose	N.I
D-sacarose	N.I
D-melibiose	25 mM
α -lactose	50 Mm
β -lactose	50 mM
D-lactulose	25 mM
D-maltose	N.I
D-rafinose	50 mM
Metil- α -D-galactopiranosídeo	25 mM
Metil- β -D-galactopiranosídeo	25 mM
Metil- β -D-tiogalactose	N.I
α -metil-manosídeo	N.I
Fenil- β -D-galactopiranosídeo	N.I
Fenil- β -D-galactose	N.I
4-nitrofenil- α -D-galactose	N.I
2-nitrofenil- β -D-galactose	N.I
Fetuína	N.I
Asialofetuína	0,062 mg.mL ⁻¹
Manana de levedura	N.I
Transferrina	N.I
Tireoglobulina	0,5 mg.mL ⁻¹
Mucina submaxilar bovina (BSM)	N.I
Mucina de estômago de porco tipo II	0,5 mg.mL ⁻¹
Mucina de estômago de porco tipo III	N.I

Fonte: o Autor. *Concentração mínima capaz de causar inibição da atividade hemaglutinante. N.I: o carboidrato ou a glicoproteína não inibiu a atividade hemaglutinante.

Além da ramnose, a lectina exibiu especificidade por galactose e certos carboidratos que possuem resíduos de galactose. Característica comumente observada em outras lectinas isoladas de equinodermos marinhos, tais como: SUL-I (Nakagawa *et al.*, 1996) CEL-I (Hatakeyama *et al.*, 1994), CEL-III (Hatakeyama *et al.*, 1994), CEL-IV (Hatakeyama *et al.*, 1994), SUEL (Ozeki *et al.*, 1991) e outras.

Contudo, alguns carboidratos derivados de galactose não foram capazes de inibir a atividade hemaglutinante de HGA-2. A lectina não foi capaz de reconhecer carboidratos com terminais de elevada hidrofobicidade. Isto é válido para fenil- β -D-galactose, 4-nitrofenil- α -D-galactosídeo e 2-nitrofenil- β -D-galactosídeo. A não interação da lectina com o carboidrato pode estar relacionada com a presença do grupo hidrofóbico associado ao carbono C1. Característica

semelhante pode estar associada a não interação entre HGA-2 e metil- β -tiogalactosídeo, no qual a presença da ramificação no carbono C1 dificulta a interação da lectina com o carboidrato. A configuração do carbono C6 também pode ser importante para o reconhecimento do carboidrato, tendo em vista que o ácido D-galacturônico não inibiu a atividade de HGA-2.

Além dos sacarídeos, a atividade hemaglutinante de HGA-2 também foi inibida por glicoproteínas, tais como mucina de estômago de porco tipo II, tiroglobulina e asialofetuína. O efeito da mucina sobre a atividade hemaglutinante de HGA-2 pode estar relacionado com as estruturas de carboidratos com glicosilação do tipo *O*, que compartilham um dissacarídeo central 1Gal β 1-3GalNAc (Melo *et al.*, 2014). Os efeitos inibitórios de mucinas na atividade hemaglutinante de lectinas de equinodermos não é uma característica incomum na literatura (Moura *et al.*, 2013; Duarte, 2018; Moura *et al.*, 2015; Torres, 2017; Duarte *et al.*, 2022).

Asialofetuína é uma glicoproteína derivada da fetuína, na qual se difere apenas pela ausência do ácido siálico em sua extremidade (Černocká; Římánková; Ostatná, 2021). Essa ausência ocasiona uma maior exposição dos resíduos de *N*-Acetil-galactosamina encontradas na asialofetuína. A ausência do ácido siálico parece favorecer o reconhecimento da lectina com a glicoproteína, tendo em vista que HGA-2 não foi inibida pela fetuína.

Tiroglobulina também foi capaz de inibir a atividade hemaglutinante de HGA-2. Esta glicoproteína contém 20 regiões putativas de glicosilação do tipo *N*. Muitas das quais podem estar ligadas a unidade de oligossacarídeos contendo fucose e galactose, além de manose e glucosamina. Outras regiões podem conter unidades do tipo *high* manose, ou ligadas a unidade de oligossacarídeos compostos por galactose além de manose e glucosamina, podendo ser estruturas híbridas ou complexas (Yang; Pollock; Rawitch, 1996). Tendo em vista que HGA-2 não foi inibida por manana de levedura, é possível sugerir que a lectina não tenha interação com a região de *high* manose da glicoproteína. Contudo, é possível aventar que a ligação da lectina com a tiroglobulina está associada aos resíduos de galactose presentes na glicoproteína.

4.3 Identificação de proteínas similares a HGA-2

Melo e colaboradores (2014) identificaram cinco peptídeos trípticos sequenciados de HGA-2. Na ocasião fora relatado que CEL-IV, lectina do tipo-C ligante de galactose isolada de *Cucumaria echinata*, era a proteína mais similar a HGA-2. De fato, três peptídeos mostraram grande similaridade com CEL-IV, totalizando, na região coberta pelas sequências disponíveis, 71% de similaridade e 62% de identidade (Figura 5).

Figura 5 – Alinhamento da sequência de aminoácidos de CEL-IV com os peptídeos conhecidos de HGA-2.

	1	10	20	30	40	50	60
CEL-IV	CLTSCPPLWTGFNGKCFRLFHNHNLNFDNAENACRQFGLASCSGDELATGHLASIHSAESQ						
HGA-2	LLTLCPPLWTQ.SVRXXXXFLNNLNFNLAONFXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX						
consensus>50	1LT1CPPLWTqfnvkcfrlF1NnLNF#1A#Nfcrqfglascsgdelatghlasihsaesq						
	70	80	90	100	110	120	
CEL-IV	AFLTELVKTSLPDLITGGWAPQVYIGMKVGSTNSDQTWTDGSSVDYDGVWSGEPNNGPNS						
HGA-2	XX						
consensus>50	aflteltvktslpdlitggwapqvvyigmkvgstnsdqtwtgdgssvdydgwvsgepnngpns						
	130	140	150				
CEL-IV	RGAIAAGDYSGFWADVYSNNFKYICQLPCVHYTLE						
HGA-2	XGAIAA.NYSEGLWADVHSNNGR.....						
consensus>50	rGAIAAg#YSeGLWADVYSNnnfkyicqlpcvhytle						

Fonte: o Autor. CEL-IV (Lectina do tipo-C de *Cucumaria echinata*). HGA-2 (Lectina de *Holothuria grisea*).

Em comparação a lectina putativa de *Holothuria leucospilota* (KAJ8044242.1), HGA-2 apresentou dois peptídeos correspondendo a sequência com 61% de similaridade e 55% de identidade (Figura 6).

Figura 6 - Alinhamento da sequência de aminoácidos da lectina putativa de *Holothuria leucospilota* (KAJ8044242.1) com os peptídeos conhecidos de HGA-2.

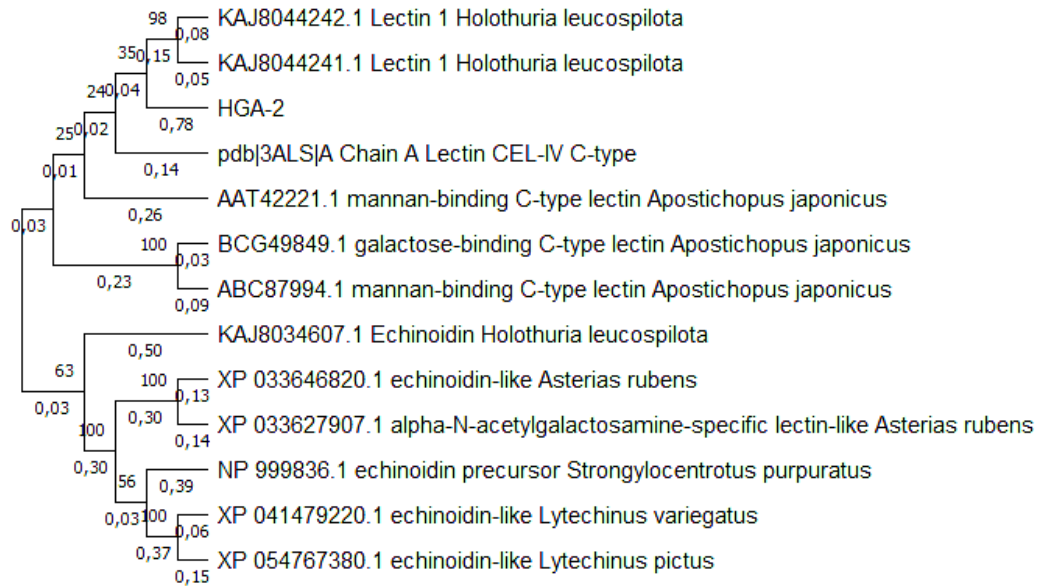
	1	10	20	30	40	50	60
KAJ8044242.1	MQSQTIFFLLGVLLVMLVGGSEACQIPCPPLWTGFKGKCYRLFHDKLLFADAEDACKALKL						
HGA-2	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXLLTLCPPLWTQ.SVRXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX						
consensus>50	mqsqtiflllgvllvmlvggseallilCPPLWTqfkvkcyrlfhdckllfadaedackalkl						
	70	80	90	100	110	120	
KAJ8044242.1	IDCNGDVLTTGHLASIHSEEEQQFLVSLVTSSLPLETDDPTWEDPQVFIGMVVGSSNSVQ						
HGA-2	XX						
consensus>50	idcngdvlttghlasihseseeqqflvslvtsslpletddptewdpqvfigmvvgssnsqv						
	130	140	150	160	170	180	
KAJ8044242.1	YWADESSFDYNGWFPGEPNNGPNSRGAIAAGTHSEGLWADVYNTARLRYICQLPCIKFRH						
HGA-2	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXGAIAA.NYSEGLWADVHSNAR.....						
consensus>50	ywadessfdyngwfpgepnngpnsrGAIAAAntySEGLWADVynnarlryicqlpcikfrh						
KAJ8044242.1	D						
HGA-2	.						
consensus>50	d						

Fonte: Autor. KAJ8044242.1 (Lectina putativa de *Holothuria leucospilota* - KAJ8044242.1). HGA-2 (Lectina de *Holothuria grisea*).

Curiosamente, na árvore filogenética construída a partir do alinhamento de HGA-2 frente a 12 lectinas do tipo-C identificadas em diferentes equinodermos é possível observar

maior relação entre HGA-2 e KAJ8044242.1 (Figura 7).

Figura 7 - Árvore filogenética de lectinas do tipo-C presentes em equinodermos.



Fonte: O Autor. A árvore foi construída pelo algoritmo *neighbor-joining* usando o pacote MEGA-X, baseado no múltiplo alinhamento das sequências pelo MUSCLE.

Inicialmente, dois agrupamentos são observados. No primeiro estão as lectinas de diferentes espécies de pepinos do mar, incluindo as lectinas putativas de *Holothuria leucospilota* (KAJ8044242.1 e KAJ8044241.1), HGA-2, CEL-IV, as lectinas ligantes de manose de *Apostichopus japonicus* (ABC87994.1 e AAT42221.1), e a lectina ligante de galactose de *Apostichopus japonicus* (BCG49849.1).

Neste agrupamento é possível observar lectinas ligantes de diferentes carboidratos (galactosídeos e manosídeos), ao mesmo tempo, este clado é representado apenas por lectinas que contém o motivo EPN, além da própria HGA-2, cuja região relacionada a este motivo não está coberta. Esta observação sugere que a especificidade não parece estar associada à similaridade de sequência, sendo possivelmente definida por questões intrínsecas, como orientação de aminoácidos chave no sítio de ligação (Hatakeyama *et al.*, 2013; Moriuchi *et al.*, 2015).

A princípio a presença da trinca de aminoácidos QPD/EPN foi considerada determinante para a especificidade por galactose e manose, respectivamente (Drickamer, 1992; Iobst; Drickamer, 1994). Contudo, existem registros de proteínas contendo a trinca EPN e sendo ligantes de galactose, o que indica que além desta trinca outros fatores estruturais definem a especificidade (Hatakeyama, 2011). As lectinas CEL-IV e BCG49849.1 de *Apostichopus japonicus* são exemplos de lectinas EPN com especificidade por galactosídeos.

O modelo tridimensional criado para a lectina de *Holothuria leucospilota* (KAJ8044242.1) apresentou estrutura típica de lectinas do tipo C, um misto de α -hélice e β -folhas e um sítio de ligação formado por alças estabilizadas por duas pontes dissulfeto (Figura 8A). Os aminoácidos ¹⁰³W, ¹⁰⁶Q, ¹³⁷E, ¹³⁹N, ¹⁵⁹A, ¹⁶⁰D e ¹⁶¹V estão envolvidos na ligação entre KAJ8044242.1 e melibiose (Gal α 1 $\rightarrow$ 6Glc), o melhor ligante segundo o COACH, confirmando que apesar de ser uma lectina EPN ela reconhece galactosídeos.

O modelo gerado mostra ainda uma orientação espacial da galactose em uma forma muito semelhante àquela observada em CEL-IV (Figura 8B). Tal orientação difere muito daquela observada em lectinas do tipo C com motivo QPD (Figura 8C).

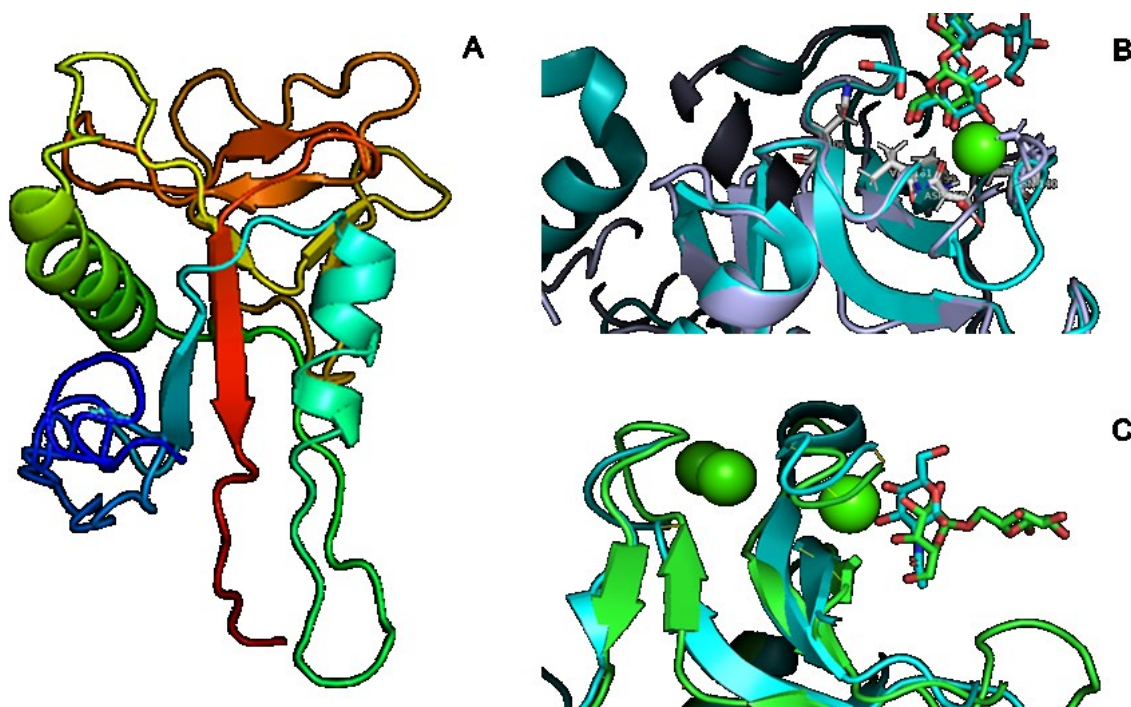
Dentre os aminoácidos envolvidos na ligação, ¹⁵⁹A, ¹⁶⁰D e ¹⁶¹V estão presentes nos peptídeos de HGA-2 e são conservados em CEL-IV, corroborando com a orientação similar da galactose na estrutura de CEL-IV e no modelo de KAJ8044242.1. De acordo com estas observações é possível que HGA-2 seja uma lectina contendo o motivo EPN.

No segundo agrupamento podem ser observadas as lectinas semelhantes à equinoidina, uma lectina do tipo-C isolada a partir do fluido celomático do ouriço *Anthocidaris crassispina* (Giga; Ikai; Takahashi, 1987). Neste clado estão presentes as lectinas putativas dos ouriços *Strongylocentrotus purpuratus* (NP_999836.1), *Lytechinus variegatus* (XP_041479220.1) e *Lytechinus pictus* (XP_054767380.1), da estrela do mar *Asterias rubens* (XP_033627907.1 e XP_033646820) e uma outra lectina de *Holothuria leucospilota* (KAJ8034607.1).

Estas lectinas tem distintas trincas de aminoácidos nas posições que supostamente definem a especificidade. Em *Strongylocentrotus purpuratus* (NP_999836.1) e *Asteria rubens* (XP_033646820.1) é observado QPD, em *Asterias rubens* (XP_033627907.1) a trinca EPN está presente, já em *Holothuria leucospilota* (KAJ8034607.1) um motivo incomum (HPA) é observado, enquanto que as demais lectinas deste agrupamento apresentam QPN. Equinoidina, de *Anthocidaris crassispina*, é específica a O-glicanos complexos e Gal β 1-3GalNAc. Equinoidina possui a trinca NPD em sua estrutura (Giga; Ikai; Takahashi, 1987).

Desta forma, a árvore filogenética indica claramente 2 linhagens de lectinas do tipo C presentes em diferentes equinodermos, mas estas linhagens parecem não estar relacionadas a especificidade por carboidratos, nem mesmo com a presença/ausência dos motivos QPD/EPN.

Figura 8 - Modelo tridimensional de KAJ8044242.1 gerado pelo servidor I-TASSER.



Fonte: O Autor. Modelo tridimensional de KAJ8044242.1 gerado pelo servidor I-TASSER. **A.** Estrutura predita global de KAJ8044242.1. **B.** Sobreposição do sítio de ligação e dos ligantes de KAJ8044242.1, em ciano, e CEL-IV (melibiose e rafinose, respectivamente), em azul. **C.** Sobreposição do sítio de ligação de KAJ8044242.1, em ciano, e CEL-I (*Cucumaria echinata* lectin-I, lectina do tipo C com motivo QPD, e seus ligantes), em verde (melibiose e N-acetilgalactosamina, respectivamente). As esferas verdes representam os átomos de Ca^{2+} .

A real posição de HGA-2 dentro da filogenia de lectinas do tipo-C só poderá ser avaliada após a obtenção da sequência de aminoácidos completa da lectina.

4.4 Atividade de HGA-2 combinada com antibióticos

Pela primeira vez foi analisado o estudo de uma lectina de equinodermo em associação com antibióticos. O ensaio de combinação de HGA-2 com antibióticos (oxacilina e tetraciclina) foi realizado para verificar se a lectina era capaz de modificar o efeito dos antibióticos contra as cepas testadas.

Para realização do ensaio, HGA-2 foi utilizada a uma concentração constante (125 $\mu\text{g/mL}$). Nos testes de combinação de HGA-2 com antibióticos foram observados efeitos antagônicos, aditivos e sinérgicos. Os resultados da associação de HGA-2 com oxacilina e

tratraciclina contra as cepas bacterianas testadas podem ser observados na Tabela 2.

No CIM individual da oxacilina foi observado um aumento significativo quando combinada com a lectina contra *S. aureus* ATCC 25923, que apresentou para esse antibiótico um valor de 0,250 µg/mL, quando combinada com a lectina esse valor se elevou para uma concentração >1 µg/mL (4x CIM individual). Com relação as cepas *S. aureus* 700698 e *E. coli* 11303 não houve interação positiva ou negativa. A CIM combinada apresentou o mesmo valor da CIM individual. Sendo 128 µg/mL (1x CIM individual) e 256 µg/mL (1x CIM individual) para *S. aureus* 700698 e *E. coli* 11303, respectivamente.

Em associação com tetraciclina foi observado efeito antagônico quando combinada com a lectina para *S. aureus* 25923, aumentando o CIM de 0,250 µg/mL para uma concentração >1 µg/mL (4x CIM individual). Para *S. aureus* 700698 foi observado efeito sinérgico quando o antibiótico foi combinado com a lectina, onde o CIM individual do antibiótico de 128 µg/mL reduziu para 16 µg/mL (1/8 da CIM). Para *E. coli* 11303 foi observado efeito aditivo, onde o CIM individual do antibiótico de 1 µg/mL reduziu para 0,5 µg/mL (1/2 da CIM individual).

A oxacilina é um antibiótico β-lactâmico que apresenta um estreito espectro de ação (Takács *et al.*, 2022). A produção de β-lactamase é o principal mecanismo de resistência bacteriana aos antibióticos β-lactâmicos. As β-lactamases são enzimas que podem clivar o anel β-lactâmico, acarretando a inativação de antibióticos β-lactâmicos. Apesar dos mecanismos de resistência a oxacilina não terem sido totalmente esclarecidos, podem ocorrer outros fatores para o desenvolvimento dessa resistência, tais como: mutações nas proteínas de ligação às penicilinas, diminuição da permeabilidade da membrana externa bacteriana e produção de novas β-lactamases hidrolisantes de oxacilina (Lode, 2008; Nomura *et al.*, 2020).

Tabela 2 – Efeito da lectina HGA-2 combinada aos antibióticos Oxacilina e Tetraciclina sobre *Staphylococcus aureus* e *E. coli*.

BACTÉRIAS	ANTIBIÓTICO			EFEITO	ANTIBIÓTICO			EFEITO
	Oxacilina				Tetraciclina			
	CIM1 µg/mL (individual)	CIM2 µg/mL (combinado)	Relação entre CIMs		CIM1 µg/mL (individual)	CIM2 µg/mL (combinado)	Relação entre CIMs	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,250	>1	4x CIM	Antagônico	0,250	>1	4x CIM	Antagônico
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	128	128	1x CIM	Não Interação	128	16	1/8	Sinergismo
<i>E. coli</i> ATCC 11303	256	256	1x CIM	Não Interação	1	0,5	1/2	Aditivo

Fonte: Próprio autor. Valores da Concentração Inibitória Mínima individual (CIM1), Concentração Inibitória Mínima Combinada (CIM2) dos antibióticos combinados a lectina HGA-2, e da relação entre CIM2/CIM1. As concentrações dos antibióticos variaram de 256 a 0,250 µg/mL para oxacilina e de 128 a 0,250 µg/mL para tetraciclina. A concentração de HGA-2 se manteve constante (125 µg/mL). Valores da relação entre as CIMs iguais a 1/2 foram interpretados como efeito aditivo, e valores entre 1/4 a 1/16 foram considerados como efeito sinérgico. Valores igual a 1x a CIM foram interpretados como não interação e valores iguais a 2x, 4x da CIM, foram considerados como antagônico.

A tetraciclina é um antibiótico de amplo espectro utilizado no tratamento de infecções contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O mecanismo de ação das tetraciclinas consiste na inibição da síntese proteica, evitando a atuação do RNA transportador (tRNA) na região 30s do ribossomo. A resistência às tetraciclinas pode surgir devido a ação de bombas de efluxo, proteção ribossômica, modificações no local alvo do fármaco e mecanismos de alteração enzimática (Gasparrini *et al.*, 2020; Sheykhsaran *et al.*, 2019).

Até o presente momento, não há descrições na literatura de trabalhos relacionado a associação de lectina de equinodermos com antibióticos. Nessa linha de pesquisa, a predominância de trabalhos está relacionada com lectinas vegetais em associação com antibióticos já comercializados. ApuL, lectina de *Alpinia purpurata*, apresentou efeito sinérgico contra diferentes microrganismos quando combinada com antibióticos. ApuL-oxacilina apresentou efeito sinérgico contra cepas de *S. aureus* resistentes a oxacilina. Além disso, o mesmo efeito também foi observado contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* quando a lectina foi combinada com ceftazidima. ApuL também apresentou ação sinérgica para *Candida parapsilosis* quando combinada com fluconazol (Ferreira *et al.*, 2018). CasuL, lectina de *Calliandra surinamensis*, apresentou efeito sinérgico contra duas cepas de *S. aureus* isoladas da mastite de espécies bovina e caprinas. Os valores do CIM individual de tetraciclina foram reduzidos de 0,5 e 2,00 µg/mL para 0,12 e $3,12 \times 10^{-2}$ µg/mL, respectivamente (Procópio *et al.*, 2019).

A grande maioria dos estudos sobre associação de lectina com antibióticos está relacionada com lectinas vegetais. Contudo, estudos recentes fizeram análises de associações de antibióticos com lectinas de organismos marinhos já descritas na literatura. Duarte e colaboradores (2023) demonstraram que a lectina ALL, de *Aplysina lactuca*, quando combinada com antibióticos, potencializa o efeito antibiótico. ALL associada a oxacilina, ou tetraciclina, apresentou efeito sinérgico contra cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. Quando combinada com ampicilina e tetraciclina, a lectina AFL, de *Aplysina fulva*, apresentou efeito sinérgico contra cepas de *S. epidermidis* e *E. coli*, respectivamente (Oliveira Neto, 2023). A lectina ACL, de *Aplysina cauliformis*, combinada com ampicilina apresentou efeito sinérgico contra cepas de *S. aureus* (ATCC 25923 e ATCC 700698). Quando combinada com tetraciclina, ACL exibiu atividade sinérgica contra *S. aureus* e *S. epidermidis* (Oton, 2023).

Estes trabalhos sugerem que o efeito sinérgico, causado pela associação de lectinas com antibióticos, pode estar relacionado com a interação do fármaco com o DRC da lectina. A lectina reconhece o carboidrato presente na membrana celular e facilita a entrada do fármaco.

Outra hipótese é que as lectinas podem interagir com glicanos presentes nas bombas de efluxo, acarretando modificações estruturais nesse mecanismo (Duarte *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2019). A análise do efeito antibacteriano de HGA-2 em associação com antibióticos é o primeiro estudo de avaliação do efeito antibacteriano de uma lectina de equinodermo em combinação com antibióticos disponíveis comercialmente. Entretanto, há uma necessidade de estudos complementares para melhor compreensão do mecanismo de interação de HGA-2 com antibióticos.

4.5 Ação de HGA-2 sobre a formação de biofilmes bacterianos

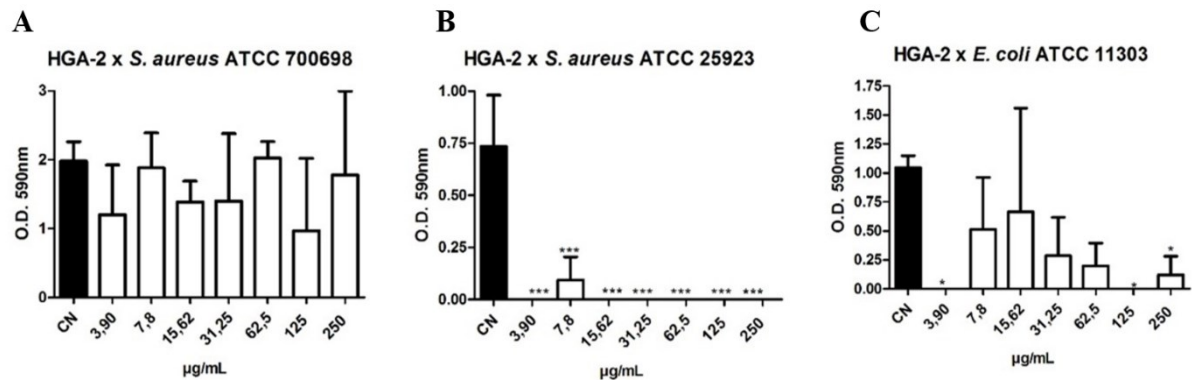
Foram utilizados dois ensaios distintos para avaliar o efeito de HGA-2 na prevenção de formação de biofilme bacteriano: o método colorimétrico Cristal de Violeta (CV) para quantificação de massa do biofilme e o método de contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) para enumerar células viáveis no biofilme.

Dentre as cepas Gram-positivas não houve redução significativa na formação de biofilme de *S. aureus* ATCC 700698 nas concentrações testadas de HGA-2 (Figura 9A). Para a cepa *S. aureus* ATCC 25923, houve redução estatisticamente significativa em todos os tratamentos testados (3,90 a 250 µg/mL) (Figura 9B). Para a cepa Gram-negativa, o tratamento do biofilme de *E. coli* ATCC 11303 com HGA-2 reduziu a biomassa nas concentrações de 3,90, 125 e 250 µg/mL (Figura 9C).

HGA-2 foi capaz de reduzir a formação do biofilme bacteriano de cepas Gram-positiva e Gram-negativa (*S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 11303), contudo HGA-2 apresentou efeito inibidor para cepa de *S. aureus* ATCC 25923, mostrando efeito significativo em todas as concentrações testadas.

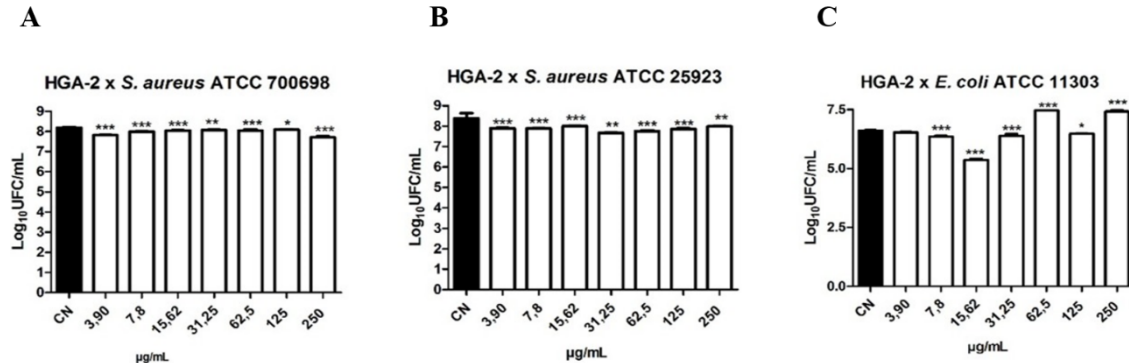
Em relação ao número de células viáveis, com exceção do tratamento para *E. coli* ATCC 11303 a uma concentração de 3,90 µg/mL, HGA-2 mostrou poder redutor em todas as concentrações (Figura 8). Para *S. aureus* ATCC 700698 e *S. aureus* ATCC 25923, o tratamento de HGA-2 reduziu o número de células viáveis em todas as concentrações testadas (Figura 8A e 8B). No tratamento com HGA-2, o número de células viáveis de *E. coli* ATCC 11303 reduziu significativamente entre as concentrações de 7,8 µg/mL e 250 µg/mL (Figura 8C).

Figura 9 - Efeito de HGA-2 sobre biofilmes de *S. aureus* ATCC 700698, *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 11303.



Fonte: O Autor. **A:** Atividade antibiofilme bacteriano de HGA-2 contra *S. aureus* ATCC 700698. **B:** Atividade antibiofilme bacteriano de HGA-2 contra *S. aureus* ATCC 25923. **C:** Atividade antibiofilme bacteriano de HGA-2 contra *E. coli* ATCC 11303. *p < 0,05 em relação ao controle. ** p < 0,001 em relação ao controle. *** p < 0,001 em relação ao controle.

Figura 10 - Número de células viáveis de *S. aureus* ATCC 700698, *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 11303 na presença de HGA-2.



Fonte: O Autor. **A:** Enumeração de células viáveis de *S. aureus* ATCC 700698 contra HGA-2. **B:** Enumeração de células viáveis de *S. aureus* ATCC 25923 contra HGA-2. **C:** Enumeração de células viáveis de *E. coli* ATCC 11303 contra HGA-2. L. *p < 0,05 em relação ao controle. ** p < 0,001 em relação ao controle. *** p < 0,001 em relação ao controle.

Biofilmes bacterianos são agregados polimicrobianos anexados a uma matriz extracelular produzidas pelos próprios microrganismos. (Bose *et al.*, 2016). Dentre as características dos biofilmes, a sua resistência ao sistema imune do hospedeiro e a antibióticos tornam essa estrutura um fator preocupante para os profissionais da saúde (Flemming; Wingender, 2010). A presença do biofilme bacteriano pode aumentar até 10.000 vezes a dose de um composto bactericida contra células convencionais, ou seja, células bacterianas na

ausência do biofilme (Miquel *et al.*, 2016).

A membrana externa das bactérias Gram-positivas é composta principalmente por peptidoglicano, também denominado mureína. Este consiste em uma repetição linear de unidade de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) ligado ao ácido *N*-acetilmurâmico. Estrutura reticulada por cadeia de aminoácidos formando uma estrutura semelhante a uma malha (Rohde, 2019). A membrana externa das bactérias Gram-negativas é constituída principalmente de lipopolissacarídeo, um sacarolípídeo formado a base de glucosamina (Sperandeo; Martorana; Polissi, 2017).

Outras lectinas de equinodermos também apresentaram efeitos significativos na redução da formação do biofilme bacteriano. ELL, de *Echinometra lucunter*, foi capaz de reduzir a biomassa e inibir a viabilidade celular do biofilme de bactérias Gram-positiva e Gram-negativas, sugerindo uma possível capacidade de reconhecimento de patógenos (Duarte, 2021). A lectina OXYL, do crinoide *A. japonica*, inibiu significativamente a formação do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* (Hasan *et al.*, 2019). Além de equinodermos, lectinas de outros organismos marinhos também apresentaram efeito antibiofilme. AfL, de *Aplysina fulva*, e CCL, de *Chondrilla caribensis*, são lectina ligantes a galactosídeos, assim como HGA-2, e também exibiram atividade antibiofilme contra cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas (Carneiro *et al.*, 2019; Marques *et al.*, 2018).

Estudos indicam que as lectinas poderiam interferir na formação do biofilme através da interação com a células bacterianas que constituem o biofilme, acarretando uma alteração da expressão dos genes associados à virulência e formação do biofilme (Marques *et al.*, 2018).

5 CONCLUSÃO

A lectina de *Holothuria grisea* (HGA-2) foi purificada corretamente através de cromatografia de afinidade em goma de guar. A atividade hemaglutinante de HGA-2 foi inibida principalmente por galactosídeos ou por carboidratos que apresentavam resíduos de galactose em sua estrutura.

A partir do modelo tridimensional de KAJ8044242.1, é possível sugerir de que HGA-2 contenha um motivo EPN conservado em sua sequência de aminoácidos.

Em associação com antibióticos, HGA-2 apresentou melhores resultados quando combinada com tetraciclina, potencializando o efeito antibiótico do fármaco.

Além disso, HGA-2 exibiu atividade antibiofilme, reduzindo a massa de biofilme e o número de células viáveis de cepas Gram-positivas e Gram-negativas.

A descoberta de novas lectinas com atividades biológicas em potencial é de grande relevância para a área da biotecnologia. Tendo em vista que essas proteínas podem interagir com os carboidratos presentes na parede celular bacteriana, essas moléculas podem ser úteis no desenvolvimento de novas terapias, ou medicamentos, contra infecções bacterianas. Tendo em vista a problemática relacionada a resistência bacteriana a fármacos conhecidos, HGA-2 mostra ser um potencial composto para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antibacteriana.

Além disso, no presente trabalho foi realizado a primeira análise do efeito antibacteriano de uma lectina de equinodermo em combinação com antibióticos disponíveis comercialmente. Entretanto, há uma necessidade de estudos complementares para melhor compreensão do mecanismo de interação de HGA-2 com antibióticos.

REFERÊNCIAS

- BIES, C.; LEHR, C. M.; WOODLEY, J. F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 4, p. 425-435, 2004.
- BOSE, P. P. *et al.* A glucose/mannose binding lectin from litchi (*Litchi chinensis*) seeds: Biochemical and biophysical characterizations. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 6, p. 242-252, 2016.
- BROWN, G. D.; WILLMENT, J. A.; WHITEHEAD, L. C-type lectins in immunity and homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 6, p. 374-389, 2018.
- BULGAKOV, A. A. *et al.* Isolation and properties of a mannan-binding lectin from the coelomic fluid of the holothurian *Cucumaria japonica*. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 65, n. 8, p. 933-939, 2000.
- BULGAKOV, A. A. *et al.* Molecular and biological characterization of a mannan-binding lectin from the holothurian *Apostichopus japonicus*. **Glycobiology**, v. 17, n. 12, p. 1284-1298, 2007.
- BULGAKOV, Aleksandr A. *et al.* Mannan-binding lectin of the sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. **Marine Biotechnology**, v. 15, p. 73-86, 2013.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* L-Rhamnose-binding lectin from eggs of the *Echinometra lucunter*: Amino acid sequence and molecular modeling. **International journal of biological macromolecules**, v. 78, p. 180-188, 2015.
- CARNEIRO, R. F. **Purificação e caracterização bioquímica de lectinas ligantes de galactose isoladas de invertebrados marinhos**. 2017. Tese (Doutorado em Biotecnologia de Recursos Naturais) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, 2017.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* A new mucin-binding lectin from the marine sponge *Aplysina fulva* (AFL) exhibits antibiofilm effects. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 662, p. 169-176, 2019.
- CECCOLINI, F.; CIANFERONI, F. New replacement names in fossil echinoderms (Echinodermata). **Paleontological Research**, v. 27, n. 4, p. 379-382, 2023.
- ČERNOCKÁ, H.; ŘÍMÁNKOVÁ, L.; OSTATNÁ, V. Fetuin and asialofetuin at charged surfaces: Influence of sialic acid presence. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 902, p. 115801, 2021.
- CHETTRI, D. *et al.* Lectins: Biological significance to biotechnological application. **Carbohydrate Research**, v. 506, p. 108367, 2021.
- CHIARAMONTE, M.; RUSSO, R. The echinoderm innate humoral immune response. **Italian Journal of Zoology**, v. 82, n. 3, p. 300-308, 2015.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic acids research**, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.

CUMMINGS, R. D. *et al.* C-type lectins. **Essentials of Glycobiology [Internet]. 4th edition**, 2022a.

CUMMINGS, R. D. *et al.* R-type lectins. **Essentials of Glycobiology [Internet]. 4th edition**, 2022b.

DAN, X.; WENLONG L.; TZI B. N. Development and applications of lectins as biological tools in biomedical research. **Medicinal research reviews**. v. 36, n. 2, p. 221-247, 2016.

DATTA, D.; TALAPATRA, S. N.; SWARNAKAR, S. An overview of lectins from freshwater and marine macroinvertebrates. **World Scientific News**, n. 46, p. 77-87, 2016.

DE KRAKER, M. E. A.; STEWARDSON, A. J.; HARBARTH, S. Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050?. **PLoS medicine**, v. 13, n. 11, p. e1002184, 2016.

DE LORGERIL, J. *et al.* Whole transcriptome profiling of successful immune response to *Vibrio* infections in the oyster *Crassostrea gigas* by digital gene expression analysis. **PLoS one**, v. 6, n. 8, p. e23142, 2011.

DÖRR, T.; VULIĆ, M.; LEWIS, K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. **PLoS biology**, v. 8, n. 2, p. e1000317, 2010.

DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 20, p. 9557-9560, 1988.

DRICKAMER, K. Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. **Nature**, v. 360, n. 6400, p. 183-186, 1992.

DUARTE, J. A. **Caracterização estrutural e avaliação do potencial antibacteriano em combinação com antibióticos de uma lectina da esponja marinha *Aplysina lactuca***. 2022. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.

DUARTE, J. A. *et al.* Structural characterization of a galectin from the marine sponge *Aplysina lactuca* (ALL) with synergistic effects when associated with antibiotics against bacteria. **Biochimie**, v. 214, p. 165-175, 2023.

DUARTE, P. L. **Purificação e caracterização bioquímica de uma lectina extraída do fluido celomático do ouriço-do-mar, *Echinometra lucunter*, exposto a indução bacteriana**. 2018. 36 f. TCC (Graduação em Engenharia de Pesca) - Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

DUARTE, P. L. **Lectina relacionada ao fibrinogênio do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*: isolamento, sequência de aminoácidos e atividade antimicrobiana**. 2021. 65 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal do Ceará, 2021.

- DUARTE, P. L. *et al.* A fibrinogen-related Lectin from *Echinometra lucunter* represents a new FReP family in Echinodermata phylum. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 131, p. 150-159, 2022.
- ELLIS, C. R. *et al.* Aquatic Antagonists: Sea Cucumbers (Holothuroidea). **Cutis**, v. 108, n. 2, p. 68-70, 2021.
- EZHOVA, O. V.; MALAKHOV, V. V. Axial complex of Crinoidea: comparison with other Ambulacraria. **Journal of Morphology**, v. 281, n. 11, p. 1456-1475, 2020.
- EL-MARADNY, Y. A. *et al.* Lectins purified from medicinal and edible mushrooms: Insights into their antiviral activity against pathogenic viruses. **International journal of biological macromolecules**, v. 179, p. 239-258, 2021.
- FERREIRA, G. R. S. *et al.* Antimicrobial potential of *Alpinia purpurata* lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity. **Microbial pathogenesis**, v. 124, p. 152-162, 2018.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature reviews microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.
- FRANSOZO, A.; NEGREIROS-FRANSOZO, M. L. (Orgs.). **Zoologia dos Invertebrados**. Rio de Janeiro: Roca, 2016.
- GASPARRINI, A. J. *et al.* Tetracycline-inactivating enzymes from environmental, human commensal, and pathogenic bacteria cause broad-spectrum tetracycline resistance. **Communications biology**, v. 3, n. 1, p. 241, 2020.
- GASPARINI, F. *et al.* Novel rhamnose-binding lectins from the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 32, n. 10, p. 1177-1191, 2008.
- GIGA, Y.; SUTOH, K.; IKAI, A. A new multimeric hemagglutinin from the coelomic fluid of the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. **Biochemistry**, v. 24, n. 16, p. 4461-4467, 1985.
- GIGA, Y.; IKAI, A.; TAKAHASHI, K. The complete amino acid sequence of echinoidin, a lectin from the coelomic fluid of the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. Homologies with mammalian and insect lectins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 13, p. 6197-6203, 1987.
- GOHARIMANESH, M. *et al.* Interactive identification key to all brittle star families (Echinodermata; Ophiuroidea) leads to revised morphological descriptions. **European Journal of Taxonomy**, v. 766, p. 1-63, 2021.
- GOUMENOU, A.; DELAUNAY, N.; PICHON, V. Recent advances in lectin-based affinity sorbents for protein glycosylation studies. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, p. 746822, 2021.

GOWDA, N. M.; GOSWAMI, U.; KHAN, M. I. Purification and characterization of a T-antigen specific lectin from the coelomic fluid of a marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 24, n. 4, p. 450-458, 2008a.

GOWDA, N. M.; GOSWAMI, U.; KHAN, M. I. T-antigen binding lectin with antibacterial activity from marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*): Possible involvement in differential recognition of bacteria. **Journal of invertebrate pathology**, v. 99, n. 2, p. 141-145, 2008b.

GUERRERO, A. G.; FORERO, A. R. Histological characterization of skin and radial bodies of two species of genus *Isostichopus* (Echinodermata: Holothuroidea). **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 2, p. 155-161, 2018.

GUPTA, A. Emerging applications of lectins in cancer detection and biomedicine. **Materials Today: Proceedings**, v. 31, p. 651-661, 2020.

HAN, L. L. *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of a C-type lectin (AJCTL) from the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. **Immunology Letters**, v. 143, n. 2, p. 137-145, 2012.

HANINGTON, P. C. *et al.* Role for a somatically diversified lectin in resistance of an invertebrate to parasite infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 49, p. 21087-21092, 2010.

HARMS, C. A. Echinoderms. **Invertebrate medicine**, p. 579-598, 2022.

HASAN, I. *et al.* Functional characterization of OXYL, a SghC1qDC LacNAc-specific lectin from the crinoid feather star *Anneissia japonica*. **Marine Drugs**, v. 17, n. 2, p. 136, 2019.

HASHIM, O. H.; JAYAPALAN, J. J.; LEE, C.S. Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers. **PeerJ**, v. 5, p.e3784, 2017.

HATAKEYAMA, T. *et al.* Purification and characterization of two lectins from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 57, n. 10, p. 1736-1739, 1993.

HATAKEYAMA, T. *et al.* Purification and characterization of four Ca^{2+} -dependent lectins from the marine invertebrate, *Cucumaria echinata*. **The Journal of Biochemistry**, v. 116, n. 1, p. 209-214, 1994.

HATAKEYAMA, T. *et al.* Amino acid sequence of a C-type lectin CEL-IV from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 59, n. 7, p. 1314-1317, 1995.

HATAKEYAMA, T. *et al.* Amino acid sequence and carbohydrate-binding analysis of the N-acetyl-D-galactosamine-specific C-type lectin, CEL-I, from the Holothuroidea, *Cucumaria echinata*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 66, n. 1, p. 157-163, 2002.

HATAKEYAMA, T. *et al.* C-type lectin-like carbohydrate recognition of the hemolytic lectin CEL-III containing ricin-type β -trefoil folds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 52, p. 37826-37835, 2007

HATAKEYAMA, T. *et al.* Galactose recognition by a tetrameric C-type lectin, CEL-IV, containing the EPN carbohydrate recognition motif. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 12, p. 10305-10315, 2011.

HATAKEYAMA, T. *et al.* Alteration of the carbohydrate-binding specificity of a C-type lectin CEL-I mutant with an EPN carbohydrate-binding motif. **Protein and Peptide Letters**, v. 20, n. 7, p. 796-801, 2013.

HATAKEYAMA, T. *et al.* cDNA cloning and characterization of a rhamnose-binding lectin SUL-I from the toxopneustid sea urchin *Toxopneustes pileolus* venom. **Toxicon**, v. 94, p. 8-15, 2015.

HENDRICKSON O. D., ZHERDEV A. V. Analytical application of lectins. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 48, n. 4, p. 279-92, 2018.

HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L. S.; KEEN, S. L. **Principios integrados de zoología**. Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2016.

HIMESHIMA, T.; HATAKEYAMA, T.; YAMASAKI, N. Amino acid sequence of a lectin from the sea cucumber, *Stichopus japonicus*, and its structural relationship to the C-type animal lectin family. **The Journal of Biochemistry**, v. 115, n. 4, p. 689-692, 1994.

IYAMA, C. *et al.* Mannose-binding C-type lectins as defense molecules on the body surface of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 116, p. 103915, 2021.

IMAMICHI, Y.; YOKOYAMA, Y. Purification and characterization of a lectin from the starfish *Asterias amurensis*. **Fisheries science**, v. 79, p. 1007-1013, 2013.

IMAMICHI, Y. *et al.* Purification, characterization and cDNA cloning of a lectin from the brittle star *Ophioplocus japonicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 262, p. 110757, 2022.

IOBST, S. T.; DRICKAMER, K. Binding of sugar ligands to Ca (2+)-dependent animal lectins. II. Generation of high-affinity galactose binding by site-directed mutagenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 22, p. 15512-15519, 1994.

KALININ, V. I.; SILCHENKO, A. S. Echinoderms Metabolites: Structure, Functions and Biomedical Perspectives II. **Marine Drugs**, v. 20, n. 8, p. 492, 2022.

KALTNER, H.; GABIUS, H. J. Sensing glycans as biochemical messages by tissue lectins: the sugar code at work in vascular biology. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 119, n. 04, p. 517-533, 2019.

- KAKIUCHI, M. *et al.* Purification, characterization, and cDNA cloning of α -N-acetylgalactosamine-specific lectin from starfish, *Asterina pectinifera*. **Glycobiology**, v. 12, n. 2, p. 85-94, 2002.
- KHAN, H. A.; BAIG, F. K.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 5, p. 478-482, 2017.
- KHOTIMCHENKO, Y. Pharmacological potential of sea cucumbers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1342, 2018.
- KIANFAR, E. Protein nanoparticles in drug delivery: animal protein, plant proteins and protein cages, albumin nanoparticles. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, p. 159, 2021.
- KILPATRICK, D. C. **Handbook of animal lectins**. John Wiley, 2000.
- KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et biophysica acta (BBA)-General subjects**, v. 1572, n. 2-3, p. 187-197, 2002.
- KUMAR, S. *et al.* MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547, 2018.
- KVENNEFORS, E. C. E. *et al.* An ancient and variable mannose-binding lectin from the coral *Acropora millepora* binds both pathogens and symbionts. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 32, n. 12, p. 1582-1592, 2008.
- KWAN, B. W. *et al.* Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 1468-1473, 2013.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LECHARTIER, B.; HARTKOONR, R. C.; COLE, S. T. In vitro combination studies of benzothiazinone lead compound BTZ043 against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l], v. 56, n. 11, p. 5790-5793, 2012.
- LI, C. *et al.* Antimicrobial peptides in echinoderm host defense. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 49, n. 1, p. 190-197, 2015.
- LIYANAGE, S. *et al.* Chemical and physical characterization of galactomannan extracted from guar cultivars (*Cyamopsis tetragonolobus* L.). **Industrial crops and Products**, v. 74, p. 388-396, 2015.
- LODE, H. M. Rational antibiotic therapy and the position of ampicillin/sulbactam. **International journal of antimicrobial agents**, v. 32, n. 1, p. 10-28, 2008.
- LOH, S. H. *et al.* Animal lectins: potential receptors for ginseng polysaccharides. **Journal of ginseng research**, v. 41, n. 1, p. 1-9, 2017.

MARQUES, D. N. *et al.* Antibacterial activity of a new lectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis*. **International journal of biological macromolecules**, v. 109, p. 1292-1301, 2018.

MATSUI, T. *et al.* Purification and characterization of two Ca^{2+} -dependent lectins from coelomic plasma of sea cucumber, *Stichopus japonicus*. **The Journal of Biochemistry**, v. 116, n. 5, p. 1127-1133, 1994.

MATSUMOTO, R. *et al.* Glycomics of a novel type-2 N-acetylglucosamine-specific lectin purified from the feather star, *Oxycomanthus japonicus* (Pelmatozoa: Crinoidea). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 158, n. 4, p. 266-273, 2011.

MEIERS, J. *et al.* Lectin antagonists in infection, immunity, and inflammation. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 53, p. 51-67, 2019.

MELO, A. A. *et al.* HGA-2, a novel galactoside-binding lectin from the sea cucumber *Holothuria grisea* binds to bacterial cells. **International journal of biological macromolecules**, v. 64, p. 435-442, 2014.

MIQUEL, S. *et al.* Anti-biofilm activity as a health issue. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 592, 2016.

MISHRA, A. *et al.* Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 134, p. 110827, 2019.

MONGIARDINO KOCH, N. **Integrating genomics with the fossil record to explore the evolutionary history of Echinoidea**. 2021.

MORIUCHI, H. *et al.* Mannose-recognition mutant of the galactose/N-acetylglucosamine-specific C-type lectin CEL-I engineered by site-directed mutagenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1850, n. 7, p. 1457-1465, 2015.

MOURA, R. M. *et al.* *Holothuria grisea* agglutinin (HGA): the first invertebrate lectin with anti-inflammatory effects. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 27, n. 6, p. 656-668, 2013.

MOURA, R. M. *et al.* Hemagglutinating/Hemolytic activities in extracts of marine invertebrates from the Brazilian coast and isolation of two lectins from the marine sponge *Cliona varians* and the sea cucumber *Holothuria grisea*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 973-984, 2015.

MOREAU, C. *et al.* The high diversity of Southern Ocean sea stars (Asteroidea) reveals original evolutionary pathways. **Progress in oceanography**, v. 190, p. 102472, 2021.

MURRAY, C. J. L. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022.

NAGANUMA, T. *et al.* Isolation, characterization and molecular evolution of a novel pearl shell lectin from a marine bivalve, *Pteria penguin*. **Molecular diversity**, v. 10, p. 607-618, 2006.

NAKAGAWA, H. *et al.* Isolation of a novel lectin from the globiferous pedicellariae of the sea urchin *Toxopneustes pileolus*. **Natural Toxins 2: Structure, Mechanism of Action, and Detection**, p. 213-223, 1996.

NAKAGAWA, H. *et al.* Biochemical and physiological properties of pedicellarial lectins from the toxopneustid sea urchins. **Journal of natural toxins**, v. 8, n. 3, p. 297-308, 1999.

NAKAGAWA, H. *et al.* Recent studies on the pathological effects of purified sea urchin toxins. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**, v. 22, n. 4, p. 633-649, 2003.

NANDHINI, P. *et al.* Recent developments in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) treatment: a review. **Antibiotics**, v. 11, n. 5, p. 606, 2022.

NEWTON, A. L.; DENNIS, M. M. Echinodermata. **Invertebrate Histology**, p. 1-18, 2021.

NOMURA, R. *et al.* A class A β -lactamase produced by borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* hydrolyses oxacillin. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 244-247, 2020.

OGAWA, T. *et al.* Diversified carbohydrate-binding lectins from marine resources. **Journal of amino acids**, v. 2011, 2011.

OLIVEIRA NETO, J. E. **Caracterização estrutural e avaliação do potencial antibacteriano em combinação com antibióticos de uma lectina da esponja marinha *Aplysina fulva***. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.

OTON, L.F. **Avaliação do potencial antimicrobiano de uma lectina da esponja marinha *Aplysina cauliformis* em combinação com antibióticos**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.

OZEKI, Y. *et al.* Amino acid sequence and molecular characterization of a D-galactoside-specific lectin purified from sea urchin (*Anthocidaris crassispina*) eggs. **Biochemistry**, v. 30, n. 9, p. 2391-2394, 1991.

PALACIOS, A. R. *et al.* Metallo- β -lactamase inhibitors inspired on snapshots from the catalytic mechanism. **Biomolecules**, v. 10, n. 6, p. 854, 2020.

PAVÃO, D. *et al.* Capacidade de formação de biofilme por cepas bacterianas e ação antibiofilme do extrato de *Lafoensia pacari* (Lythraceae). 2021.

PECHENIK, J. A. **Biologia dos Invertebrados**, 7ed. Porto Alegre: AMGH Editora LTDA, 2016.

- PLATTNER, V. E. *et al.* Alteration of the glycosylation pattern of monocytic THP-1 cells upon differentiation and its impact on lectin-mediated drug delivery. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 73, n. 3, p. 324-330, 2009.
- PROCÓPIO, T. F. *et al.* Looking for alternative treatments for bovine and caprine mastitis: Evaluation of the potential of *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae lectin (CasuL), both alone and in combination with antibiotics. **Microbiologyopen**, v. 8, n. 11, p. e869, 2019.
- RADHAKRISHNAN, A. *et al.* Classification of lectins. In: **Lectins: Innate immune defense and Therapeutics**. Singapore: Springer Singapore, 2022. p. 51-72.
- RAHMAN, M. A. *et al.* Echinoderm fisheries: their culture, conservation, bioactive compounds and therapeutic applications. **Journal of Biological Studies**, v. 5, n. 3 (Special Issue), p. 413-443, 2022.
- ROBINSON, R. K. **Encyclopedia of food microbiology**. Academic press, 2014.
- RODRIGUEZ, E. L. *et al.* Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. **Journal of Chromatography B**, v. 1157, p. 122332, 2020.
- ROHDE, M. The Gram-positive bacterial cell wall. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 3, p. 10.1128/microbiolspec. gpp3-0044-2018, 2019.
- SAKAI, H. *et al.* Isolation and partial characterization of a L-rhamnose-binding lectin from the globiferous pedicellariae of the toxopneustid sea urchin, *Toxopneustes pileolus*. **International Aquatic Research**, v. 5, p. 1-10, 2013.
- SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 5, p. 765-769, 1998.
- SANTOS, A. F. S. *et al.* Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. 2014.
- SANTOS, V. F. *et al.* *Dioclea violacea* lectin modulates the gentamicin activity against multi-resistant strains and induces nephroprotection during antibiotic exposure. **International journal of biological macromolecules**, v. 146, p. 841-852, 2020.
- SEIKE, Y.; SHIBATA, H.; SUYEMITSU, T. Purification of a sperm lectin extracted from spermatozoa of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. **Development, growth & differentiation**, v. 34, n. 3, p. 285-291, 1992.
- SHANG, X. H. *et al.* Traditional Chinese Medicine—Sea Urchin. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 6, p. 537-542, 2014.
- SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 2004.
- SHARON, N. Lectins: past, present and future1. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, n. 6, p. 1457-1460, 2008.

SHEYKHSARAN, E *et al.* An overview of tetracyclines and related resistance mechanisms. **Reviews and Research in Medical Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 69-75, 2019.

SHI, Y. *et al.* Characterization and genome sequencing of a novel T7-like lytic phage, kpssk3, infecting carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Archives of Virology**, v. 165, p. 97-104, 2020.

SIBIYA, A. *et al.* Bioactive compounds from various types of sea urchin and their therapeutic effects—a review. **Regional Studies in Marine Science**, v. 44, p. 101760, 2021.

SILVA TRENTIN, D.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 213-236, 2013.

SILVA, J. F.; PRATA, J.; CHRISTOFFERSEN, M. L. Intraspecific variations in species of Ophiuroidea (Echinodermata) from the Tropical Southwest Atlantic, Northeast Brazil. **Organisms Diversity & Evolution**, p. 1-26, 2023.

SILVA, M. O.; AQUINO, S. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 8, n. 4, p. 472-482, 2018.

SILVA, R. R. S *et al.* *Parkia platycephala* lectin enhances the antibiotic activity against multi-resistant bacterial strains and inhibits the development of *Haemonchus contortus*. **Microbial pathogenesis**, v. 135, p. 103629, 2019.

SMITH, L. C. *et al.* Echinoderm immunity. **Invertebrate immunity**, p. 260-301, 2010.

SMIRNOV, A. V. Origin of the Class Holothuroidea. **Paleontological Journal**, v. 55, p. 766-786, 2021.

SPERANDEO, P.; MARTORANA, A. M.; POLISSI, A. Lipopolysaccharide biogenesis and transport at the outer membrane of Gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 11, p. 1451-1460, 2017.

STRUMSKI, M. A. **Purification And Characterization Of An Endogenous Carbohydrate-Binding Protein From The Sea Urchin, *Lytechinus Variegatus* (eggs, Carrageenan, Development, Agar, Lectin)**. University of Miami, 1985

SUGAWARA, H. *et al.* Characteristic recognition of N-acetylgalactosamine by an invertebrate C-type Lectin, CEL-I, revealed by X-ray crystallographic analysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 43, p. 45219-45225, 2004.

TAKÁCS, E. *et al.* Elimination of oxacillin, its toxicity and antibacterial activity by using ionizing radiation. **Chemosphere**, v. 286, p. 131467, 2022.

TELMER, C. A. *et al.* Echinobase: a resource to support the echinoderm research community. **Genetics**, p. iyae002, 2024.

THONGDA, W. *et al.* L-rhamnose-binding lectins (RBLs) in channel catfish, *Ictalurus punctatus*: Characterization and expression profiling in mucosal tissues. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 44, n. 2, p. 320-331, 2014.

TORRES, R. C. F. **Purificação parcial e caracterização bioquímica de uma lectina extraída da pele do pepino-do-mar, *Holothuria arenicola***. 2017. 33 f. TCC (Graduação em Engenharia de Pesca) - Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

UCHIDA, T. *et al.* Crystal structure of the hemolytic lectin CEL-III isolated from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*: implications of domain structure for its membrane pore-formation mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 35, p. 37133-37141, 2004.

VARGAS, P.; ZARDOYA, R. **El árbol de la vida: sistemática y evolución de los seres vivos**. Vargas, Pablo, 2012.

VARKI, A. *et al.* **Essentials of Glycobiology** [internet]. 2022.

VASCONCELOS, M. A. *et al.* Effect of algae and plant lectins on planktonic growth and biofilm formation in clinically relevant bacteria and yeasts. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

WANG, H. *et al.* A novel C-type lectin from the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (AjCTL-2) with preferential binding of D-galactose. **Fish & shellfish immunology**, v. 79, p. 218-227, 2018.

WANG, X. W.; VASTA, G. R.; WANG, J. X. The functional relevance of shrimp C-type lectins in host-pathogen interactions. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 109, p. 103708, 2020.

WANG, Y *et al.* A novel fucoselectin from *Apostichopus japonicus* with broad PAMP recognition pattern. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 77, p. 402-409, 2018.

World Health Organization (WHO). **Health and economic impacts of antimicrobial resistance in the Western Pacific Region, 2020–2030**. 2023a. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789290620112>. Acesso em: 25/06/2023.

World Health Organisation (WHO). **Antimicrobial resistance**. 2023b. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso: 27 dezembro 2023.

WRIGHT, D. F. Bayesian estimation of fossil phylogenies and the evolution of early to middle Paleozoic crinoids (Echinodermata). **Journal of Paleontology**, v. 91, n. 4, p. 799-814, 2017.

WU, D. *et al.* Probing N-glycoprotein microheterogeneity by lectin affinity purification-mass spectrometry analysis. **Chemical science**, v. 10, n. 19, p. 5146-5155, 2019.

YANG, J.; ROY, A.; ZHANG, Y. Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. **Bioinformatics**, v. 29, n. 20, p. 2588-2595, 2013.

YANG, S. X.; POLLOCK, H. G.; RAWITCH, A. B. Glycosylation in human thyroglobulin: location of the *N*-linked oligosaccharide units and comparison with bovine thyroglobulin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 327, n. 1, p. 61-70, 1996.

YUNITA, N. *et al.* Diversity of holothuroidea by spicule type in the intertidal zone of Sepanjang Beach, Gunungkidul, Yogyakarta. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2022. p. 012053.

ZHANG, Y. *et al.* Advanced oral vaccine delivery strategies for improving the immunity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 177, p. 113928, 2021.

ZHENG, W. *et al.* Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations. **Cell reports methods**, v. 1, n. 3, 2021.

ZHUKOVA, N. V. Fatty Acids of Echinoderms: Diversity, Current Applications and Future Opportunities. **Marine Drugs**, v. 21, n. 1, p. 21, 2022.