



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

JOSÉ EDUARDO DE OLIVEIRA NETO

**ESTUDO BIOQUÍMICO E ESTRUTURAL DE UMA LECTINA DA ALGA
VERMELHA *Alsidium seaforthii* EXPRESSA EM SISTEMA HETERÓLOGO**

FORTALEZA

2025

JOSÉ EDUARDO DE OLIVEIRA NETO

ESTUDO BIOQUÍMICO E ESTRUTURAL DE UMA LECTINA DA ALGA VERMELHA
Alsidium seaforthii EXPRESSA EM SISTEMA HETERÓLOGO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Dr. Rômulo Farias Carneiro

FORTALEZA

2025

JOSÉ EDUARDO DE OLIVEIRA NETO

ESTUDO BIOQUÍMICO E ESTRUTURAL DE UMA LECTINA DA ALGA VERMELHA
Alsidium seaforthii EXPRESSA EM SISTEMA HETERÓLOGO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Dr. Rômulo Farias Carneiro

Aprovado em: 30/ 07 /2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Raquel Guimarães Benevides

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rafael da Conceição Simões

Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha família: meus pais Manoel e Socorro; minha tia Neuda por todo o suporte, carinho, amor e apoio em minha vida.

Ao meu orientador Prof. Rômulo, pela oportunidade de trabalhar e desenvolver meu projeto no INTC Laboratório de Biotecnologia Marinha (BioMar), além dos ensinamentos, conselhos e a sua disponibilidade para ajudar nos momentos necessários.

Aos participantes da banca examinadora, Prof. Dr. Rafael da Conceição Simões Profa. Dra. Raquel Guimarães Benevides, agradeço a prontidão e gentileza em aceitar participar da banca e poder contribuir para o trabalho.

À Dra. Renata Pinheiro Chaves e ao Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano, pela oportunidade de atuar no laboratório e aos ensinamentos durante a minha estadia no INTC BioMar.

A toda a equipe do INTC BioMar, por me ajudarem, diretamente ou indiretamente, em vários momentos do meu trabalho. Muito obrigado.

À Glória, amor da minha vida, por todo o carinho, paciência e companheirismo que tivemos e ainda teremos pelos anos que virão. Te amo muito, Glorinha.

Aos amigos que o laboratório proporcionou, Philippe, João Marcelo, Israel, Paulo, Tawanny, Elany e Marília por todas as risadas, pelos momentos de descontração, pela camaradagem, pela amizade e pelas trocas de conhecimentos. Obrigado por tudo.

Aos meus nobres amigos que a Biologia me deu a chance de conhecer: Victor Braz, Marcos Victor, Eduardo Melo e Matheus Mordecai. Obrigado pela resenha durante a graduação.

Ao meu amigo de longa data, Roger. Obrigado por mais de uma década de amizade, irmandade e a sabedoria repassada durante a construção desse trabalho. Apesar de você dizer que se inspira em mim, o contrário é o mais próximo da verdade.

À Instituição CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O ambiente marinho, com sua alta biodiversidade, tem se destacado como uma fonte promissora de produtos naturais bioativos, cujas características químicas únicas oferecem grande potencial para o desenvolvimento de novas drogas. As algas são uma rica fonte de compostos com propriedades biotecnológicas promissoras, incluindo lectinas: proteínas e glicoproteínas com capacidade de ligação específica, reversível e não catalítica a carboidratos. A expressão em sistema heterólogo possibilita a purificação de lectinas, cujas fontes naturais apresentam adversidades como sazonalidade, baixo rendimento e a presença de isoformas. O objetivo deste trabalho foi produzir de forma heteróloga a lectina da alga marinha vermelha *Alsidium seaforthii*, e caracterizá-la bioquimicamente e estruturalmente. A isolectina 3 (BSL3) *Alsidium seaforthii* foi expressa em vetor pET32a-TEV, e obtida a partir da fração solúvel das culturas bacterianas de *Escherichia coli* BL21(DE3). A proteína (rBSL3) foi purificada por cromatografia de afinidade em matriz de níquel imobilizado, e a massa molecular foi estimada em 30 kDa por SDS-PAGE 15%. O rendimento final de purificação foi de cerca 1,35 mg por 2,5 litros de cultura induzida. O ensaio de atividade hemaglutinante demonstrou que rBSL3 é capaz de aglutinar eritrócitos de coelho tratados com tripsina, tal como a forma nativa. A rBSL3 exibiu afinidade por tireoglobulina porcina, uma glicoproteína rica em oligossacarídeos com núcleo α 1,6-fucosilado. A determinação da estrutura primária por espectrometria de massas em tandem demonstrou identidade com a sequência da lectina nativa. A constante de dissociação do complexo lectina-ligante foi determinada por calorimetria de titulação isotérmica em 53 μ M. O tamanho hidrodinâmico da lectina foi de 5,89 nm foi detectado por espalhamento dinâmico da luz. A predição da estrutura secundária por dicroísmo circular demonstrou que rBSL3 é formada por 18,5% de α -hélice; 29,3% de folhas- β ; 22,8 % de dobras- β e de 28,5% de estruturas aleatórias. A predição estrutural *in silico* realizada por AlphaFold2, baseada em aprendizado de máquinas (*machine learning*), revelou uma composição majoritária por folhas- β na estrutura secundária e 98,51% de resíduos de aminoácidos dispostos em regiões favorecidas do gráfico de Ramachandran. Logo, considerando a caracterização de rBSL3 no com as propriedades da forma nativa, os resultados evidenciam o potencial como uma ferramenta no diagnóstico de câncer e na citotoxicidade contra células cancerígenas.

Palavras-chaves: produção recombinante; calorimetria de titulação isotérmica; predição estrutural

ABSTRACT

Marine environments, due to their high biodiversity, stand out as promising sources of bioactive natural products, whose unique structures and chemical properties offer great potential for the development of new drugs. Algae are a rich source of compounds with relevant biotechnological and pharmacological properties, including lectins: proteins and glycoproteins capable of specific, reversible, and non-catalytic binding to carbohydrates. Heterologous expression enables the production and purification of lectins, overcoming limitations of natural sources such as seasonality, low yield, and the presence of isoforms. The aim of this work was to heterologously produce the lectin from the red marine alga *Alsidium seaforthii*, characterize it biochemically, and predict its three-dimensional structure *in silico*. The isolectin 3 of *Alsidium seaforthii* (BSL3) was expressed using the pET32a-TEV vector and obtained from the soluble fraction of *Escherichia coli* BL21(DE3) bacterial cultures. The protein (rBSL3) was purified by nickel-affinity chromatography, and its molecular mass was estimated at 30 kDa by 15% SDS-PAGE. The final purification yield was approximately 1.35 mg per 2.5 liters of induced culture. The hemagglutination assay showed that rBSL3 is capable of agglutinating trypsin-treated rabbit erythrocytes, similarly to the wild-type form. rBSL3 demonstrated affinity for porcine thyroglobulin, a glycoprotein rich in α 1,6-core-fucosylated oligosaccharides, a glycan marker associated with tumor cells. Primary structure determination by mass spectrometry confirmed identity with the native lectin sequence. The dissociation constant of the lectin–ligand complex was determined by isothermal titration calorimetry as 53 μ M. The hydrodynamic size of the lectin, 5.89 nm, was determined by dynamic light scattering. Secondary structure prediction by circular dichroism revealed that rBSL3 is composed of 18.5% α -helices, 29.3% β -sheets, 22.8% β -turns, and 28.5% random coils. *In silico* structural prediction using AlphaFold2, based on machine learning, indicated a secondary structure predominantly composed of β -sheets, with 98.51% of amino acid residues located in favored regions of the Ramachandran plot. Therefore, considering the characterization of rBSL3 in this study alongside the properties of its wild-type form, the results highlight its potential as a tool for cancer diagnostics and studies of cytotoxicity against tumor cells.

Keywords: recombinant production; isothermal titration calorimetry; structural prediction

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Atividades biológicas da lectina nativa de <i>Alsidium seaforthii</i>	20
Tabela 2	– Lectinas de algas expressas em sistema heterólogo	24
Tabela 3	– Plasmídeos bacterianos e cepas de <i>E. coli</i> utilizados	28
Tabela 4	– Inibição de atividade hemaglutinante de rBSL3	48
Tabela 5	– Sequências de peptídeos obtidas por digestão enzimática com tripsina da lectina recombinante fusionada rBSL3	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Alsidium seaforthii</i>	15
Figura 2 – Exemplos de glicosilação do tipo <i>N</i>	18
Figura 3 – Modificações em <i>N</i> -glicanos	22
Figura 4 – Cálculo de estimativa em % da estrutura secundária de rBSL3 isolada	41
Figura 5 – Mapa do vetor pET32a-TEV	42
Figura 6 – Sequência de aminoácidos da proteína recombinante rBSL3 com proteína de fusão tiorredoxina (Trx)	43
Figura 7 – Validação da transformação de células de <i>E. coli</i> provenientes da purificação do plasmídeo e PCR de colônia	44
Figura 8 – Testes de expressão em <i>E. coli</i> BL21(DE3)	45
Figura 9 – Cromatograma referente à aplicação dos lisados solúveis de <i>E. coli</i> aplicados em coluna de níquel imobilizado <i>HisTrap FF Crude</i> (5 mL; GE Healthcare)	46
Figura 10 – Eletroforese em gel de poliacrilamida com adição de dodecil sulfato de sódio 15% de rBSL3	47
Figura 11 – Cromatograma referente à aplicação da solução de rBSL3 após diálise e digestão em coluna de níquel imobilizado <i>HisTrap FF Crude</i> (5 mL; GE Healthcare)	48
Figura 12 – Eletroforese em gel de poliacrilamida com adição de dodecil sulfato de sódio 15% de rBSL3 após diálise e digestão enzimática	49
Figura 13 – Atividade hemaglutinante de rBSL3	50
Figura 14 – Calorimetria de titulação isométrica (ITC) de rBSL3	51
Figura 15 – Calorimetria de titulação isométrica (ITC) de tiorredoxina	52
Figura 16 – Padrões identificados nas distribuições baseadas em volume, intensidade e número do espalhamento dinâmico da luz de rBSL3 e tiorredoxina isolada ..	53
Figura 17 – Mapa peptídico de rBSL3 fusionada	54

Figura	– Espectros de dicroísmo circular de rBSL3 e tiorredoxina isolada	55
18		
Figura	– Gráfico de comparação de estrutura secundária	57
19		
Figura	– Estrutura geral da rBSL3 com localização e representação do DRC	58
20		

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Algas	11
1.2	Lectinas	13
1.3	Lectinas de macroalgas	14
1.3.1	Lectinas de algas vermelhas	15
1.3.2	Lectinas de algas verdes	16
1.3.3	Lectinas de algas pardas	17
1.4	Lectina de <i>Alsidium seaforthii</i>	17
1.5	Desafios na extração e purificação de lectinas de algas	21
1.6	Sistema heterólogo de produção de lectinas de algas	22
1.7	Lectinas e o potencial antitumoral	25
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivos gerais	27
2.2	Objetivos específicos	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	Obtenção do gene sintético de BSL3	28
3.2	Preparação das células competentes	30
3.3	Transformação bacteriana em <i>E. coli</i> DH5α	30
3.4	Purificação do plasmídeo recombinante	31
3.5	Confirmação dos plasmídeos recombinantes	31
3.6	Transformação bacteriana em <i>E. coli</i> BL21(DE3)	32
3.7	Ensaio para estabelecimento de condição ótima de expressão	32
3.8	Extração de proteínas totais de <i>E. coli</i> recombinante	33
3.9	Ensaio de expressão em larga escala da rBSL3	33
3.10	Ensaio de expressão da tiorredoxina	34
3.11	Purificação de rBSL3 por cromatografia de afinidade do tipo IMAC	34
3.12	Ensaio de digestão da rBSL3	35
3.13	Avaliação da homogeneidade por SDS-PAGE 15%	35
3.14	Ensaio de atividade hemaglutinante e de inibição	35
3.15	Calorimetria de Titulação Isométrica (ITC)	36
3.16	Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)	37

3.17	Determinação da estrutura primária por MS/MS	37
3.17.1	<i>Digestão da lectina com enzima proteolítica em gel</i>	37
3.17.2	<i>Sequenciamento dos peptídeos obtidos por digestão</i>	38
3.17.3	<i>Análise dos dados</i>	38
3.18	Dicroísmo circular	38
3.19	Predição estrutural	39
4	RESULTADOS	40
4.1	Obtenção do gene sintético	40
4.2	Confirmação dos plasmídeos recombinantes	41
4.3	Ensaio para estabelecimento de condição ótima de expressão	43
4.4	Purificação da rBSL3 por cromatografia de afinidade do tipo IMAC	43
4.5	Purificação da rBSL3 por IMAC após os ensaios de digestão	45
4.6	Ensaio de atividade hemaglutinante e teste de inibição com carboidratos ..	47
4.7	Calorimetria de Titulação Isométrica (ITC)	48
4.8	Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)	50
4.9	Determinação da estrutura primária por MS/MS	51
4.10	Dicroísmo circular	53
4.11	Predição estrutural	55
5	DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Algas

As algas marinhas compreendem organismos que despertam o interesse da comunidade científica devido a sua importância ecológica nos ecossistemas aquáticos e seu potencial como reservatório de substâncias bioativas com vasta aplicabilidade (Cadar *et al.*, 2025; Nova; Gomes; Costa-Pinto, 2023). Como resultado das adaptações ambientais, esses bioativos vão desde pigmentos acessórios e moléculas de reserva responsáveis por funções homeostáticas, até substâncias com capacidades mais específicas, como proteção e reprodução, que provavelmente são adquiridas em razão da concorrência inibitória em um ambiente dinâmico e hostil (Hakim; Patel, 2020; Patel *et al.*, 2022).

Caracterizadas como produtores primários procarióticos ou eucarióticos, as algas são divididas em micro e macroalgas (Pereira, 2021). A riquíssima diversidade desses organismos os permite serem também agrupados de acordo com seus pigmentos, morfologias e características anatômicas. As microalgas podem estar relacionadas a inúmeros subconjuntos divididos entre organismos procarióticos (cianobactérias) e eucarióticos. Por outro lado, as macroalgas dividem-se nos filos Chlorophyta (algas verdes), Rhodophyta (algas vermelhas), Phaeophyta (algas marrons) e Cyanophyta (algas azuis-esverdeadas) (Sousa *et al.*, 2023; Waghmode, 2017).

As algas vermelhas são particularmente abundantes em águas tropicais e quentes, apesar de também serem encontradas em regiões mais frias. Pouco mais de 100 espécies diferentes de algas vermelhas são encontradas em ambientes de água doce, contudo, no mar o número de espécies é muito maior do que a combinação de todos os outros tipos de algas marinhas bentônicas. Os cloroplastos das algas vermelhas (estruturalmente semelhantes aos das cianobactérias) contêm ficobilinas, que mascaram a cor da clorofila a e dão a estas algas sua cor característica (Raven; Evert; Eichhorn, 2014). Além disso, em algas marinhas vermelhas, é possível observar a extração de ácidos graxos, terpenos, pigmentos, compostos fenólicos, vitaminas e proteínas (Cotas *et al.*, 2020).

O gênero *Alsidium* (anteriormente designado *Bryothamnium*), pertencente ao filo Rhodophyta, é composto por um total de 25 espécies amplamente distribuídas (García-Soto; Lopez-Bautista, 2018; Guiry; Guiry, 2018), que apresentam potencial para a produção de

compostos bioativos (Carpena *et al.*, 2022; Harb, 2021). O litoral brasileiro abriga as espécies *Alsidium seaforthii* e *A. triquetrum* (Martins *et al.*, 2024; Santos *et al.*, 2023; Sousa, 2022).

A alga *Alsidium seaforthii* da família Rhodomelaceae (Figura 1) é um exemplo desse gênero que exibe potencial biotecnológico como repositório de moléculas bioativas (Harb *et al.*, 2022). Alguns desses metabólitos estão presentes nos extratos aquosos e metanólicos, como polifenóis com ação inibitória na transcriptase reversa de HIV-1 (Harb, Chow, 2022).

Figura 1 - *Alsidium seaforthii*.



Fonte: Adaptado de Carneiro *et al.*, 2024.

Dentre os compostos sintetizados pelas algas que se destacam e estão presentes em *A. seaforthii* estão as lectinas (Nascimento-Neto *et al.*, 2012; Vasconcelos *et al.*, 2014).

1.2 Lectinas

As lectinas despertaram o interesse da comunidade científica desde o final do século XIX. Em 1888, Peter Hermann Stillmark descreveu a atividade biológica de extratos da semente de mamona (*Ricinus communis* L.), observando efeitos tóxicos atribuídos à ricina. Posteriormente, foi relatado o fenômeno de aglutinação de eritrócitos promovido por esses extratos, o que levou à introdução dos termos “aglutinina” ou “fito-hemaglutinina”. A descoberta de que esses efeitos estavam relacionados à ligação específica a carboidratos foi fundamental para a consolidação do conceito de lectina (Watkins; Morgan, 1952).

Atualmente, as lectinas são definidas como proteínas ou glicoproteínas ubíquas que se ligam de maneira específica, reversível e não catalítica a carboidratos e glicoconjugados, configurando-se como ferramentas biológicas promissoras para aplicações clínicas e biotecnológicas (Wang et al., 2017; Singh; Walia, 2018). A ligação ocorre por meio de interações não covalentes, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals, com alta seletividade por determinados glicanos.

A especificidade das lectinas se dá pela presença de ao menos um domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC), elemento estrutural essencial para a interação com resíduos glicídicos. Em lectinas multiméricas, geralmente há um DRC por subunidade, o que aumenta a estabilidade e a especificidade da ligação. As propriedades do DRC — incluindo número, composição, orientação espacial e extensão — influenciam diretamente a afinidade das lectinas por diferentes glicoconjugados.

Além disso, algumas lectinas monoméricas podem apresentar mais de um DRC funcional, ampliando sua capacidade de interação com múltiplos ligantes. Frequentemente, essas regiões de reconhecimento compartilham assinaturas conservadas em suas sequências, permitindo a classificação das lectinas em famílias estruturais e funcionais (Chettri et al., 2021; Radhakrishnan et al., 2022).

A definição de lectinas foi refinada ao longo das décadas (Ahmmed et al., 2022; Barondes, 1988; Gardères et al., 2015; Goldstein et al., 1980), e hoje essas biomoléculas são amplamente reconhecidas por sua capacidade de reconhecer padrões glicídicos específicos, sendo aplicadas em diagnóstico, terapias-alvo, engenharia de fármacos e controle de processos infecciosos.

1.3 Lectinas de macroalgas

O primeiro registro de lectina presente em algas foi descrito por Boyd, Almodóvar e Boyd (1966). Com o avanço dos anos, as lectinas foram sendo reportadas em um número crescente de espécies. No Brasil, os primeiros estudos sobre lectinas de algas marinhas surgiram no início da década de 1990. Ainouz e Sampaio (1991) identificaram a presença dessas moléculas em aproximadamente vinte espécies de algas, incluindo representantes das rodófitas e clorófitas. Os extratos obtidos mostraram-se eficazes na aglutinação de eritrócitos de diversos animais, como coelho, galinha, vaca e ovelha, além de células sanguíneas humanas dos tipos A, B e O.

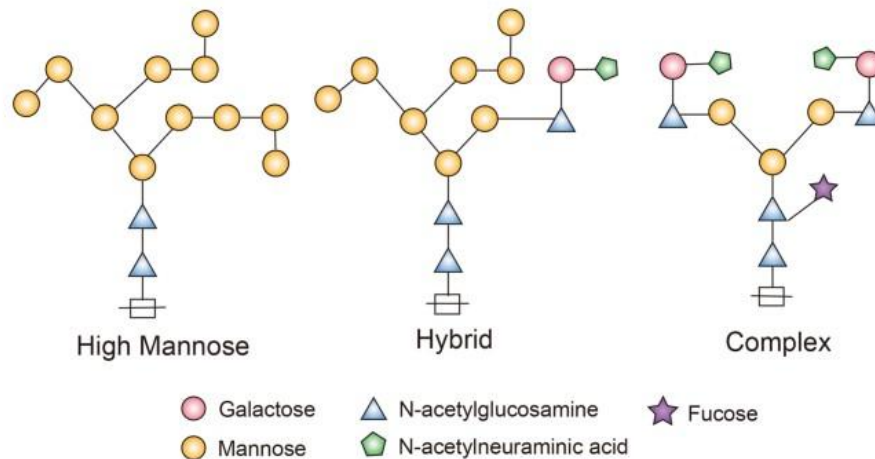
As lectinas de algas marinhas possuem propriedades bioquímicas que as distinguem das lectinas de plantas terrestres: peso molecular médio de 4.200 a 25.000 daltons; majoritariamente monoméricas; hemaglutinação contra eritrócitos de coelhos tratados enzimaticamente com tripsina e afinidade por carboidratos complexos/glicoproteínas (Costa Filho, 2024; Hori; Miyazawa; Ito, 1990; Sampaio *et al.*, 1993; Singh; Thakur; Bansal, 2015).

As lectinas de algas se apresentam comumente como monômeros. Consequentemente, com a necessidade de suprir essas necessidades de estabilidade e/ou de estender seus locais de contato com as superfícies glicídicas, lectinas monoméricas podem apresentar mais de um DRC em sua sequência de aminoácidos. Essas regiões podem ser repetições ou diferirem, atuando de forma cooperativa ou interagindo com diferentes carboidratos (Nabi-Afjadi *et al.*, 2022; Notova *et al.*, 2020).

O domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC) é a característica basal das lectinas e deve ser expressa pelo menos uma vez na cadeia peptídica — propriedades como a quantidade de DRC na cadeia, composição, orientação e extensão definem a capacidade de ligação das lectinas. O DRC pode apresentar assinatura conservada em conjuntos de proteínas, o que ajuda na sua classificação em famílias/grupos (Chettri *et al.*, 2021; Radhakrishnan *et al.*, 2022). Em lectinas multiméricas, costumam-se encontrar um DRC por subunidade e a atuação dos sítios de ligação por monômeros confere maior especificidade e estabilidade para a ligação.

De acordo com a especificidade de ligação às glicoproteínas, as lectinas de algas são classificadas como específicas a *N*-glicanos do tipo *high-mannose* (HM), do tipo complexo ou do tipo híbrido, com maior representatividade do tipo HM (Dang *et al.*, 2022; Hori; Miyazawa; Ito, 1990; Nabi-Afjadi *et al.*, 2022) (Figura 2).

Figura 2 – Exemplos de glicosilação do tipo N.



Fonte: Adaptado de Dang *et al.* (2022).

Os glicoconjugados e as glicoproteínas reconhecidas por lectinas de algas compõem a membrana plasmática de organismos e/ou tecidos biológicos mais complexos, a exemplo das mananas encontradas na membrana de leveduras, ou mucinas, proteínas glicosiladas situadas em tecidos epiteliais de metazoários (Liu *et al.*, 2021; Melhem; Regan-Komito; Niess, 2021). Ademais, os padrões anormais de glicosilação presente em células tumorais tornam oportuno o desenvolvimento de ferramentas moleculares capazes de reconhecê-las, como é o caso das lectinas (Buriak; Kumeiko, 2024).

1.3.1 Lectinas de algas vermelhas

Em relação a origem das lectinas na biodiversidade de algas marinhas, é estimado que aproximadamente 60% das lectinas isoladas de algas são do filo Rhodophyta (Costa Filho, 2024). A explicação se deve ao fato de um maior número de lectinas oriundas de algas vermelhas apresentarem atividade hemaglutinante, mecanismo utilizado para confirmar a presença e a funcionalidade das lectinas nos extratos, e por conseguinte, o potencial biológico inerente dessas macromoléculas em algas vermelhas (Singh; Walia, 2018).

Calvete e colaboradores (2000) foram os primeiros a determinar a estrutura primária de uma lectina de alga vermelha, extraída de *Alsidium (Bryothamnium) triquetum* (BTL), a qual demonstrou capacidade de aglutinar eritrócitos de diferentes espécies animais, incluindo os tipos sanguíneos humanos ABO. Nagano *et al.* (2005) elucidaram as estruturas primárias de

duas outras lectinas, isoladas de *Hypnea cervicornis* (HCA) e *Hypnea musciformis* (HML), utilizando uma abordagem combinada de degradação de Edman e espectrometria de massas do tipo MALDI-ToF.

A lectina isolada da alga marinha vermelha *Griffithsia* sp. (GRFT) é inibida preferencialmente por *N*-glicanos do tipo HM, possuindo diversas características interessantes como alto nível de rentabilidade, estabilidade estrutural e funcionalidade biológica — tornando-a umas das lectinas mais amplamente estudadas (Mori *et al.* 2005). Esta proteína exibe atividade antiviral, especialmente contra o HIV (através da interação com a glicoproteína do capsídeo viral gp120, rica em oligossacarídeos do tipo HM), hepatite C, herpes tipo 2 (HSV-2), encefalite japonesa (JEV), coronavírus (SARS-CoV) e vírus Ebola (Lee, 2019; Wang *et al.* 2025).

Outras lectinas de algas marinhas vermelhas, como *Eucheuma serra* (Fukuda *et al.*, 2006), *Acrocystis nana* (Anam *et al.*, 2017) e *Solieria filiformis* (Chaves *et al.*, 2018), possuem potencial anticancerígeno e são utilizadas como agentes de liberação de medicamentos devido à sua especificidade a carboidratos.

1.3.2 Lectinas de algas verdes

Nos últimos anos, algumas algas verdes tiveram lectinas propriamente estudadas bioquimicamente e suas aplicações biológicas exploradas. Carneiro *et al.* (2020) isolaram duas lectinas da alga *Codium isthmocladum*, denominadas CiL-1 e CiL-2. A CiL-1 demonstrou afinidade por galactosídeos e fetuína, enquanto CiL-2 apresentou preferência por galactosamina e mucina tipo PSM-2. Ambas possuem massa molecular aproximada de 12 kDa e foram eficazes na inibição da formação de biofilmes bacterianos por *Staphylococcus* spp.

Trabalhos posteriores exploraram as propriedades anti-inflamatórias de CiL-1 (Alves *et al.*, 2022) e a associação de CiL-2 com o antibiótico tetraciclina, apresentando sinergismo contra cepas de *Staphylococcus aureus* (Costa Filho, 2024). Kumar e Barros (2020) isolaram uma lectina da alga verde *Ulva fasciata* (UFH) com massa molecular de aproximadamente 14,5 kDa. A UFH demonstrou capacidade de aglutinar eritrócitos dos grupos sanguíneos ABO, e estabilidade frente a variações de temperatura e pH. Contudo, ainda são necessários estudos adicionais para esclarecer sua estrutura e investigar suas atividades biológicas em ensaios *in vitro*.

A lectina isolada da alga verde *Bryopsis plumosa* (BPL2) demonstrou eficácia na inibição de células tumorais pulmonares, paralelamente, com baixa toxicidade em células não tumorais. A BPL2 também exibiu um efeito sinérgico significativo quando combinada com o fármaco gefitinibe, resultando em aproximadamente 80% de redução na viabilidade celular em uma das linhagens testadas (Lee *et al.*, 2022).

A lectina HBL40, isolada da alga verde *Halimeda borneensis*, demonstrou atividade antiviral potente contra o vírus *Influenza* (A/H3N2/Udorn/72). A HBL40 é uma proteína dimérica com subunidades de aproximadamente 20 kDa e apresentou especificidade por *N*-glicanos tipo complexo, sendo a primeira isolada de algas marinhas com especificidade por tais macromoléculas (Mu *et al.* 2024).

1.3.3 Lectinas de alga pardas

Apesar de se encontrar na literatura científica relatos de lectinas em todos os filos de macroalgas, até o presente momento apenas três lectinas derivadas de algas pardas foram identificadas e isoladas de *Hizikia fusiformis*, *Padina australis* e *P. minor* (Fajarningsih *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2016).

Segundo Harrysson *et al.* (2018), o isolamento dessas proteínas em algas pardas é dificultado pela elevada presença de compostos não proteicos, como polifenóis e polissacarídeos, que podem mascarar a atividade lectínica e dificultar sua detecção.

1.4 Lectina de *Alsidium seaforthii*

A lectina da alga vermelha *Alsidium seaforthii* (BSL), previamente categorizada como *Bryothamnion seaforthii* (García-Soto; Lopez-Bautista, 2018), foi purificada por cromatografia de troca iônica e caracterizada estruturalmente através de espectrometria de massa em *tandem* (MS/MS). A BSL purificada demonstrou em SDS-PAGE uma massa molecular estimada de 9 kDa. Posteriormente, a análise por espectrometria de massas confirmou a presença de cinco isoformas com as seguintes *m/z*: 8898.1 ± 2 ; 8960.8 ± 2 ; 9012.8 ± 2 ; 9065.8 ± 2 e 9096.1 ± 2 . Dentre as cinco isolectinas, BSL 2, BSL 3 e BSL 4 tiveram suas estruturas primárias elucidadas. As isolectinas são compostas de 91 resíduos de aminoácidos,

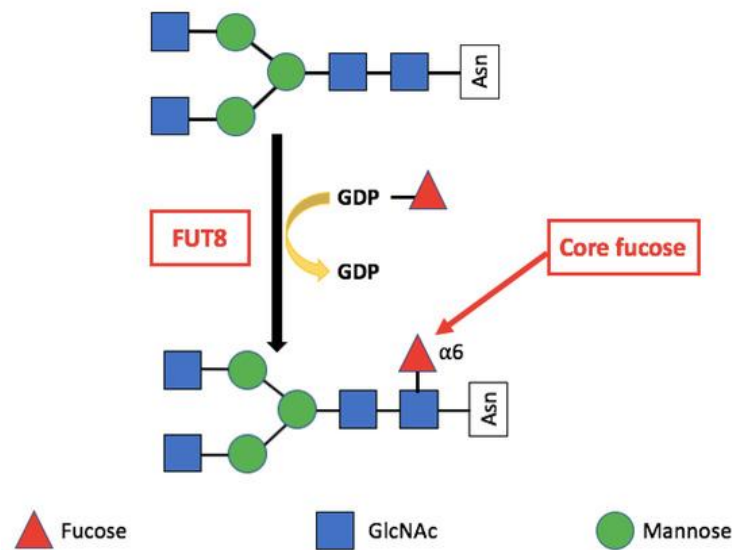
incluindo quatro resíduos de cisteína. A atividade hemaglutinante realizada com eritrócitos de coelho tratados com tripsina foi de 256 U.H.mg⁻¹ (Ainouiz; Sampaio, 1991), e a inibição ocorreu exclusivamente pelas glicoproteínas fetuína, avidina e mucina (Nascimento-Neto *et al.*, 2012)

O alinhamento da sequência de BSL com o banco de dados BLAST revelou 48% de identidade e 64% de similaridade com HJA, uma lectina da alga vermelha marinha *Hypnea japonica* (Hori; Matsubara; Miyazawa, 2000). Em comparação com a lectina de *Alsidium triquetrum* (BTL), BSL difere em apenas sete posições exclusivas, apresentando 83% de identidade (Calvete *et al.*, 2000). Em relação à hemaglutinina BSH, isolada de *A. seaforthii* na costa da Venezuela, a BSL diverge em cinco posições exclusivas, além das heterogeneidades entre suas próprias isoformas: 43(P/S), 47(S/L), 55(G/A), 66(G/S) e 67(A/V) (Medina-Ramirez *et al.* 2007). Dada a similaridade entre essas lectinas e a presença de isoformas, além de outras características bioquímicas semelhantes, os dados corroboram que BSL é um membro da primeira família de lectinas de algas vermelhas marinhas, que inclui as isoformas de HJA, BTL e BSH (Nascimento-Neto *et al.*, 2012).

Outra propriedade compartilhada entre as isolectinas supracitadas é a atividade de ligação a glicoproteínas fucosiladas — como demonstrada em extratos das algas vermelhas marinhas *Bryothamnion triquetrum* e *B. seaforthii* (Ainouz *et al.*, 1995), *Hypnea musciformis* e *Hypnea cervicornis* (Nagano *et al.*, 2005), e *H. japonica* (Okuyama *et al.*, 2009). A fucosilação é um subtipo importante da *N*-glicosilação, no qual resíduos de fucose são adicionados por meio de ligações α 1,2-, α 1,3-/4- ou α 1,6-, além de envolver duas fucosiltransferases específicas para *O*-glicanos.

Especificamente, a ligação α 1,6 é reconhecida como um marcador biológico proeminente para a carcinogênese e o controle de qualidade de anticorpos terapêuticos (Figura 3) (Duan *et al.* 2025; Pan; Zhang, 2025). Assim, as lectinas de algas desempenham um papel significativo na decodificação de informações provenientes dos glicanos, podendo atuar na discriminação de diferentes perfis de carboidratos (Nascimento *et al.* 2015; Okuyama *et al.*, 2009).

Figura 3 – Modificações em *N*-glicanos



Fonte: Adaptado de Bastian *et al.*, 2021. A enzima fucosiltransferase 8 (FUT8) transfere um resíduo de L-fucose da GDP- β -L-fucose (GDP-Fuc) para a GlcNAc mais interna de um *N*-glicano, formando uma ligação α -1,6. Um fator chave na glicosilação tumoral é a alteração da fucosilação do núcleo.

A baixa massa molecular da BSL é uma propriedade marcante que facilita o mecanismo de entrega de fármacos (*drug delivery*), assim como reduz a chance de detecção por sistemas antagonistas. Essas propriedades potencializam as aplicações terapêuticas da lectina e sugere pistas sobre suas funções e características naturais (Negreanu-Pirjol *et al.*, 2022). A presença de resíduos de cisteínas na estrutura primária da BSL culminam na formação de ligações dissulfeto que desempenham papel significativo na estabilidade mecânica das proteínas, como na estabilização termodinâmica (Samavati *et al.*, 2020).

Em relação as demais atividades biotecnológicas da lectina de *A. seaforthii*, a proteína induziu a migração de neutrófilos, mecanismo importante em respostas inflamatórias e processos imunológicos (Neves *et al.*, 2001). BSL inibiu a aderência, *in vitro*, de espécies bacterianas causadoras de cáries dentárias (Teixeira *et al.*, 2007). A lectina também exibiu perfis distintos na interação com tumores do Sistema Nervoso Central (SNC), indicando uma singularidade no reconhecimento de glicorreceptores em células tumorais, e um potencial biomarcador tumoral em células do SNC (Conrado *et al.*, 2012).

A BSL exibiu atividade antibacteriana em crescimento planctônico e na formação de biofilmes. Especificamente, BSL reduziu a massa de biofilme de *Staphylococcus aureus* em

todas as concentrações testadas no estudo. No crescimento planctônico, BSL demonstrou redução nas culturas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Vasconcelos *et al.*, 2014). A lectina demonstrou atividade anti-hiperglicêmica, atuou significativamente na produção de insulina por células β pancreáticas e reduziu a proporção de radicais livres — atuando como antioxidante (Alves *et al.*, 2020).

Recentemente, verificou-se a ação da BSL na redução da concentração inibitória mínima (CIM) da tetraciclina em até 16 vezes contra *S. aureus* ATCC 25923, demonstrando seu potencial em potencializar eficazmente o efeito do antibiótico (Carneiro *et al.* 2024).

As aplicações biotecnológicas já apresentadas para a BSL nativa se encontram sumarizadas na tabela adiante (Tabela 1).

Tabela 1 – Atividades biológicas da lectina nativa de *Alsidium seaforthii*.

Atividades biotecnológicas	Referências
Pró-cicatrizante	Nascimento-Neto <i>et al.</i> , 2012
Antibacteriana	Vasconcelos <i>et al.</i> , 2014
Antinociceptiva	Viana <i>et al.</i> , 2002
Marcador de células cancerígenas	Conrado <i>et al.</i> , 2012
Indução da migração de neutrófilos	Neves <i>et al.</i> , 2001
Antibiofilme	Teixeira <i>et al.</i> , 2007
Diferenciação de células cancerígenas	Pinto <i>et al.</i> , 2009
Antioxidante	De Alencar Alves <i>et al.</i> , 2020
Anti-hiperglicêmica	De Alencar Alves <i>et al.</i> , 2020

Tabela 1 – Atividades biológicas da lectina nativa de *Alsidium seaforthii* (Conclusão).

Atividades biotecnológicas	Referências
Ensaio combinado com antibióticos	Carneiro <i>et al.</i> , 2024

1.5 Desafios na extração e purificação de lectinas de algas

A extração e purificação de lectinas de algas marinhas envolvem obstáculos que vão desde a coleta dos espécimes até os métodos mais refinados de purificação dessas moléculas. A princípio, o conteúdo proteico passível de ser extraído é influenciado pela espécie da alga, a época de coleta, localização e condições de crescimento do ambiente. As características fisiológicas das algas marinhas, como a presença da parede celular e talos rigorosos, também influenciam no rendimento final da proteína extraída (Pliego-Cortés *et al.*, 2020; Maliki *et al.*, 2022).

As metodologias tradicionais de purificação de lectinas incluem processos aquosos, ácidos, alcalinos e enzimáticos, seguidos por maceração com nitrogênio líquido, centrifugação, precipitação, ultrafiltração e cromatografia (Bleakley; Hayes, 2017). Apesar de oferecerem rendimentos significativos, esses métodos enfrentam obstáculos que comprometem a funcionalidade das lectinas prospectadas: a liberação de proteases dos vacúolos citosólicos, a presença de compostos fenólicos, a alta viscosidade causada por polissacarídeos intracelulares e interações iônicas (Ganeva; Galutzov; Teissié, 2003; Joubert; Fleurence, 2008; Mendez; Kwon, 2021). Outro aspecto crucial de ser ressaltado é a semelhança entre isoformas das lectinas de macroalgas marinhas que dificulta seu fracionamento por completo, ou seja, resultando frequentemente em alíquotas semipurificadas (Martínez-Alarcón; Blanco-Labra; García-Gasca, 2018).

Os métodos convencionais de extração causam impactos ambientais aos ecossistemas marinhos, como esperada de qualquer atividade que envolva a bioprospecção de recursos naturais. A remoção da biomassa de algas modifica os habitats dos demais organismos marinhos, principalmente nos habitats mais vulneráveis como zonas subtidais arenosas ou rochosas, como também na biodiversidade de espécies de peixes e invertebrados (Lyons *et al.*,

2014). No quesito de efeitos práticos, a coleta exacerbada das algas impacta na detecção de contaminantes e na avaliação da saúde do ambiente, uma vez que certas espécies atuam como biomonitoras de poluentes de uma região (Lavergne *et al.*, 2021).

Logo, quando esse processo é escalonado, os impactos e os desperdícios são elevados progressivamente. Portanto, são necessárias melhorias para reduzir o tempo, o custo, o consumo de energia e os riscos à saúde tanto para os seres humanos quanto para o meio ambiente na extração e purificação de lectinas oriundas de algas marinhas.

1.6 Sistema heterólogo de produção de lectinas de algas

A tecnologia do DNA recombinante, nas últimas décadas, possibilitou o uso do sistema de expressão heterólogo para a produção de lectinas recombinantes (Van Damme, 2022). As lectinas recombinantes se apresentam mais homogêneas e definidas bioquimicamente entre os produtos resultantes, evitando a potencial contaminação com outros compostos e possibilitando a obtenção de uma única proteína precisamente caracterizada (Martínez-Alarcón; Blanco-Labra; García-Gasca, 2018). Deve-se levar em consideração também que, embora algumas isoformas diferenciem-se apenas ligeiramente em suas propriedades funcionais, as particularidades de cada molécula podem afetar significativamente sua atividade biológica em outros casos (Torres-Arteaga *et al.*, 2022).

Com o intuito de simular as condições de síntese da lectina na sua forma nativa, as propriedades físico-químicas da proteína alvo são considerações a serem tomadas na estratégia da escolha do organismo modelo na produção heteróloga de proteínas. *Escherichia coli* foi o primeiro e o mais amplamente utilizado organismo para produzir proteínas recombinantes devido a muitas vantagens - incluindo sua simplicidade, o conhecimento de sua fisiologia e de seu genoma, bem como sua rápida taxa de reprodução (Brown, 2021; Terpe, 2006).

A cepa BL21(DE3) de *E. coli* é usualmente empregada na produção de larga escala devido a altas taxas de transcrição pela integração da RNA polimerase T7 (Studier; Moffatt, 1986). Dentre os modelos de promotor em sistemas de expressão pET, o operon *lac* continua a ser uma opção favorável, e é geralmente usado quando o gene alvo é inserido a jusante (Dubendorf; Studier, 1991; Ojima *et al.*, 2025). Logo, a proteína repressora do operon apenas

será inibida pela alolactose ou uma estrutura análoga, como o comumente utilizado β -D-1-tiogalactopiranosídeo isopropílico (IPTG) (Wurm *et al.*, 2016).

Os plasmídeos pET são bastantes utilizados tanto no meio acadêmico quanto na indústria para a produção de proteínas recombinantes. Rosenberg *et al.* (1987) descreveram o primeiro plasmídeo de expressão pET, integrando o promotor forte $\phi 10$ para a T7 RNA polimerase (promotor T7) e o terminador de transcrição T ϕ (terminador T7) no esqueleto do vetor pBR322, estabelecendo a nomenclatura pET (plasmídeo para expressão por T7 RNA polimerase). Como a T7 RNA polimerase é aproximadamente cinco vezes mais rápida que a RNA polimerase de *E. coli*, grandes quantidades de RNA recombinante são geradas em um curto período, e a proteína recombinante pode constituir até 50% do conteúdo proteico da célula (Khananisho *et al.*, 2023; Shilling *et al.*, 2020).

A purificação de proteínas recombinantes tem como o cerne a separação da molécula alvo das milhares de proteínas inerentes do organismo hospedeiro usado na expressão heteróloga. Devido as propriedades em comum entre as inúmeras proteínas e a limitação das técnicas tradicionais de separação bioquímica com biomoléculas similares (peso molecular, carga, hidrofobicidade etc.), a proteína recombinante requer uma característica única que possibilite o fracionamento das proteínas totais da célula ou organismo: *etiqueta* de purificação de proteínas (Kimple; Brill; Pasker, 2013; Reece, 2004).

A *His-tag* é uma cadeia composta geralmente por seis resíduos de histidina inseridos nas extremidades C-terminal ou N-terminal da proteína alvo. A histidina forma ligações não-covalentes e de alta afinidade com metais de transição — usualmente o Ni^{2+} é imobilizado a uma matriz de resina utilizada para capturar proteínas fusionadas com cauda histidínica numa técnica de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (*Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography* - IMAC) (Hochuli *et al.* 1988; Ojima-Kato, 2024; Porath *et al.*, 1975).

Na literatura científica é possível encontrar exemplos de lectinas de algas sintetizadas com sucesso em sistema heterólogo (Tabela 2).

Tabela 2 – Lectinas de algas expressas em sistema heterólogo.

Lectina recombinante	Organismo de origem	Organismo hospedeiro	Vetor de expressão	Proteína de fusão	Rendimento	Caraterização bioquímica/ biotecnológica	Referência
rOOA	<i>Oscillatoria agardhii</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET-28a(+)	<i>Histag</i>	14,8 mg/1 L	Caraterização bioquímica	Sato; Hori, 2009
rBTL	<i>Alsidium triquetrum</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET32a-TEV	Tiorredoxina <i>Histag</i>	1 mg/1 L	Caraterização bioquímica	Nascimento <i>et al.</i> , 2015
rSfL-1	<i>Solieria filiformis</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET-28a(+)	<i>Histag</i>	60 mg/1 L	Antimicrobiano Pró-cicatrizante	Chaves <i>et al.</i> , 2023
rGVSL	<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET-28a(+)	<i>Histag</i>	X	Reconhecimento de gametas	Nan <i>et al.</i> , 2024
Griffithsin	<i>Griffithsia</i> sp.	<i>Saccharomyces boulardii</i>	pSF-TEF1-URA3	X	X	Antiviral	Tang <i>et al.</i> , 2024
rLGFL	<i>Gracilaria fisheri</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pTATcon	Tiorredoxina <i>Histag</i>	X	Aglutinação bacteriana	Boonsri <i>et al.</i> , 2025

Fonte: O autor. X: não informado pelos autores e/ou não presente no estudo.

1.7 Lectinas e o potencial antitumoral

Segundo os dados mais recentes levantados pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que em 2022 houve 20 milhões de novos casos de câncer e 9,7 milhões de mortes. Cerca de 1 em cada 5 pessoas desenvolverá câncer durante a vida; cerca de 1 em cada 9 homens e 1 em cada 12 mulheres morrerão da doença.

O câncer de pulmão foi o câncer mais comum em todo o mundo, com 2,5 milhões de novos casos, representando 12,4% de todos os novos casos. O câncer de mama feminino ficou em segundo lugar (2,3 milhões de casos; 11,6%), seguido pelo câncer colorretal (1,9 milhão de casos; 9,6%), câncer de próstata (1,5 milhão de casos; 7,3%) e câncer de estômago (970 mil casos; 4,9%). A previsão é de mais de 35 milhões de novos casos de câncer em 2050, um aumento de 77% em relação aos cerca de 20 milhões de casos estimados em 2022 (IARC, 2024).

Dentre as sucessões de marcas distintivas que as células evoluem progressivamente para um estado neoplásico, permitem-as tornar tumorigênicas e malignas, está a glicosilação aberrante. Seja tanto em termos de níveis alterados de expressão de glicanos (quantitativa) quanto na produção de estruturas específicas (qualitativa), é uma característica universal de todos os estágios do câncer (Yingli *et al.* 2025).

Considerando o crescente ônus do câncer e a busca por biomoléculas com atividade antitumoral com baixa toxicidade em células humanas saudáveis, as lectinas impedem a metástase ao se ligarem a carboidratos específicos na superfície celular, um processo crucial para a interação entre as células. Adicionalmente, há também a interação entre a lectina e proteínas que regulam o ciclo celular e bloqueia a síntese de proteínas em diversas linhagens de células tumorais (Arruda *et al.* 2023).

As lectinas de macroalgas marinhas, em geral, possuem especificidade a carboidratos complexos e gliconjugados na superfície de células cancerígenas durante a glicosilação – isso tornam-as particularmente úteis em aplicações biológicas e bioquímicas (Catanzaro *et al.* 2019; Chaves *et al.*, 2018 Pinto *et al.* 2009).

Logo, o presente projeto buscar expressar em sistema heterólogo uma lectina da alga marinha vermelha *Alsidium seaforthii*, considerando as suas propriedades bioquímicas e

físico-químicas a fim de avaliar seu potencial e viabilizar o seu direcionamento para uma futura aplicação biotecnológica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Produzir, por expressão heteróloga, a isolectina BSL3 da alga marinha vermelha *Alsidium seaforthii*, e realizar sua caracterização bioquímica e estrutural.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir e purificar a isoforma BSL 3 de forma heteróloga em *E. coli*;
- Avaliar a homogeneidade e pureza da lectina por meio de gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS–PAGE);
- Avaliar a atividade hemaglutinante da lectina recombinante e sua especificidade glicídica;
- Determinar os parâmetros termodinâmicos de associação entre a lectina e seus ligantes através de calorimetria de titulação isotérmica (ITC);
- Avaliar o tamanho hidrodinâmico do complexo lectina-proteína fusionada por espalhamento dinâmico de luz (DLS);
- Avaliar a estrutura primária da lectina recombinante por espectrometria de massas (*MS/MS*);
- Avaliar a estrutura secundária da lectina recombinante através de dicroísmo circular;
- Predizer a estrutura tridimensional da lectina e identificar potenciais domínios de reconhecimento de carboidratos (DRCs).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção do gene sintético de BSL3

A região codificadora do DNA referente a isoforma BSL3, compreendendo os resíduos de aminoácidos A¹ – K⁹¹ (Nascimento-Neto *et al.*, 2012), foi utilizada para desenhar o gene sintético adquirido junto a empresa FastBio, sendo otimizada a preferência de códons para a *Escherichia coli*. A otimização de códons visa aumentar a produção da proteína recombinante alvo ao alterar códons do gene alvo, deixando-os mais similares aos códons de uso da célula hospedeira.

O gene foi inserido em um vetor plasmidial pET32a-TEV entre os sítios de restrição *NcoI* e *XhoI*. O vetor possui um promotor transcricional T7 que confere uma alta expressão proteica em *E. coli*. O plasmídeo em questão origina uma proteína de fusão composta pela proteína alvo acrescida de uma etiqueta de seis resíduos de histidinas (*histag*) e da proteína tiorredoxina (Trx) no N-terminal. Além disso, o pET32a-TEV carrega um gene de resistência à ampicilina e um sítio de clivagem para a protease *Tobacco Etch Virus* (TEV), pertencente ao vírus do gênero *Potyvirus*.

O uso da informação genética tem autorização e regulação junto ao SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, ID: A1792FE).

Os experimentos de biologia molecular foram realizados em um laboratório de biossegurança certificado de acordo com as exigências governamentais (CQB: R007-2016).

A tabela a seguir sumariza os plasmídeos e as cepas utilizadas durante o estudo (Tabela 3).

Tabela 3 – Plasmídeos bacterianos e cepas de *E. coli* utilizados.

Cepa ou plasmídeo	Propriedades	Referência
DH5α	Célula tratada quimicamente para ser competente	<i>Invitrogen</i>

Tabela 3 – Plasmídeos bacterianos e cepas de *E. coli* utilizados (Conclusão).

	à transformação. Demonstra uma alta eficiência de transformação.	
BL21(DE3)	Célula de referência utilizada para expressão de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i> . A nomenclatura (DE3) designa a presença de uma cópia cromossomal da <i>T7 RNA Polimerase</i> induzível com isopropil- β -tiogalactosídeo (IPTG).	<i>Novagen</i>
pET32a-TEV	O vetor foi projetado para a clonagem e alta expressão de sequências peptídicas fundidas com a proteína tiorredoxina. Sítios de clonagem estão disponíveis para produzir proteínas de fusão que também contêm sequências cliváveis de cauda de histidina e etiqueta S para detecção e purificação. Possui um promotor T7 induzível com IPTG e um gene de resistência à ampicilina.	<i>Novagen</i>

Fonte: O autor.

3.2 Preparação das células competentes

A preparação de células competentes foi realizada conforme descrito por Sambrook (2002), ou método de cloreto de cálcio. Um pré-inóculo de células de *E. coli* foi preparado em 5 mL de meio líquido LB (Luria-Bertani) Broth e incubado a 37 °C durante 16 horas, sob agitação constante. A cultura foi diluída (1/100) em 500 mL de LB líquido e incubada novamente a 37 °C até atingir $D.O_{620nm} = 0,4-0,6$. Em seguida, foi incubada em banho de gelo por 5 minutos. As células foram centrifugadas a 1.600 x g a 4 °C por 10 minutos e o concentrado celular suspenso cuidadosamente em 50 mL de 100 mM $MgCl_2$ gelado.

A ressuspensão foi incubada em banho de gelo por 30-45 min e então centrifugada a 1.600 x g a 4 °C por 10 minutos, descartando o sobrenadante. O concentrado celular foi cuidadosamente suspenso em 10 mL de tampão 100 mM $CaCl_2$ gelado e incubado em banho de gelo por 90-120 min. Foram adicionados 2 mL de glicerol (15-20% final) e distribuiu-se rapidamente a suspensão de células em tubos de microcentrífuga em alíquotas de 100 µL. Os tubos foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer -80 °C.

3.3 Transformação bacteriana em *E. coli* DH5α

A reação de transformação consistiu na mistura de 2 µL de vetor pET32a-TEV-BSL com 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α. Posteriormente, as células ficaram em repouso em banho de gelo por 20 min, seguidas por um choque térmico em banho-maria à 42 °C por 45 segundos. Logo depois foram deixadas em repouso por mais 2 minutos no gelo. Finalmente as células foram incubadas a 37 °C por 1 hora em meio LB-Broth (Sambrook, 2002).

Com o intuito de validar a transformação, uma alíquota da suspensão de células transformadas foi transferida para placas de Petri contendo LB ágar (LB acrescentado de ágar 1,6%, pH 7,5) e 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas. Os clones crescidos foram então selecionados para extração plasmideal.

3.4 Purificação do plasmídeo recombinante

Para a purificação do DNA plasmideal foi utilizado o kit *illustra™ plasmidPrep Mini Spin*. O procedimento foi executado de acordo com o manual do fabricante.

Cada colônia positiva, crescida em meio LB ágar contendo ampicilina, foi inoculada em 10 mL de meio líquido LB Broth a 37 °C por 16 h em 180 rpm. As células foram então precipitadas por centrifugação a 1.000 x g por 5 min em tubos de microcentrifugação e o sobrenadante foi descartado. O concentrado celular final foi ressuspensão em 250 µL de solução de ressuspensão celular, homogeneizado, e então foi adicionado 250 µL de solução de lise. Ao homogeneizado, acrescentou-se 10 µL de solução alcalina deixando em incubação à temperatura ambiente.

Ao fim de 5 minutos, 350 µL de solução de neutralização foram adicionados, homogeneizados e submetidos a uma nova centrifugação a 13.000 x g por 10 minutos. O lisado clarificado, correspondente ao sobrenadante, foi então aplicado em uma coluna de sílica, centrifugando-a em um tubo coletor a 13.000 x g por 1 min. Após isso, 750 µL e depois 250 µL de solução de lavagem foram aplicados na coluna, intercalados por centrifugação a 13.000 x g por 1 min.

Em um tubo de microcentrifugação limpo, os plasmídeos foram eluídos da coluna com adição de 50 µL de água livre de nucleases.

3.5 Confirmação dos plasmídeos recombinantes

A reação em cadeia da polimerase (PCR) de colônia foi realizada utilizando colônias previamente cultivadas em meio LB-ágar com ampicilina seguidas pela extração do DNA plasmideal. Foram adotadas as concentrações para uma reação final de PCR: tampão 1x; 2,5 mM de MgCl₂; 0,4 µM de dNTP mix; 0,4 µM de iniciador T7; 0,4 µM de terminador T7; 0,5 µL de DNA plasmidial; 1 U de Taq DNA polimerase e água ultrapura para completar o volume final de 10 µL.

A amplificação ocorreu em termociclador *Eppendorf 22 Mastercycler Nexus Gradient*, nas etapas: (I) desnaturação inicial do DNA à 94 °C por 5 minutos; (II) 30 ciclos à 94 °C por 30 segundos com anelamento por 30 segundos à 50 °C; extensão por 1 minuto e 30

segundos à 72 °C; e (III) extensão final de 72 °C por 7 minutos. Posteriormente, os produtos oriundos da PCR – juntamente com os plasmídeos purificados da extração plasmidial – foram visualizados em gel de agarose para validação da integridade do vetor e do sucesso da transformação bacteriana.

3.6 Transformação bacteriana em *E. coli* BL21(DE3)

Após os experimentos prévios e a confirmação do plasmídeo recombinante, este foi utilizado para transformação de células competentes da cepa *E. coli* BL21(DE3). A reação de transformação consistiu na mistura de 2 µL de vetor pET32a-TEV-BSL com 100 µL de células competentes de *E. coli* BL21(DE3). Posteriormente, as células ficaram em repouso em banho de gelo por 20 min, seguidas por um choque térmico em banho-maria à 42 °C por 45 segundos. Logo depois foram deixadas em repouso por mais 2 minutos no gelo. Finalmente as células foram incubadas a 37 °C por 1 hora em meio LB-Broth. Os mesmos passos de confirmação dos plasmídeos recombinantes em *E. coli* DH5α foram empregados para validar o processo em *E. coli* BL21(DE3).

3.7 Ensaios para estabelecimento de condição ótima de expressão

Com o intuito de otimizar a produção da lectina recombinante, testes de condições acerca da expressão em sistema heterólogo foram conduzidos previamente a produção em larga escala.

As bactérias transformadas foram inicialmente pré-cultivadas em 5 mL de meio LB-Broth com ampicilina (100 mg.mL⁻¹) a 37 °C, sob agitação contínua de 190 rpm por 16 horas. Posteriormente, o cultivo foi transferido para 50 mL do mesmo meio LB com ampicilina na mesma concentração. A indução da expressão ocorreu quando a D.O. 620nm atingiu entre 0,4-0,5, pela adição de isopropil-β-tiogalactosídeo (IPTG) em concentrações de 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 mM.

Diversos tempos (4, 16, 20 e 24 horas) e temperaturas (18, 25, 30 e 37 °C) foram testados. Após cada concentração de indutor, tempo final e temperatura de incubação, uma alíquota de 1 mL foi coletada para avaliar a eficiência da expressão proteica via SDS-PAGE

15%. A condição que resultou na máxima expressão de rBSL3 foi selecionada para produções em maior escala.

3.8 Extração de proteínas totais de *E. coli* recombinante

As células foram sedimentadas por centrifugação a $10.000 \times g$ durante 10 minutos a 4 °C. Cada 1,0 g de pellet celular foi suspenso em 10,0 mL de tampão TBS (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5% v/v glicerol, pH 8,0) e lisado por sonicação. A lise celular foi realizada por ultrassonicação em gelo, utilizando um sonicador de sonda Soni-tech Ultrasonic Clean 450 W, em ciclos de 15 segundos a 30% de potência, com intervalos de 30 segundos entre os pulsos. O material resultante foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 15 minutos a 4 °C.

A separação das frações solúvel e insolúvel foi realizada mediante centrifugação a $10.000 \times g$ por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante (fração solúvel) e o sedimento (fração insolúvel) foram coletados para análise por SDS-PAGE 15%. Após as avaliações iniciais, foram eleitas as condições ótimas de expressão para rBSL3 e então foram feitas induções em volumes maiores para purificação em larga escala das proteínas.

3.9 Ensaios de expressão em larga escala da rBSL3

As células bacterianas de expressão foram inoculadas em meios *Luria-Bertani* (LB) de 5 mL suplementados com $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de ampicilina e cultivadas *overnight* a 37 °C em um agitador sob rotação a 190 rpm. Em seguida, as células foram transferidas para 1 L de meio LB com adição $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de am. A densidade óptica das culturas de bactérias foram mensuradas até atingirem o valor de absorbância 0,4-0,6 a 620 nm, e então adicionou-se o agente indutor isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG) até atingir uma concentração final de 0,1 mM.

Após 24 horas de incubação a 18 °C, as células foram recolhidas e suspensas em tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 150 mM NaCl; 5% v/v glicerol; 20 mM de imidazol. A proporção utilizada foi de 10 mL de tampão para cada 1 g de massa celular precipitada. A lise celular foi realizada por ultrassonicação em gelo utilizando um sonicador de sonda *Soni-tech Ultrasonic Clean* 450 W, em ciclos de 15 segundos em 30% de potência com 30 segundos de intervalo. O material resultante foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 15 minutos a 4 °C.

3.10 Ensaios de expressão da tiorredoxina

As células bacterianas de expressão (contendo o vetor pET32a-TEV sem o inserto) foram inoculadas em meios *Luria-Bertani* (LB) de 5 mL suplementados com 100 mg.mL⁻¹ de ampicilina e cultivadas *overnight* a 37 °C em um agitador sob rotação a 190 rpm. Em seguida, as células foram transferidas para 1 L de meio LB com adição 100 mg.mL⁻¹ de am. A densidade óptica das culturas de bactérias foram mensuradas até atingirem o valor de absorbância 0,4-0,6 a 620 nm, e então adicionou-se o agente indutor isopropil-β-D-tiogalactosídeo (IPTG) até atingir uma concentração final de 0,1 mM.

Após 24 horas de incubação a 18 °C, as células foram recolhidas e suspensas em tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 150 mM NaCl; 5% v/v glicerol; 20 mM de imidazol. A proporção utilizada foi de 10 mL de tampão para cada 1 g de massa celular precipitada. A lise celular foi realizada por ultrassonicação em gelo utilizando um sonicador de sonda *Sonitech Ultrasonic Clean* 450 W, em ciclos de 15 segundos em 30% de potência com 30 segundos de intervalo. O material resultante foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C.

3.11 Purificação de rBSL3 por cromatografia de afinidade de tipo IMAC

O extrato bacteriano foi submetido a uma cromatografia de afinidade em uma coluna *HisTrap FF Crude* (5 mL; GE Healthcare) a um fluxo de 2,0 mL.min⁻¹. A resina foi previamente lavada com cinco volumes de coluna do tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 150 mM NaCl; 5% v/v glicerol; 20 mM de imidazol. A proteína foi eluída com tampão de eluição 20 mM Tris-HCl pH 8,0; contendo 150 mM de NaCl; 175 mM de imidazol e 5% v/v de glicerol. As frações de 2 mL foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE.

O princípio da cromatografia de afinidade em metal imobilizado de tipo IMAC (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*) se baseia na interação iônica que se forma entre o anel imidazólico dos resíduos de histidina da proteína e a carga positiva dos íons de níquel da resina. Consequentemente, a proteína é eluída por um mecanismo competitivo envolvendo uma quantidade crescente de imidazol presente nos tampões.

3.12 Ensaios de digestão da rBSL3

Detectada as proteínas de fusão (tiorredoxina-His6-rBSL3), as frações retidas na coluna de HisTrap foram dialisadas contra tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 150 mM NaCl; 5% v/v glicerol; 0,05 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 1mM de cisteína. O material foi então submetido a uma reação de digestão para a remoção da proteína de fusão.

A etiqueta de polihistidina pode ser eliminada por clivagem com a protease TEV (produzida de forma recombinante) também fusionada a uma etiqueta de histidina. A proteína de interesse foi incubada por 24 horas a 4 °C com a protease TEV diluída 1/20. Em seguida, a lectina foi submetida a um sistema AKTA Pure (GE Healthcare) com uma coluna *HisTrap FF Crude* (5 mL; GE Healthcare)

Dessa vez, a fração não retida contendo a proteína de interesse foi recuperada. As proteínas não digeridas, a proteína de fusão e a protease TEV ficaram retidas à coluna, graças à presença da etiqueta de histidina.

3.13 Avaliação da homogeneidade por SDS-PAGE 15%

O SDS–PAGE 15% foi realizado com o objetivo de estimar a massa molecular aparente em comparação a massa molecular da lectina nativa (Nascimento-Neto *et al.*, 2012) e avaliar a homogeneidade da rBSL3 purificada. As alíquotas contendo rBSL3 foram avaliadas através de SDS PAGE em condições redutoras (Laemmli, 1970).

3.14 Ensaios de atividade hemaglutinante e de inibição

Os ensaios de atividade hemaglutinante foram realizados utilizando eritrócitos de coelho, os quais são mantidos no Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará. A coleta de sangue foi previamente autorizada pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais de Produção (CEUAP 2211202101).

Os eritrócitos foram preparados em sua forma nativa e tratados com tripsina. Os testes foram realizados seguindo o método da dupla diluição seriada, em placas de

microtitulação de fundo em V. O ensaio de inibição da atividade hemaglutinante foi realizado com as seguintes glicoproteínas: mucina de estômago de porco tipo 2 (PSM-II); mucina de estômago de porco tipo 3 (PSM-III); fetuína bovina; mucina submaxilar bovina (BSM) e tireoglobulina suína. Ambos os ensaios foram realizados de acordo com a metodologia estabelecida (Sampaio *et al.*, 2002). A tiorredoxina isolada foi utilizada como controle negativo.

3.15 Calorimetria de Titulação Isométrica (ITC)

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é uma técnica que mede diretamente o calor liberado ou absorvido durante a mistura de reagentes, o que permite caracterizar qualquer processo químico que envolva trocas de calor, e assim fornecendo um perfil termodinâmico completo da interação molecular.

Os experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foram realizados utilizando um calorímetro MicroCal PEAQ-ITC (Malvern Instruments) com uma célula padrão de 250 μL e uma seringa de titulação de 40 μL . Foi avaliada a rBSL3 em interação com a tireoglobulina suína.

As amostras foram preparadas em uma solução de 20 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 150 mM NaCl; 5% v/v glicerol; 175 mM de imidazol. A solução contendo rBSL3 foi ajustada para uma concentração de 0,33 μM , enquanto a solução do ligante foi preparada em concentração de 0,4 μM e injetado pela seringa de titulação. A análise foi conduzida em 19 ciclos de injeção, com volumes de 2 μL de solução de ligante sendo injetados na célula de amostra a cada 150 segundos, sob agitação de 750 rpm.

A titulação da tiorredoxina isolada com a tireoglobulina suína foi realizada como controle negativo.

Os efeitos de calorimetria integrados foram analisados por regressão não linear utilizando o modelo de ligação de sítio (*software MicroCal PEAQ-ITC Analysis*). Os dados experimentais foram ajustados a uma curva teórica, permitindo a determinação da constante de dissociação (K_d), da entalpia de ligação (ΔH) e do número de sítios (n).

3.16 Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) é uma ferramenta usada para estudar o comportamento de difusão de macromoléculas em solução. O coeficiente de difusão e, conseqüentemente, o tamanho hidrodinâmico calculado a partir dele, dependem do tamanho e da forma das macromoléculas. Além disso, é possível inferir informações sobre a presença de agregados, a dispersividade e a homogeneidade da amostra (Stetefeld; McKenna; Patel, 2016).

A análise por DLS foi conduzida para avaliar o comportamento hidrodinâmico e homogeneidade da rBSL3 em determinada condição de pH, assim como compará-la com a proteína de fusão tiorredoxina (controle negativo) nas mesmas condições. A lectina e a tiorredoxina foram solubilizadas na concentração final de 1 mg/mL em tampão 20 mM Tris-HCl pH 7,0. As amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 20 minutos a 4 °C para eliminar agregados insolúveis e partículas. Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para cubetas de poliestireno limpas e as medições de DLS foram feitas a 20 °C com um *Zetasizer Advance Ultra* (Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

As distribuições de tamanho hidrodinâmico foram determinadas a partir das funções de autocorrelação de intensidade, número e volume, empregando o modelo de análise de uso geral disponibilizado pelo fabricante.

3.17 Determinação da estrutura primária por MS/MS

3.17.1 Digestão da lectina com enzima proteolítica em gel

Para a determinação da sequência de aminoácidos por espectrometria de massas (MS/MS), a lectina purificada foi submetida à SDS-PAGE 12% corado com *Coomassie Brilliant Blue* (Laemmli, 1970). As bandas foram excisadas e descoradas segundo o protocolo previamente estabelecido (Shevchenko *et al.*, 2007). As bandas eletroforéticas descoradas da proteína seguiram para digestão com a enzima proteolítica tripsina.

As digestões foram realizadas em bicarbonato de amônio 25 mM a 1:50 p/p (enzima/substrato), mantidas a 37 °C por 18 horas. A digestão foi interrompida com adição de 2 µL de ácido fórmico a 2%. Os peptídeos resultantes foram extraídos do gel conforme Shevchenko *et al.* (2007).

3.17.2 Sequenciamento dos peptídeos obtidos por digestão

Para o sequenciamento dos peptídeos obtidos por digestão, as soluções contendo os foram injetadas em uma coluna de fase reversa C18 (100 μm x 100 mm) em um sistema nanoAcquity (Waters Corporation, MA, EUA), os peptídeos foram eluidos por gradiente linear de acetonitrila, contendo 0,1% de ácido fórmico. Os eluatos foram infundidos diretamente em uma fonte de nanoeletrospray no espectrômetro de massas (nESI-LC/MS).

O espectrômetro de massas operou em modo positivo na faixa de 50 a 3000 m/z , sob voltagem do capilar de 3,5 kV e temperatura da fonte de 363 K. As análises de LC-MS/MS foram conduzidas de acordo com a função DDA (*Data Dependent Analysis* - Análise Dependente de Dados), sendo selecionados para análise de MS/MS íons precursores com carga (z) entre 2+ e 4+, onde foram fragmentados por Dissociação Induzida por Colisão (CID), utilizando argônio como gás de fragmentação.

3.17.3 Análise dos dados

Para a análise de dados os espectros coletados foram processados pelos programas MassLynx v4.1 e ProteinLynx v2.4 (Waters Corporation). Os espectros de fragmentação foram interpretados manualmente pelo uso da ferramenta PepSeq (Waters). A estrutura primária foi determinada por sobreposição dos peptídeos sequenciados.

3.18 Dicroísmo circular

A estrutura secundária da rBSL3 foi analisada por espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) usando um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco International Co., Tóquio, Japão) equipado com um sistema *peltier* com temperatura controlada. A lectina foi solubilizada em tampão fosfato 20 mM (pH 7,0) a uma concentração final de 0,2 mg/mL. A tioredoxina isolada foi utilizada em concentração e tampão equivalentes para efeito de comparação. Após a centrifugação, as amostras foram transferidas para uma cubeta de quartzo com 1 mm de caminho óptico.

Os espectros de CD foram registrados na faixa do UV-distante (190–240 nm) a uma velocidade de varredura de 50 nm/min. As predições da estrutura secundária foram realizadas utilizando o servidor online DichroWeb (Referência).

3.19 Predição estrutural

A modelagem estrutural de rBSL3 sem a proteína de fusão foi realizada usando o servidor *AlphaFold2*, gerando cinco estruturas tridimensionais previstas a partir da sequência de aminoácidos da isoforma (Jumper *et al.*, 2021; Nascimento-Neto *et al.*, 2012). A análise do modelo foi feita com base na cobertura de sequência e gráficos de identidade fornecidos pelo servidor.

Para avaliação estereoquímica, critérios como sobreposições estéricas, parâmetros de desvio de C β Ramachandran, rotâmeros e qualidade do ângulo de ligação foram considerados usando o software *MolProbity* e *VoroMQA* (Chen *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2017). O modelo de maior qualidade foi selecionado e inspecionado visualmente no *PyMOL* (Schrödinger).

Adicionalmente, os domínios de reconhecimento de carboidratos (DRC) da rBSL3 foram analisados com a ferramenta DogSiteScorer (<https://proteins.plus>), que aplica um filtro de Diferença Gaussiana a uma representação tridimensional da proteína para detecção de cavidades (Volkamer *et al.*, 2012; Schöning-Stierand *et al.*, 2020).

Para estimar a composição da estrutura secundária de rBSL3 isolada (sem a presença da proteína de fusão) por categoria (α -hélices, folhas- β etc.) a partir dos dados de rBSL3 fusionada e da tiorredoxina isolada, foi utilizada a seguinte fórmula matemática (Figura 4):

Figura 4 – Cálculo de estimativa em % da estrutura secundária de rBSL3 isolada.

$$SrBSL = \frac{S_{\text{fusão}} - (F_{\text{Trx}} \cdot S_{\text{Trx}})}{FrBSL}$$

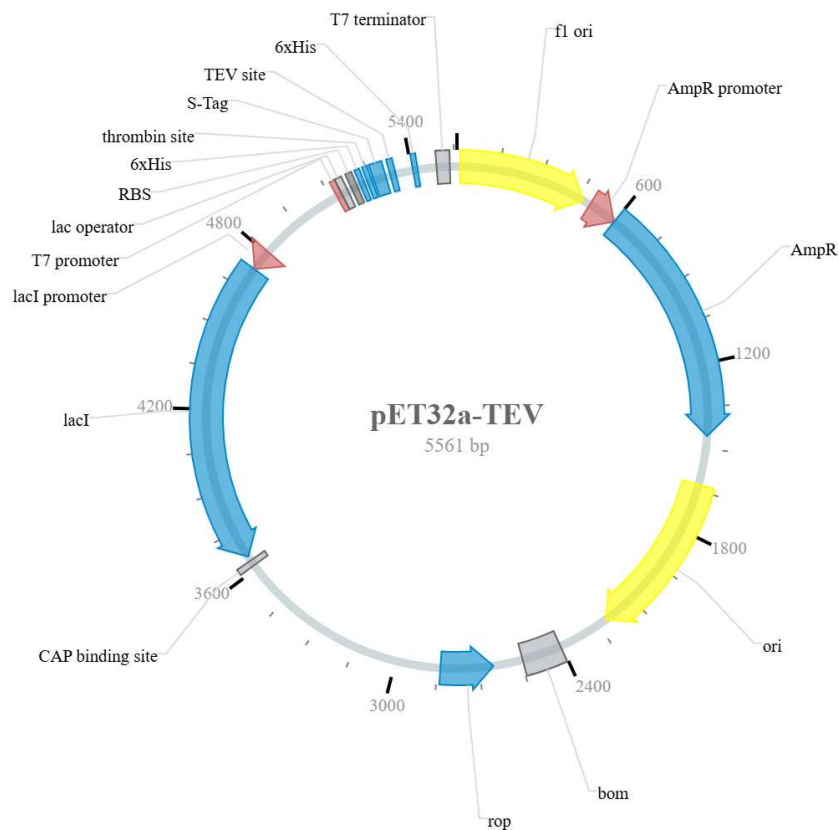
Fonte: O autor. **SrBSL**: estimativa em % da estrutura secundária de rBSL3 isolada; **Sfusão**: percentual observado na construção rBSL3 + Trx (por categoria: hélice, folha etc.); **FTrx**: fração da Trx na construção rBSL3 + Trx (167 aa de 258 aa totais $\rightarrow$ 0,647); **STrx**: percentual de estrutura secundária por categoria da Trx isolada (obtido por dicroísmo circular); **FrBSL**: fração da rBSL3 na construção rBSL3 (1 – FTrx).

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção do gene sintético

O gene codificante otimizado para a lectina rBSL3 foi construído no vetor de expressão pET32a (+) entre os sítios de restrição *NcoI* e *XhoI*, contendo um sítio de clivagem para a protease TEV (Figuras 5 e 6).

Figura 5 – Mapa do vetor pET32a-TEV.



Fonte: Imagem do vetor pET32a-TEV da empresa NovoPro. Disponível em: <https://www.novoprolabs.com/vector/Vgeztknbt>

Figura 6 – Sequência de aminoácidos da proteína recombinante rBSL3 com proteína de fusão tiorredoxina (Trx).

rBSL 3

```

      10      20      30      40      50      60
MSDKIIHLTD DSFDTDVLKA DGAILVDFWA EWCGPCKMIA PILDEIADEY QGKLTVAKLN

      70      80      90     100     110     120
IDQNPGTAPK YGIRGIPTLL LFKNGEVAAT KVGALSKGQL KEFLDANLAG SGSGHMHHHH

     130     140     150     160     170     180
HHSSGLVPRG SGMKETAAAK FERQHMDSPD LGTDDDDKAM ENLYFOGADP VCGSSGYSGT

     190     200     210     220     230     240
TPAILTPKSP GNFP SGYDKL IVTGVGGSYP VYISRPDGFV VGKVSEGGCA NFGAYSGGGK

     250
SEVG VYGSSG TIVAVACK

```

Número de aminoácidos: 258

Peso molecular: 27131.53 kDa

Ponto isolétrico teórico (pI): 5.53

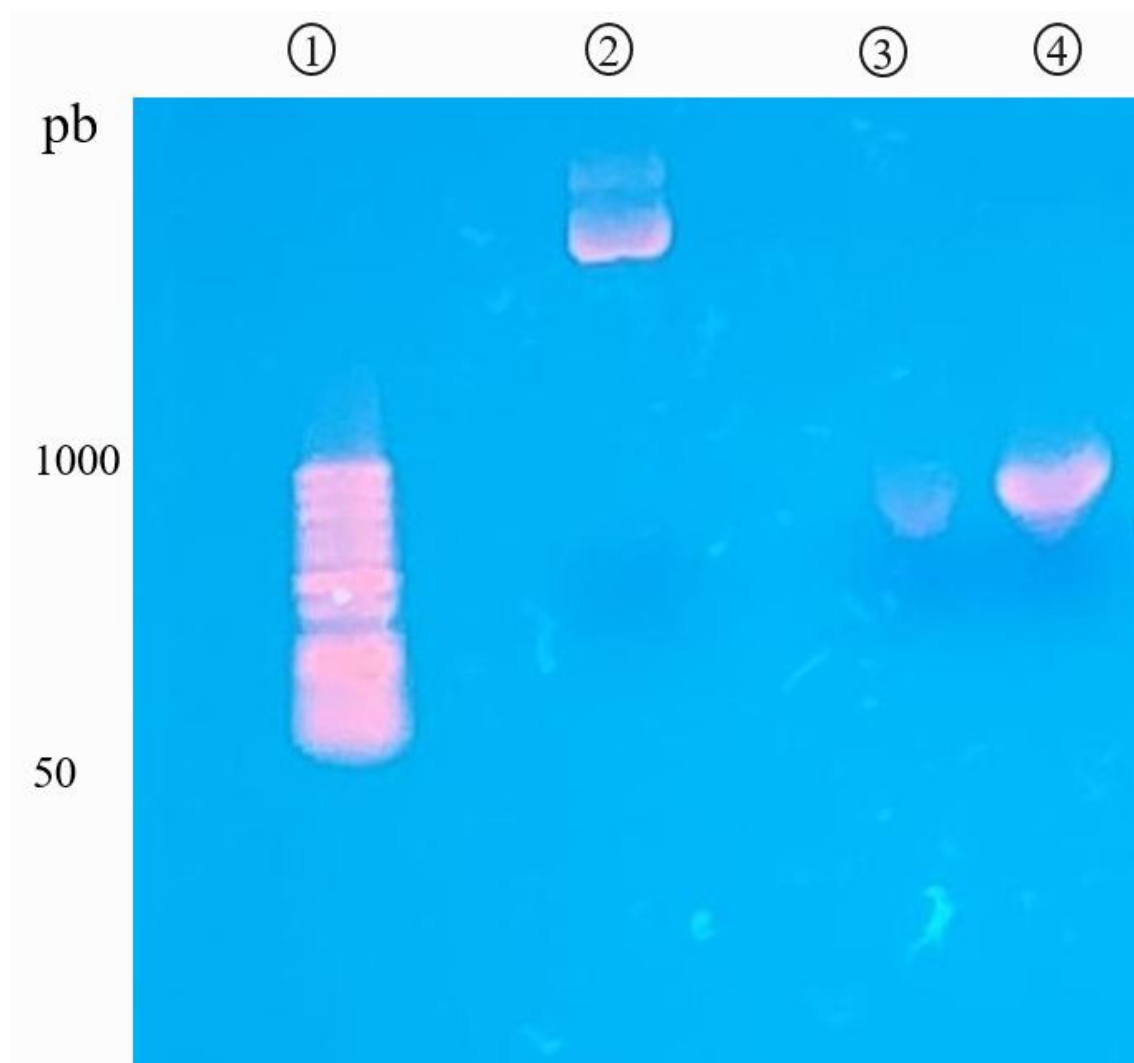
Coefficiente de extinção molar: 30.285 M⁻¹ cm⁻¹

Fonte: O autor. Sequência de aminoácidos da lectina rBSL3 com cauda de fusão (proteína de fusão Trx, *his-tag* e sítio de clivagem para a protease TEV) expresso a partir do pET32a-TEV. Itálico: Tiorredoxina (Trx). Sublinhado: vermelho: sequência de seis resíduos de histidina (*his-tag*), amarelo: sítio de clivagem para a protease TEV. Negrito: lectina. Dados informados pelo NovoProLabs: <https://novoprolabs.com/tools/protein-extinction-coefficient-calculation>.

4.2 Confirmação dos plasmídeos recombinantes

A confirmação dos clones transformados com o vetor contendo a *Open Reading Frame* (ORF) da rBSL3 foram realizados por PCR e visualizados em gel de agarose (Figura 7).

Figura 7 – Validação da transformação de células de *E. coli* provenientes da purificação do plasmideal e PCR de colônia.



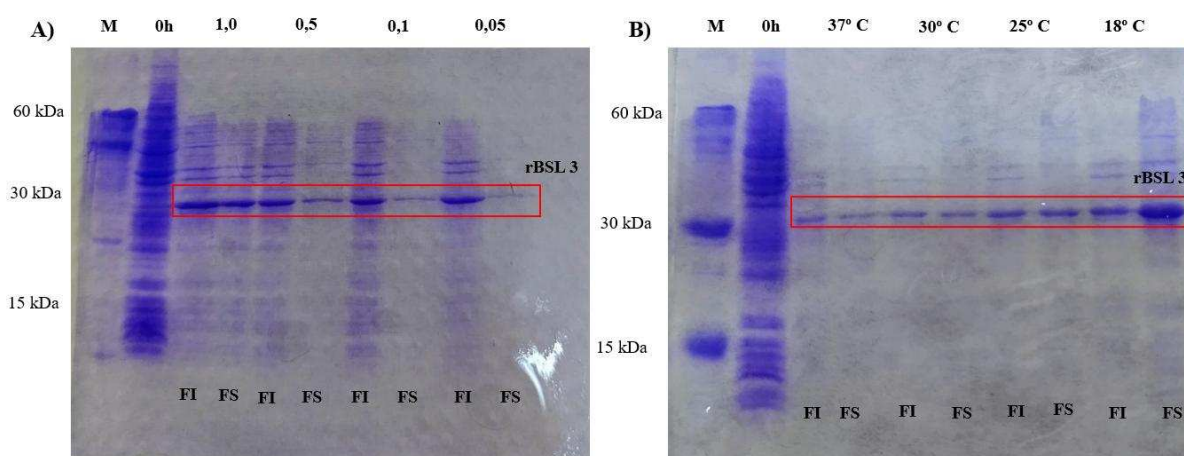
Fonte: O autor. Eletroforese em gel de agarose 1%. **1:** marcador de peso molecular comercial (GeneRuler 50 pb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific); **2:** pET32a-TEV-rBSL3 obtido após a purificação plasmideal; **3:** controle negativo da PCR de colônia; **4:** rBSL3 em *E. coli* BL21(DE3) obtido dos produtos amplificados da PCR de colônia.

A ORF equivalente a rBSL3 fusionada a tiorredoxina contém 258 aminoácidos, logo 774 pares de bases (pb). A amplificação abrangeu toda a região dos *primers* T7 iniciador (19 pb) e terminador (48 pb), consistindo em aproximadamente 841 pares de bases. Conforme é observado no resultado da PCR, com banda acima de 500 pb e aproximadamente 870 pb, é confirmado a presença do vetor com a ORF de rBSL3.

4.3 Ensaio para estabelecimento de condição ótima de expressão

Após avaliação da eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) das amostras obtidas, foi observado que em todos os testes realizados a proteína rBSL3 foi expressa tanto na fração solúvel quanto na fração insolúvel. Consequentemente, as seguintes condições foram escolhidas para a expressão otimizada de rBSL3 em fração solúvel: indução com 0,1 mM de IPTG a 18 °C por 24 horas (Figura 8).

Figura 8 - Testes de expressão em *E. coli* BL21(DE3).



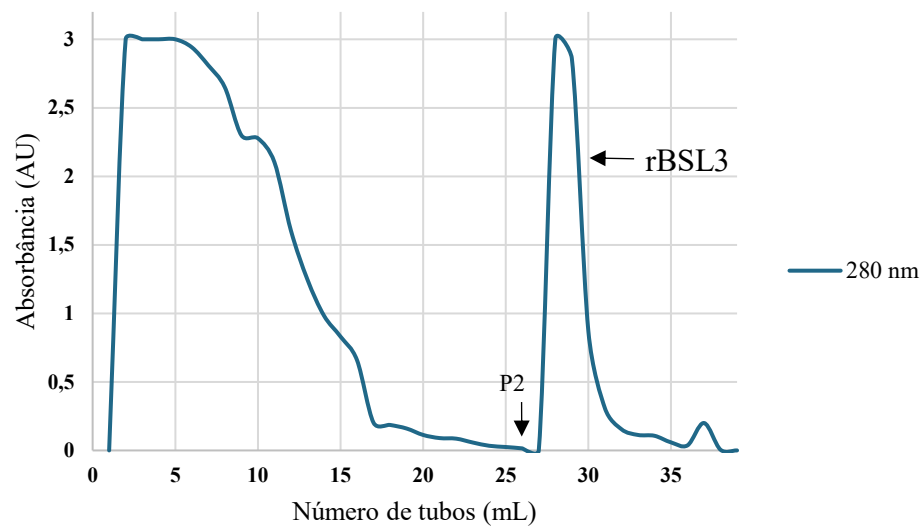
Fonte: O autor. SDS-PAGE 15% dos testes de expressão da rBSL3 no vetor pET32a (+). Transformação em *E. coli* BL21 (DE3). **A:** Teste da variação da concentração de IPTG (0,05 mM; 0,1 mM; 0,5 mM e 1mM) a 37 °C por 4 horas; **B:** Teste de variação da temperatura (37 °C por 4 horas; 30 °C por 16 horas; 25 °C por 20 horas e 18 °C por 24 horas) a 0,1 mM de IPTG. **M:** Marcador: lectina de *Chondrilla caribensis*, 15 kDa; lectina recombinante de *Solieria filiformis*, 30 kDa; albumina sérica bovina, 66 kDa. **0h:** teste sem indutor em OD 0.4 - 0.6; **FI:** Fração insolúvel; **FS:** Fração solúvel; rBSL3: proteína recombinante de rBSL3 com, aproximadamente, 30 kDa).

4.4 Purificação da rBSL3 por cromatografia de afinidade do tipo IMAC

O rendimento final de purificação da rBSL3 foi de cerca 1,35 mg por 2,5 litros de cultura induzida. A rBSL3 inicialmente foi purificada por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados com uma coluna *HisTrap FF Crude* (5 mL; GE Healthcare). Os picos contendo a lectina foram eluídos (P2) com o tampão TBS contendo 175 mM de imidazol

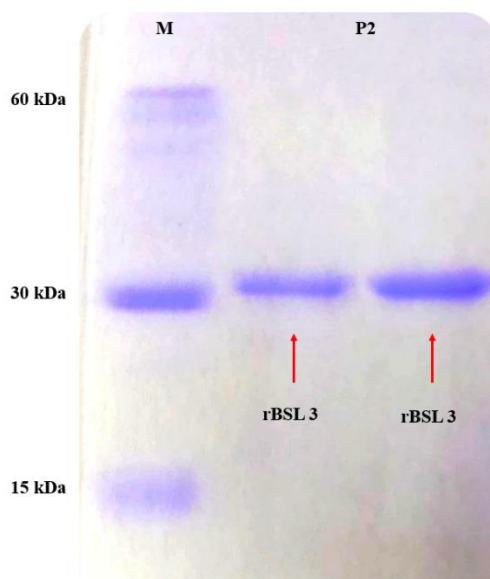
(Figura 9). Os eluatos foram submetidos a SDS-PAGE para verificar o grau de pureza, e a banda de interesse apresentou massa estimada de 30 kDa (Figura 10).

Figura 9 – Cromatograma referente à aplicação dos lisados solúveis de *E. coli* aplicados em coluna de níquel imobilizado *HisTrap FF Crude* (5 mL; GE Healthcare).



Fonte: O autor. Os lisados solúveis se referem as seguintes condições de expressão: 18 °C por 24 horas com 0,1 mM de IPTG. **P2**: Uso do tampão de eluição: 20 mM de Tris-HCl pH 8,0; 150 mM de NaCl; 5% v/v glicerol; 175 mM de imidazol. Fluxo: 2 mL/min. Volume dos tubos coletados: 2 mL.

Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com adição de dodecil sulfato de sódio 15% de rBSL3

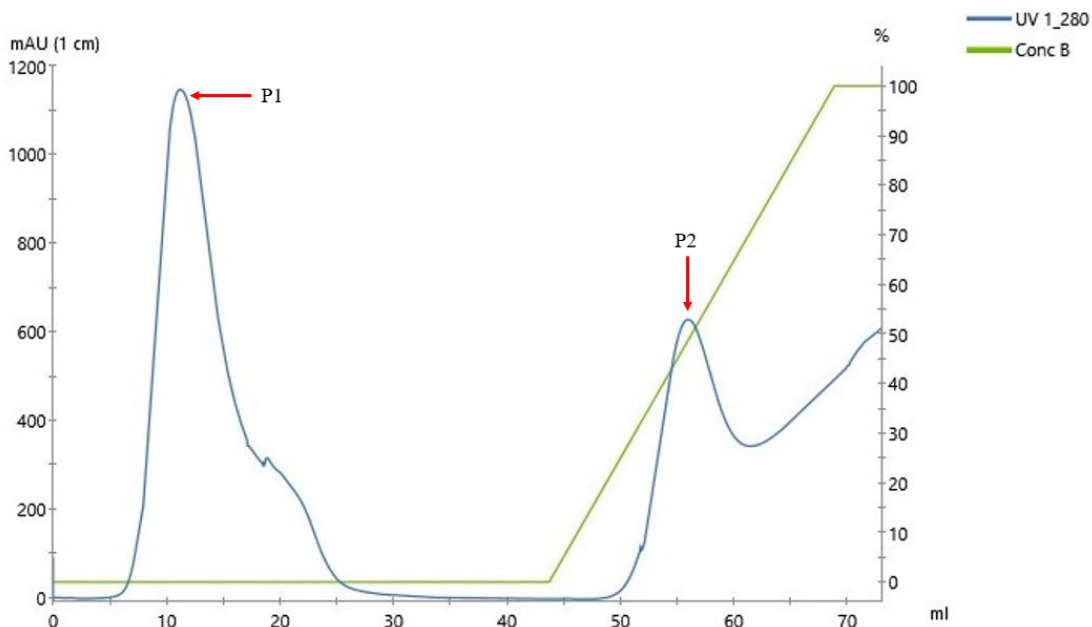


Fonte: O autor. SDS-PAGE dos eluatos da cromatografia de afinidade com níquel imobilizado da rBSL3. **M**: Marcador: lectina de *Chondrilla caribensis*, 15 kDa; lectina recombinante de *Solieria filiformis*, 30 kDa; albumina sérica bovina, 66 kDa. **P2**: Pico eluído com tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,0; contendo 150 mM de NaCl; 175 mM de imidazol e 5% v/v de glicerol. **rBSL3**: proteína recombinante com proteína fusionada de BSL 3 com, aproximadamente, 30 kDa.

4.5 Purificação da rBSL3 por IMAC após os ensaios de digestão

A rBSL3 submetida à digestão com a protease TEV foi purificada por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados com uma coluna *HisTrap FF Crude* (5 mL; GE Healthcare). Os picos contendo a lectina foram eluídos (P1) com o tampão TBS contendo 20 mM de imidazol. As proteínas não digeridas, a proteína de fusão e a protease TEV foram eluídos (P2) com o tampão TBS contendo 175 mM de imidazol. (Figura 11).

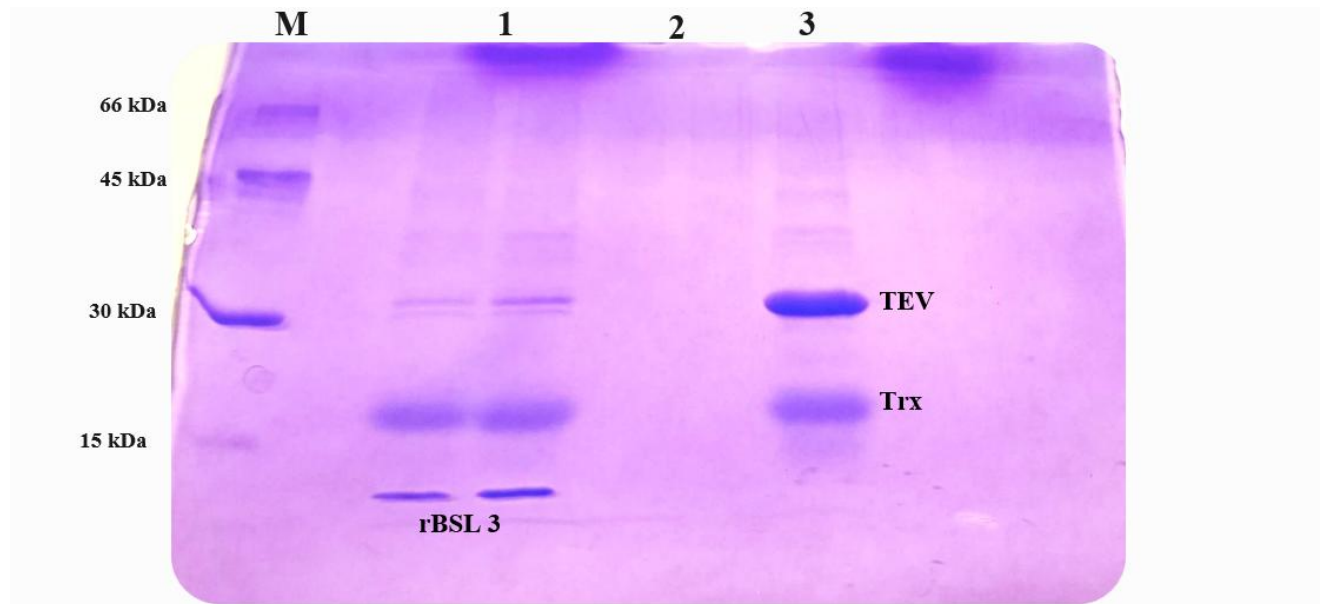
Figura 11 - Cromatograma referente à aplicação da solução de rBSL3 após diálise e digestão em coluna de níquel imobilizado *HisTrap FF Crude* (5 mL; GE Healthcare).



Fonte: O autor. Os lisados solúveis se referem as seguintes condições de expressão: 18 °C por 24 horas com 0,1 mM de IPTG. A proteína de interesse foi incubada por 24 horas a 4 °C com a protease TEV diluída 1/20. **P1**: Uso do tampão de eluição: 20 mM de Tris-HCl pH 8,0; 150 mM de NaCl; 5% v/v glicerol; 20 mM de imidazol. **P2**: Uso do tampão de eluição: 20 mM de Tris-HCl pH 8,0; 150 mM de NaCl; 5% v/v glicerol; 175 mM de imidazol. Fluxo: 2 mL/min. Volume dos tubos coletados: 2 mL.

Os eluatos foram submetidos a SDS-PAGE para verificar o grau de pureza. Verificou-se a presença de rBSL 3 nas amostras digeridas e não cromatografadas. Contudo, não foi observada a sua presença após a aplicação em coluna de níquel imobilizado *HisTrap FF Crude* (5 mL; GE Healthcare) (Figura 12).

Figura 12 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com adição de dodecil sulfato de sódio 15% de rBSL3 após diálise e digestão enzimática.



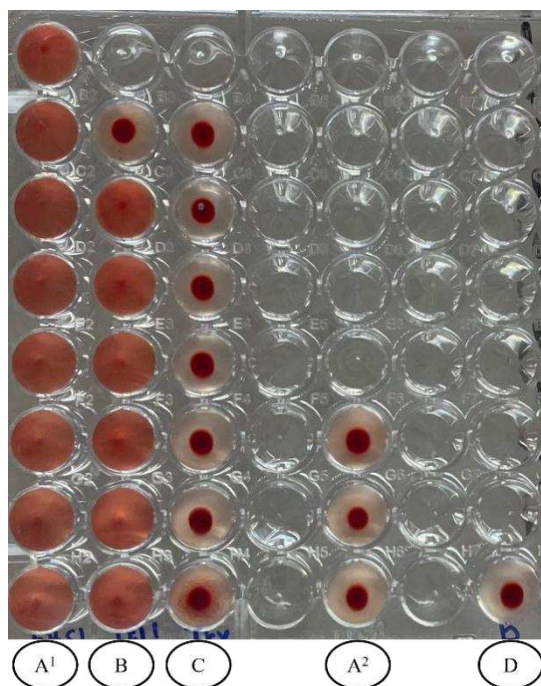
Fonte: O autor. SDS-PAGE 15% dos eluatos da cromatografia de afinidade com níquel imobilizado da rBSL 3 digerida. **M**: Marcador: lectina de *Chondrilla caribensis*, 15 kDa; lectina recombinante de *Solieria filiformis*, 30 kDa; albumina sérica bovina, 66 kDa. **rBSL 3**: proteína recombinante digerida de BSL com, aproximadamente, 9 kDa. **1**: rBSL 3 digerida e não cromatografada. **2**: rBSL 3 digerida e cromatografada. **3**: Cauda contendo protease rTEV (cerca de 30 kDa) e tiorredoxina (TRX) (cerca de 16 kDa).

4.6 Ensaio de atividade hemaglutinante e teste de inibição com carboidratos

A atividade hemaglutinante de rBSL3 foi realizada com eritrócitos de coelho tratados enzimaticamente com tripsina. As amostras coletadas da cromatografia de afinidade apresentaram 256 U.H.mL⁻¹ (Figura 13-A¹ e A²). A atividade hemaglutinante foi inibida por tireoglobulina suína (Tabela 4).

A tiorredoxina isolada (controle negativo) não demonstrou atividade hemaglutinante, e consequentemente, não foi realizado o ensaio de inibição (Figura 13-C).

Figura 13 – Atividade hemaglutinante de rBSL3.



Fonte: O autor. Eritrócitos de coelho a 3% tratados com enzima tripsina. **A¹**: lectina recombinante fusionada (rBSL3) a 1 mg.mL^{-1} . **A²**: continuação da atividade hemaglutinante em **A¹**. **B**: lectina recombinante fusionada (rBSL3) a $500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. **C**: Tiorredoxina (controle negativo) a 1 mg.mL^{-1} . **D**: Eritrócitos de coelho tratados em solução de NaCl $0,15 \text{ M}$ (Branco).

Tabela 4 – Inibição de atividade hemaglutinante de rBSL3.

Glicoproteínas	CIM (rBSL3)
Mucina de estômago de porco II	X
Mucina de estômago de porco III	X
Mucina maxilar bovina	X
Fetuína	X
Tireoglobulina	$31,25 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$

Fonte: Autor. CIM: Concentração inibitória mínima. X: Não ocorreu inibição na concentração de 1 mg.mL^{-1} .

4.7 Calorimetria de Titulação Isométrica (ITC)

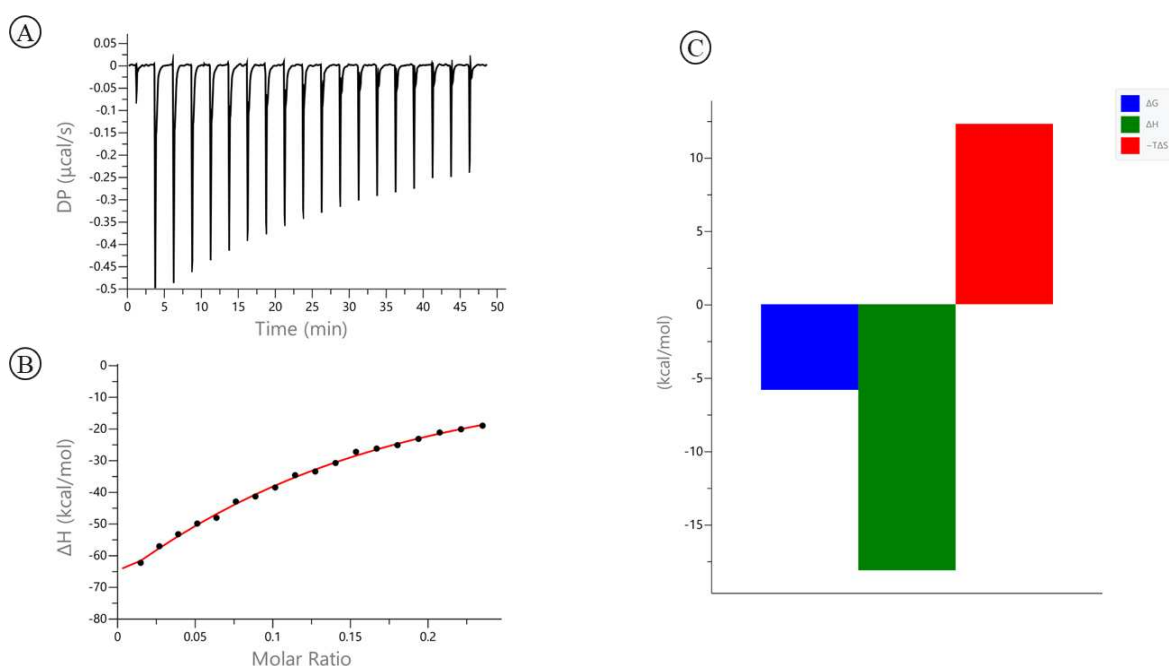
A afinidade da rBSL3 pela tireoglobulina, uma glicoproteína rica em resíduos fucosilados, foi avaliada por experimentos de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC). A

introdução da tireoglobulina em solução contendo rBSL3 resultou em picos exotérmicos, indicando uma interação de natureza exotérmica.

A titulação revelou uma razão proteína/ligante de aproximadamente 9 ($n = 9,33 \pm 1,46$), sugerindo que nove moléculas de rBSL3 interagem com uma única molécula de tireoglobulina. A lectina apresentou afinidade significativa pelo glicano fucosilado, com uma constante de dissociação (K_d) de $53,2 \mu\text{M}$ ($\pm 4,59 \times 10^{-5}$) e uma constante de associação (K_a) de $1,88 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Os valores obtidos para a variação entrópica (ΔS) e entálpica (ΔH) foram de $12,3 \text{ kcal/mol}$ e $-18,1 \text{ kcal/mol}$ ($\pm 9,64$), respectivamente (Figura 14).

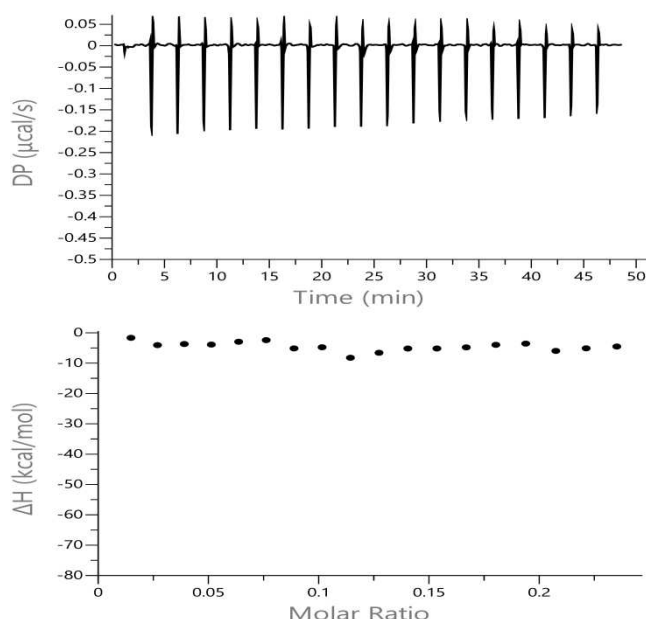
Nenhuma resposta calorimétrica expressiva foi observada na interação entre tiorredoxina e tireoglobulina, utilizada como controle negativo (Figura 15).

Figura 14 - Calorimetria de titulação isométrica (ITC) de rBSL3



Fonte: O autor. (A) Termograma de rBSL3 titulado com tireoglobulina. (B) Curva de titulação para a interação rBSL3-tireoglobulina. (C) Mapa de calor mostrando as contribuições da entalpia (ΔH , verde), entropia ($-T\Delta S$, vermelho) e energia livre de Gibbs (ΔG , azul) para a interação de ligação rBSL3-tireoglobulina. Os experimentos foram realizados a 25°C utilizando um sistema MicroCal PEAQ-ITC, e os dados foram ajustados a um modelo de ligação de um conjunto de sítios.

Figura 15 - Calorimetria de titulação isométrica (ITC) de tiorredoxina.



Fonte: O autor. Termograma de tiorredoxina titulado com tireoglobulina. O painel inferior mostra a curva de titulação para a interação tiorredoxina-tireoglobulina.

4.8 Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)

A análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi utilizada para determinar o tamanho hidrodinâmico da rBSL3 e da proteína de fusão tiorredoxina, assim como estimar a homogeneidade e a possível formação de agregados.

A rBSL3 a 1 mg.mL^{-1} apresentou um perfil altamente polidisperso, com índice de polidispersidade (PDI) equivalente a 1,0. O tamanho hidrodinâmico médio (*Z-Average*) foi de 26,16 nm, um valor intermediário fortemente influenciado pela presença de agregados maiores.

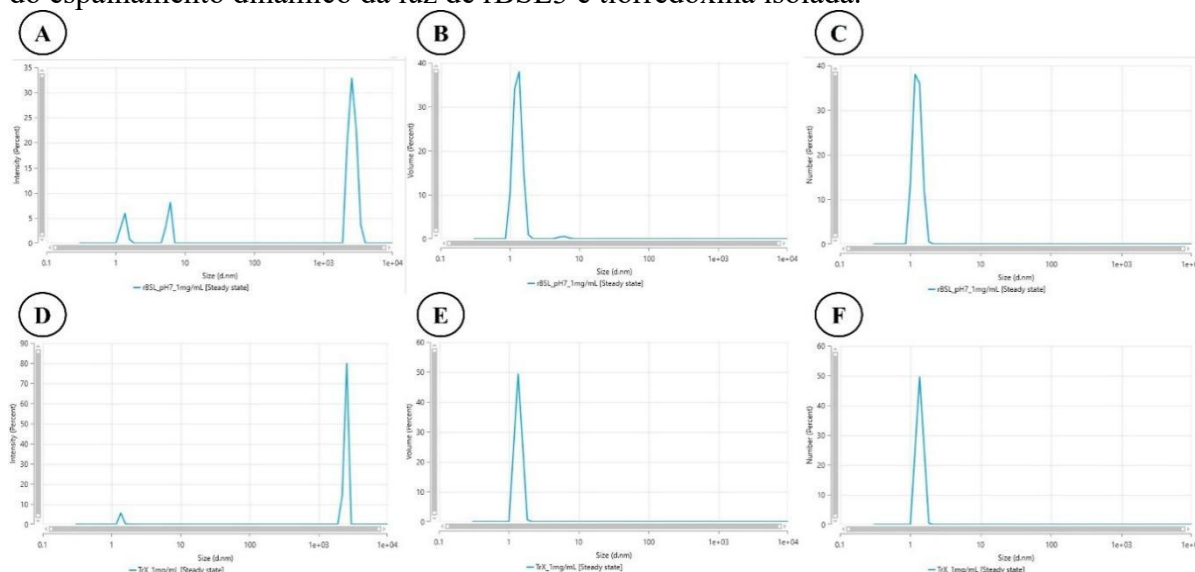
A distribuição por intensidade revelou duas populações principais: a primeira população, majoritária em intensidade, apresentou tamanho médio de aproximadamente 2641 nm, contribuindo com 79,04% da intensidade total da amostra.

A segunda população corresponde a partículas menores, com tamanho médio de 5,89 nm, responsável por 11,38% da intensidade. Embora as partículas maiores dominem a distribuição por intensidade, as análises por número e por volume confirmaram que a fração numérica e volumétrica é composta principalmente por partículas menores ($\sim 5\text{-}6 \text{ nm}$).

A análise do comportamento hidrodinâmico da tiorredoxina a mg.mL^{-1} revelou uma distribuição polidispersa PDI igual a 1,0, sugerindo a presença de espécies heterogêneas em solução. O *Z-Average* foi de 5050 nm, valor influenciado pela presença de grandes

agregados. A distribuição por intensidade evidenciou duas populações distintas: a população majoritária apresentou tamanho médio de 2516 nm, representando 94,17% da intensidade total, enquanto a população minoritária apresentou tamanho médio de 1,366 nm, correspondendo a 5,833% da intensidade. As distribuições por volume e por número revelaram que a fração majoritária da amostra é composta por partículas menores (~1-3 nm) (Figura 16).

Figura 16 – Padrões identificados nas distribuições baseadas em volume, intensidade e número do espalhamento dinâmico da luz de rBSL3 e tiorredoxina isolada.



Fonte: O autor. **A:** distribuição por intensidade de rBSL3; **B:** distribuição por volume de rBSL3; **C:** distribuição por número de rBSL3; **D:** distribuição por intensidade de tiorredoxina; **E:** distribuição por volume de tiorredoxina; **F:** distribuição por número de tiorredoxina.

4.9 Determinação da estrutura primária por MS/MS

A digestão de rBSL3 com a enzima tripsina produziu peptídeos de variados tamanhos, destes, cinco fragmentos no total foram utilizados para confirmar a sequência da lectina recombinante fusionada (Tabela 4).

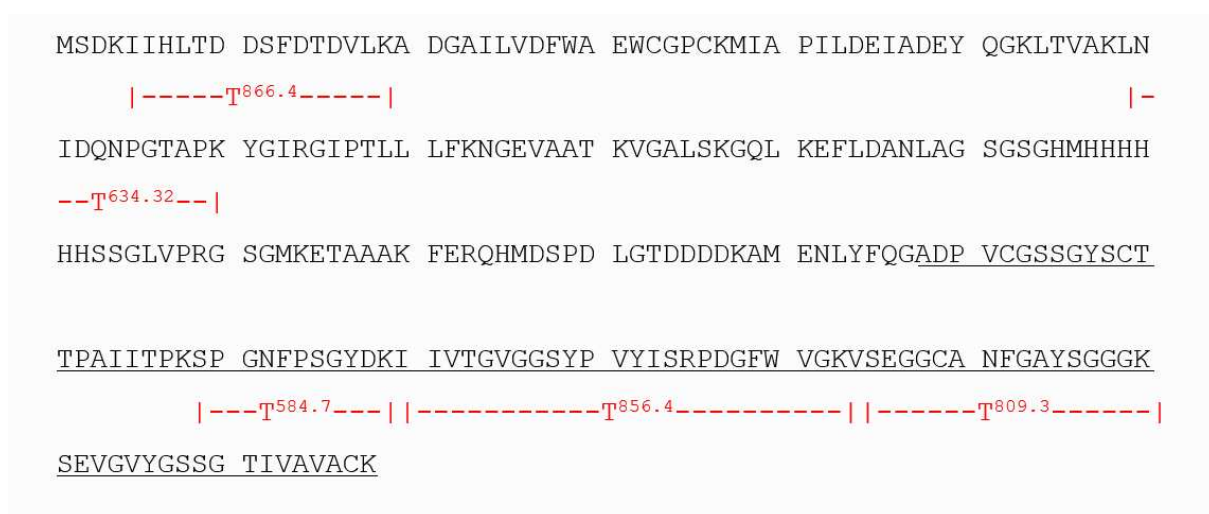
Tabela 5 - Sequências de peptídeos obtidas por digestão enzimática com tripsina da lectina recombinante fusionada rBSL3.

<i>m/z</i>	Sequência	Massa		Δ (Da)
		Observada	Calculada	
866.4	IIHLTDDSFDTDVLK	1730,78	1730,87	0,08
634.3	LNIDQNPGTAPK	1266,62	1266,65	0,03
584.7	SPGNFPSGYDK	1167,44	1167,51	0,07
856.4	IIVTGVGGSYPVYISRPDGFVVGK	2566,31	2566,35	0,04
809.3	VSEGGCANFGAYSGGGK	1616,63	1616,68	0,05

Fonte: O autor. Peptídeos manualmente sequenciados após digestão enzimática com tripsina dos *spots* e em solução de rBSL3 e sob condição redutora. *m/z*: massa/carga. Δ : massa calculada – massa observada.

Os fragmentos de peptídeos obtidos de rBSL3 com *m/z* 584,7; 856,4 e 809,3 apresentam valores de massa calculada similares aos fragmentos de peptídeos T2.1, T3.1 e T4.2 da lectina nativa de *A. seaforthii* analisados por Nascimento-Neto e colaboradores (2012). Os fragmentos mencionados obtidos neste projeto correspondem a fração da lectina alvo na construção da proteína fusionada (Figura 17).

Figura 17 - Mapa peptídico de rBSL3 fusionada.



Fonte: O autor. Mapa peptídico de rBSL3 fusionada montado por sobreposição de peptídeos obtidos a partir de digestão enzimática com tripsina (T). Sublinhado: fração da construção correspondente a lectina alvo.

4.10 Dicroísmo circular

Os espectros oriundos do dicroísmo circular de rBSL3 revelaram uma banda positiva máxima em torno 193 nm e uma banda negativa mínima em 211 nm. A tiorredoxina isolada apresentou o seguinte perfil: uma banda positiva máxima em 192 nm e uma banda negativa mínima em 210 nm (Figura 18).

Figura 18 - Espectros de dicroísmo circular de rBSL3 e tiorredoxina isolada.

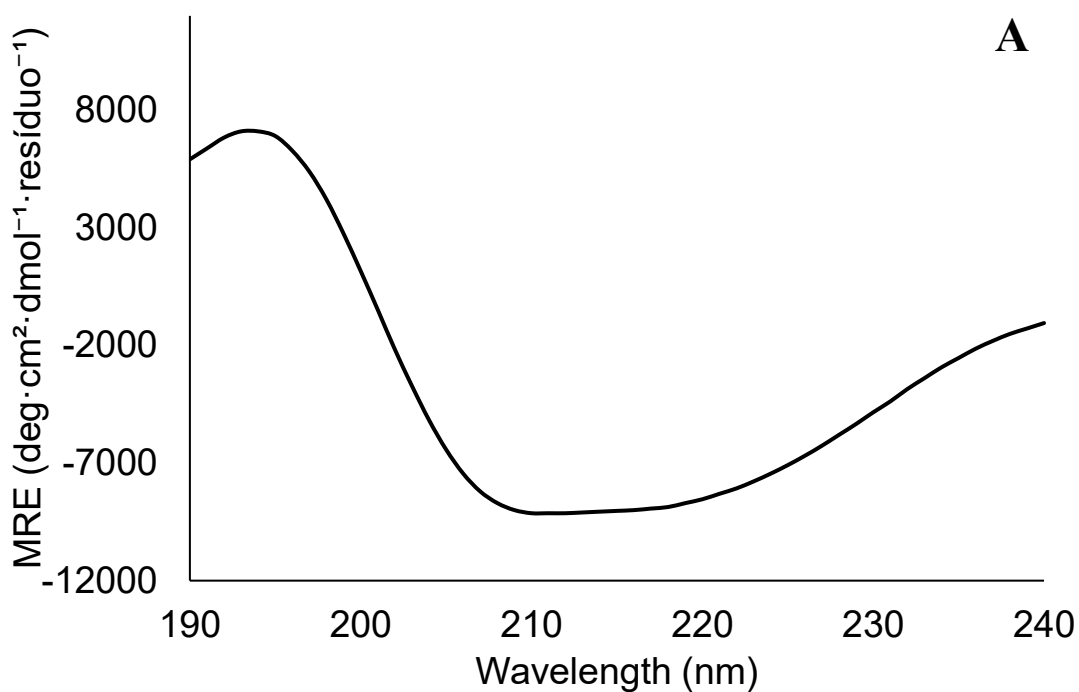
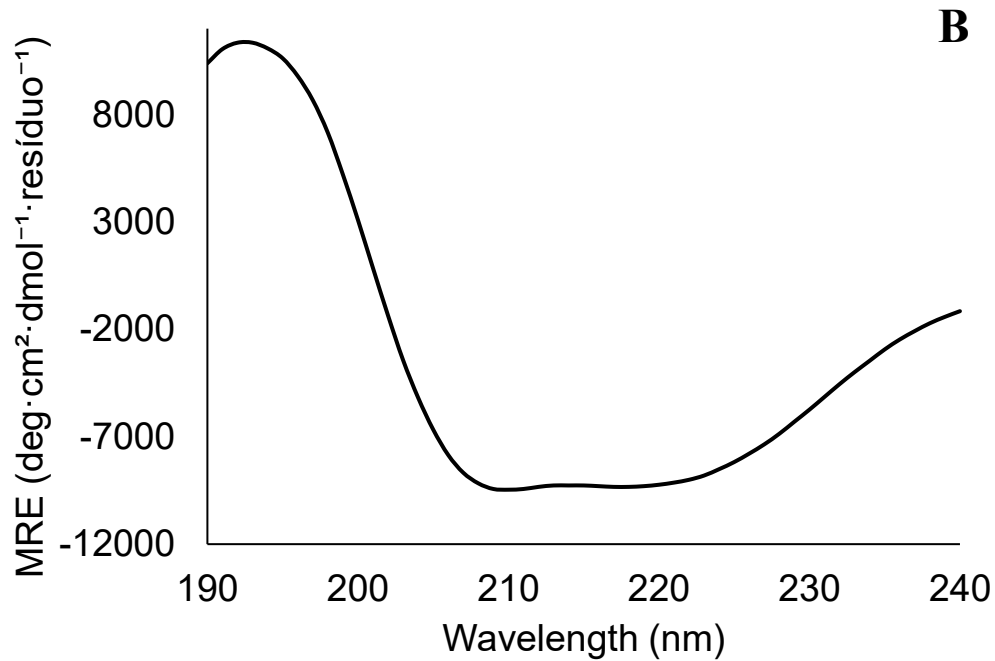


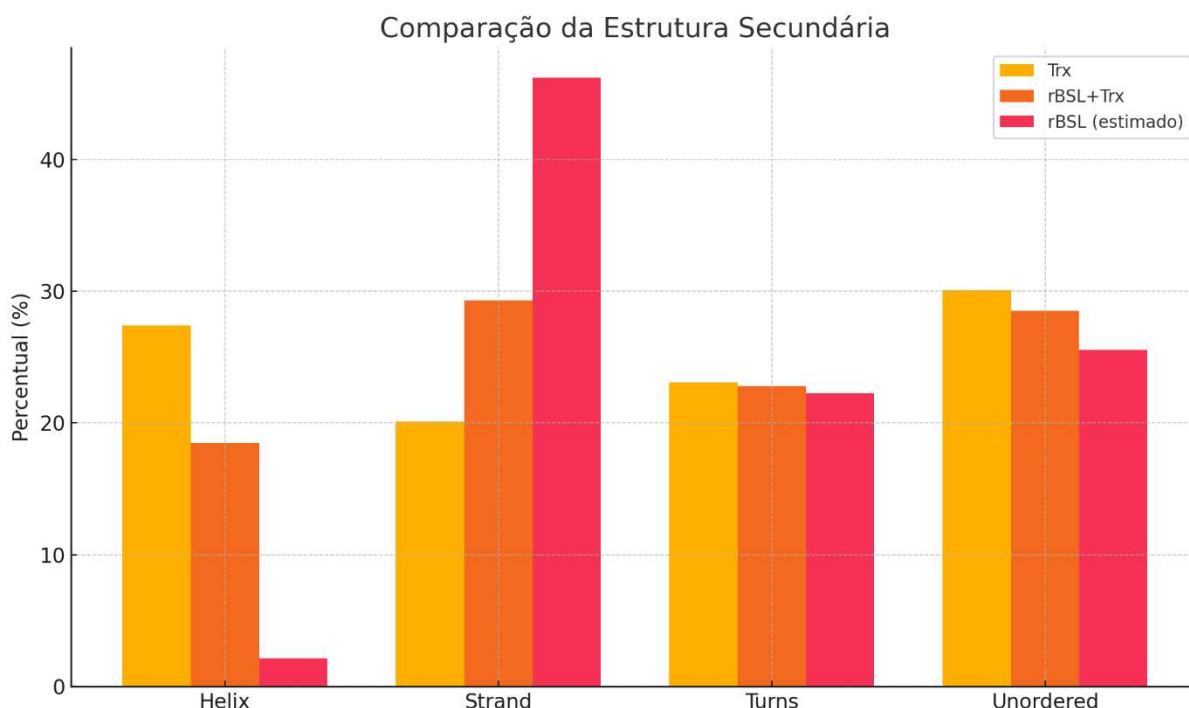
Figura 18 – Espectros de dicroísmo circular de rBSL3 e tiorredoxina isolada (Conclusão).



Fonte: O autor. Espectro de Dicroísmo Circular de rBSL3 e tiorredoxina isolada (*Far - UV*; 190 a 240 nm). **A**: espectro da lectina recombinante fusionada rBSL3. **B**: espectro da tiorredoxina isolada.

Através do algoritmo de predição CONTIN (Sreerama; Woody, 2000), alocada no servidor online *DichroWeb* (Van Stokkum *et al.*, 1990), a composição da estrutura secundária da rBSL3 é formada por é formada por 18,5% de α -hélice; 29,3% de folhas- β ; 22,8 % de dobras- β e de 28,5% de estruturas aleatórias. A estrutura secundária da tiorredoxina isolada é formada por é formada por 27,4% de α -hélice; 29,3% de folhas- β ; 22,8 % de dobras- β e de 28,5% de estruturas aleatórias (Figura 19).

Figura 19 – Gráfico de comparação de estrutura secundária.



Fonte: O autor. **Helix**: α -hélice; **Strand**: folhas- β ; **Turns**: dobras- β ; **Unordered**: estruturas aleatórias.

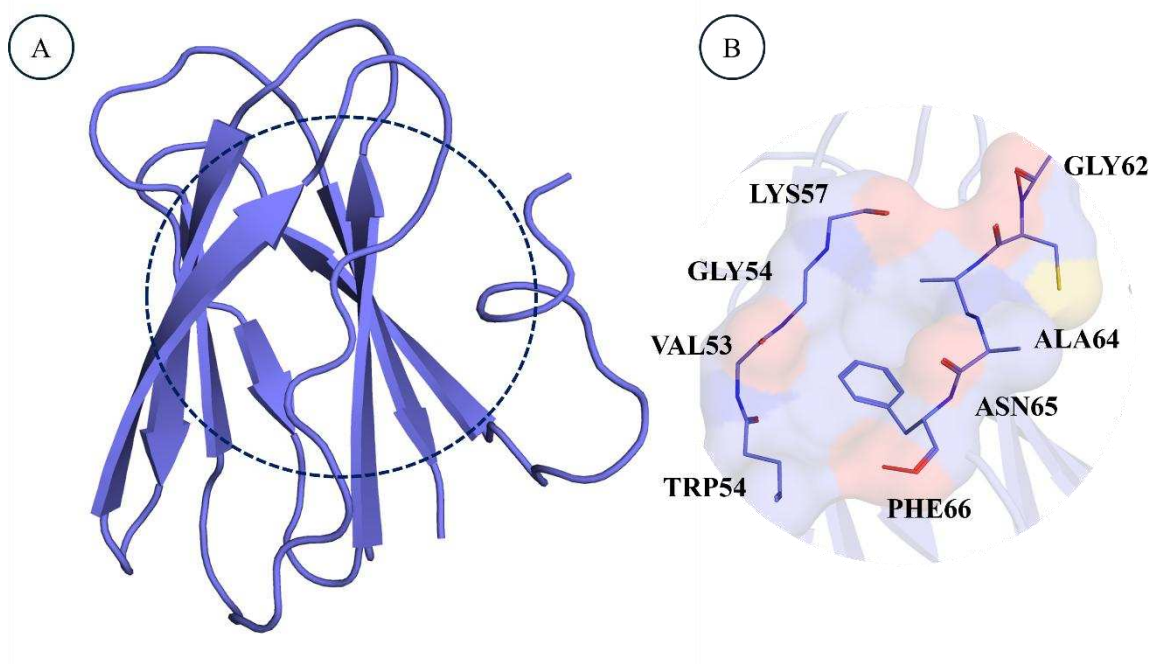
A composição aproximada da estrutura secundária da rBSL3 isolada é formada por 2,17% de α -hélice; 46,18% de folhas- β ; 22,25% de dobras- β e 25,56% de estruturas aleatórias. A composição da estrutura secundária da BSL selvagem é formada por 5% de α -hélice; 51% de folhas- β e 44% de estruturas aleatórias (Sousa, 2022). Ou seja, fica em evidência a similaridade no quesito de estrutura secundária predita entre a forma selvagem e a forma recombinante.

4.11 Predição estrutural

A análise preditiva revelou que a estrutura secundária da lectina BSL consiste em conformações predominante de folhas- β organizadas em um arranjo tipo β -sanduíche (Figura 20-A). Essa arquitetura é composta por várias cadeias β antiparalelas conectadas por alças (segmento flexível). Foi analisado um potencial domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC) localizado no centro de um arranjo β -sanduíche da proteína, próximo aos resíduos V(45); W(54); V(55); G(56); K(57); G(62); A(64); N(65); F(66); Y(69). Essa região forma uma cavidade que pode atuar como sítio de interação com ligantes (Figura 20-B).

A estrutura obtida foi analisada e validada, mostrando 98,51% de resíduos de aminoácidos dispostos em regiões favorecidas do gráfico de Ramachandran, segundo o servidor *MolProbity*. A análise por meio do *VoroMQA* forneceu um escore global de 0,522, valor considerado de um modelo de alta qualidade estrutural.

Figura 20 - Estrutura geral da rBSL3 com localização e representação do DRC.



Fonte: Elaborado pelo autor. **A** - A estrutura de rBSL3 é representada como um desenho animado roxo. **B** - O potencial sítio de ligação a carboidrato de rBSL3 é mostrado contendo resíduos interativos como linhas roxas. Para maior clareza, alguns resíduos de aminoácidos da proteína foram omitidos.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, uma isolectina da alga marinha vermelha *A. seaforthii* foi produzida por expressão recombinante após otimização de códons para expressão em *E. coli* BL21(DE3), otimizada para solubilidade e integridade estrutural. A sequência de nucleotídeos codificante de lectina foi introduzida no vetor de expressão pET32a-TEV usando os sítios de restrição *NcoI* e *XhoI*, compreendendo a proteína de fusão (*etiquetas*) tiorredoxina seguida por uma cauda de seis resíduos de histidinas no N-terminal.

A escolha da isoforma BSL3 como candidata à expressão recombinante baseia-se em uma combinação de critérios estruturais e comparativos com dados experimentais previamente estabelecidos. Dentre as isoformas da lectina BSL (BSL2, BSL3 e BSL4), a BSL3, a isoforma mais abundante, apresenta a maior similaridade com a isoforma mais abundante de BTL — compartilhando 83% de identidade de sequência (Nascimento, 2014; Nascimento-Neto *et al.*, 2012). A isoforma de BTL foi utilizada na produção heteróloga e na caracterização das suas propriedades bioquímicas (Nascimento, 2014).

As onze heterogeneidades observadas em BSL3/BTL são em sua maioria toleráveis ou fora de regiões conservadas. As posições e o número de resíduos de cisteínas são idênticas entre as lectinas: C⁵, C¹¹, C⁶² e C⁹⁰ — destacando conservação das pontes dissulfetos para a estabilidade de ambas as lectinas.

Assim, dado o paralelismo estrutural evidente entre BSL3 e a isoforma mencionada de BTL, cuja expressão recombinante de rBTL foi estabelecida com sucesso (Nascimento *et al.* 2015), é evidente a escolha da isoforma BSL3 para produção em sistema heterólogo.

Na expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*, certos parâmetros podem influenciar o rendimento final da produção: a cepa da bactéria, o vetor e o tipo do meio de cultura (Hayat *et al.* 2018). De acordo com os ensaios para o estabelecimento de condição ótima de expressão, é possível inferir certas conclusões. A variação de temperatura no cultivo é um dos fatores que influenciam no enovelamento correto da proteína e na formação de corpos de inclusão (proteína agregada). Altas temperaturas contribuem para a expressão da proteína recombinante na fração insolúvel – formando corpos de inclusão. Temperaturas mais baixas auxiliam no enovelamento correto de proteínas recém-formadas devido a diversas variáveis, como uma taxa de tradução mais lenta e alterações na cinética de enovelamento da cadeia polipeptídica (Íncir; Kaplan, 2024). Como tal, a escolha de cultivar as células bacterianas neste projeto a 18 °C por 24 horas é baseada nessas evidências.

Quanto a concentração do indutor, nos ensaios realizados, 0,1 mM de IPTG foi ideal para expressão na fração de solúvel de rBSL3. Altas concentrações do indutor podem levar a taxas de tradução que excedem a capacidade de enovelamento das chaperonas, ou seja, resultando na formação de corpos de inclusão. Em geral, a concentração usual para indução com IPTG é 0,1-1 mM para expressão otimizada em *E. coli* (Falak; Sajed; Rashid, 2022).

Nesse contexto, outras lectinas de algas vermelhas quando expressas em sistema heterólogo apresentaram os parâmetros otimizados semelhantes aos presentes neste trabalho: rBTL com 0,2 mM por 16 horas a 16 °C e rSfL-1 com 0,05 mM por 20 horas a 25 °C (Chaves *et al.*, 2023; Nascimento, 2014).

O plasmídeo pET32a-TEV origina uma proteína de fusão composta pela proteína alvo, acrescida da proteína tiorredoxina e de uma etiqueta de histidina (*HisTag*). As etiquetas de fusão melhoram a solubilidade e o enovelamento da proteína expressa, além de aumentarem a eficiência da purificação (Costa *et al.*, 2014; Eche; Gordon, 2021). A escolha da tiorredoxina (Trx) se sustenta na propriedade da proteína em reduzir ligações dissulfeto em outras proteínas, o que é fundamental para o enovelamento correto da cadeia de aminoácidos, favorecendo a solubilidade e prevenindo a formação de corpos de inclusão (Yuan; Geng; Wang, 2025).

A tiorredoxina pode ser ligada tanto na extremidade N-terminal quanto na C-terminal da proteína de interesse, no entanto, a tiorredoxina não se liga a fase estacionária durante processos cromatográficos. Logo, para uma purificação eficaz, a Trx precisa ser usada em conjunto com uma cauda de seis resíduos de histidinas ou outro grupamento que possua características de afinidade.

A etiqueta em questão foi explorada no processo de purificação da rBSL3 quanto da rBTL. Os anéis de imidazol da histidina interagem com as cargas positivas dos íons de níquel da resina, através de interação iônica, o que permite a purificação da proteína de interesse através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel imobilizado (IMAC). O sistema de etiqueta His₆, aliado à tecnologia IMAC, permanece como a principal escolha para purificação genérica em passo único por suas diversas vantagens. Devido ao seu tamanho e carga reduzidos, a etiqueta de seis resíduos raramente interfere na estrutura ou função da proteína-alvo, podendo ser facilmente adicionada em qualquer uma das suas extremidades N ou C-terminal (Lichty *et al.*, 2005; Yadav *et al.*, 2016).

A análise por SDS-PAGE 15% revelou que frações retidas na coluna de *HisTrap* correspondem à proteína rBSL3 fusionada à tiorredoxina com etiqueta de resíduos de histidina. As bandas de interesse possuem um peso molecular estimado de 30 kDa – equivalente à proteína de fusão tiorredoxina com etiqueta de histidina, em torno de 18 kDa, fusionada à

lectina alvo rBSL3, com cerca de 9 kDa. Devido a inexistência da presença e homogeneidade em SDS-PAGE 15% da banda respectiva aos produtos da rBSL3 após diálise, digestão com TEV e cromatografia de afinidade em coluna de níquel imobilizado, optou-se por trabalhar com a lectina recombinante anexada à proteína de fusão. Tal estratégia não foi empregada na expressão em sistema heterólogo da rBTL (Nascimento, 2014).

A rBSL3 mostrou atividade de hemaglutinação contra eritrócitos de coelho tratados com tripsina, o que está de acordo com as lectinas de *Hypnea japonica* (HJA), *Alsidium triquetrum* (BTL) e *Alsidium seaforthii* da costa venezuelana (BSH) — pertencentes à mesma família de lectinas de algas da BSL (Calvete *et al.*, 2000; Hori; Matsubara; Miyazawa, 2000; Nascimento *et al.*, 2015; Nascimento-Neto *et al.*, 2012). Sua contraparte nativa mostrou uma atividade específica equivalente quando em contato com eritrócitos tratados com tripsina, sendo detectada aglutinação até uma diluição de 2^8 , o que confere a proteína uma atividade específica de 256 UH/mg de proteína (Ainouz; Sampaio; 1991). A atividade de hemaglutinação confirma a integridade funcional da rBSL3, e a inexistência da capacidade da proteína de fusão tiorrexodina em interagir seletivamente com carboidratos específicos (Boonsri *et al.*, 2025).

O reconhecimento e ligação a tireoglobulina suína por rBSL3 demonstra a propriedade compartilhada entres as lectinas da família mencionada: a especificidade restrita por *N*-glicanos complexos com o núcleo de fucosilação α 1-6. A tireoglobulina (Tg) é uma glicoproteína de 660 kDa com altos níveis de glicosilação situada nas estruturas foliculares da glândula tireoide, e que atua como precursora dos hormônios tireoidianos tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) (Steurer *et al.*, 2021; Vijlder; Graaf; Ris-Stalpers, 2004).

A fucosilação representa o mecanismo de transferência de um resíduo de fucose para as cadeias de oligossacarídeos presentes em glicoproteínas ou glicolípídios da membrana celular. Existem dois tipos de *N*-fucosilação: fucolisação central (α -1,6-fucosilação) e fucolisação terminal (α -1,2-fucosilação, α -1,3/4-fucosilação) (Ma *et al.*, 2019). A tireoglobulina apresenta dois tipos de cadeias, oligomanose e *N*-acetilactosamina — sendo que nesta última os principais *N*-glicanos são estruturas biantenárias α 1-6 fucosiladas (Nagano *et al.*, 2005).

A inibição da atividade hemaglutinante de rBSL3 pela tireoglobulina corrobora com os resultados observados na lectina recombinante da alga vermelha *A. triquetrum* e na lectina da alga vermelha *H. japonica*: a especificidade restrita a *N*-glicanos fucosilados do núcleo (α 1-6) (Nascimento *et al.*, 2015; Okuyama *et al.*, 2009). Além disso, a inibição pela tireoglobulina também foi observada com a lectina nativa da *A. seaforthii* (Sousa, 2022).

Em mamíferos, a fucosilação do núcleo é caracterizada por uma ligação α -1,6-fucose, é uma das formas mais comuns de fucosilação em N-glicanos e é mediada exclusivamente pela enzima FUT8. A regulação significativa da FUT8 observada em vários tipos de câncer sugere seu papel crítico na atividade das células cancerígenas (Huang *et al.*, 2025). Por exemplo, células de câncer de pulmão com alto potencial metastático exibem N-glicanos com fucosilação do núcleo na E-caderina, uma proteína crucial para a adesão celular, enquanto células com baixo potencial metastático não possuem essa modificação (Rafique *et al.*, 2024). Assim, fica explícito o potencial uso da rBSL3 como uma ferramenta para compreensão dos mecanismos de glicosilação em células cancerígenas e/ou células saudáveis devido a sua especificidade por N-glicanos complexos com o núcleo de fucosilação α 1-6.

As interações termodinâmicas apresentadas entre a lectina recombinante fusionada rBSL3 e a glicoproteína tireoglobulina suína foram analisadas por calorimetria de titulação isotérmica (ITC). A constante de associação (K_a) igual a $1,88 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e a energia livre de Gibbs (ΔG) igual a $-5,83 \text{ kcal/mol}$ indicam que a interação proteína-glicoproteína apresenta uma afinidade significativa, e que a reação ocorreu de forma espontânea. Outras lectinas quando em contato com seus respectivos glicanos apresentaram K_a similares a rBSL3: a lectina da esponja marinha *Aiolochoia crassa* e fetuína ($3,039 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$); a lectina da esponja marinha *Aplysina fistularis* e mucina de estômago de porco ($5,95 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$); lectina da *Canavalia ensiformis* e 2-(metacrilamido)glicopirranose ($1,75 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) (Andrade *et al.*, 2025; Torres, 2024; Wang *et al.*, 2013).

O número de ligação (n) encontrado foi de 9, indicando que nove moléculas da rBSL3 interagem com uma única molécula de tireoglobulina porcina. A tireoglobulina é uma glicoproteína composta por oligossacarídeos do tipo *high mannose* (tipo unidade A) e do tipo complexo (tipo unidade B) ligados a resíduos de asparagina na porção peptídica em todas as espécies estudadas (Arima; Spiro; Spiro, 1972). A unidade do tipo complexo em tireoglobulina apresenta nove oligossacarídeos N-glicanos fucosilados do núcleo α 1-6 (Yamamoto *et al.*, 1981).

Além disso, a associação é impulsionada pela forte contribuição da entalpia (ΔH) de $-18,1 \text{ kcal/mol}$, evidenciando o caráter exotérmico da interação. Ainda que a contribuição entrópica positiva ($\Delta S = 12,3 \text{ kcal/mol}$) indique um aumento da desordem – divergente do conceito da formação de um complexo ordenado – a entropia positiva favorece termodinamicamente a interação ao reduzir ΔG , ou seja, uma reação espontânea e favorável.

A afinidade de rBTL por oligossacarídeos fucosilados também foi investigada por experimentos de ITC. A injeção de um octassacarídeo com fucose no núcleo α 1,6 na célula

contendo rBTL resultou em fortes picos exotérmicos, revelando uma interação exotérmica (Nascimento *et al.*, 2015). Tanto rBSL3 e rBTL apresentam especificidade a *N*-glicanos fucosilados no núcleo (α 1-6).

Nos resultados obtidos em DLS, alíquotas de rBSL3 fusionada e tiorredoxina isolada (controle negativo) foram analisadas quanto a sua homogeneidade e a formação de agregados. Os três parâmetros analisados (intensidade, volume e número) referem-se a diferentes formas de representar a distribuição de tamanhos de partículas em um ensaio de DLS. A distribuição por intensidade é baseada na quantidade de luz espalhada por cada partícula. A distribuição por volume destaca o volume relativo por faixa de tamanho na solução estudada. A distribuição por número estima o número real de partículas presentes em cada faixa e tamanho.

O índice de polidispersão (PDI) igual a 1 sugere uma alta heterogeneidade em ambas as amostras. O tampão de análise (Tris-HCl 20 mM pH 8; NaCl 150 mM), sem glicerol, sugere a formação de agregados. O perfil da tiorredoxina (Trx) como controle negativo revelou uma população predominantemente homogênea, com tamanho médio de aproximadamente 1,3 nm, compatível com a forma monomérica da proteína (Collet; Messens, 2010).

A proteína recombinante rBSL3 apresentou um perfil heterogêneo, com a coexistência de populações pequenas (~5-6 nm) e agregados maiores (~2500-5000 nm), além de um aumento significativo no índice de polidispersão. Esses resultados sugerem que, embora a presença da Trx tenha contribuído para a manutenção de uma fração solúvel, a proteína de interesse mantém uma propensão intrínseca à formação de agregados por meio de mudanças conformacionais da fusão das duas proteínas.

As análises *in silico* corroboram com os dados preditos para a lectina nativa de *A. seaforthii* realizados anteriormente por C-I-TASSER: a predominância de folhas- β em sua estrutura secundária (Sousa, 2022). Outras lectinas de algas também demonstram a mesma característica (Carneiro *et al.*, 2020; Chaves *et al.*, 2018, Costa-Filho, 2024; Menezes, 2024; Silva, 2023). Os resíduos de aminoácidos que compõem o potencial sítio de ligação a carboidratos de rBSL3 apresentam similaridade com os sítios presentes nas lectinas de macroalgas vermelhas *Amansia multifida* e *Solieria filiformis* – ambas da família de lectinas homólogas da aglutinina de *Oscillatoria agardhii* (OAAH) (Chaves *et al.*, 2023; Silva, 2023). Contudo, estudos são necessários acerca das lectinas que pertencem a mesma família de BSL.

A predição da estrutura secundária obtidas pelos resultados da análise pelo dicroísmo circular se alinha com os resultados da análise *in silico*: uma parcela majoritária da estrutura de rBSL3 é composta por folhas- β . Ao analisar as absorções máximas e mínimas de

rBSL3 com outras lectinas de algas vermelhas, é possível inferir as similaridades estruturais. As lectinas das algas vermelhas *Solieria filiformis* (SfL) e *Meristiella echinocarpa* (MeL) exibiram absorção máxima negativa em 207 nm e 214 nm e um máxima positiva em torno de 193 e 190 nm, respectivamente (Chaves, 2018). A lectina da alga vermelha *Amansia multifida* apresentou uma absorção máxima e mínima de 195 e 216 nm, respectivamente estudo (Mesquita *et al.*, 2021). As lectinas nativas de *Alsidium triquetrum* (BTL) e *Alsidium seaforthii* (BSL) exibiram absorção máxima em torno de 190 nm e 194 nm, e uma absorção mínima de 212 nm e 218 nm para BTL e BSL, respectivamente (Sousa, 2022).

De acordo com Sreerama e Woody (2003), há a possibilidade de dois tipos de espectros de dicroísmo circular para proteínas com predominância de estruturas tipo β : proteínas- β I e proteínas- β II, onde os espectros do tipo - β I são semelhantes aos de modelo β -folha, com um máximo positivo em 190 nm e máximo negativo em torno de 210 a 220 nm. A rBSL3 fusionada apresentou uma absorção com máximos negativos e positivos próximos aos de proteínas com predominância de estruturas folha- β , e semelhantes aos espectros de proteínas- β I.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi desenvolvido um protocolo eficiente para a expressão heteróloga da lectina BSL3, oriunda da alga *Alsidium seaforthii*. A proteína recombinante foi obtida em sua forma ativa e corretamente dobrada, apresentando atividade hemaglutinante e parâmetros bioquímicas compatíveis com a forma silvestre.

A lectina demonstrou afinidade por glicanos contendo fucose α 1,6, especialmente na interação com tireoglobulina, sugerindo seu potencial uso, em ensaios futuros, como marcador tumoral em células que expressam esse tipo de modificação e na citotoxicidade contra células cancerígenas.

REFERÊNCIAS

- AHMED, Mirja Kaizer *et al.* An Update of Lectins from Marine Organisms: characterization, extraction methodology, and potential biofunctional applications. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 430-470, 29 jun. 2022.
- ALVES, Mayara Freire de Alencar *et al.* Antihyperglycemic and antioxidant activities of a lectin from the marine red algae, *Bryothamnion seaforthii*, in rats with streptozotocin-induced diabetes. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 158, p. 773-780, set. 2020.
- ALVES, A. W. *et al.* *Codium isthmocladum* lectin 1 (CiL-1): Interaction with *N*-glycans explains antinociceptive and anti-inflammatory activities in adult zebrafish (*Dani orerio*). **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 208, p. 1082-1089, 2022.
- AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H. Screening of Brazilian marine algae for hemagglutinins. **Botanica Marina**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 211-214, 1991.
- AINOUZ, I. L. *et al.* Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, [s. l.], v. 7, p. 15-19, 1995.
- ANAM, C *et al.* Preliminary Characterization of Crude Lectin Fraction of the Red Alga, *Acrocystis nana* from Wediombo Beach of the Southern Coast of Java Island, Gunung Kidul, Yogyakarta, Indonesia. **Iop Conference Series: Materials Science and Engineering**, [s. l.], v. 193, p. 012016, abr. 2017.
- ANDRADE, Francisco Regivanio Nascimento *et al.* Afil, a Lectin from *Aplysina fistularis*, Exhibits Antibiofilm and Synergistic Antibacterial Activity Against Resistant Bacteria. **Microorganisms**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 1349, 10 jun. 2025.
- ARIMA, Terukatsu; SPIRO, Mary Jane; SPIRO, Robert G. Studies on the Carbohydrate Units of Thyroglobulin. **Journal Of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 247, n. 6, p. 1825-1835, mar. 1972.
- ARRUDA, Maria Carla Santana de *et al.* Antitumor lectins from algae: a systematic review. **Algal Research**, [s. l.], v. 70, p. 102962, mar. 2023.
- BASTIAN, Kayla *et al.* FUT8 Alpha-(1,6)-Fucosyltransferase in Cancer. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 455, 5 jan. 2021.
- BAUES, Reinhold J; GRAY, Gary R. Lectin purification on affinity columns containing reductively aminated disaccharides. **Journal Of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 252, n. 1, p. 57-60, jan. 1977.
- BARONDES, Samuel H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends In Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 480-482, dez. 1988.

BOONSRI, Boonyakorn *et al.* Functional characterization of the recombinant L-type lectin from red alga *Gracilaria fisheri* with antibacterial potential. **Algal Research**, [s. l.], v. 89, p. 104092, jul. 2025.

BOYD, William C.; ALMODÓVAR, Luis R.; BOYD, Lyle G. Agglutinins in Marine Algae for Human Erythrocytes. **Transfusion**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 82-83, 2 jan. 1966.

BOYD, William C.; SHAPLEIGH, Elizabeth. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). **Science**, [s. l.], v. 119, n. 3091, p. 419-419, 26 mar. 1954.

BURIAK, Ivan; KUMEIKO, Vadim. Marine Lectins and Lectin-like Proteins as Promising Molecules Targeting Aberrant Glycosylation Signatures in Human Brain Tumors. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 527, 22 nov. 2024.

BLEAKLEY, Stephen.; HAYES, Maria. Algal Proteins: extraction, application, and challenges concerning production. **Foods**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 33, 26 abr. 2017.

BOONSRI, Boonyakorn *et al.* Functional characterization of the recombinant L-type lectin from red alga *Gracilaria fisheri* with antibacterial potential. **Algal Research**, [s. l.], v. 89, p. 104092, jul. 2025.

BROWN, T. A. **Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction**. 8. ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2021.

CADAR, Emin *et al.* Bioactive Compounds of Marine Algae and Their Potential Health and Nutraceutical Applications: a review. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 152, 31 mar. 2025.

CALVETE, J. J. *et al.* The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine algae *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 57, p. 343–350, 2000.

CARNEIRO, R.F. *et al.* Purification, biochemical characterization, and amino acid sequence of a novel type of lectin from *Aplysia dactylomela* eggs with antibacterial/antibiofilm potential. **Marine Biotechnology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 49-64, 2017

CARNEIRO, Rômulo Farias *et al.* New lectins from *Codium isthmocladum* Vickers show unique amino acid sequence and antibiofilm effect on pathogenic bacteria. **Journal Of Applied Phycology**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 4263-4276, 21 jul. 2020.

CARNEIRO, Rômulo F. *et al.* Toward Enhanced Antibiotic Efficacy: exploring the synergistic potential of marine-derived lectins against human pathogenic bacteria. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 96, n. 4, p. 1-11, 15 jul. 2024.

CARPENA, M. *et al.* Biological properties and potential of compounds extracted from red seaweeds. **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 1509-1540, 1 jul. 2022.

CATANZARO, Elena *et al.* Antitumor Potential of Marine and Freshwater Lectins. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 11, 21 dez. 2019.

COLLET, Jean-Francois; MESSENS, Joris. Structure, Function, and Mechanism of Thioredoxin Proteins. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1205-1216, 15 out. 2010.

CONRADO, M. *et al.* *Erythrina velutina* and *Bryothamnion seaforthii* lectins binding to proteins of primary central nervous system tumors. **Journal Of Cancer Research And Experimental Oncology**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 21-26, 30 nov. 2012.

COSTA, Sofia *et al.* Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel fh8 system. **Frontiers In Microbiology**, [s. l.], v. 5, p. 1-3, 2014.

COSTA FILHO, Manoel Ferreira da. **Caracterização estrutural e avaliação do potencial antimicrobiano em associação com antibióticos da lectina CiL-2 de *Codium isthmocladum*, novo membro das lectinas do Tipo-H**. 2024. 172 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2024.

COTAS, João *et al.* Seaweed Phenolics: from extraction to applications. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 384, 24 jul. 2020.

CHAVES, Renata Pinheiro. **Caracterização estrutural e potencial biotecnológico de duas lectinas pertencentes a família de lectinas homólogas a *Oscillatoria agardhii* agglutinin OAAH**. 2018. 139 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia de Recursos Naturais)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

CHAVES, Renata Pinheiro *et al.* Structural characterization of two isolectins from the marine red alga *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W. Gabrielson and their anticancer effect on MCF-7 breast cancer cells. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 107, p. 1320-1329, fev. 2018.

CHAVES, Renata Pinheiro *et al.* Structural study and antimicrobial and wound healing effects of lectin from *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W. Gabrielson. **Biochimie**, [s. l.], v. 214, p. 61-76, nov. 2023.

CHAWLA, Meenal *et al.* Antibiotic Potentiators Against Multidrug-Resistant Bacteria: discovery, development, and clinical relevance. **Frontiers In Microbiology**, [s. l.], v. 13, p. 1-15, 1 jul. 2022.

CHEN, Vincent B. *et al.* MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 12-21, 21 dez. 2009.

DANG, Kai *et al.* The role of protein glycosylation in muscle diseases. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 49, n. 8, p. 8037-8049, 15 abr. 2022.

DIAS, Lucas P. *et al.* RcAlb-PepII, a synthetic small peptide bioinspired in the 2S albumin from the seed cake of *Ricinus communis*, is a potent antimicrobial agent against 32 *Klebsiella pneumoniae* and *Candida parapsilosis*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [s. l.], v. 1862, n. 2, p. 183092, fev. 2020.

DUAN, Caihan *et al.* Fucosylation in digestive inflammatory diseases and cancers: from mechanical studies to clinical translation. **Genes & Diseases**, [s. l.], p. 101570, fev. 2025.

DUBENDORF, John W.; STUDIER, F. William. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. **Journal Of Molecular Biology**, [s. l.], v. 219, n. 1, p. 45-59, maio 1991.

ECHE, Simeon; GORDON, Michelle L. Recombinant expression of HIV-1 protease using soluble fusion tags in *Escherichia coli*: a vital tool for functional characterization of hiv-1 protease. **Virus Research**, [s. l.], v. 295, p. 198289, abr. 2021.

FAJARNINGSIH, N. D. *et al.* Extraction and Partial Characterization of Lectin from Indonesian Brown Algae *Padina australis* and *Padina minor*. **Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology**, [s. l.], v. 14, p. 103-111, 2019.

FALAK, Samia; SAJED, Muhammad; RASHID, Naeem. Strategies to enhance soluble production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Biologia**, [s. l.], v. 77, n. 3, p. 893-905, 2 fev. 2022.

GARCÍA-SOTO, Gabriela; LOPEZ-BAUTISTA, Juan. Taxonomic notes on the genus *Alsidium* C. Agardh, including the merging of *Bryothamnion* Kützting (Rhodomelaceae). **Algae**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 215-229, 15 set. 2018. The Korean Society of Phycology.

GANEVA, V; GALUTZOV, B; TEISSIÉ, J. High yield electroextraction of proteins from yeast by a flow process. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 315, n. 1, p. 77-81, abr. 2003.

GOLDSTEIN, Irwin J. *et al.* What should be called a lectin? **Nature**, [s. l.], v. 285, n. 5760, p. 66-66, 8 maio 1980.

GUIRY, M. D; GUIRY, G. M. 2018. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. **AlgaeBase**. Disponível em: https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=33994. Acesso em: 8 abr.2025.

HAKIM, M. M.; PATEL, I. C. A review on phytoconstituents of marine brown algae. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 6, p. 1-11, 2020.

HARB, Talissa Barroco. **Caracterização química, potencial antioxidante e atividade biológica de macroalgas arribadas do litoral brasileiro**. 2021. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

HARB, Talissa Barroco *et al.* Brazilian Beach-Cast Seaweeds: antioxidant, photoprotection and cytotoxicity properties. **Waste And Biomass Valorization**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 2249-2265, 15 dez. 2022.

HARB, Talissa Barroco; CHOW, Fungyi. Anti-HIV activity of methanolic and aqueous extracts of fifteen materials of beach-cast macroalgae: valorization of underused waste biomass. **Applied Phycology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 236-246, 17 mar. 2022.

HARRYSSON, H. *et al.* Production of protein extracts from Swedish red, green, and brown seaweeds, *Porphyra umbilicalis* Kützinger, *Ulva lactuca* Linnaeus, and *Saccharina latissimi* (Linnaeus) J. V. Lamouroux using three different methods. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 30, p. 3565–3580, 2018.

HAYAT, Seyed Mohammad Gheibi *et al.* Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli* (*E.coli*): what we need to know. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 718-725, 10 maio 2018.

HOCHULI, E. *et al.* Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 6, n. 11, p. 1321-1325, nov. 1988.

HORI, Kanji.; MIYAZAWA, Keisuke.; ITO, Keiji. Some common properties of lectins from marine algae. **Hydrobiologia**, [s. l.], v. 204, p. 561-566, 1990.

HORI, Kanji; MATSUBARA, Kiminori; MIYAZAWA, Keisuke. Primary structures of two hemagglutinins from the marine red alga, *Hypnea japonica*. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - General Subjects**, [s. l.], v. 1474, n. 2, p. 226-236, abr. 2000.

HUANG, Yibo *et al.* The significance of protein N-glycosylation in the pathogenesis of lung cancer and its clinical implications. **Cancer Letters**, [s. l.], p. 217849, jun. 2025.

HUMPHREY, William; DALKE, Andrew; SCHULTEN, Klaus. VMD: visual molecular dynamics. **Journal Of Molecular Graphics**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 33-38, fev. 1996.

IARC. **Global Cancer Observatory**: Cancer Today. Lyon, França: International Agency for Research on Cancer, 2024. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/39-all-cancers-fact-sheet.pdf>. Acesso em: 02 jul. 2025.

İNCİR, İbrahim; KAPLAN, Özlem. *Escherichia coli* as a versatile cell factory: advances and challenges in recombinant protein production. **Protein Expression And Purification**, [s. l.], v. 219, p. 106463, jul. 2024.

JOUBERT, Yolaine; FLEURENCE, Joël. Simultaneous extraction of proteins and DNA by an enzymatic treatment of the cell wall of *Palmaria palmata* (Rhodophyta). **Journal Of Applied Phycology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 55-61, 25 maio 2007.

JUMPER, John *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, [s. l.], v. 596, n. 7873, p. 583-589, 15 jul. 2021.

KIMPLE, Michelle E.; BRILL, Allison L.; PASKER, Renee L. Overview of Affinity Tags for Protein Purification. **Current Protocols In Protein Science**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 1-6, ago. 2013.

KUMAR, S.; BARROS, U. Purification and partial characterization of a haemagglutinin from *Ulva fasciata*. **Current Science**, [s. l.], v. 118, n. 4, p. 621, 2020.

KUMAR, Ajit *et al.* A Review of Marine Algae as a Sustainable Source of Antiviral and Anticancer Compounds. **Macromol**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 11, 7 mar. 2025.

KHANANISHO, Diana *et al.* Tips for efficiently maintaining pET expression plasmids. **Current Genetics**, [s. l.], v. 69, n. 4-6, p. 277-287, 8 nov. 2023.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, [s. l.], v.227, p.680-683, 1970.

LAVERGNE, Céline *et al.* Macroalgae metal-biomonitoring in Antarctica: addressing the consequences of human presence in the white continent. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 292, p. 118365, jan. 2022.

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.

LEE, C. Griffithsin, a Highly Potent Broad-Spectrum Antiviral Lectin from Red Algae: From Discovery to Clinical Application. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 17, 2019.

LEE, J. H. *et al.* Anticancer Activity of Mannose-Specific Lectin, BPL2, from Marine Green Alga *Bryopsis plumosa*. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 776, 2022.

LICHTY, Jordan J. *et al.* Comparison of affinity tags for protein purification. **Protein Expression And Purification**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 98-105, maio 2005.

LIM, Jing-Sheng *et al.* Novel drug candidates against antibiotic-resistant microorganisms: a review. **Iranian Journal Of Basic Medical Sciences**, [s. l.], v.24, p. 134-136, out. 2023. Mashhad University of Medical Sciences.

LIU, Yana *et al.* Structure, preparation, modification, and bioactivities of β -glucan and mannan from yeast cell wall: a review. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 173, p. 445-456, mar. 2021.

LYONS, Devin A. *et al.* Macroalgal blooms alter community structure and primary productivity in marine ecosystems. **Global Change Biology**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. 2712-2724, 4 jul. 2014.

MA, Minking *et al.* Functional roles of fucosylated and O-glycosylated cadherins during carcinogenesis and metastasis. **Cellular Signalling**, [s. l.], v. 63, p. 109365, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109365>.

MALIK, Intan Mariana, *et al.* Production of Lectins from Marine Algae: current status, challenges, and opportunities for non-destructive extraction. **Marine Drugs**, v. 20, n. 2, p. 102, 26 jan. 2022.

MARTÍNEZ-ALARCÓN, Dania; BLANCO-LABRA, Alejandro; GARCÍA-GASCA, Teresa. Expression of Lectins in Heterologous Systems. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 616, 21 fev. 2018.

MARTINS, Iago A. G. *et al.* Biodiversity and Reproductive Status of Beach-Cast Seaweeds from Espírito Santo, Southeastern Brazil: sustainable use and conservation. **Phycology**, v. 4, n. 3, p. 427-442, 5 set. 2024.

MEDINA-RAMIREZ, Gerardo *et al.* Micro-heterogeneity and molecular assembly of the haemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *B. triquetrum* from the Caribbean Sea. **European Journal Of Phycology**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 105-112, fev. 2007.

MELHEM, Hassan; REGAN-KOMITO, Daniel; NIESS, Jan Hendrik. Mucins Dynamics in Physiological and Pathological Conditions. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 24, p. 13642, 20 dez. 2021.

MESQUITA, Jacilane Ximenes *et al.* Lectin from red algae *Amansia multifida* Lamouroux: extraction, characterization and anti-inflammatory activity. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 170, p. 532-539, fev. 2021.

MENDEZ, Rufa L.; KWON, Jung Yeon. Effect of extraction condition on protein recovery and phenolic interference in Pacific dulse (*Devaleraea mollis*). **Journal Of Applied Phycology**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 2497-2503, 27 abr. 2021.

MENEZES, Vinícius Paulino Pinto. **Estudo estrutural e avaliação do efeito antibacteriano de três lectinas de algas marinhas vermelhas da família OAAH em combinação com antibióticos**. 2024. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2024.

MORI, T. *et al.* Isolation and characterization of Griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia* sp. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 9345-9353, 2005.

MU, Jinmin *et al.* A Novel High-Mannose Specific Lectin from the Green Alga *Halimeda renschii* Exhibits a Potent Anti-Influenza Virus Activity through High-Affinity Binding to the Viral Hemagglutinin. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 255, 16 ago. 2017.

MU, Jinmin *et al.* A Complex-Type N-Glycan-Specific Lectin Isolated from Green Alga *Halimeda borneensis* Exhibits Potent Anti-Influenza Virus Activity. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 8, p. 4345, 15 abr. 2024.

NABI-AFJADI, Mohsen *et al.* Lectins and lectibodies: potential promising antiviral agents. **Cellular & Molecular Biology Letters**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 1-10, 13 maio 2022.

NAGANO, C. S. *et al.* HCA and HML isolated from *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis* define a novel lectin family. **Protein Science**, [s. l.], v. 14, p. 2167-2176, 2005.

NAGHAVI, Mohsen *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. **The Lancet**, v. 404, n. 10459, p. 1199-1226, set. 2024.

NAN, Xiaoyan *et al.* Identification and characterization of an L-fucose specific lectin GVSL involved in gamete recognition of *Gracilaria vermiculophylla*. **Algal Research**, v. 80, p. 103527, jun. 2024.

NASCIMENTO, A. S. F. **Lectinas recombinantes das algas marinhas vermelhas *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamouroux e *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelin) M. Howe: produção heteróloga e caracterização bioquímica**. 2014. 260 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

NASCIMENTO, Antônia S. F. do *et al.* Algal lectin binding to core (α 1–6) fucosylated N-glycans: structural basis for specificity and production of recombinant protein. **Glycobiology**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 607-616, 8 jan. 2015.

NASCIMENTO-NETO, Luiz Gonzaga do *et al.* Characterization of Isoforms of the Lectin Isolated from the Red Algae *Bryothamnion seaforthii* and Its Pro-Healing Effect. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 1936-1954, 4 set. 2012.

NEGREANU-PIRJOL, Bogdan-Stefan *et al.* Marine Bioactive Compounds Derived from Macroalgae as New Potential Players in Drug Delivery Systems: a review. **Pharmaceutics**, v. [s. l.], 14, n. 9, p. 1781, 25 ago. 2022.

NEVES, S. A. *et al.* Neutrophil migration induced in vivo and in vitro by marine algal lectins. **Inflammation Research**, v. 50, p. 486-490, 2001.

NOTOVA, S. *et al.* Structure and engineering of tandem repeat lectins. **Current opinion in structural biology**, v. 62, p. 39-47, 2020.

OJIMA, Yoshihiro *et al.* Induction conditions that promote the effect of glycerol on recombinant protein production in *Escherichia coli*. **Biotechnology Reports**, v. 46, p. 1-7, jun. 2025.

OJIMA-KATO, Teruyo. Advances in recombinant protein production in microorganisms and functional peptide tags. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [s. l.], v. 89, n. 1, p. 1-10, 30 out. 2024.

OKUYAMA, Satomi *et al.* Strict Binding Specificity of Small-Sized Lectins from the Red Alga *Hypnea japonica* for Core (α 1-6) Fucosylated N-Glycans. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [s. l.], v. 73, n. 4, p. 912-920, 23 abr. 2009.

OLIVEIRA, J. T. A. *et al.* Mo-CBP3-PepI, Mo-CBP3-PepII, and Mo-CBP3-PepIII are synthetic antimicrobial peptides active against human pathogens by stimulating ROS generation and increasing plasma membrane permeability. **Biochimie**, [s. l.], v. 157, p. 10-21, fev. 2019.

PAN, Qiu; ZHANG, Xiao-Lian. Roles of core fucosylation modification in immune system and diseases. **Cell Insight**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 100211, fev. 2025.

PATEL, A. K. *et al.* Algae as an emerging source of bioactive pigments. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 351, p. 126910, 2022.

PEREIRA, Leonel. Macroalgae. **Encyclopedia**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 177-188, 7 fev. 2021.

PINTO, Vicente P. T. *et al.* Lectins from the Red Marine Algal Species *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum* as Tools to Differentiate Human Colon Carcinoma Cells. **Advances In Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 2009, p. 1-6, 2009.

PORATH, Jerker *et al.* Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. **Nature**, [s. l.], v. 258, n. 5536, p. 598-599, dez. 1975.

PLIEGO-CORTÉS, Hugo *et al.* Current knowledge and challenges in extraction, characterization and bioactivity of seaweed protein and seaweed-derived proteins. **Advances In Botanical Research**, [s. l.], p. 289-291, 2020.

PRASEPTIANGGA, D. Development of Seaweed-based Biopolymers for Edible Films and Lectins. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, [s. l.], v. 193, 2017.

RAFIQUE, Saima *et al.* Exploring fucosylation in lung cancer: mechanisms, diagnosis, and therapeutic strategies. **Advances In Biomarker Sciences And Technology**, [s. l.], v. 6, p. 174-190, 2024.

RATHEESH, Sadanandan; APPU, Anoop; RAUF, Arun. A. Antibacterial activity of GVL, a lectin isolated from marine algae *Gracilaria verrucosa*. **Journal Of Fundamental And Applied Sciences**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 509-517, 4 jun. 2023.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 8. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2014.

REECE, Richard J. **Analysis of Genes and Genomes**. 1. ed. Inglaterra: John Wiley & Sons, 2004.

ROSENBERG, Alan H. *et al.* Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. **Gene**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 125-135, jan. 1987.

SAMAVATI, Shima Famil *et al.* Reduced thermodynamic stability as prerequisite for aggregation of SOD1 mutants: a path through the reduction in intramolecular disulfide bonds. **Journal Of The Iranian Chemical Society**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 2053-2071, 24 mar. 2020.

SAMBROOK, Joseph.; RUSSELL, David W. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 3. ed. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.

SAMPAIO, Alexandre Holanda.; AINOZ, Iracema Lima.; FREITAS, Ana Lúcia Ponte.; BENEVIDES, Norma Maria Barros. Hemaglutininas de algas marinhas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 171-177, 1993.

SAMPAIO, Alexandre Holanda *et al.* New affinity procedure for the isolation and further characterization of the blood group B specific lectin from the red marine alga *Ptilota plumosa*. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 14, p. 489-495, 2002.

SANTOS, Gustavo Souza dos *et al.* Seaweeds and Corals from the Brazilian Coast: review on biotechnological potential and environmental aspects. **Molecules**, [s. l.], v. 28, n. 11, p. 4285, 23 maio 2023.

SATO, Tomomi; HORI, Kanji. Cloning, expression, and characterization of a novel anti-HIV lectin from the cultured cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. **Fisheries Science**, [s. l.], v. 75, n. 3, p. 743-753, 19 mar. 2009.

SILVA, Gloria Steffanne Damasio Da. **Caracterização estrutural in silico e análise das bases moleculares de interação das lectinas das algas vermelhas *Amansia multifida* e *Meristotheca echinocarpa***. 2023. 68 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em 2023) – Universidade Estadual do Ceará, Limoeiro do Norte, 2023.

SINGH, Ram Sarup; THAKUR, Shivani Rani; BANSAL, Parveen. Algal lectins as promising biomolecules for biomedical research. **Critical Reviews In Microbiology**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 77-88, 16 jul. 2015.

SINGH, Ram Sarup; WALIA, Amandeep Kaur. Lectins from red algae and their biomedical potential. **Journal Of Applied Phycology**, v. 30, n. 3, p. 1833-1858, 20 nov. 2018.

SCHNEIDER, Michael; AL-SHAREFFI, Esam; HALTIWANGER, Robert s. Biological functions of fucose in mammals. **Glycobiology**, [s. l.], v. 27, n. 7, p. 601-618, 4 maio 2017.

SOUSA, Maurilio Feijo de. **Caracterização estrutural e estudo comparativo das lectinas de algas marinhas vermelhas *Bryothamnion seaforthii* (BSL) e *Bryothamnion triquetrum* (BTL)**. 2022. 58 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.

SOUSA, Vítor; PEREIRA, Ricardo N.; VICENTE, António A.; DIAS, Oscar.; GEADA, Pedro. Microalgae biomasses an alternative source of biocompounds: New insights and future perspectives of extraction methodologies. **Food Research International**, [s. l.], p. 113282, 2023.

SUMNER, James B.; HOWELL, Stacey F. Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. **Journal Of Bacteriology**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 227-237, ago. 1936.

SURYA, P. H.; DEEPTI, M.; ELYAS, K. K. Plant lectins: sugar-binding properties and biotechnological applications. **Plant metabolites: methods, applications and prospects**, [s. l.], p. 401-439, 2020.

SCHÖNING-STIERAND, Katrin *et al.* ProteinsPlus: interactive analysis of protein-ligand binding interfaces. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 48-53, 16 abr. 2020.

SHEVCHENKO, A. *et al.* In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 2859-2860, 2007.

SHILLING, Patrick J. *et al.* Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. **Communications Biology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1-4, 7 maio 2020.

SREERAMA, Narasimha; WOODY, Robert W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: comparison of contin, selcon, and cdsstr methods with an expanded reference set. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 287, n. 2, p. 252-260, dez. 2000.

SREERAMA, Narasimha; WOODY, Robert W. Structural composition of β I- and β II-proteins. **Protein Science**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 384-388, fev. 2003.

STEURER, Stefan *et al.* Immunohistochemically detectable thyroglobulin expression in extrathyroidal cancer is 100% specific for thyroidal tumor origin. **Annals Of Diagnostic Pathology**, [s. l.], v. 54, p. 151793, out. 2021.

STETEFELD, Jörg; MCKENNA, Sean A.; PATEL, Trushar R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical Reviews**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 409-427, 6 out. 2016.

STILLMARK, H. **Über Ricin: ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus communis L. und einige anderen Euphorbiaceen.** 1888. 121 f. Tese (Doutorado em Medicina) – University of Dorpat, Dorpat, Estônia, 1888.

STUDIER, F. William; MOFFATT, Barbara A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **Journal Of Molecular Biology**, [s. l.], v. 189, n. 1, p. 113-130, maio 1986.

TANG, Jie *et al.* Heterologous Expression of the Antiviral Lectin Griffithsin in Probiotic *Saccharomyces boulardii* and In Vitro Characterization of Its Properties. **Microorganisms**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 2414, 25 nov. 2024.

TEIXEIRA, E.H. *et al.* In vitro inhibition of oral streptococci binding to the acquired pellicle by algal lectins. **Journal Of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 103, n. 4, p. 1001-1006, out. 2007.

TERPE, Kay. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 211-222, 22 jun. 2006.

TORRES, Renato César Farias. **Purificação, caracterização bioquímica, estrutural e atividade antibacteriana de uma galectina da esponja marinha *Aiolochoira crassa* (Hyatt, 1875).** 2024. Tese (Doutorado em Engenharia de Pesca)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2024.

TORRES-ARTEAGA, Iovanna *et al.* Comparative study, homology modelling and molecular docking with cancer associated glycans of two non-fetuin-binding Tepary bean lectins. **Glycoconjugate Journal**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 69-84, 17 nov. 2022.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal Of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 455-461, 4 jun. 2009.

VASCONCELOS, Mayron Alves *et al.* Effect of Algae and Plant Lectins on Planktonic Growth and Biofilm Formation in Clinically Relevant Bacteria and Yeasts. **Biomed Research International**, [s. l.], v. 2014, p. 1-9, 2014.

VAN DAMME, Els J. M. 35 years in plant lectin research: a journey from basic science to applications in agriculture and medicine. **Glycoconjugate Journal**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 83-97, 2022.

VAN STOKKUM, Ivo H.M. *et al.* Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 191, n. 1, p. 110-118, nov. 1990.

VIJLDER, Jan J.M. de; GRAAF, Simone A.R. van de; RIS-STALPERS, Carrie. Thyroglobulin. **Encyclopedia Of Endocrine Diseases**, [s. l.], p. 366-368, 2004.

VOLKAMER, Andrea *et al.* DoGSiteScorer: a web server for automatic binding site prediction, analysis and druggability assessment. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 28, n. 15, p. 2074-2075, 23 maio 2012.

WANG, Zhaohui *et al.* Investigation of the factors affecting the carbohydrate–lectin interaction by ITC and QCM-D. **Colloid And Polymer Science**, [s. l.], v. 292, n. 2, p. 391-398, 9 out. 2013.

WANG, Leah Liu *et al.* Algal Lectin Griffithsin Inhibits Ebola Virus Infection. **Molecules**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 892, 14 fev. 2025.

WATKINS, Winifred M.; MORGAN, W. T. J. Neutralization of the Anti-H Agglutinin in Eel Serum by Simple Sugars. **Nature**, [s. l.], v. 169, n. 4307, p. 825-826, maio 1952.

WILLIAMS, Christopher J. *et al.* MolProbity: more and better reference data for improved all :atom structure validation. **Protein Science**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 293-315, 27 nov. 2017.

WU, M. *et al.* A novel thyroglobulin-binding lectin from the brown alga *Hizikia fusiformis* and its antioxidant activities. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 201, p. 7-13, 2016.

WURM, David Johannes *et al.* The *E. coli* pET expression system revisited—mechanistic correlation between glucose and lactose uptake. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 100, n. 20, p. 8721-8729, 27 maio 2016.

WAGHMODE, A. V. Diversity and distribution of seaweeds from the west coast of Maharashtra. **J. Algal Biomass Utln**, v. [s. l.], 8, n. 3, p. 29-39, 2017.

YADAV, Dinesh K. *et al.* An insight into fusion technology aiding efficient recombinant protein production for functional proteomics. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s. l.], v. 612, p. 57-77, dez. 2016.

YAMAMOTO, K *et al.* The structure of carbohydrate unit B of porcine thyroglobulin. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 195, n. 3, p. 701-713, 1 jun. 1981.

YINGLI, He *et al.* Aberrant protein glycosylation in the colon adenoma-cancer sequence: colorectal cancer mechanisms and clinical implications. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular Basis Of Disease**, [s. l.], v. 1871, n. 6, p. 167853, ago. 2025.

YUAN, Jing-Jia; GENG, Shao-Lei; WANG, Tian-Yun. Research Progress Fusion Tags for Recombinant Protein Production. **Biotechnology And Applied Biochemistry**, [s. l.], v. 27, n. 49, p. 1-3, 27 mar. 2025.