



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

**JOÃO MARCELO DE SOUSA SILVA**

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTRUTURAL DE DUAS  
NOVAS LECTINAS DA ESPONJA MARINHA *APLYSINA PSEUDOLACUNOSA*  
(PINHEIRO; HAJDU, 2007)**

**FORTALEZA**

**2026**

JOÃO MARCELO DE SOUSA SILVA

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTRUTURAL DE DUAS  
NOVAS LECTINAS DA ESPONJA MARINHA *APLYSINA PSEUDOLACUNOSA*  
(PINHEIRO; HAJDU, 2007)

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.

Coorientador: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.

FORTALEZA

2026

JOÃO MARCELO DE SOUSA SILVA

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTRUTURAL DE DUAS  
NOVAS LECTINAS DA ESPONJA MARINHA *APLYSINA PSEUDOLACUNOSA*  
(PINHEIRO; HAJDU, 2007)

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

Aprovada em: \_\_ 19 \_\_ / \_\_ 02 \_\_ /2026.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Renato César Farias Torres  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Helton Colares da Silva  
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

A Deus.

À minha mãe, Antônia Edênia de Sousa.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por Sua fidelidade e orientação ao longo de toda a minha trajetória. Reconheço que foi por meio de Sua força e propósito que pude superar desafios, perseverar diante das dificuldades e concluir esta etapa acadêmica.

À minha mãe, Antônia Edênia de Sousa, pelo amor incondicional, apoio constante e dedicação incansável. Sua presença foi fundamental para que eu pudesse seguir em frente, mesmo diante das adversidades, sendo um alicerce essencial para a concretização desta jornada.

À minha namorada, Vanessa Pereira Lopes, pelo apoio incondicional, carinho, companheirismo e compreensão ao longo de todo o mestrado. Sua presença, paciência e incentivo foram fundamentais nos momentos de maior cansaço e incerteza, tornando essa caminhada mais leve e possível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio, pelos ensinamentos, orientação, amizade, apoio e atenção ao longo do desenvolvimento deste trabalho, contribuindo de forma decisiva para o meu crescimento acadêmico e científico.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro, pelos ensinamentos, pelas oportunidades concedidas, pela paciência, amizade e confiança depositada em mim ao longo do período em que estive no INCT BioMar, contribuindo de maneira significativa para o meu amadurecimento profissional e científico.

Ao Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano, pelos valiosos ensinamentos, disponibilidade, rigor científico e contribuições técnicas ao longo da minha trajetória, sendo uma referência fundamental para o meu desenvolvimento como pesquisador.

À Dra. Renata Pinheiro Chaves, pela ajuda, paciência e ensinamentos compartilhados durante todo este período, contribuindo significativamente para a execução deste trabalho.

Aos meus amigos de laboratório, Manoel, Israel, Eduardo, Gloria e Paulo, pelo apoio, parceria e colaboração durante a realização deste trabalho.

Aos amigos que fiz durante a graduação e o mestrado, Régis, Luana e Bianca, pela amizade, companheirismo, apoio e momentos de descontração ao longo dessa trajetória.

Aos colegas do INCT BioMar, por toda a ajuda, colaboração e convivência ao longo do período em que estive no instituto.

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

“Tenho-vos dito isto para que em mim tenhais paz; no mundo tereis aflições, mas tende bom ânimo; eu venci o mundo” (João 16:33).

## RESUMO

Esponjas marinhas, pertencentes ao filo Porifera, são importantes fontes de biomoléculas ativas, incluindo lectinas, proteínas capazes de reconhecer e se ligar reversivelmente a carboidratos específicos. A espécie *Aplysina pseudolacunosa*, encontrada no litoral cearense, ainda não possuía lectinas caracterizadas na literatura. Assim, este trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar bioquímica e estruturalmente duas lectinas dessa espécie, denominadas ApL-1 e ApL-2. As lectinas foram purificadas por precipitação com sulfato de amônio, seguida de cromatografia de afinidade e cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. Em SDS-PAGE, a ApL-1 apresentou massa molecular aparente de aproximadamente 12 kDa, enquanto a ApL-2 apresentou cerca de 28 kDa. Ambas exibiram atividade hemaglutinante, com títulos de 32 U.H.mL<sup>-1</sup> (ApL-1) e 128 U.H.mL<sup>-1</sup> (ApL-2). A ApL-1 apresentou maior afinidade à fetuína bovina, enquanto a ApL-2 foi fortemente inibida por mucinas gástricas suínas dos tipos II e III. Ambas mantiveram atividade em ampla faixa de pH (4–10), apresentaram estabilidade térmica e atividade independente de íons divalentes. A caracterização por dicroísmo circular revelou arquiteturas conformacionais distintas, com predominância de folhas  $\beta$  para a ApL-1, compatível com o padrão estrutural descrito para proto-galectinas, enquanto a ApL-2 exibiu organização estrutural com maior quantidade de estruturas de  $\alpha$ -hélice. As análises por espalhamento dinâmico de luz indicaram comportamento monodisperso para a ApL-1, sugerindo organização dimérica em solução, e perfil mais heterogêneo para a ApL-2, indicando maior grau de associação molecular. A estrutura primária de ApL-1 foi completamente elucidada por espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS). Análises por BLASTp revelaram elevada homologia com galectinas de esponjas marinhas, destacando-se as isoformas ALL-a e ALL-b, com identidades de 86,9% e 78,6%, respectivamente, cobertura de 100% da sequência, sendo compatível com o padrão estrutural descrito para proto-galectinas. A ApL-2 teve sua estrutura primária parcialmente caracterizada e os alinhamentos com proteínas putativas de genomas de esponjas marinhas apresentaram identidades entre 34 e 41% e com baixa cobertura, sugerindo tratar-se de uma lectina não convencional. Assim, as duas novas lectinas caracterizadas neste estudo contribuem para a compreensão da diversidade estrutural e funcional das lectinas marinhas, estabelecendo bases para estudos posteriores de caracterização biológica e eventual exploração biotecnológica, condicionada à validação funcional.

**Palavra-chaves:** esponjas marinhas; lectinas; galectinas.

## ABSTRACT

Marine sponges, belonging to the phylum Porifera, are important sources of bioactive biomolecules, including lectins, which are proteins capable of recognizing and reversibly binding to specific carbohydrates. The species *Aplysina pseudolacunosa*, found along the coast of Ceará, had not yet had any lectins characterized in the literature. Therefore, this study aimed to purify and biochemically and structurally characterize two lectins from this species, named ApL-1 and ApL-2. The lectins were purified by ammonium sulfate precipitation, followed by affinity chromatography and reverse-phase high-performance liquid chromatography. In SDS-PAGE, ApL-1 exhibited an apparent molecular mass of approximately 12 kDa, whereas ApL-2 showed a mass of about 28 kDa. Both lectins displayed hemagglutinating activity, with titers of 32 U.H. mL<sup>-1</sup> for ApL-1 and 128 U.H. mL<sup>-1</sup> for ApL-2. ApL-1 showed greater affinity to bovine fetuin, while ApL-2 was strongly inhibited by porcine gastric mucins types II and III. Both lectins maintained activity over a wide pH range (4–10), exhibited thermal stability and divalent ion-independent activity. Circular dichroism characterization revealed distinct conformational architectures, with a predominance of  $\beta$ -sheet structures for ApL-1, consistent with galectins described from marine sponges, whereas ApL-2 exhibited a structural organization with a higher content of  $\alpha$ -helical structures. Dynamic light scattering analyses indicated a monodisperse behavior for ApL-1, suggesting a dimeric organization in solution, and a more heterogeneous profile for ApL-2, indicating a higher degree of molecular association. The primary structure of ApL-1 was fully elucidated by tandem mass spectrometry (MS/MS). BLASTp analyses revealed high homology with galectins from marine sponges, particularly the isoforms ALL-a and ALL-b, with sequence identities of 86.9% and 78.6%, respectively, and 100% sequence coverage, compatible with the structural pattern described for proto-galectins. ApL-2 had its primary structure partially characterized, and alignments with putative proteins from marine sponge genomes showed identities ranging from 34 to 41% with low sequence coverage, suggesting that it represents a non-conventional lectin. Thus, the two new lectins characterized in this study expand the current knowledge of structural and functional diversity among marine sponge lectins and provide a foundation for future biological characterization and potential biotechnological investigation, pending further functional validation.

**Keywords:** marine sponges; lectins; galectins.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Visão geral do plano corporal de uma esponja marinha .....	13
Figura 2	– Organização leuconóide do sistema aquífero de esponjas marinhas .....	15
Figura 3	– <i>Aplysina pseudolacunosa</i> (Pinheiro; Hajdu, 2007) .....	16
Figura 4	– Organização estrutural das galectinas e suas principais arquiteturas .....	24
Figura 5	– Estrutura cristalográfica do domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) de galectina-1 humana, evidenciando a arquitetura $\beta$ -sanduíche conservada típica das galectinas .....	25
Figura 6	– Resíduos conservados no sítio de ligação das galectinas.....	26
Figura 7	– Cromatografia de afinidade em matriz de goma de guar da fração 0-70 do sulfato de amônio do extrato de <i>A. pseudolacunosa</i> .....	39
Figura 8	– Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% da fração P2 de <i>A. pseudolacunosa</i> ....	41
Figura 9	– Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-UPLC) da fração P2 de <i>A. pseudolacunosa</i> .....	42
Figura 10	– Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante de ApL-1.....	45
Figura 11	– Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante de ApL-1 .....	45
Figura 12	– Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante de ApL-2 .....	46
Figura 13	– Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante de ApL-2 .....	47
Figura 14	– Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% das lectinas ApL-1 e ApL-2 .....	48
Figura 15	– Espectros de dicroísmo circular de ApL-1 .....	49
Figura 16	– Espectros de dicroísmo circular de ApL-2 .....	50
Figura 17	– Espalhamento dinâmico de luz ApL-1 .....	51
Figura 18	– Espalhamento dinâmico de luz ApL-2 .....	52
Figura 19	– Mapa peptídico da lectina ApL-1 obtido por espectrometria de massas em <i>tandem</i> (MS/MS) .....	52

Figura 20 – Alinhamento da estrutura de ApL-1 com outras galectinas de esponjas marinhas .....	54
Figura 21 – Predição estrutural tridimensional da lectina ApL-1 .....	56
Figura 22 – Mapa peptídico da lectina ApL-2 obtido por espectrometria de massas em <i>tandem</i> (MS/MS) .....	57
Figura 23 – Alinhamento da sequência parcial de ApL-2 com proteínas putativas codificadas em genomas de esponjas marinhas .....	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sumário do processo de purificação das lectinas de <i>Aplysina pseudolacunosa</i> , desde o extrato bruto até a fração P2 .....	40
Tabela 2 – Atividade hemaglutinante das frações obtidas, desde o extrato bruto até a fração P2 .....	41
Tabela 3 – Atividade hemaglutinante das lectinas ApL-1 e ApL-2, após a cromatografia de fase reversa .....	43
Tabela 4 – Inibição da atividade hemaglutinante de ApL-1 .....	43
Tabela 5 – Inibição da atividade hemaglutinante de ApL-2 .....	44
Tabela 6 – Sequências de aminoácidos dos peptídeos de ApL-1 .....	53
Tabela 7 – Sequências de aminoácidos dos peptídeos de ApL-2 .....	57

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>1.1</b>	<b>Esponjas marinhas</b> .....	13
<i>1.1.1</i>	<i>Classe Demospongiae</i> .....	14
<b>1.2</b>	<b>Lectinas</b> .....	18
<i>1.2.1</i>	<i>Lectinas de animais</i> .....	20
<i>1.2.2</i>	<i>Lectinas de esponjas marinhas</i> .....	22
<i>1.2.2.1</i>	<i>Galectinas de esponjas marinhas</i> .....	23
<i>1.2.2.2</i>	<i>Lectinas de esponjas marinhas sem classificação definida</i> .....	27
<b>1.3</b>	<b>Lectinas do gênero <i>Aplysina</i></b> .....	29
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	31
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	31
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	31
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
<b>3.1</b>	<b>Coleta da esponja</b> .....	32
<b>3.2</b>	<b>Purificação das lectinas</b> .....	32
<b>3.3</b>	<b>Avaliação da atividade hemaglutinante e inibição</b> .....	33
<b>3.4</b>	<b>Caracterização bioquímica das lectinas</b> .....	34
<b>3.5</b>	<b>Análise de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)</b> .....	34
<b>3.6</b>	<b>Estimativa de massa molecular</b> .....	35
<b>3.7</b>	<b>Análise de dicroísmo circular</b> .....	35
<b>3.8</b>	<b>Determinação da estrutura primária</b> .....	36
<i>3.8.1</i>	<i>Determinação da sequência de aminoácidos</i> .....	36
<i>3.8.2</i>	<i>Sequenciamento dos peptídeos obtidos por digestão</i> .....	36
<i>3.8.3</i>	<i>Análise dos dados</i> .....	37
<i>3.8.4</i>	<i>Análise da sequência de aminoácidos</i> .....	37
<i>3.8.5</i>	<i>Predição estrutural e validação estereoquímica de ApL-1</i> .....	37
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	39
<b>4.1</b>	<b>Purificação inicial e obtenção da fração lectínica P2</b> .....	39
<i>4.1.1</i>	<i>Atividade hemaglutinante</i> .....	41
<i>4.1.2</i>	<i>Estimativa da massa molecular</i> .....	41
<b>4.2</b>	<b>Separação das lectinas por cromatografia de fase reversa</b> .....	42

4.3	Caracterização bioquímica das lectinas ApL-1 e ApL-2 .....	43
4.3.1	<i>Atividade hemaglutinante de ApL-1 e ApL-2 .....</i>	43
4.3.2	<i>Especificidade por carboidratos e glicoproteínas de ApL-1 e ApL-2 .....</i>	43
4.3.3	<i>Efeitos de teste de pH, temperatura e íons divalentes de ApL-1 e ApL-2 .....</i>	44
4.3.4	<i>Estimativas das massas moleculares das lectinas ApL-1 e ApL-2 .....</i>	47
4.4	Caracterização conformacional das lectinas ApL-1 e ApL-2 .....	49
4.4.1	<i>Dicroísmo circular (DC) de ApL-1 e ApL-2 .....</i>	49
4.4.2	<i>Espalhamento dinâmico de luz (DLS) de ApL-1 e ApL-2 .....</i>	50
4.5	Caracterização estrutural de ApL-1 .....	52
4.5.1	<i>Sequenciamento completo de ApL-1 por espectrometria de massas (MS/MS).</i>	52
4.5.2	<i>Análise de similaridade pelo BLASTp .....</i>	54
4.5.3	<i>Predição estrutural tridimensional .....</i>	55
4.6	Caracterização estrutural de ApL-2 .....	56
4.6.1	<i>Sequenciamento de ApL-2 por espectrometria de massas (MS/MS) .....</i>	56
4.6.2	<i>Análise de similaridade pelo BLASTp .....</i>	58
5	DISCUSSÃO .....	60
6	CONCLUSÃO .....	70
	REFERÊNCIAS .....	71

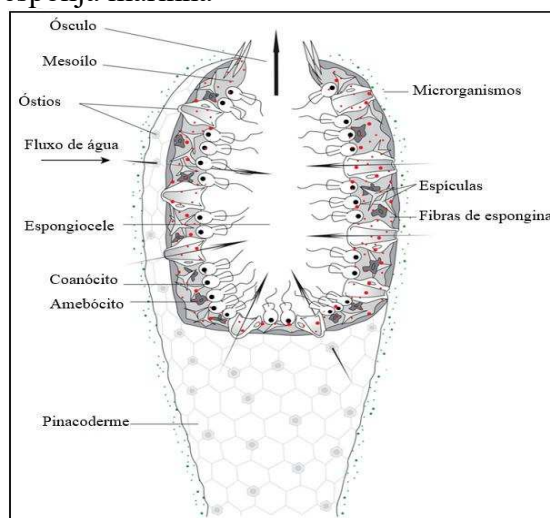
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Esponjas marinhas

O filo Porifera compreende os mais antigos representantes dos organismos metazoários ainda existentes, caracterizados por uma arquitetura corporal e morfologia adaptáveis que lhes conferiu resiliência evolutiva frente a modificações ambientais significativas e pressões competitivas interespecíficas (Dahihande; Thakur, 2021; Hooper *et al.*, 2021; Van Soest *et al.*, 2012). Estes organismos, exclusivamente aquáticos, cuja etimologia deriva do latim *porus*, "poros"; e *ferre*, "possuir", apresentam ampla distribuição ecológica, habitando desde ecossistemas marinhos até dulcícolas, com ocorrência desde zonas entre-marés até profundidades abissais (De Voogd *et al.*, 2025; Van Soest *et al.*, 2012).

A organização estrutural das esponjas se fundamenta em um sofisticado sistema aquífero constituído por uma complexa rede de poros e canais interconectados que possibilitam a circulação unidirecional de água através do corpo do animal, permitindo a filtração e captação eficiente de partículas alimentares em suspensão (Figura 1) (Masangkay *et al.*, 2022; Thompson, F.; Thompson, C., 2020; Van Soest *et al.*, 2012; Webster; Thomas, 2016). Este sistema hidrodinâmico é impulsionado por uma camada especializada de células flageladas denominadas coanócitos, que promovem o fluxo contínuo de água através da estrutura corporal (Ereskovsky; Lavrov, 2021; Van Soest *et al.*, 2012).

Figura 1 – Morfologia geral de uma esponja marinha



Fonte: Esquema da circulação de água em Porifera, destacando óstios, espongiocele e organização do mesoilo. Adaptado de Webster e Thomas (2016).

O parênquima das esponjas abriga uma população de células mesenquimais altamente móveis que exibem notável capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares especializados, fenômeno denominado totipotência, conferindo-lhes plasticidade morfológica e adaptabilidade estrutural (Ereskovsky; Lavrov, 2021; Van Soest *et al.*, 2012; Webster; Thomas, 2016).

As esponjas constituem componente significativo da biomassa bentônica marinha, com mais de 9.700 espécies taxonomicamente descritas, exibindo diversidade morfológica, cromática e dimensional, com dimensões que oscilam desde poucos milímetros (3 – 10 milímetros) até metros (1,5 – 2 metros) (De Voogd *et al.*, 2025). Esta diversidade morfológica reflete a heterogeneidade na composição de seus elementos esqueléticos sintetizados por células especializadas denominadas esclerócitos ou escleroblastos. A arquitetura esquelética das esponjas se fundamenta em elementos estruturais diversificados, incluindo espículas silicosas, calcárias ou fibras orgânicas colagenosas (espongina), que conferem suporte estrutural e características taxonômicas distintivas a estes organismos (Aguilar-Camacho; Doonan; McCormack, 2019; Van Soest *et al.*, 2012).

A diversidade de elementos esqueléticos constitui uma das bases fundamentais para a classificação taxonômica das esponjas, que atualmente são divididas em quatro classes: Demospongiae (a mais diversa das espécies descritas, caracterizada pela presença de espículas silicosas e/ou fibras de espongina), Hexactinellida (esponjas de vidro, com espículas silicosas de seis raios), Calcarea (com espículas calcárias) e Homoscleromorpha (com características únicas no córtex e presença de membrana basal) (De Voogd *et al.*, 2025; Van Soest *et al.*, 2012).

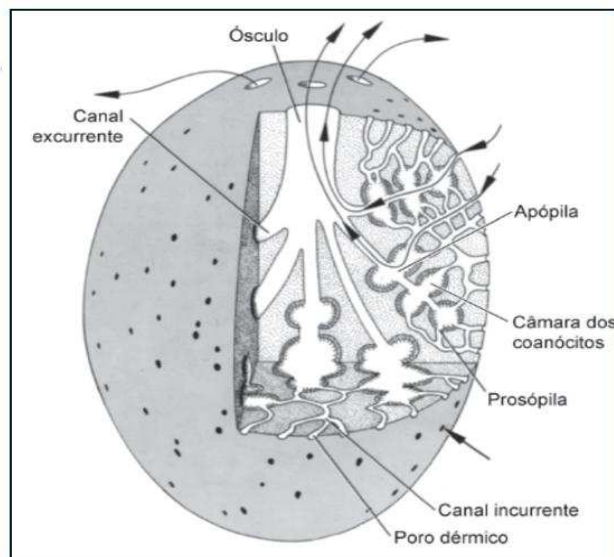
### ***1.1.1 Classe Demospongiae***

A classe Demospongiae representa o maior contingente taxonômico do filo Porifera, reunindo mais de 80% das espécies descritas e incluindo todas as espécies dulcícolas, que somam menos de 300 táxons conhecidos (De Voogd *et al.*, 2025; Van Soest *et al.*, 2012). Seus elementos de sustentação são formados por espículas siliciosas, fibras de espongina ou ambos, caracterizando-se pela ausência de espículas calcárias, um traço distintivo do grupo (Brusca; Moore; Shuster, 2018).

A maioria das espécies pertencentes à classe Demospongiae apresenta organização corporal do tipo leuconóide (Figura 2), considerada a forma mais complexa do sistema aquífero entre os poríferos. Nesse arranjo, a coanoderme se encontra distribuída em extensas dobras,

resultando em um mesoílo espessado, no qual câmaras coanocíticas pequenas e ovais estão amplamente dispersas (Aguilar-Camacho; Doonan; McCormack, 2019; Brusca; Moore; Shuster, 2018). O átrio é tipicamente reduzido e substituído por uma rede de canais exalantes, responsáveis por conduzir a água filtrada das câmaras até o ósculo. Essa arquitetura altamente compartimentalizada maximiza a eficiência do processo de filtração, permitindo maior área de contato entre a água e as superfícies flageladas, e está diretamente associada à elevada diversidade morfológica observada na classe (Brusca; Moore; Shuster, 2018; Thompson, F.; Thompson, C., 2020; Van Soest *et al.*, 2012).

Figura 2 – Organização leuconóide do sistema aquífero de esponjas marinhas



Fonte: Esquema do plano corporal leuconóide, destacando câmaras de coanócitos, canais, prosópilos, apópilos e ósculo, com indicação do fluxo unidirecional da água. As setas indicam o sentido do fluxo hídrico. Adaptado de Brusca; Moore; Shuster (2018).

A plasticidade morfológica das demosponjas é notável, abrangendo formas incrustantes, eretas, ramificadas, multilobadas, esféricas ou tubulares. O porte corporal também é altamente variável, podendo oscilar desde poucos milímetros até indivíduos que ultrapassam dois metros de diâmetro, dependendo da espécie e das condições ambientais em que se desenvolvem (Ereskovsky; Lavrov, 2021; Van Soest *et al.*, 2012).

O gênero *Aplysina* Nardo, 1834 (Figura 3), pertencente à classe Demospongiae, ordem Verongiida e família Aplysinidae, apresenta ampla distribuição em ambientes marinhos tropicais e subtropicais, sendo particularmente diverso no Atlântico Tropical Ocidental,

incluindo a costa brasileira (Cruz-Barraza *et al.*, 2012; De Voogd *et al.*, 2025; Pinheiro; Hajdu, 2007).

Figura 3 – *Aplysina pseudolacunosa* (Pinheiro; Hajdu, 2007)



Fonte: O autor. Espécimes da esponja marinha *Aplysina pseudolacunosa* foram coletados por meio de mergulho autônomo no Parque Estadual Marinho da Pedra da Risca do Meio, Fortaleza, Ceará, Brasil.

Estudos taxonômicos baseados em características morfológicas externas e na arquitetura esquelética demonstram que espécies de *Aplysina* exibem elevada plasticidade morfológica, com variação significativa tanto entre espécies quanto entre indivíduos de uma mesma espécie (Klöppel *et al.*, 2009; Pinheiro; Hajdu, 2007). Essa variabilidade se expressa em diferentes morfotipos, incluindo formas tubulares, ramificadas, maciças ou em forma de vaso, frequentemente associadas às condições ambientais locais, profundidade e disponibilidade de substrato (Cruz-Barraza *et al.*, 2012; Díaz *et al.*, 2001).

Além da variação na forma corporal, alterações na coloração também têm sido registradas. Espécies do gênero podem apresentar tonalidades que variam entre amarelo, marrom, laranja e púrpura, e alguns estudos evidenciaram mudanças fenotípicas associadas a fatores ambientais ou à exposição ao ar, como observado em espécies mediterrâneas, nas quais a pigmentação se altera após a remoção do meio aquático (Díaz *et al.*, 2001; Klöppel *et al.*, 2009).

No contexto brasileiro, estima-se que aproximadamente 15 espécies do gênero *Aplysina* ocorram ao longo da costa, com maior frequência no Atlântico Tropical Sudoeste,

ocupando recifes coralíneos e substratos consolidados (Pinheiro; Hajdu, 2007; Sandes *et al.*, 2024). Paralelamente às características morfológicas, espécies de *Aplysina* são amplamente reconhecidas pela produção de compostos bromotirosinados e outros metabólitos secundários, os quais desempenham papéis relevantes em processos de defesa química, competição por espaço e interações ecológicas (Puyana *et al.*, 2015; Varijakzhan *et al.*, 2021).

Variações fenotípicas tradicionalmente utilizadas na identificação taxonômica, como forma e coloração, podem apresentar variações significativas em resposta a fatores ambientais ou à exposição ao ar. Alterações de pigmentação e morfologia já foram descritas em espécies mediterrâneas de *Aplysina* quando removidas de seu ambiente natural (Díaz *et al.*, 2005; Klöppel *et al.*, 2009; Neigel; Schmahl, 1984; Putz *et al.*, 2009; Pita *et al.*, 2025).

A condição sésil das esponjas marinhas favoreceu, ao longo de sua história evolutiva, o desenvolvimento de sofisticados mecanismos químicos de defesa contra predadores, competidores e microrganismos patogênicos, resultando na produção de um amplo arsenal de metabólitos secundários bioativos (Karthikeyan; Joseph; Nair, 2022; Thompson, F.; Thompson, C., 2020). Esses compostos, que incluem terpenos, esteróis, alcaloides, macrólidos e policetídeos, apresentam estruturas químicas diversas e um amplo espectro de atividades biológicas, como ação antimicrobiana, antiviral, antitumoral, anti-inflamatória, imunomoduladora, antiparasitária e antioxidante (Esposito *et al.*, 2022; Gomez-Banderas, 2022; Mannelli *et al.*, 2021; Mehub *et al.*, 2024; Santi Martignago *et al.*, 2025; Srinivasan *et al.*, 2021; Varijakzhan *et al.*, 2021).

A complexidade química observada é atribuída tanto à maquinaria biossintética do hospedeiro quanto à interação com sua microbiota associada, composta por bactérias, arqueas, fungos e microalgas, sendo que abordagens multi-ômicas têm demonstrado que parte desses metabólitos é produzida por microrganismos simbioses ou resulta de vias biossintéticas híbridas (Mehub *et al.*, 2024; Muñoz-Miranda; Iñiguez-Moreno, 2023).

A relevância biotecnológica desses metabólitos é evidenciada pelo avanço de diversos compostos para ensaios clínicos e pela aprovação de fármacos derivados ou inspirados em moléculas originalmente associadas a esponjas marinhas. Entre os exemplos clássicos destacam-se a citarabina (Ara-C) e a vidarabina (Ara-A), análogos nucleosídicos sintéticos desenvolvidos com base em compostos naturais isolados da esponja *Tethya crypta*, utilizados no tratamento de leucemia e infecções virais, respectivamente, além da eribulina (Halaven®), derivada da halicondrina B isolada de *Halichondria okadai*, e do trabectedin (Yondelis®),

estruturalmente relacionado a compostos de esponjas e empregado no tratamento de neoplasias específicas (Bhatia, 2018; Rotter *et al.*, 2021).

Diante desse cenário, *Aplysina pseudolacunosa* se destaca como uma espécie ainda pouco explorada em termos de composição molecular e de proteínas de reconhecimento, não havendo, até o presente momento, registros na literatura sobre lectinas isoladas dessa espécie.

Assim, a investigação das lectinas presentes em *A. pseudolacunosa* torna-se relevante para ampliar o conhecimento bioquímico do gênero e compreender o repertório molecular empregado por essas esponjas em seus processos fisiológicos.

## 1.2 Lectinas

O termo *lectina* deriva do latim *legere*, que significa “escolher” ou “selecionar”, foi introduzido na literatura científica por Boyd em 1954, a partir da observação da capacidade de determinadas proteínas em promover a aglutinação específica de grupos sanguíneos. Inicialmente, o conceito esteve associado a essas propriedades hemaglutinantes, entretanto, com o avanço dos estudos bioquímicos e estruturais, a definição foi progressivamente ampliada para incluir proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica capazes de reconhecer carboidratos de forma específica (Sharon; Lis, 1972; Radhakrishnan *et al.*, 2021).

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas ubíquas capazes de reconhecer e se ligar de forma específica e reversível a carboidratos, sem modificá-los quimicamente e, embora sejam componentes relevantes do sistema imune inato, elas não pertencem às principais classes de imunoglobulinas (Ahmmed *et al.*, 2022; Elumalai; Lakshmi, 2022; Gardères *et al.*, 2015; Sharon; Lis, 2008).

A interação entre lectinas e seus ligantes é mediada por domínios de reconhecimento de carboidratos (DRCs), que permitem o reconhecimento de mono e oligossacarídeos presentes na superfície celular, na matriz extracelular e em estruturas microbianas (Chettri *et al.*, 2021; Sharon; Lis, 2004; Gabius *et al.*, 2002).

As lectinas estão amplamente distribuídas entre os organismos vivos, sendo descritas em plantas, algas, bactérias, fungos, vertebrados e invertebrados marinhos (Ahmmed *et al.*, 2022; Hatakeyama; Unno, 2023; Sharon; Lis, 1998; Sharon; Lis, 2004; Peumans; Van Damme, 1995). Essa ampla distribuição reflete a diversidade de funções biológicas atribuídas a essas proteínas, que incluem adesão celular, reconhecimento e sinalização intercelular, processos de fertilização, apoptose, desenvolvimento embrionário e, especialmente,

mecanismos de defesa associados à imunidade inata (Gabiús *et al.*, 2002; Hatakeyama; Unno, 2023; Vasta, 2016).

O interesse crescente pelas lectinas está diretamente relacionado ao seu papel no reconhecimento do glicocódigo, isto é, padrões informacionais gerados pela diversidade estrutural dos carboidratos presentes na superfície celular e na matriz extracelular, os quais mediam interações celulares, processos de reconhecimento molecular e eventos de sinalização biológica (Ideo; Tsuchida; Takada, 2024; Sharon; Lis, 2004; Varki *et al.*, 2022). Esses códigos glicídicos são fundamentais para a comunicação célula–célula, interações hospedeiro–patógeno e processos imunológicos, exigindo a atuação de proteínas capazes de decodificá-los com elevada especificidade, função desempenhada centralmente pelas lectinas (Gabiús *et al.*, 2002; Varki *et al.*, 2016; Wisnovsky; Bertozzi, 2022). A especificidade dessas interações é determinada não apenas pela conformação do DRC, mas também por resíduos adjacentes que contribuem para o refinamento da seletividade molecular (Vasta, 2016; Weis, 1996).

Do ponto de vista evolutivo, a presença de lectinas em organismos basalmente divergentes, como invertebrados marinhos, sugere que essas proteínas representam um dos sistemas mais antigos de reconhecimento molecular (Gardères *et al.*, 2015). Em esponjas e outros invertebrados aquáticos, as lectinas têm sido associadas à resposta imune primária, atuando como moléculas de reconhecimento de padrões moleculares associados a microrganismos, contribuindo para a defesa contra patógenos e para a manutenção da homeostase simbiótica (Ahmmed *et al.*, 2022; Elumalai; Lakshmi, 2022).

O avanço das técnicas analíticas nas últimas décadas, incluindo espectrometria de massas, proteômica, bioinformática e modelagem estrutural, permitiu uma compreensão mais aprofundada da diversidade estrutural e funcional das lectinas. Esses métodos possibilitaram classificações mais refinadas, baseadas em domínios conservados e famílias estruturais, ampliando significativamente o número de lectinas caracterizadas em diferentes organismos, incluindo espécies marinhas (Birhanu, 2023; Lebreton *et al.*, 2021; Jiang *et al.*, 2024; Lisacek; Schnider; Imberty, 2025).

Nesse contexto, as propriedades estruturais e funcionais das lectinas, particularmente sua capacidade de reconhecer glicanos de forma altamente específica e reversível, têm despertado crescente interesse na comunidade científica. Essa especificidade molecular confere a essas proteínas um elevado potencial biológico, uma vez que os glicanos participam de processos fisiológicos e patológicos fundamentais, incluindo infecções,

inflamação, reconhecimento celular e progressão tumoral (Ideo; Tsuchida; Takada, 2024; Sharon; Lis, 2004; Varki *et al.*, 2022).

Assim, lectinas podem ser exploradas como ferramentas em estratégias diagnósticas e no desenvolvimento de abordagens terapêuticas com atividades antimicrobianas, antivirais, antitumorais, imunomoduladoras, antioxidantes e aplicações terapêuticas, reforçando sua relevância biológica e biotecnológica (Ahmmed *et al.*, 2022; Andrade *et al.*, 2025; Carneiro *et al.*, 2024; Gómez-Banderas, 2022; Ideo; Tsuchida; Takada, 2024).

### ***1.2.1 Lectinas de animais***

As lectinas de animais constituem um grupo heterogêneo de proteínas e glicoproteínas caracterizadas pela capacidade de reconhecer e se ligar de forma específica e reversível a carboidratos, sem promover alterações químicas nos ligantes (Hatakeyama; Unno, 2023; Kilpatrick, 2002; Vasta, 2016). Essas moléculas apresentam pelo menos um domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC), responsável pela interação específica com mono e oligossacarídeos presentes em glicoconjugados da superfície celular, da matriz extracelular ou de microrganismos (Sharon; Lis, 1998; Vasta; Wang, 2020). Diferentemente das imunoglobulinas, as lectinas não são produtos de recombinação gênica somática, mas integram componentes constitutivos do sistema imune inato, atuando como mediadoras iniciais de reconhecimento molecular (Kilpatrick, 2002; Vasta, 2016).

Em animais, as lectinas estão majoritariamente associadas à imunidade inata, atuando como moléculas de reconhecimento capazes de identificar padrões moleculares conservados presentes em microrganismos. Essas interações permitem a mediação de processos como opsonização, ativação de vias inflamatórias e regulação da resposta imune inicial, especialmente em contextos em que a resposta adaptativa ainda não foi estabelecida ou é inexistente (Hatakeyama; Unno, 2023; Kilpatrick, 2002; Vasta, 2016).

Em invertebrados, cuja resposta imune carece de imunidade adaptativa clássica, as lectinas assumem papel central como moléculas efetoras, funcionando como receptores de reconhecimento de padrões moleculares conservados presentes em microrganismos e participando de respostas imunes inatas (Vasta, 2016). Estudos mostram que lectinas de invertebrados podem ser moduladas em sua expressão em resposta a desafios infecciosos e desempenhar papel em processos como fagocitose, recrutamento de hemócitos e ativação de cascatas imunes (Saco *et al.*, 2023; Viana *et al.*, 2022).

Historicamente, a classificação das lectinas animais foi baseada em critérios funcionais e estruturais, incluindo a dependência de íons metálicos e a especificidade por determinados resíduos glicídicos. Entre as principais famílias estruturalmente definidas estão as lectinas do tipo C, caracterizadas por domínios dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ ; as galectinas, que reconhecem  $\beta$ -galactosídeos; as lectinas do tipo P, envolvidas no reconhecimento de manose-6-fosfato; e as lectinas do tipo I, pertencentes à superfamília das imunoglobulinas, as siglecs (*Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins*), um grupo de lectinas transmembrana expressas principalmente em células do sistema imune, que reconhecem resíduos de ácido siálico e participam da modulação de respostas imunes. (Angata, 2002; Cummings *et al.*, 2017; Drickamer, 1988; Raposo *et al.*, 2021). Essa diversidade estrutural está associada à multiplicidade de funções biológicas desempenhadas por essas proteínas em diferentes contextos fisiológicos e reflete um processo evolutivo conservado, no qual proteínas de reconhecimento de carboidratos desempenham papéis centrais na imunidade inata de organismos basalmente divergentes, incluindo invertebrados marinhos (Vasta, 2008; Vasta, 2016; Varki *et al.*, 2022).

Em organismos aquáticos, particularmente invertebrados marinhos, lectinas têm sido associadas não apenas à defesa contra patógenos, mas também à mediação de interações simbióticas e à manutenção da homeostase entre o hospedeiro e sua microbiota associada (Ahmed *et al.*, 2022; Guryanova; Ovchinnikova, 2022). Esses organismos, por ocuparem ambientes ricos em microrganismos, dependem fortemente de sistemas de reconhecimento molecular eficientes, nos quais as lectinas atuam como receptores de padrões, contribuindo para a discriminação entre microrganismos simbióticos e potenciais patógenos (Ahmed *et al.*, 2022; Buriak, 2024).

Em invertebrados marinhos, incluindo moluscos e equinodermos, as lectinas apresentam adicionalmente papéis associados à organização tecidual, processos de desenvolvimento e mediação de interações ecológicas. Essas funções ampliam o escopo biológico das lectinas animais para além da imunidade, posicionando-as como elementos-chave em sistemas de reconhecimento celular e comunicação molecular em ambientes marinhos complexos (Vasta, 2016; Wang; Vasta, 2020).

Dessa forma, embora as lectinas de animais englobem múltiplas famílias e funções, seu papel central como mediadoras de interações proteína-carboidrato estabelece uma base conceitual importante para a compreensão das lectinas descritas em organismos basais. Esse panorama é particularmente relevante para a análise das lectinas de esponjas marinhas, nas

quais mecanismos de reconhecimento glicídico parecem estar associados tanto à defesa quanto à interação com a microbiota simbiótica (Gardères *et al.*, 2015; Vasta, 2016).

### ***1.2.2 Lectinas de esponjas marinhas***

Em esponjas marinhas, os primeiros relatos sobre a presença de lectinas datam de 1968, quando Dodd e colaboradores investigaram as espécies *Cliona celata*, *Axinella* sp. e *Tethya aurantium*. Nos extratos obtidos de *C. celata* e *Axinella* sp., foi detectada atividade hemaglutinante, indicando a presença dessas proteínas (Dodd; Maclellan; Hawkins, 1968). Desde então, investigações subsequentes têm demonstrado que lectinas estão amplamente distribuídas entre diferentes táxons de esponjas (Andrade *et al.*, 2025; Carneiro *et al.*, 2017; Carneiro *et al.*, 2013; Carneiro *et al.*, 2019; Torres *et al.*, 2025).

As lectinas de esponjas marinhas apresentam uma notável diversidade estrutural e funcional (Elumalai; Lakshmi, 2022). Estas proteínas podem variar significativamente em termos de massa molecular, composição de subunidades, especificidade por carboidratos, dependência de íons metálicos e estabilidade frente a diferentes condições (Almeida *et al.*, 2023; Andrade *et al.*, 2025; Carneiro *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2020).

As lectinas de esponjas marinhas podem ser classificadas em diferentes famílias, incluindo lectinas do tipo C (cuja atividade de ligação a carboidratos pode envolver a presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$ ), galectinas (com afinidade por  $\beta$ -galactosídeos), taquilectinas (com domínios repetidos), além de lectinas que apresentam novos motivos estruturais ainda não atribuídos a famílias estabelecidas. Essa diversidade estrutural reflete a complexidade funcional dessas proteínas e sugere múltiplas origens evolutivas (Elumalai; Lakshmi, 2022; Gupta, 2012; Wang; Vasta; Wang, 2020).

Classificadas como proteínas de reconhecimento de padrões (PRPs), as lectinas de esponjas marinhas possuem a habilidade de identificar e se ligar a estruturas de glicanos encontradas na superfície de patógenos, conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PMAPs) (Wang, *et al.*, 2018). Essa interação desencadeia respostas imunes celulares e humorais, além disso, as lectinas participam ativamente da opsonização de microrganismos invasores, contribuindo significativamente para a defesa do hospedeiro (Elumalai; Lakshmi, 2022; Gardères *et al.*, 2015; Vasta, 2016).

Com um amplo espectro de aplicações, as lectinas podem ser empregadas em estudos estruturais, biologia molecular e celular, imunologia, farmacologia e medicina. Em

particular, lectinas e outras proteínas derivadas de esponjas marinhas têm se mostrado como possíveis candidatas para a criação de novos medicamentos, exibindo uma diversidade de efeitos biológicos como atividades antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, antifúngica, antitumoral e anticâncer (Ahmmed *et al.*, 2022; Andrade *et al.*, 2025; Carneiro *et al.*, 2024; Mehbub *et al.*, 2024; Santi Martignago *et al.*, 2025).

Nesse contexto, o estudo de lectinas isoladas de esponjas marinhas tem contribuído significativamente para a compreensão dos mecanismos de reconhecimento molecular em metazoários basais, além de fornecer subsídios para a caracterização de novas proteínas com propriedades bioquímicas e estruturais singulares. Essa diversidade justifica o interesse contínuo na investigação de lectinas provenientes desses organismos, especialmente aquelas ainda não plenamente classificadas (Gardères *et al.*, 2015).

### ***1.2.2.1 Galectinas de esponjas marinhas***

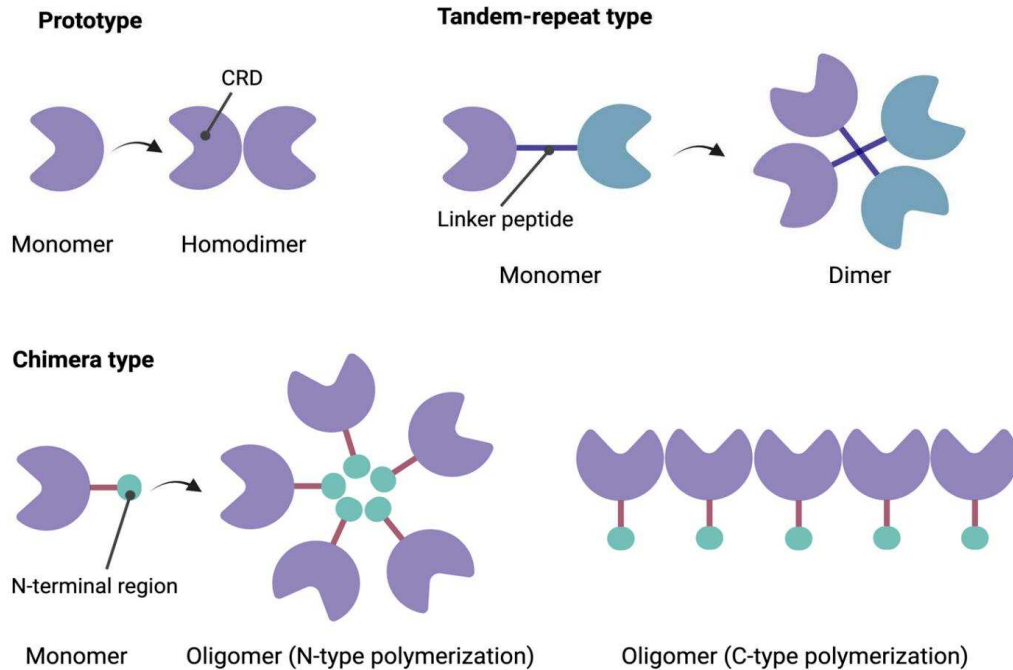
Entre as lectinas descritas em esponjas marinhas, as galectinas constituem uma das famílias mais bem caracterizadas do ponto de vista estrutural. Essas proteínas são definidas pela afinidade específica por  $\beta$ -galactosídeos e pela presença de domínios de reconhecimento de carboidratos (DRCs) estruturalmente conservados, semelhantes aos observados em galectinas de outros metazoários, o que sugere a conservação evolutiva desses domínios ao longo da diversificação animal (Vasta; Ahmed, 2008; Radhakrishnan *et al.*, 2023). Além disso, a conservação estrutural das galectinas em esponjas indica que mecanismos de reconhecimento glicídico mediados por essas proteínas já estavam estabelecidos em organismos basais, possivelmente desempenhando funções essenciais em processos de adesão celular, reconhecimento molecular e defesa.

Do ponto de vista estrutural, as galectinas podem ser organizadas em três arquiteturas principais: galectinas do tipo proto, formadas por um único DRC cujos monômeros são capazes de se associar em dímeros; galectinas do tipo tandem-repeat, caracterizadas por dois DRCs distintos conectados por um link peptídico; e galectinas do tipo quimera, que apresentam um DRC associado a uma região N-terminal que pode estar envolvida em processos de oligomerização (Bertuzzi *et al.*, 2021; Cummings *et al.*, 2022; Vasta, 2016) (Figura 4).

Essas diferentes arquiteturas estruturais estão diretamente relacionadas à multivalência e à dinâmica de interação com glicoconjugados, influenciando a especificidade e a estabilidade das interações proteína-carboidrato. Assim, a diversidade organizacional

observada nessa família contribui para a ampliação do repertório funcional das galectinas em distintos contextos biológicos (Cummings *et al.*, 2022).

Figura 4 – Organização estrutural das galectinas e suas principais arquiteturas



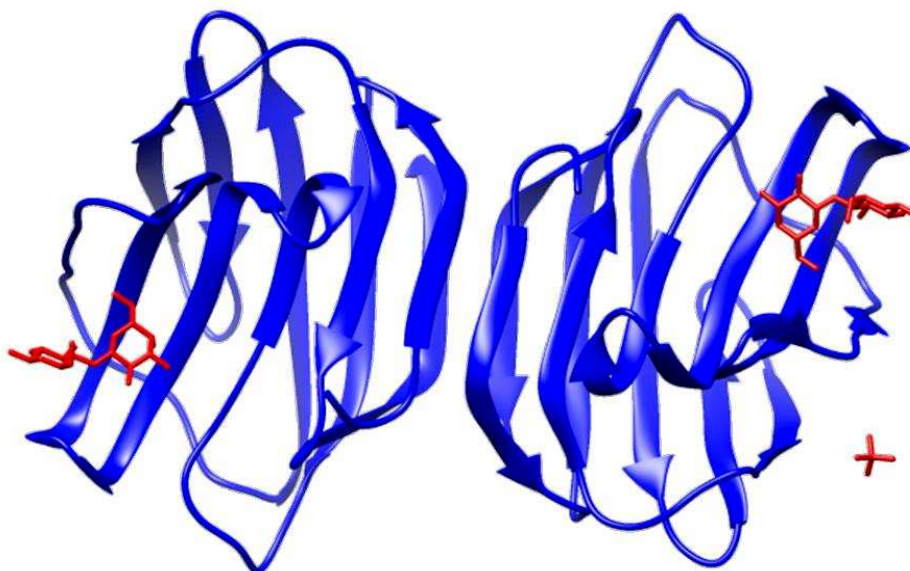
Fonte: O esquema ilustra os principais arranjos estruturais das galectinas: (i) tipo proto, com um único domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) e capacidade de formar homodímeros; (ii) tipo *tandem-repeat*, constituído por dois DRCs conectados por um peptídeo ligante; e (iii) tipo quimera, composto por um DRC associado a uma região N-terminal envolvida em processos de oligomerização. Adaptado de Arco *et al.* (2024).

Nas galectinas do tipo quimera, a oligomerização pode ocorrer por diferentes mecanismos estruturais. Na denominada oligomerização do tipo N (*N-type polymerization*), a associação entre monômeros é mediada predominantemente pela região N-terminal, que promove interações proteína-proteína independentes do sítio de reconhecimento de carboidratos, resultando na formação de estruturas multivalentes. Por outro lado, na oligomerização do tipo C (*C-type polymerization*), a associação ocorre por interfaces envolvendo o próprio DRC, conduzindo à organização de dímeros ou arranjos lineares mediados pelo domínio lectínico (Bertuzzi *et al.*, 2021; Cummings *et al.*, 2022).

Essas diferentes arquiteturas estruturais modulam propriedades como multivalência, estabilidade das interações proteína-carboidrato e dinâmica de interação com glicoconjugados, aspectos relevantes para o reconhecimento molecular em ambientes marinhos complexos (Gardères *et al.*, 2015; Radhakrishnan *et al.*, 2023).

Do ponto de vista molecular, o DRC das galectinas apresenta uma arquitetura altamente conservada, composta por um arranjo do tipo  $\beta$ -sanduíche formado por folhas  $\beta$  antiparalelas, responsável pela ligação específica a  $\beta$ -galactosídeos. Estruturas cristalográficas de galectinas de vertebrados, como a galectina-1 humana, têm sido amplamente utilizadas como modelos estruturais para a compreensão dessa organização conservada (Figura 5), fornecendo subsídios para inferências estruturais em galectinas de organismos basalmente divergentes, incluindo esponjas marinhas (Barondes *et al.*, 1994; López-Lucendo *et al.*, 2004).

Figura 5 – Estrutura cristalográfica do domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) de galectina-1 humana, evidenciando a arquitetura  $\beta$ -sanduíche conservada típica das galectinas



Fonte: A estrutura tridimensional evidencia o dobramento formado por folhas  $\beta$  antiparalelas organizadas em duas lâminas, característico do domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) das galectinas. A proteína está representada em *cartoon* (azul), enquanto os ligantes de carboidrato estão destacados em vermelho, indicando a região funcional de interação proteína-carboidrato. Adaptado de López-Lucendo *et al.* (2004).

Além da conservação do dobramento  $\beta$ -sanduíche, o domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) das galectinas apresenta resíduos altamente conservados envolvidos diretamente na interação com  $\beta$ -galactosídeos. Esses aminoácidos constituem uma assinatura molecular característica da família, preservada ao longo da evolução e essencial para o reconhecimento glicídico específico (Figura 6) (Cummings *et al.*, 2022).

Figura 6 – Resíduos conservados no sítio de ligação das galectinas

```

Galectin-1  41      * * *          56      *          * 71* *
-NLCLHFNPRFNAHGD-----ANTIVCNSSKD-GGAWG-TEQRE-
Galectin-2  -KLNLHFNPRFSD-----ESTIVCNSLD-GSNWG-QEQRE-
Galectin-3  -DVAFHFNPRFENN-----RRVIVCNTKL-DNNWG-REERQ-
Galectin-4  -DVAFHFNPRFDG-----WDKVVFNTLQ-GGKWG-SEERK- N-Terminal
              -DIALHINPRMG-----NGTVVRNSL-NGSWG-SEEKK- C-Terminal
Galectin-7  -DAALHFNPRLD-----TSEVVFNSKE-QGSWG-REERG-

```

Fonte: Alinhamento destacando resíduos conservados envolvidos na ligação a  $\beta$ -galactosídeos em diferentes galectinas. Adaptado de Cummings *et al.* (2022).

Em esponjas marinhas, galectinas têm sido associadas a processos de reconhecimento celular, interação com microrganismos simbiotes e possíveis mecanismos de defesa inata. Evidências estruturais indicam que, embora compartilhem características gerais com galectinas de vertebrados, essas proteínas podem apresentar particularidades quanto à organização oligomérica e à dinâmica de associação, refletindo adaptações específicas ao ambiente marinho (Vasta, 2011; Wang; Vasta, 2020).

A galectina ALL (*Aplysina lactuca lectin*), isolada da esponja *Aplysina lactuca*, constitui um dos exemplos mais bem caracterizados desse grupo em Porifera. Essa lectina ocorre na forma de um homotetrâmero e apresenta o dobramento típico do tipo  $\beta$ -sanduíche, característico das galectinas. Estudos estruturais e de sequenciamento revelaram ainda a existência de duas isoformas distintas, ALL-a e ALL-b, cujas sequências primárias completas foram determinadas (Carneiro *et al.*, 2017; Duarte *et al.*, 2023).

Entre os modelos clássicos, destaca-se a galectina GCG (*Geodia cydonium galectin*), amplamente utilizada como referência para estudos estruturais em esponjas marinhas. Essa lectina apresenta organização do tipo proto, com três isoformas principais (13, 15 e 16 kDa), capazes de formar dímeros e tetrâmeros. Embora preserve o arcabouço estrutural típico das galectinas, a GCG exibe particularidades oligoméricas que a diferenciam das galectinas de vertebrados, sendo frequentemente discutida como um possível representante ancestral dessa família (Stalz *et al.*, 2006).

A CCL, uma galectina estruturalmente caracterizada a partir da esponja *Chondrilla caribensis*, apresenta arquitetura estrutural do tipo  $\beta$ -sanduíche altamente conservada. A estrutura primária completa de CCL, composta por 142 aminoácidos, revelou a presença de motivos assinatura característicos de galectinas, embora com modificações específicas em resíduos conservados, sugerindo adaptações funcionais associadas ao ambiente marinho (Sousa *et al.*, 2021).

Outro exemplo relevante é a galectina HOL-30, isolada da esponja marinha *Halichondria okadaï*. Essa lectina foi caracterizada como uma galectina do tipo *tandem-repeat*, contendo dois DRCs organizados em uma única cadeia polipeptídica e apresentando estrutura secundária predominantemente composta por folhas  $\beta$ , compatível com o dobramento típico das galectinas. A arquitetura tandem-repeat confere à HOL-30 propriedades de multivalência, ampliando seu potencial de reconhecimento glicídico e sua atuação em processos de reconhecimento molecular e imunidade inata em esponjas marinhas (Ohkawa *et al.*, 2025).

Recentemente, uma nova proto-galectina foi caracterizada a partir da esponja *Aiolochoiria crassa*, denominada AcrL. A modelagem estrutural confirmou sua classificação como proto-galectina e revelou um sítio de ligação a carboidratos estruturalmente ampliado, capaz de acomodar glicanos complexos, em especial aqueles contendo resíduos terminais de ácido siálico (Torres *et al.*, 2025).

A ocorrência de galectinas em organismos basalmente divergentes, como as esponjas, reforça a hipótese de que essa família representa um sistema ancestral de reconhecimento molecular. Nesse contexto, a caracterização estrutural de galectinas isoladas de esponjas marinhas, como a ApL-1, torna-se particularmente relevante para compreender como diferentes arranjos oligoméricos podem influenciar propriedades bioquímicas e funcionais dessas lectinas.

#### ***1.2.2.2 Lectinas de esponjas marinhas sem classificação definida***

Apesar dos avanços na caracterização bioquímica e estrutural de lectinas isoladas de esponjas marinhas, uma parcela expressiva dessas proteínas ainda não pode ser adequadamente atribuída às famílias clássicas de lectinas descritas na literatura. Essa limitação está associada, principalmente, à ausência de informações completas sobre suas sequências, à identificação incompleta de domínios estruturais conservados e à escassez de dados detalhados sobre seus mecanismos de reconhecimento de carboidratos, que constituem critérios centrais para a classificação dessas proteínas (Ahmed *et al.*, 2022; Gardères *et al.*, 2015).

Lectinas sem classificação definida têm sido relatadas em diferentes espécies de esponjas marinhas e, em muitos casos, exibem propriedades bioquímicas singulares, incluindo massas moleculares atípicas, especificidade incomum por ligantes glicídicos e organizações estruturais distintas daquelas observadas em lectinas canônicas. Tais características sugerem a possível existência de novos domínios de reconhecimento de carboidratos ou de variações

estruturais ainda não descritas nos sistemas de classificação atualmente estabelecidos (Gardères *et al.*, 2015).

A lectina ACL, purificada de *Aplysina cauliformis*, foi descrita sob a forma de duas isoformas oligoméricas de alta massa molecular (ACL-1 e ACL-2), sem correspondência com famílias clássicas de lectinas animais, reforçando a existência de arquiteturas lectínicas não convencionais em Porifera (Viana, 2021).

De forma semelhante, a lectina AfIL, isolada de *Aplysina fistularis*, teve sua estrutura primária parcialmente determinada por espectrometria de massas, não apresentando similaridade com lectinas animais previamente caracterizadas, o que dificulta seu enquadramento nas famílias clássicas de lectinas descritas na literatura (Andrade *et al.*, 2025).

Outros exemplos incluem as lectinas Halilectin-2 e Halilectin-3, isoladas de *Haliclona caerulea*, que apresentam estruturas oligoméricas complexas e ausência de similaridade de sequência com galectinas, lectinas tipo C ou siglecs, sendo classificadas como lectinas animais não convencionais (Carneiro *et al.*, 2013a; Carneiro *et al.*, 2013b).

Um exemplo adicional é a lectina CvL, isolada da esponja marinha *Cliona varians*. Essa proteína foi caracterizada como uma lectina funcionalmente ativa, apresentando propriedades hemaglutinantes e atividade antibacteriana, porém sem similaridade de sequência ou enquadramento estrutural em famílias clássicas de lectinas animais. A ausência de domínios de reconhecimento de carboidratos característicos de galectinas, lectinas tipo C ou siglecs reforça seu enquadramento como uma lectina animal não convencional em Porifera (Moura *et al.*, 2006).

De modo semelhante, a lectina CauL, isolada de *Craniella australiensis*, apresenta organização trimérica singular, se colocando fora das famílias clássicas de lectinas descritas até o momento (Xiong *et al.*, 2006).

Nesse contexto, a caracterização de lectinas isoladas de esponjas marinhas que não se enquadram claramente em famílias conhecidas, como a ApL-2, assume relevância particular.

A análise integrada de suas propriedades bioquímicas, estruturais e funcionais pode contribuir para a compreensão de seus papéis biológicos e para a ampliação dos modelos conceituais utilizados na classificação de lectinas em invertebrados marinhos (Gardères *et al.*, 2015).

### 1.3 Lectinas do gênero *Aplysina*

As esponjas do gênero *Aplysina* têm sido amplamente investigadas devido à sua capacidade de produzir uma diversidade de biomoléculas, entre as quais se destacam as lectinas. Estudos voltados à bioprospecção dessas proteínas nesse gênero têm revelado moléculas com características bioquímicas e estruturais singulares, contribuindo de forma significativa para o entendimento da diversidade molecular das lectinas em Porifera (Carneiro *et al.*, 2017, 2019; Duarte *et al.*, 2023; Andrade *et al.*, 2025).

Até o presente momento, seis lectinas foram isoladas de esponjas do gênero *Aplysina*, pertencentes às espécies *A. archeri*, *A. lacunosa*, *A. lactuca*, *A. fulva*, *A. cauliformis* e *A. fistularis* (Andrade *et al.*, 2025; Carneiro *et al.*, 2017; Carneiro *et al.*, 2019; Miarons; Fresno, 2000; Viana, 2021)

As lectinas AaL, de *A. archeri*, e ALL, de *A. lacunosa*, foram isoladas utilizando uma combinação de cromatografia de afinidade e cromatografia de exclusão molecular. Ambas apresentaram afinidade por galactosídeos não redutores. Por meio de SDS-PAGE a massa molecular de suas subunidades foi estimada em aproximadamente 16 kDa, tanto em condições redutoras quanto não redutoras, sendo que, no estado nativo, essas lectinas formam estruturas homotetraméricas com massa total estimada em 63 kDa (Miarons; Fresno, 2000). Ambas as lectinas, AIL e AaL, dependem da presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  para expressão de sua atividade biológica. A AaL demonstrou atividade hemaglutinante frente a eritrócitos do sistema ABO (Miarons; Fresno, 2000).

A lectina isolada de *A. lactuca* (ALL) foi purificada inicialmente por precipitação com sulfato de amônio, seguida de cromatografia de afinidade utilizando uma matriz de goma guar (Carneiro *et al.*, 2017). A proteína apresentou atividade hemaglutinante sobre eritrócitos humanos (tipos A, B e O) e de coelho, tanto nativos quanto previamente tratados com enzimas proteolíticas. A atividade hemaglutinante foi inibida por açúcares simples como D-galactose,  $\alpha$ -lactose, lactulose, além da glicoproteína mucina estomacal suína, indicando especificidade da lectina por galactosídicos (Carneiro *et al.*, 2017). Em relação à sua estrutura, a ALL é um homotetrâmero de aproximadamente 60 kDa, composto por quatro subunidades de cerca de 15 kDa (Duarte *et al.*, 2023). Embora estudos anteriores (Carneiro *et al.*, 2017) tenham estimado uma massa molecular de  $31.810 \pm 2$  Da por espectrometria de massa, indicando uma possível forma dimérica, a caracterização mais recente e detalhada (Duarte *et al.*, 2023) estabelece a organização tetramérica como a estrutura funcional da lectina.

AFL, isolada de *A. fulva*, é uma lectina cuja massa molecular aparente em SDS-PAGE, sob condições redutoras, é de aproximadamente 15 kDa, com bandas adicionais em torno de 30 kDa. Em condições não redutoras, apresenta bandas de 30 kDa e 70 kDa. A análise por MALDI-ToF indicou um íon principal de  $31.652 \pm 5$  Da, sugerindo um dímero de subunidades ligadas por pontes dissulfeto. Sua atividade hemaglutinante não é afetada por cátions divalentes ou EDTA. A especificidade de ligação da AFL é inibida por galactose, L-ramnose, lactose e lactulose (com MIC de 50 mM), e potentemente inibida por mucina de estômago suíno (PSM) (com MIC de 8  $\mu\text{g/mL}$ ). A lectina é estável em temperaturas de até 70 °C e possui um pH ótimo na zona alcalina (Carneiro *et al.*, 2019).

A ACL, lectina isolada de *A. cauliformis*, foi purificada por meio de combinação de cromatografia de afinidade, troca iônica e exclusão molecular. A ACL apresentou uma banda de aproximadamente 66 kDa em condições não redutoras e duas bandas de aproximadamente 30 e 35 kDa em condições redutoras. Por cromatografia de exclusão molecular, foram detectadas e separadas duas lectinas, ACL-1 e ACL-2, com massas nativas de 145 kDa e 120 kDa, respectivamente (Viana, 2021). A ACL demonstrou atividade hemaglutinante contra eritrócitos humanos, sendo inibida por N-acetil-galactosamina,  $\alpha$ -lactose, L-fucose, arabinose e  $\beta$ -metil-tiogalactosídeo. A ACL é independente de íons divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) e é estável em pH neutro a alcalino (com pico de atividade em pH 9 e 10) e temperaturas até 80 °C (Viana, 2021).

Por fim, a lectina AfIL, isolada de *A. fistularis*, apresentou em SDS-PAGE, na ausência de agentes redutores, uma única banda de aproximadamente 70 kDa, enquanto, na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, foram observadas duas bandas em torno de 30 kDa. Estudos de especificidade indicaram afinidade por galactosídeos complexos, além de interações com lipopolissacarídeos e ácidos teicoicos, sugerindo um reconhecimento dirigido a componentes estruturais da superfície celular (Andrade *et al.*, 2025).

Diante desse panorama, observa-se que as lectinas do gênero *Aplysina* apresentam ampla diversidade bioquímica e estrutural, incluindo variações em massa molecular, organização oligomérica, dependência de íons divalentes, estabilidade físico-química e especificidade por diferentes glicanos. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo purificar e caracterizar bioquímica e estruturalmente duas novas lectinas isoladas da esponja marinha *Aplysina pseudolacunosa*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Purificar e realizar a caracterização bioquímica e estrutural de duas lectinas isoladas da esponja marinha *Aplysina pseudolacunosa*, avaliando suas propriedades de reconhecimento de carboidratos e seus parâmetros físico-químicos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer o protocolo de extração e purificação das lectinas ApL-1 e ApL-2 a partir de extratos aquosos da esponja marinha *Aplysina pseudolacunosa*.
- Determinar a atividade hemaglutinante das lectinas ApL-1 e ApL-2, bem como sua especificidade por carboidratos e glicoproteínas, por meio de ensaios de inibição da hemaglutinação.
- Realizar a caracterização bioquímica das lectinas ApL-1 e ApL-2, incluindo a análise do perfil eletroforético (SDS-PAGE), a dependência de íons cálcio e a avaliação da estabilidade frente a diferentes valores de pH e temperatura.
- Investigar a estrutura secundária e estabilidade conformacional das lectinas ApL-1 e ApL-2 por meio de dicroísmo circular (DC).
- Avaliar o comportamento hidrodinâmico e o estado oligomérico das lectinas ApL-1 e ApL-2 por meio de espalhamento dinâmico de luz (DLS).
- Determinar a estrutura primária das lectinas ApL-1 e ApL-2 por espectrometria de massas (MS/MS), seguida de análise de similaridade e predição estrutural por ferramentas *in silico*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta da esponja

Espécimes da esponja marinha *Aplysina pseudolacunosa* foram coletadas por meio de mergulho autônomo no Parque Estadual Marinho da Pedra da Risca do Meio, Fortaleza, Ceará, Brasil. Os exemplares foram transportados em caixas térmicas para o laboratório e armazenados a -20 °C para uso posterior. Todas as coletas e seu acesso genético foram autorizadas e certificadas pelos órgãos ambientais responsáveis (SISBIO ID: 33913-14 e SISGEN ID: A1792FE).

#### 3.2 Purificação das lectinas

A partir da coleta, as amostras foram pesadas, cortadas em pedaços pequenos, maceradas e homogeneizadas em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6; contendo NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM e L-cisteína 1 mM (TBS/Cys), na proporção de 1:2 (p/v). O extrato homogeneizado foi filtrado em tecido de nylon para retenção de partículas grandes e, posteriormente, foi centrifugado a 9000 xg, por 20 minutos, a 4 °C.

O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi então submetido à precipitação com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 70% de saturação para precipitação das proteínas. Após 4 horas, a 4 °C, a amostra foi centrifugada a 9000 xg, por 20 minutos a 4 °C. Em seguida, o precipitado foi solubilizado em um pequeno volume de TBS/Cys, novamente centrifugado, e submetido a cromatografia de afinidade em matriz de goma de guar, previamente equilibrada com o tampão de extração. A fração não retida foi eluída com o mesmo tampão, enquanto as proteínas ligadas à matriz foram eluídas utilizando tampão glicina 50 mM, pH 2,6, contendo NaCl 150 mM e L-cisteína 1 mM. As frações correspondentes às lectinas (P2) foram reunidas, dialisadas contra água destilada e liofilizadas.

A fração P2 obtida após a cromatografia de afinidade foi concentrada e submetida à cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-UPLC). A análise foi conduzida em sistema UPLC BioAcquity (Waters Corp., EUA), equipado com detector UV ajustado para 280 nm. Antes da aplicação na coluna, as amostras foram centrifugadas a 9.000 xg por 5 min.

As amostras foram aplicadas em coluna de fase reversa C8 Sephasil Peptide (12 µm ST 4,6/250 mm), previamente equilibrada com solução aquosa contendo 5% de acetonitrila

(ACN) e 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA). A eluição foi realizada por meio de gradiente linear de ACN contendo 0,1% de TFA em três etapas. Na primeira etapa de eluição, o gradiente foi de 5-40% de ACN (5% por minuto), a seguir o gradiente empregado foi de 40-70% (1% por minuto), a etapa final de eluição empregou a concentração fixa de 90% de ACN. As frações foram coletadas manualmente e a absorbância a 280 nm foi monitorada. As frações coletadas manualmente foram submetidas a evaporação em concentrador a vácuo, para remoção dos solventes orgânicos, e posteriormente foram avaliadas quanto à atividade hemaglutinante. As proteínas purificadas foram denominadas ApL-1 e ApL-2.

Durante o processo de purificação, as frações obtidas até a etapa da cromatografia de afinidade foram submetidas à determinação da concentração de proteínas totais solúveis pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

### 3.3 Avaliação da atividade hemaglutinante e inibição

Os ensaios de atividade hemaglutinante foram realizados utilizando eritrócitos de coelhos mantidos no Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará. As coletas são regulamentadas e autorizadas pelos órgãos competentes (CEUA nº 2211202101). Os testes foram realizados com eritrócitos de coelho, seguindo o método da diluição seriada, em placas de microtitulação de fundo em “V”, segundo a metodologia de Sampaio *et al.* (1998).

Para o teste de inibição da atividade hemaglutinante, segundo metodologia previamente estabelecida (Sampaio *et al.*, 1998), foram utilizados os seguintes açúcares simples (100 mM) e glicoproteínas (250 µg.mL<sup>-1</sup>), ambos submetidos a diluições seriadas em base dois:

D-xilose (100 mM), D-ribose (100 mM), L-fucose (100 mM), L-arabinose (100 mM), L-ramnose (100 mM), D-galactose (100 mM), D-manose (100 mM), D-glicose (100 mM), D-glucosamina (100 mM), D-galactosamina (100 mM), N-acetil-D-glucosamina (100 mM), N-acetil-D-galactosamina (100 mM), N-acetil-D-manosamina (100 mM), ácido D-galacturônico (100 mM), D-frutose (100 mM), sacarose (100 mM), melibiose (100 mM), lactose  $\alpha$  (100 mM), lactose  $\beta$  (100 mM), lactulose (100 mM), maltose (100 mM), rafinose (100 mM), metil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo (100 mM), metil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (100 mM), metil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (100 mM), fenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (100 mM), 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo (100 mM), 2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (100 mM),  $\alpha$ -metil-D-manosídeo (100 mM); transferrina humana (250 µg.mL<sup>-1</sup>), asialofetuína bovina (250

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), tireoglobulina suína ( $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), mucina gástrica suína tipo II (PSM-II) ( $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), mucina gástrica suína tipo III (PSM-III) ( $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), mucina submaxilar bovina ( $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e fetuína bovina ( $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir completamente a hemaglutinação visível.

### 3.4 Caracterização bioquímica das lectinas

O efeito de íons divalentes na atividade hemaglutinante foi avaliado através da presença de  $\text{CaCl}_2$  e EDTA conforme descrito por Sampaio *et al.* (1998), utilizando placas de microtitulação em V. Para avaliar a estabilidade das proteínas frente a variações de pH, as lectinas ApL-1 e ApL-2 ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foram solubilizadas em NaCl 0,15 M e diluídas em tampões de diferentes valores de pH (acetato de sódio 100 mM, pH 4 e pH 5; fosfato de sódio 100 mM, pH 6; Tris 100 mM, pH 7 e pH 8; glicina 100 mM, pH 9 e pH 10), todos contendo NaCl 0,15 M, seguida da determinação da atividade hemaglutinante.

Para avaliar o efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante das lectinas ApL-1 e ApL-2, amostras das proteínas, solubilizadas em NaCl 150 mM, foram aquecidas por 1 h em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C) e, posteriormente, submetidas aos testes de atividade hemaglutinante em tampão TBS, conforme descrito por Sampaio *et al.* (1998).

### 3.5 Análise de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi realizada para avaliar o comportamento hidrodinâmico das lectinas ApL-1 e ApL-2. As lectinas ApL-1 e ApL-2 foram solubilizadas em água ultrapura (Milli-Q) em uma concentração final de  $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Antes da análise, todas as amostras foram centrifugadas a  $10.000 \text{ xg}$  por 20 min, a 4 °C, para remoção de agregados insolúveis e partículas em suspensão.

Os sobrenadantes resultantes foram transferidos para cubetas de poliestireno limpas, e as medições de DLS foram realizadas a 25 °C utilizando um equipamento Zetasizer Advance Ultra (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). As distribuições de diâmetro hidrodinâmico foram calculadas a partir das funções de autocorrelação de intensidade, utilizando o modelo de análise de propósito geral fornecido pelo fabricante. Cada condição foi

medida em triplicata, e cada medição representou a média de múltiplas varreduras. Os procedimentos experimentais foram realizados conforme métodos previamente estabelecidos (Lorber *et al.*, 2012; Saraiva, 2025).

### 3.6 Estimativa de massa molecular

A pureza, homogeneidade e estimativa da massa molecular aparente das lectinas ApL-1 e ApL-2 foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE), corado com Coomassie Brilliant Blue R-250, conforme descrito por Laemmli (1970). A estimativa da massa molecular foi realizada por correlação da migração eletroforética das proteínas com marcadores de massa molecular conhecida.

Foram utilizados dois sistemas de referência para estimativa de massa molecular. No primeiro, empregou-se um marcador caseiro composto por lectina de *Chondrilla caribensis* (15 kDa), lectina recombinante de *Solieria filiformis* (30 kDa) e albumina sérica bovina (66 kDa). No segundo, utilizou-se um marcador comercial contendo as seguintes proteínas padrão: albumina sérica bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), tripsinogênio (24 kDa),  $\alpha$ -lactalbumina (14,2 kDa) e aprotinina (6,5 kDa).

As amostras foram analisadas sob condições redutoras e não redutoras, na presença ou ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol, respectivamente. A corrida eletroforética foi realizada a 150 V e 25 mA por aproximadamente 1 hora.

### 3.7 Análise de dicroísmo circular

Os estudos espectroscópicos de dicroísmo circular (DC) foram realizados utilizando um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco International Co., Tóquio, Japão), acoplado a um sistema *Peltier* com controle de temperatura. As lectinas ApL-1 e ApL-2 foram solubilizadas em tampão fosfato 20 mM, pH 7,0, na concentração de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , sendo posteriormente adicionadas em cubetas retangulares de quartzo, com caminho óptico de 1 mm e volume total de 400  $\mu\text{L}$ . Os espectros foram adquiridos na faixa de 200 a 250 nm (*far-UV*), com 4 repetições, a uma velocidade de varredura de  $100 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ .

A predição da estrutura secundária foi realizada pelo servidor online BestSel (Micsonai *et al.*, 2015).

### 3.8 Determinação da estrutura primária

#### 3.8.1 Determinação da sequência de aminoácidos

Para a determinação da sequência de aminoácidos, as lectinas purificadas ApL-1 e ApL-2 foram analisadas por espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS). Esse processo envolveu a separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12%, sendo os géis corados com Coomassie Brilliant Blue, conforme descrito por Laemmli (1970).

As bandas proteicas de interesse foram cuidadosamente excisadas do gel e submetidas a um protocolo de descoloração. Em seguida, as proteínas contidas no gel foram reduzidas e alquiladas, conforme metodologia descrita por Shevchenko *et al.* (2007). Para a obtenção de peptídeos, as bandas descoradas foram submetidas à digestão enzimática com tripsina e quimiotripsina.

Essas digestões foram conduzidas em bicarbonato de amônio 25 mM, na proporção enzima/substrato de 1:50 (p/p), mantidas a 37 °C por um período de 18 horas. A reação de digestão foi finalizada com a adição de 2 µL de ácido fórmico a 2%. Os peptídeos resultantes foram extraídos da matriz do gel seguindo o procedimento de Shevchenko *et al.* (2007).

#### 3.8.2 Sequenciamento dos peptídeos obtidos por digestão

Para o sequenciamento dos peptídeos obtidos por digestão, as amostras foram injetadas em uma coluna de fase reversa C18 (100 µm x 100 mm), acoplada a um sistema nanoAcquity (Waters Corporation, MA, EUA). A eluição dos peptídeos ocorreu por meio de um gradiente linear de acetonitrila, contendo 0,1% de ácido fórmico. Os eluatos foram diretamente infundidos em uma fonte de nanoeletrospray, conectada ao espectrômetro de massas (nESI-LC/MSMS).

O espectrômetro de massas foi operado no modo de íons positivos, abrangendo a faixa de massa/carga ( $m/z$ ) de 300 a 3000. As condições de operação incluíram uma voltagem de capilar de 3,5 kV e uma temperatura de fonte de 363 K. As análises de LC-MS/MS foram conduzidas empregando a função de Análise Dependente de Dados (DDA – *Data Dependent Analysis*), com seleção de íons precursores com estados de carga entre 2<sup>+</sup> e 4<sup>+</sup>, os quais foram

subsequentemente fragmentados por Dissociação Induzida por Colisão (CID), utilizando argônio como gás de fragmentação.

### **3.8.3 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.

### **3.8.4 Análise da sequência de aminoácidos**

A sequência de aminoácido de ApL-1 foi submetida à análise *in silico* utilizando a ferramenta ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005), disponível no servidor ExPASy, com o objetivo de estimar propriedades da proteína, incluindo massa molecular teórica, ponto isoelétrico (pI), composição de aminoácidos, índice de instabilidade, índice alifático e hidropaticidade média (GRAVY).

Já em relação à similaridade de sequência, as lectinas ApL-1 e ApL-2 foram avaliadas *in silico* utilizando a ferramenta BLASTp, disponível online no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), empregando o banco de dados de proteínas, conforme descrito por Madden (2002).

### **3.8.5 Predição estrutural e validação estereoquímica de ApL-1**

A predição da estrutura tridimensional da lectina ApL-1 foi realizada utilizando o servidor AlphaFold2 (Jumper *et al.*, 2021), empregando a sequência de aminoácidos obtida a partir da análise por espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS). O servidor gerou múltiplos modelos estruturais preditos para a proteína, os quais foram avaliados com base nas métricas internas fornecidas pela plataforma, incluindo cobertura de sequência e índices de confiabilidade estrutural.

Para a validação estereoquímica dos modelos obtidos, as estruturas preditas foram analisadas por meio dos servidores MolProbity (Chen *et al.*, 2009) e VoroMQA (Olechnovič; Venclovas, 2017). Os critérios considerados incluíram a distribuição dos resíduos nos gráficos

de Ramachandran, a presença de sobreposições estéricas, a conformação dos rotâmeros e os parâmetros globais de qualidade estrutural.

O modelo que apresentou os melhores indicadores de qualidade estrutural global foi selecionado e submetido à inspeção visual detalhada utilizando o software PyMOL (Schrödinger), para análise da organização tridimensional e identificação dos principais elementos estruturais (Delano, 2002).

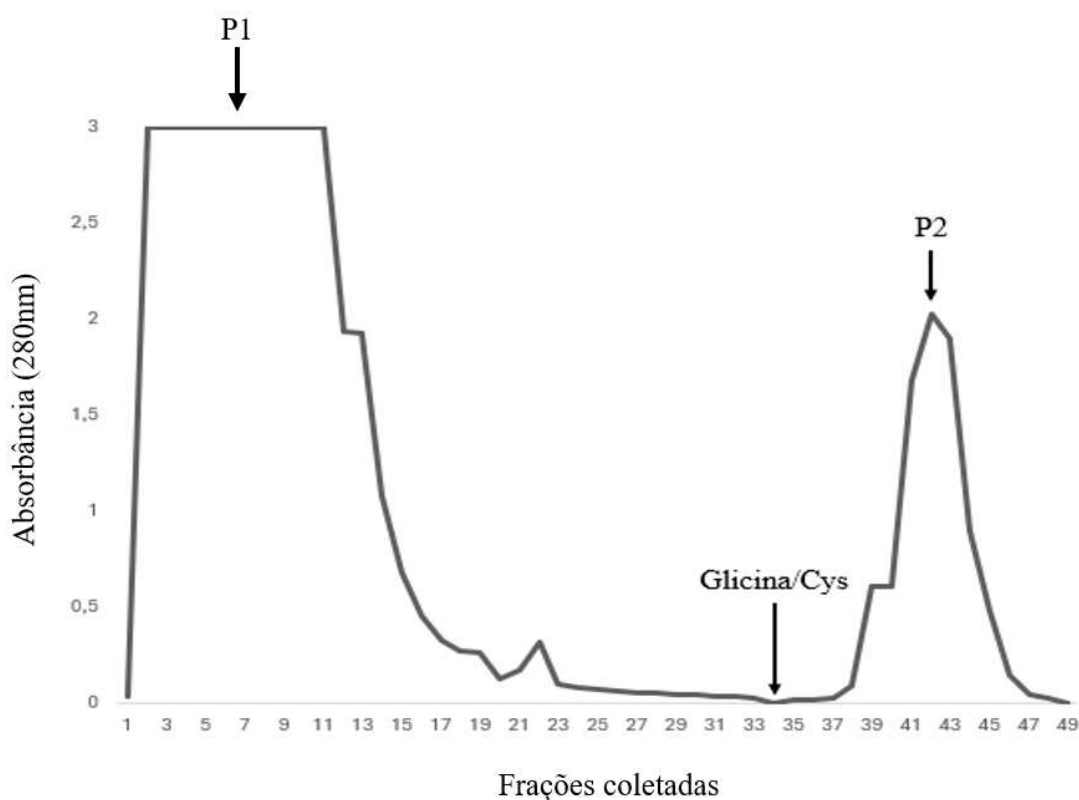
O modelo escolhido foi então submetido a análise da ferramenta HullRad para determinação do raio hidrodinâmico e estimativa do estado oligomérico por comparação com os dados de DLS (Fleming; Fleming, 2018).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Purificação inicial e obtenção da fração lectínica P2

As lectinas presentes no extrato bruto foram concentradas por precipitação com sulfato de amônio (0–70%), e a fração obtida foi submetida à cromatografia de afinidade em matriz de goma de guar. Após a eluição, foi observado um pico cromatográfico contendo atividade hemaglutinante, o qual foi denominado P2. (Figura 7).

Figura 7 – Cromatografia de afinidade em matriz de goma de guar da fração 0-70 do sulfato de amônio do extrato de *A. pseudolacunosa*



Fonte: O autor. Cromatografia de afinidade em coluna de Goma de Guar, equilibrada com Tris 20 mM, NaCl, 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM e L-cisteína 1mM e pH 7,6. A coluna foi eluída com glicina 50 mM, NaCl 150 mM, Cisteína 1 mM e pH 2,6. No pico de absorbância designado de “P2”, referente às lectinas, foram coletadas frações contendo 2 mL correspondentes aos tubos 39 ao 46. O fluxo foi mantido a 2 mL.min<sup>-1</sup>.

A quantificação de proteína pelo método de Bradford (Bradford, 1976) revelou uma concentração no extrato bruto de 0,86 mg.mL<sup>-1</sup>. Na fração 0-70, a concentração de proteínas foi de 1,41. Já para a fração coletada da cromatografia de afinidade (P2), a concentração de proteínas foi de 0,37 mg.mL<sup>-1</sup> (Tabela 1).

Tabela 1 – Sumário do processo de purificação das lectinas de *Aplysina pseudolacunosa*, desde o extrato bruto até a fração P2

<b>Fração</b>	<b>Volume (mL)</b>	<b>Título U.H.mL<sup>-1</sup></b>	<b>[Pro] mg/mL</b>	<b>Proteína total (mg)</b>	<b>U.H. Total</b>	<b>Atividade específica (U.H.mg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Purificação (vezes)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
<b>Extrato bruto</b>	430	8.192	0,86	369,8	3.522.560	9.525,58	1	100
<b>0-70</b>	90	32.768	1,41	126,9	2.949.120	23.246,45	2,44	83,72
<b>P2</b>	156	4.096	0,37	57,72	638.976	16.068,9	1,16	34,66

Fonte: O autor.

#### 4.1.1 Atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante das frações selecionadas foram avaliadas frente a eritrócitos de coelho. A amostra coletada da cromatografia de afinidade apresentou atividade hemaglutinante de 2.048 U.H.mL<sup>-1</sup> no P1 e 4.096 U.H.mL<sup>-1</sup> no P2 (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividade hemaglutinante das frações obtidas, desde o extrato bruto até a fração P2

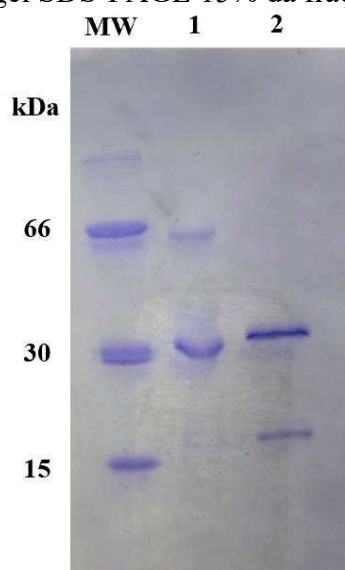
Fração	U.H.mL <sup>-1</sup>
Extrato bruto	8.192
Fração 0-70	32.768
P1	2.048
P2	4.096

Fonte: O autor. A atividade hemaglutinante foi realizada com eritrócitos de coelho nativo. A atividade foi expressa como título de hemaglutinação (U.H.mL<sup>-1</sup>.)

#### 4.1.2 Estimativa da massa molecular

A análise da fração P2 por SDS-PAGE (15%) revelou a presença de duas bandas proteicas principais, com massas moleculares aparentes de aproximadamente 15 kDa e 30 kDa, sugerindo a presença de duas lectinas na amostra. (Figura 8).

Figura 8 – Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% da fração P2 de *A. pseudolacunosa*



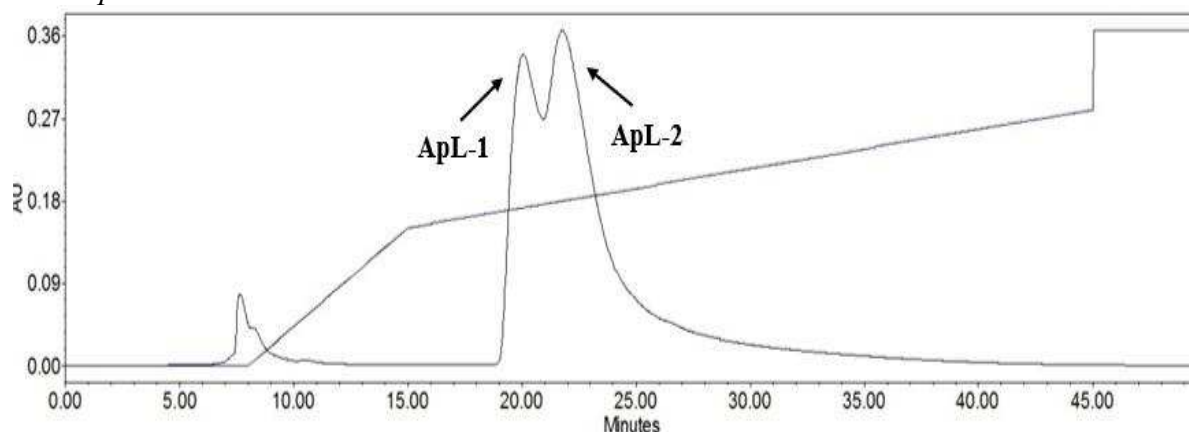
Fonte: O autor. MW: Marcador molecular: lectina de *Chondrilla caribensis*, 15 kDa; lectina recombinante de *Solieria filiformis*, 30 kDa; albumina sérica bovina, 66 kDa. 1: ApL sem agente redutor β-mercaptoetanol. 2: ApL com agente redutor, eluído com tampão Tris 20 Mm, NaCl, 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM e L-cisteína 1mM e pH 7,6.

Em condições não redutoras, a ApL-1 apresentou massa molecular aparente de aproximadamente 30 kDa e a ApL-2 em torno de 60 kDa. Sob condições redutoras, as massas aparentes foram reduzidas para aproximadamente 15 kDa e 30 kDa, respectivamente.

#### 4.2 Separação das lectinas por cromatografia de fase reversa

O perfil cromatográfico revelou a presença de dois picos principais bem definidos, eluídos em tempos de retenção distintos, indicando a separação de duas proteínas com diferentes propriedades hidrofóbicas (Figura 9). As frações correspondentes a cada pico foram coletadas individualmente e analisadas quanto à atividade hemaglutinante e ao perfil eletroforético.

Figura 9 – Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-UPLC) da fração P2 de *A. pseudolacunosa*



Fonte O autor. Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-UPLC) da fração P2 de *Aplysina pseudolacunosa*, realizada em coluna de fase reversa C8 e monitorada a 280 nm. A eluição ocorreu por gradiente de acetonitrila em presença de ácido trifluoroacético, resultando na separação de dois picos principais com tempos de retenção distintos. Os picos indicados correspondem às lectinas ApL-1 e ApL-2, cujas frações foram coletadas individualmente nos respectivos tempos de retenção e posteriormente concentradas para análises subsequentes.

A análise posterior dessas frações por SDS-PAGE demonstrou que cada pico cromatográfico correspondia predominantemente a uma única banda proteica, com massas moleculares aparentes de aproximadamente 15 kDa e 30 kDa, na presença de um agente redutor. Com base nesses resultados, as lectinas isoladas, ApL-1 e ApL-2, respectivamente, foram utilizadas nas etapas posteriores de caracterização bioquímica e estrutural.

### 4.3 Caracterização bioquímica das lectinas ApL-1 e ApL-2

#### 4.3.1 Atividade hemaglutinante de ApL-1 e ApL-2

Após evaporação dos solventes, ApL-1 apresentou título hemaglutinante de 32 U.H.mL<sup>-1</sup>, enquanto a ApL-2 exibiu título de 128 U.H.mL<sup>-1</sup>, evidenciando diferenças quantitativas na atividade entre as duas proteínas (Tabela 3).

Tabela 3 – Atividade hemaglutinante das lectinas ApL-1 e ApL-2, após a cromatografia de fase reversa

Fração	U.H.mL <sup>-1</sup>
ApL-1	32
ApL-2	128

Fonte: O autor. A atividade hemaglutinante foi realizada com eritrócitos de coelho nativo. A atividade foi expressa como título de hemaglutinação (U.H.mL<sup>-1</sup>).

#### 4.3.2 Especificidade por carboidratos e glicoproteínas de ApL-1 e ApL-2

A atividade hemaglutinante da lectina ApL-1 foi inibida predominantemente por glicoproteínas. Entre os ligantes avaliados, a fetuína bovina apresentou o maior efeito inibitório, com concentração inibitória mínima (CIM) de 0,98 µg.mL<sup>-1</sup>. A mucina submaxilar bovina (BSM) e a asialofetuína bovina também inibiram a atividade hemaglutinante, ambas com CIM de 15,62 µg.mL<sup>-1</sup>. Em contraste, a tireoglobulina não apresentou efeito inibitório detectável até a maior concentração testada (250 µg.mL<sup>-1</sup>). Da mesma forma, o carboidrato simples lactulose não promoveu inibição mensurável da atividade hemaglutinante nas condições avaliadas (Tabela 4).

Tabela 4 – Inibição da atividade hemaglutinante de ApL-1

Carboidratos	CIM (mM)
Lactulose	NI (≤ 100)
Glicoproteínas	CIM (µg.mL <sup>-1</sup> )
Fetuína	0,98
Mucina submaxilar bovina (BSM)	15,62
Asialofetuína	15,62
Tireoglobulina	NI (≤ 250)

Fonte: O autor. A atividade hemaglutinante foi realizada com eritrócitos de coelho nativo. CIM: Concentração inibitória mínima. NI: não inibiu até a maior concentração testada.

Já em relação a ApL-2, foi constatado a inibição da atividade hemaglutinante na presença de glicoproteínas. Entre os ligantes avaliados, as mucinas gástricas suínas dos tipos II (PSM-II) e III (PSM-III) foram os inibidores mais eficientes, ambas com concentração inibitória mínima (CIM) de 0,98  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Tabela 5). A fetuína bovina e a asialofetuína bovina também inibiram a atividade hemaglutinante, apresentando CIM de 3,91  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , enquanto a mucina submaxilar bovina (BSM) apresentou CIM de 7,81  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Tabela 5).

Tabela 5 – Inibição da atividade hemaglutinante de ApL-2

<b>Carboidratos</b>	<b>CIM (mM)</b>
4-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo	NI ( $\leq 100$ )
$\alpha$ -D-lactose	62,5
Lactulose	NI ( $\leq 100$ )
$\beta$ -D-lactose	62,5
<b>Glicoproteínas</b>	<b>CIM (<math>\mu\text{g.mL}^{-1}</math>)</b>
Fetuína	3,91
Mucina submaxilar bovina (BSM)	7,81
Asialofetuína	3,91
PSM-II	0,98
PSM-III	0,98

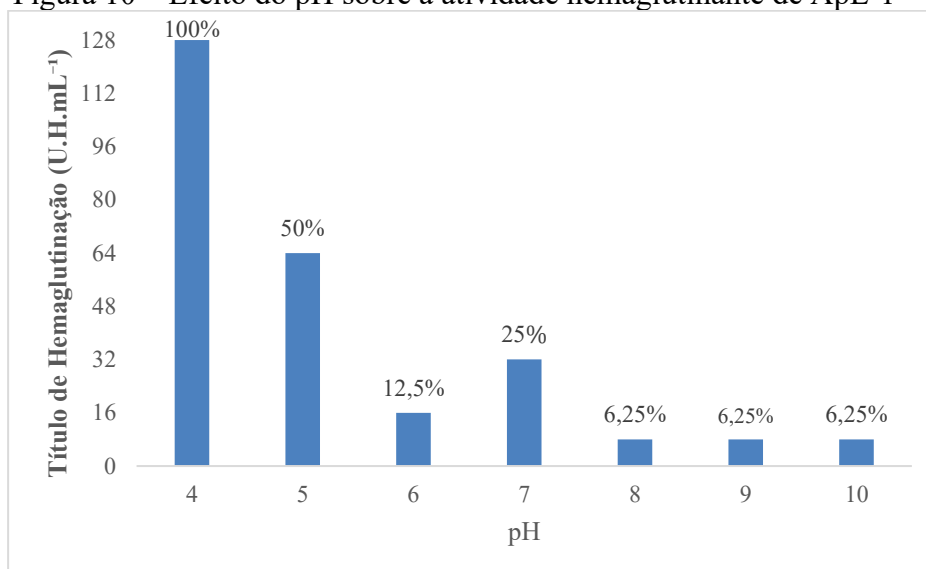
Fonte: O autor. A atividade hemaglutinante foi realizada com eritrócitos de coelho nativo. CIM: Concentração inibitória mínima. NI: não inibiu até a maior concentração testada.

Os carboidratos simples avaliados apresentaram inibição apenas em concentrações mais elevadas. A  $\alpha$ -D-lactose e a  $\beta$ -D-lactose inibiram a atividade hemaglutinante na concentração de 62,5 mM, enquanto o 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo e a lactulose não apresentaram efeito inibitório detectável até a maior concentração testada (100 mM) (Tabela 5).

#### 4.3.3 Efeitos de teste de pH, temperatura e íons divalentes de ApL-1 e ApL-2

A ApL-1 apresentou atividade hemaglutinante em uma ampla faixa de pH, entre pH 4 e 10, com maior título hemaglutinante observado em pH 4 e 5 (Figura 10). Em valores de pH próximos à neutralidade, a atividade foi reduzida em relação ao máximo observado, se mantendo em níveis inferiores e relativamente constantes em pHs alcalinos.

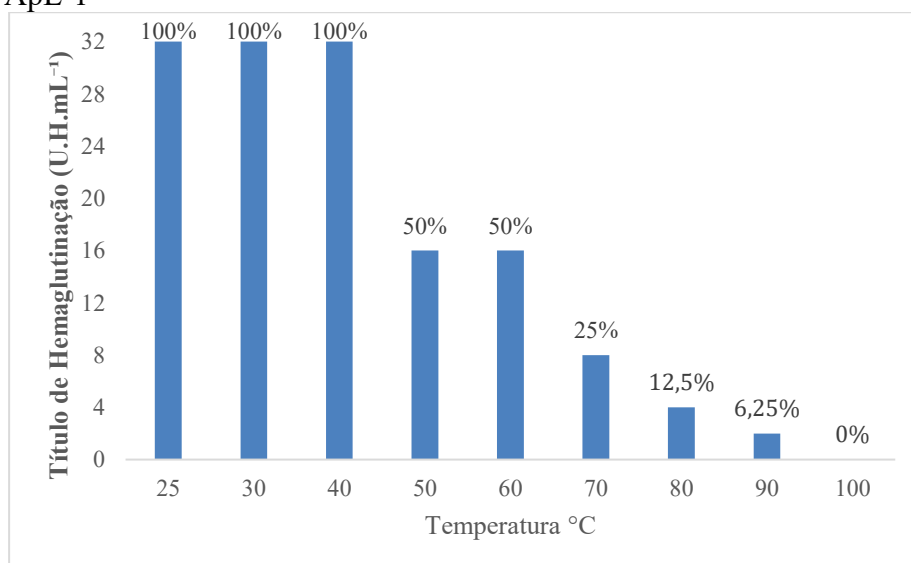
Figura 10 – Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante de ApL-1



Fonte: O autor. A atividade hemaglutinante foi realizada com eritrócitos de coelho nativo. Os tampões usados foram: acetato de sódio 100 mM, pH 4 e pH 5; fosfato de sódio, pH 6; Tris 100 mM, pH 7 e pH 8; glicina 100 mM, pH 9 e pH 10; todos contendo NaCl 150 mM. A atividade foi expressa como título de hemaglutinação (U.H.mL<sup>-1</sup>) após incubação da lectina em diferentes valores de pH.

No ensaio de temperatura, a ApL-1 exibiu maior título de hemaglutinação (32 U.H.mL<sup>-1</sup>) após incubação entre 25 e 40 °C (Figura 11). A partir de 50 °C, foi observado uma redução progressiva da atividade hemaglutinante, com diminuição acentuada em temperaturas mais elevadas.

Figura 11 – Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante de ApL-1

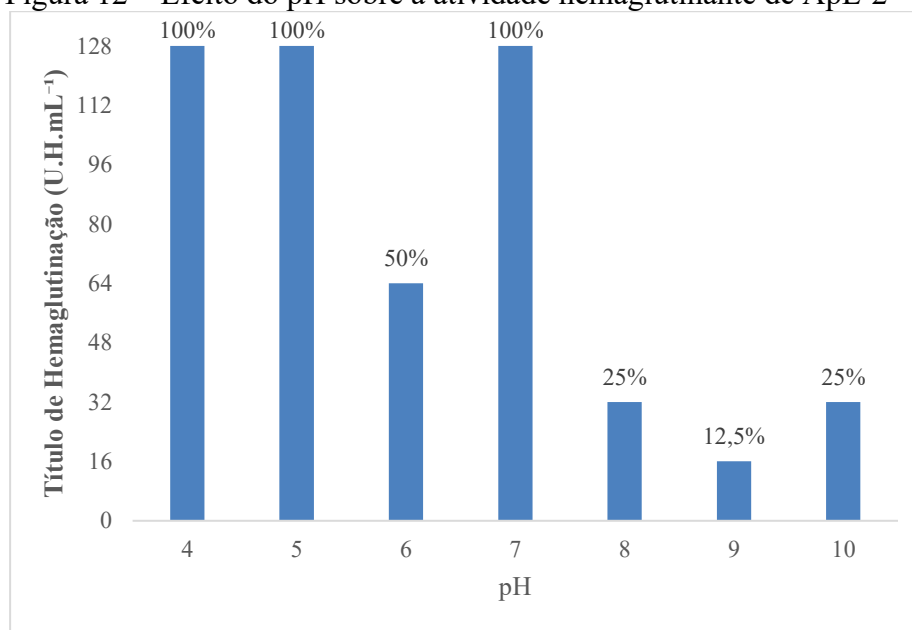


Fonte O autor. A atividade hemaglutinante foi realizada com eritrócitos de coelho nativo. A lectina ApL-1 foi mantida inicialmente a 25 °C (temperatura ambiente) e incubada a 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C e, posteriormente, submetida ao ensaio de atividade hemaglutinante, expressa como título de hemaglutinação (U.H.mL<sup>-1</sup>).

Em 80 e 90 °C, a atividade residual foi inferior a 15% da atividade máxima, sendo a atividade hemaglutinante completamente extinguida após incubação a 100 °C, indicando perda da integridade funcional da proteína.

Já em relação a ApL-2, foi notado que esta apresentou atividade hemaglutinante em ampla faixa de pH, entre pH 4 e 10, com títulos máximos de hemaglutinação (128 U.H.mL<sup>-1</sup>) observados em pH 4, 5 e 7 (Figura 12).

Figura 12 – Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante de ApL-2

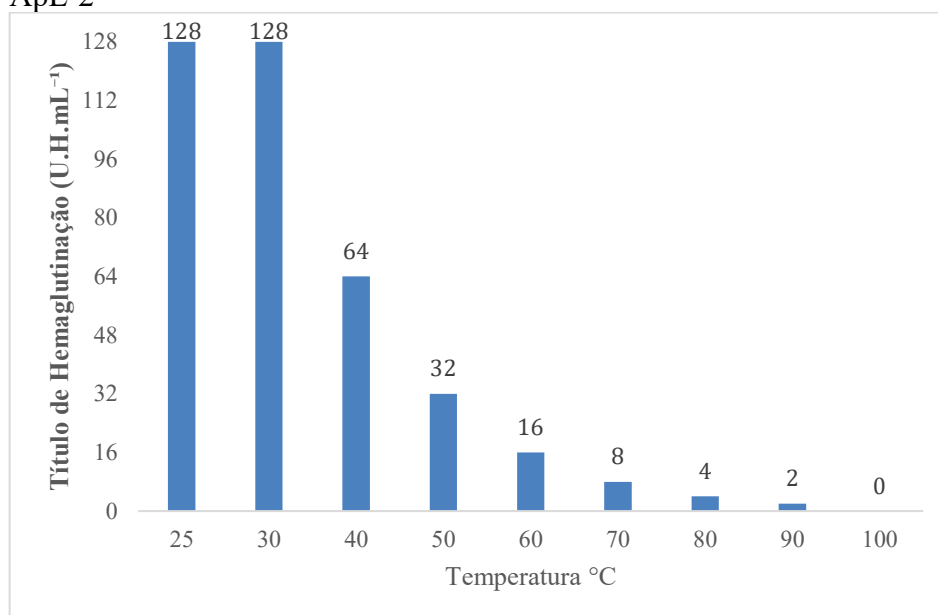


Fonte: O autor. A atividade hemaglutinante foi realizada com eritrócitos de coelho nativo. Os tampões usados foram: acetato de sódio 100 mM, pH 4 e pH 5; fosfato de sódio, pH 6; Tris 100 mM, pH 7 e pH 8; glicina 100 mM, pH 9 e pH 10; todos contendo NaCl 150 mM. A atividade foi expressa como título de hemaglutinação (U.H.mL<sup>-1</sup>) após incubação da lectina em diferentes valores de pH.

Nessas condições, a atividade foi considerada 100% da atividade relativa. Em pH 6, a atividade hemaglutinante foi reduzida à metade do valor máximo. A partir de pH 8, foi observado diminuição progressiva da atividade, com títulos equivalentes a 25% (pH 8) e 12,5% (pH 9) da atividade máxima. Em pH 10, a ApL-2 manteve atividade correspondente a aproximadamente 25% da atividade relativa, indicando manutenção parcial da função hemaglutinante em condições alcalinas.

A ApL-2 manteve atividade hemaglutinante máxima (128 U.H.mL<sup>-1</sup>) após incubação a 25 e 30 °C, correspondendo a 100% da atividade relativa (Figura 13). A partir de 40 °C, foi observado redução gradual da atividade hemaglutinante, com valores correspondentes a 50% da atividade relativa.

Figura 13 – Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante de ApL-2



Fonte O autor. A atividade hemaglutinante foi realizada com eritrócitos de coelho nativo. A lectina ApL-1 foi mantida inicialmente a 25 °C (temperatura ambiente) e incubada a 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C e, posteriormente, submetida ao ensaio de atividade hemaglutinante, expressa como título de hemaglutinação (U.H.mL<sup>-1</sup>).

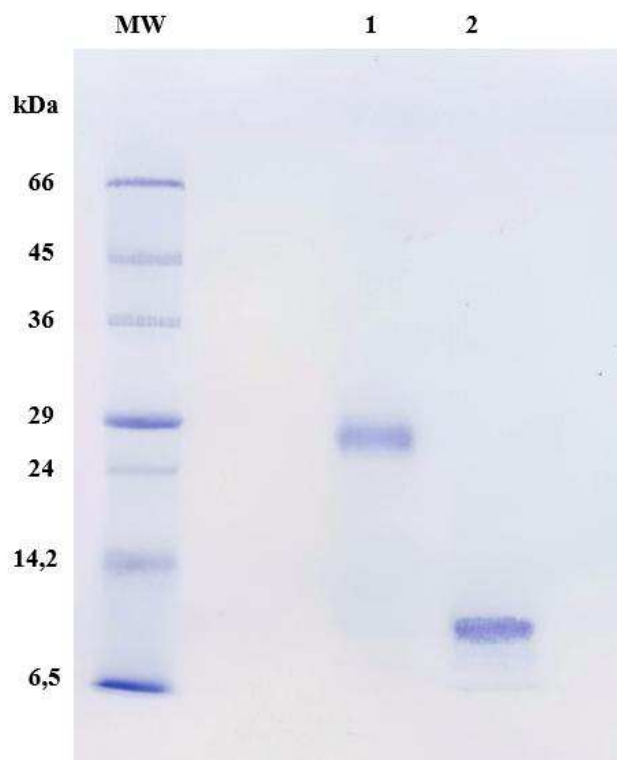
Em temperaturas mais elevadas, a atividade foi progressivamente reduzida, atingindo 25% a 50 °C, 12,5% a 60 °C e valores inferiores a 10% acima de 70 °C. Em 100 °C, não houve mais atividade hemaglutinante, indicada perda total da função da proteína sob aquecimento extremo.

A atividade hemaglutinante de ApL-1 e de ApL-2 não foi afetada pela presença ou ausência de íons Ca<sup>2+</sup>, uma vez que a atividade foi mantida mesmo na presença do agente quelante EDTA (dados não mostrados).

#### 4.3.4 Estimativas das massas moleculares das lectinas ApL-1 e Apl-2

A análise eletroforética da lectina purificada de *Aplysina pseudolacunosa* (Figura 14) revelou a presença de duas lectinas distintas, ApL-1 e ApL-2, que coexistem na mesma espécie. Esse resultado evidencia a diversidade molecular presente no repertório lectínico dessa esponja marinha, sugerindo a ocorrência de proteínas com propriedades estruturais e funcionais diferenciadas.

Figura 14 – Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% das lectinas ApL-1 e ApL-2



Fonte: O autor. SDS-PAGE, na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, 15%. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. MM – Marcadores Moleculares: BSA, 66 kDa; ovalbumina de ovo de frango, 45 kDa; Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 36 kDa; anidrase carbônica; 29 kDa; tripsinogênio, 24 kDa; tripsina,  $\alpha$  lactalbumina, 14, 2 kDa; aprotinina, 6,5kDa. 1: ApL-2 com agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol. eluido com tampão 0,06% de ácido trifluoroacético (TFA). 2: ApL-1 com agente redutor, eluido com tampão 0,06% de ácido trifluoroacético (TFA).

A análise de eletroforese das lectinas purificadas por cromatografia em fase reversa foi realizada por SDS-PAGE (15%) sob condições redutoras, na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol (Figura 14). Inicialmente, a lectina ApL-1 apresentou uma banda com massa molecular aparente próxima de 15 kDa, contudo, após RP-UPLC a lectina apresentou mobilidade eletroforética ligeiramente inferior ao marcador de 14,2 kDa, indicando migração abaixo do valor esperado, em torno de 12 kDa.

Essa variação na mobilidade pode estar relacionada a alterações conformacionais induzidas pelo processo de purificação ou a particularidades na interação da proteína com o SDS. A ApL-2, por sua vez, apresentou uma banda com massa molecular aparente em torno de 28 kDa, compatível com o perfil eletroforético previamente observado após cromatografia de fase reversa, evidenciando a manutenção da integridade da subunidade proteica após as etapas de purificação.

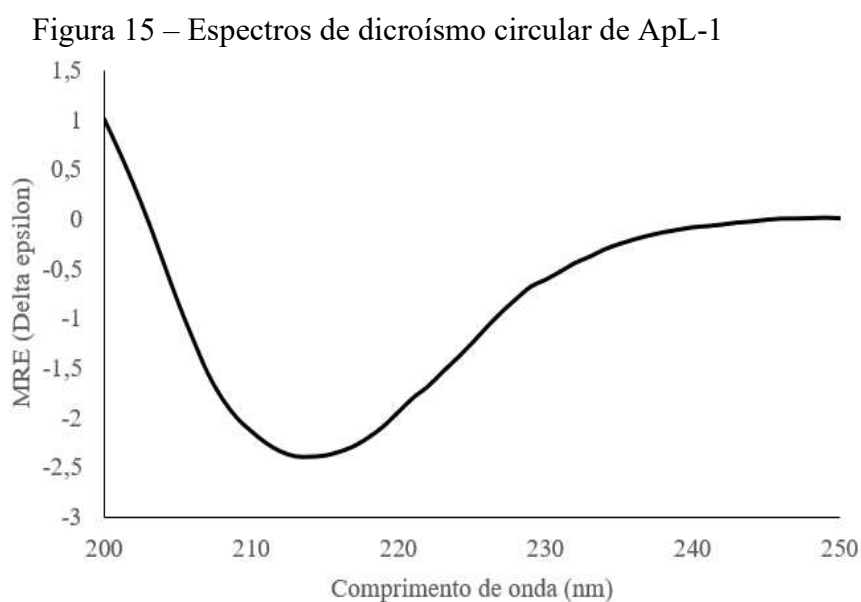
A análise eletroforética das lectinas também foi realizada em condições não redutoras, entretanto, não foi observada a presença de bandas detectáveis nessas condições

(dados não mostrados), possivelmente em decorrência de alterações na solubilidade ou na eficiência de migração da proteína na ausência de agente redutor.

#### 4.4 Caracterização conformacional das lectinas ApL-1 e ApL-2

##### 4.4.1 Dicroísmo circular (DC) de ApL-1 e ApL-2

Os espectros de dicroísmo circular da lectina ApL-1, obtidos na região do ultravioleta distante (*far-UV*), apresentaram um mínimo pronunciado entre 215 e 218 nm, enquanto não foram observadas bandas negativas definidas em 208 e 222 nm (Figura 15).



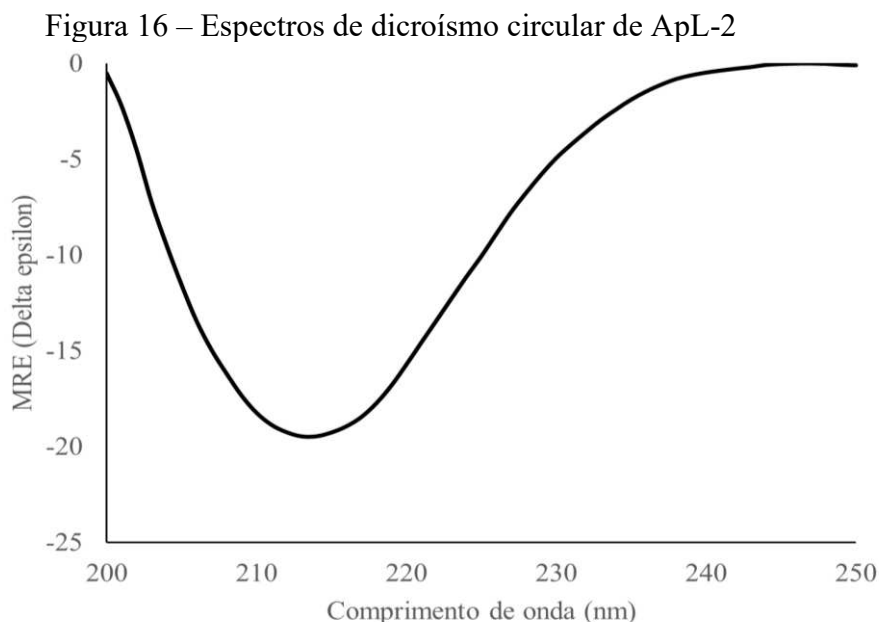
Fonte: O autor. Espectro de Dicroísmo Circular de ApL-1 (*Far – UV*; 200 a 250 nm).

A deconvolução dos espectros, realizada com o auxílio do servidor BestSel, indicou que a estrutura secundária de ApL-1 é composta predominantemente por folhas  $\beta$ , correspondendo a 33,5% de conformações  $\beta$  antiparalelas e 6,8% de folhas  $\beta$  paralelas.

A contribuição de  $\alpha$ -hélices foi estimada em 8,4%, enquanto regiões de voltas representaram 7,0% da estrutura. As demais conformações foram classificadas como “outros”, totalizando 44,3%.

O ajuste entre os espectros experimental e teórico apresentou valores de erro baixos (RMSD = 0,1966; NRMSD = 0,0649).

Já em relação aos espectros de dicroísmo circular da lectina ApL-2, obtidos na região do ultravioleta distante (*far-UV*), apresentaram um mínimo amplo entre 215 e 218 nm, sem a presença simultânea de bandas negativas bem definidas em 208 e 222 nm (Figura 16).



Fonte: O autor. Espectro de Dicroísmo Circular de ApL-2 (*Far – UV*; 200 a 250 nm).

A deconvolução dos espectros, realizada com o auxílio do servidor BestSel, indicou que a estrutura secundária de ApL-2 é composta majoritariamente por  $\alpha$ -hélices, correspondendo a 44,5% do conteúdo estrutural.

As folhas  $\beta$  antiparalelas representaram 18,3% e as folhas  $\beta$  paralelas 7,1% da estrutura. Não foi detectada contribuição significativa de regiões classificadas como voltas (*turns*). As demais conformações foram classificadas como “outros”, totalizando 30,1% (Figura 16).

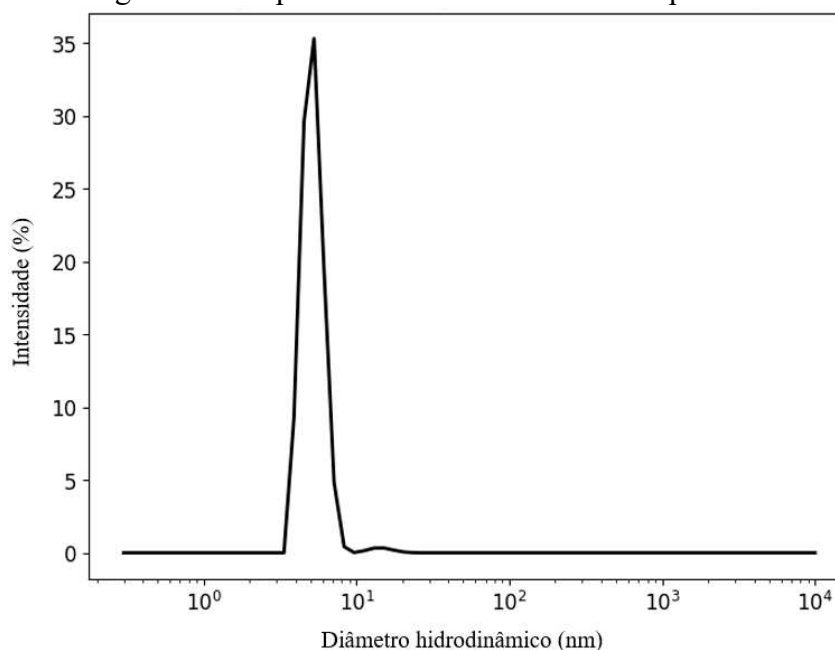
O ajuste entre os espectros experimental e teórico apresentou valores de erro de RMSD = 1,9755 e NRMSD = 0,10294.

#### 4.4.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) de ApL-1 e ApL-2

A análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi utilizada para avaliar o comportamento hidrodinâmico da lectina ApL-1 em solução aquosa. A distribuição de tamanho por intensidade apresentou um perfil monodisperso, caracterizado por um único pico bem definido e estreito. O diâmetro hidrodinâmico ( $D_h$ ) foi observado em aproximadamente 5,3 nm,

não sendo detectadas populações secundárias relevantes em regiões de maior tamanho (Figura 17).

Figura 17 – Espalhamento dinâmico de luz ApL-1



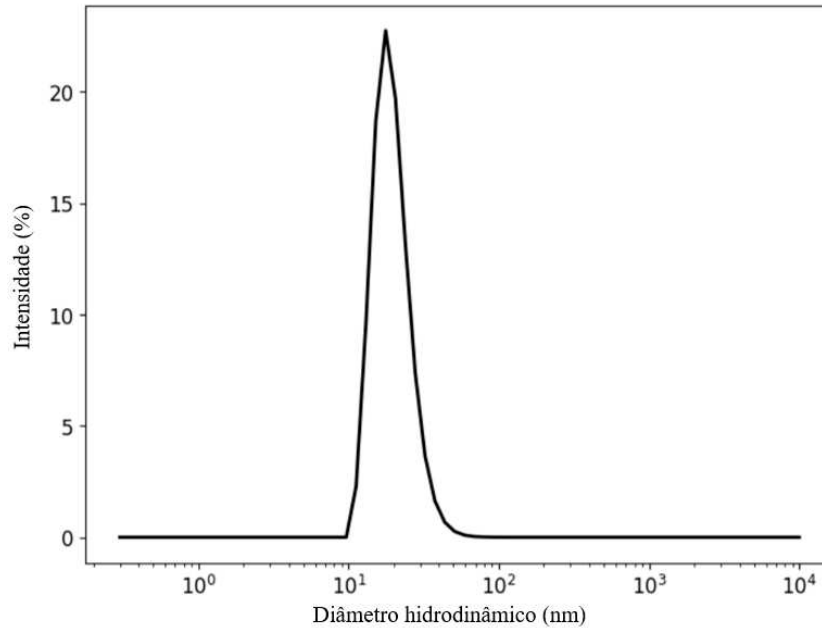
Fonte: O autor. Distribuição de tamanho por intensidade da lectina ApL-1 determinada por espalhamento dinâmico de luz (DLS). A amostra foi analisada em solução aquosa, e o gráfico apresenta a intensidade (%) em função do diâmetro hidrodinâmico (nm), com eixo X em escala logarítmica.

Esse perfil indica elevada homogeneidade da amostra e sugere a predominância de uma única população de partículas em solução. O servidor HullRad apontou um raio de giro de aproximadamente 1,4 nm, indicando um diâmetro de 2,8 nm para o modelo monomérico de ApL-1. Desta forma, as análises de DLS possivelmente indicam a organização dimérica da lectina.

A lectina ApL-2 apresentou um comportamento hidrodinâmico distinto quando analisada por DLS em solução aquosa. A distribuição de tamanho por intensidade exibiu um pico principal em aproximadamente 17–18 nm, acompanhado por uma distribuição mais larga, indicando maior heterogeneidade da amostra (Figura 18).

Pequenas contribuições em regiões de maior diâmetro hidrodinâmico também foram observadas, sugerindo a presença de espécies de maior tamanho em solução. Esses resultados indicam que a ApL-2 apresenta um sistema mais polidisperso quando comparado à ApL-1 nas mesmas condições experimentais.

Figura 18 – Espelhamento dinâmico de luz ApL-2



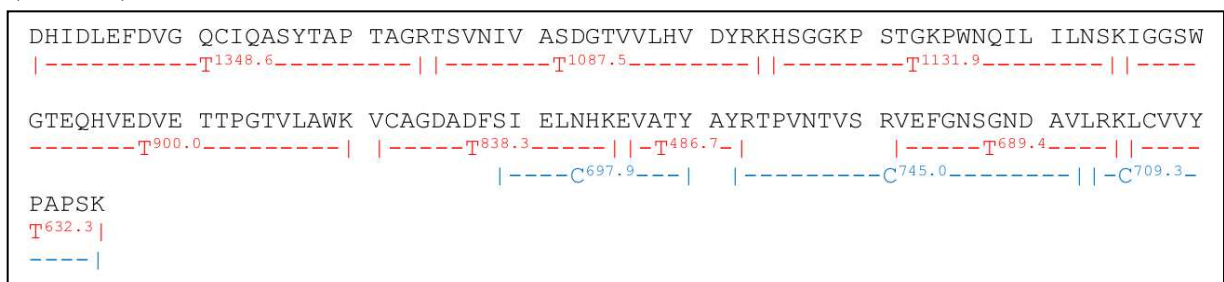
Fonte: O autor. Distribuição de tamanho por intensidade da lectina ApL-2 determinada por espalhamento dinâmico de luz (DLS). A amostra foi analisada em solução aquosa, e o gráfico apresenta a intensidade (%) em função do diâmetro hidrodinâmico (nm), com eixo X em escala logarítmica.

## 4.5 Caracterização estrutural de ApL-1

### 4.5.1 Sequenciamento completo de ApL-1 por espectrometria de massas (MS/MS)

Os peptídeos identificados apresentaram comprimentos variados e exibiram extensas regiões de sobreposição, permitindo a construção completa da estrutura primária de ApL-1, totalizando 145 resíduos de aminoácidos (Figura 19). As sequências dos peptídeos identificados e seus respectivos valores de massa observada e calculada encontram-se sumarizados na Tabela 6.

Figura 19 – Mapa peptídico da lectina ApL-1 obtido por espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS)



Fonte: O autor. Peptídeos obtidos a partir da digestão com: T – tripsina e C – Quimiotripsina.

A digestão com tripsina resultou na identificação de 8 peptídeos, cujas sequências foram determinadas com elevado grau de confiabilidade, evidenciado pelos baixos desvios entre as massas observadas e calculadas. A digestão com quimiotripsina rendeu 3 peptídeos sequenciados, os quais foram complementares as sequências dos peptídeos de tripsina.

Tabela 6 – Sequências de aminoácidos dos peptídeos de ApL-1

m/z	Sequência	Massa		Δ (Da)
		Observada	Calculada	
T <sub>1348.08</sub>	DHIDLEFDVQGCIQASYTAPTTGR	2693,19	2693,23	0,04
T <sub>468.92</sub>	RTPVNTVSRVEF	1403,73	1403,75	0,02
T <sub>749.37</sub>	GNSGNDAVLRKLCVVYPAPSK	2244,02	2244,16	0,14
T <sub>724.51</sub>	TYRTPVNTVSRVEFGNSGNDAVLRKL	2892,01	2892,52	0,51
T <sub>779.92</sub>	TYRTPVNTVSRVEFGNSGNDAVLRKLCVVYPAPSK	3894,61	3894,02	-0,59
T <sub>790.19</sub>	SNSGFDAVLRKLCVVYPAPSK	2366,57	2367,20	0,64
T <sub>631.90</sub>	KLCVVYPAPSK	1260,53	1260,69	0,15
T <sub>755.18</sub>	HSGGKPSTGKPWNQILIINSK	2261,51	2261,22	-0,29
T <sub>821.34</sub>	LGGSWGTEQHVEDVK	1604,65	1640,77	0,13
T <sub>900.06</sub>	IGGSWGTEQHVEDVETTPGTVLAWK	2696,15	2696,30	0,15
T <sub>1087.56</sub>	TSVNIVASDGTVVLHVDYRK	2172,11	2172,15	0,03
T <sub>838.34</sub>	VCAGDADFSIELNHK	1674,65	1674,76	0,11
C <sub>697.86</sub>	SIELNQKEVATY	1393,68	1393,70	0,02
C <sub>676.23</sub>	QHLSYASGWR	1350,80	1350,64	-0,16
C <sub>667.91</sub>	TFLSYASGWR	1333,80	1333,64	-0,16

Fonte: O autor. m/z: massa/carga. Δ: Massa cal. - Massa obs.

A análise *in silico* pelo ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) da sequência obtida indicou uma massa molecular teórica de 15,64 kDa (compatível com o determinado experimentalmente) e pI teórico de 5,92, caracterizando-a como uma proteína de natureza levemente ácida.

A composição de aminoácidos revelou uma predominância de resíduos hidrofóbicos, com destaque para valina (11,7%), glicina (9,0%) e alanina (7,6%). A sequência apresenta 16 resíduos carregados negativamente (Asp + Glu) e 13 resíduos carregados positivamente (Arg + Lys), em concordância com o pI ácido observado.

O índice de instabilidade calculado foi de 26,52, classificando a ApL-1 como uma proteína estável, enquanto o índice alifático elevado (81,93) sugere boa estabilidade estrutural, especialmente frente a variações de temperatura. A hidropaticidade média (GRAVY)

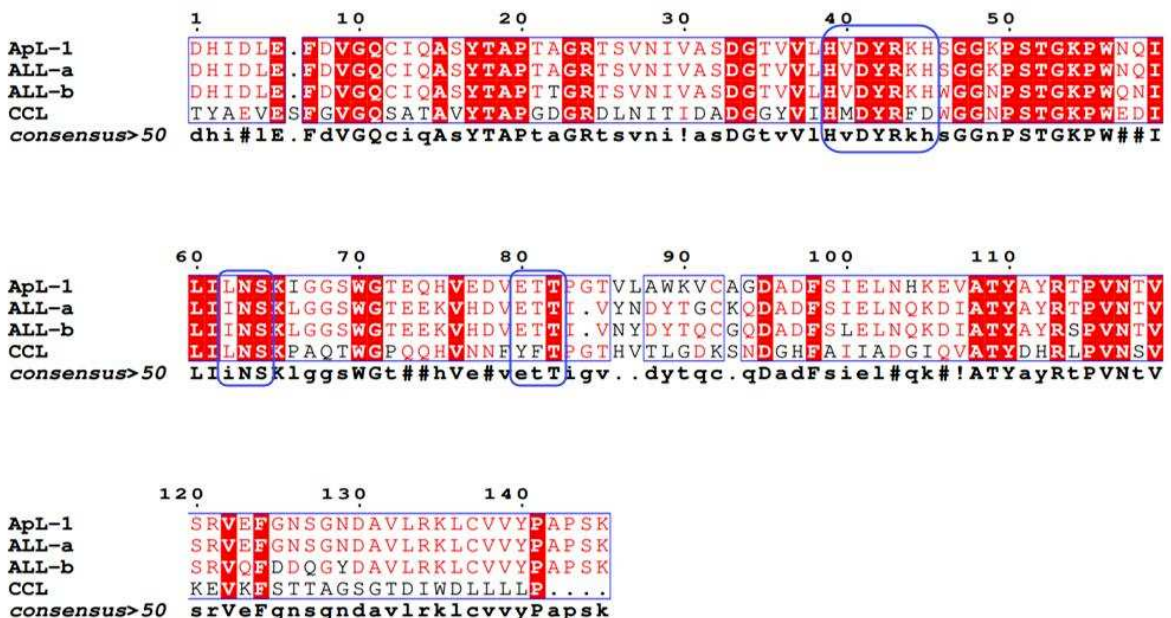
apresentou valor de  $-0,262$ , indicando caráter predominantemente hidrofílico, consistente com a elevada solubilidade da proteína em meio aquoso.

A análise da sequência de ApL-1 por meio do servidor SMART (Letunic; Khedkar; Bork, 2020) indicou a presença de um domínio característico de galectinas (GLECT), abrangendo os aminoácidos das posições 3 a 139, com *E-value* de  $4,79 \times 10^{-3}$ . Esse domínio cobre praticamente toda a extensão da proteína, evidenciando uma arquitetura típica de galectinas do tipo proto-galectina, composta por um único domínio de reconhecimento de carboidratos.

#### 4.5.2 Análise de similaridade pelo BLASTp

O alinhamento múltiplo das sequências de ApL-1 com as isoformas ALL-a e ALL-b, isoladas de *Aplysina lactuca*, e com a CCL, lectina presente na *Chondrilla caribensis*, revelou elevado grau de conservação ao longo de praticamente toda a cadeia polipeptídica, evidenciando a proximidade estrutural entre essas lectinas, indicando fortemente o pertencimento a família das galectinas.

Figura 20 – Alinhamento da estrutura de ApL-1 com outras galectinas de esponjas marinhas



Fonte: O autor. Alinhamento da estrutura primária de ApL-1 com outras galectinas de esponjas marinhas. O alinhamento evidencia regiões conservadas entre a ApL-1 e as galectinas ALL-a e ALL-b, isoformas isoladas de *Aplysina lactuca*, bem como a CCL, isolada de *Chondrilla caribensis*, destacando motivos conservados característicos de galectinas. As regiões destacadas em azul indicam motivos conservados associados ao domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC). O alinhamento foi realizado com o auxílio da ferramenta MultAlin.

A análise de similaridade da sequência completa de ApL-1 por BLASTp revelou elevada homologia com galectinas previamente descritas em esponjas marinhas, sendo os alinhamentos de maior significância correspondentes às galectinas ALL-a e ALL-b, que apresentaram identidades de 86,9% e 78,6%, respectivamente, ambas com cobertura de 100% da sequência e valores de *E-value* extremamente baixos,  $1 \times 10^{-85}$  para ALL-a e  $1 \times 10^{-76}$  para ALL-b, respectivamente, indicando forte relação evolutiva.

A comparação com a galectina CCL, isolada de *Chondrilla caribensis*, evidenciou maior divergência de sequência, com identidade de 48,3% e cobertura de 81%, associada a inserções e deleções distribuídas principalmente nas regiões terminais. Apesar dessa divergência, o alinhamento apresentou *E-value* de  $3 \times 10^{-27}$  e preservou resíduos conservados associados ao domínio de reconhecimento de carboidratos típico da família das galectinas, indicando conservação estrutural desse domínio funcional (Figura 20).

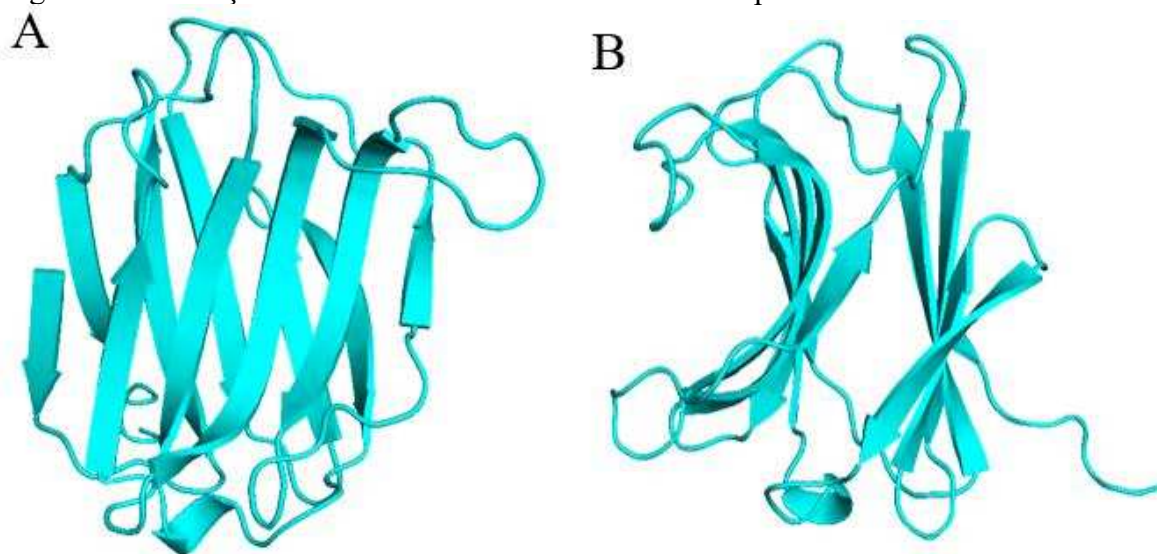
A análise do alinhamento múltiplo realizada por meio da ferramenta MultAlin permitiu a identificação de motivos conservados característicos de galectinas na sequência de ApL-1. Destaca-se a presença do heptapeptídeo assinatura típico das galectinas, incluindo o motivo LHFNPR (posições 39–45), os quais foram substituídos por <sup>39</sup>H, <sup>40</sup>V, <sup>41</sup>D, <sup>42</sup>Y, <sup>43</sup>R, <sup>44</sup>K e <sup>45</sup>H, reconhecido como elemento central do sítio de ligação a  $\beta$ -galactosídeos. Também foram identificados resíduos conservados envolvidos na interação com carboidratos, como o segmento VLN (posições 60–62), substituídos por <sup>62</sup>L, <sup>61</sup>N e <sup>62</sup>S, associado à estabilização do complexo lectina–glicano, e o motivo FPF (posição 80–82), substituídos por <sup>80</sup>E, <sup>81</sup>T e <sup>82</sup>P, frequentemente relacionado à manutenção da arquitetura do domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC).

A análise do alinhamento múltiplo (MultAlin) permitiu a identificação de motivos característicos de galectinas na sequência de ApL-1, incluindo a região <sup>39</sup>H, <sup>40</sup>V, <sup>41</sup>D, <sup>42</sup>Y, <sup>43</sup>R e o segmento <sup>47</sup>G, <sup>48</sup>G, <sup>49</sup>K, <sup>50</sup>P, <sup>51</sup>S, <sup>52</sup>T, <sup>53</sup>G, <sup>54</sup>K, <sup>55</sup>P e <sup>56</sup>W, além de outras regiões conservadas compartilhadas com as isoformas ALL-a e ALL-b e parcialmente preservadas na galectina CCL (Figura 20).

#### **4.5.3 Predição estrutural tridimensional**

A análise de predição revelou que a estrutura de ApL-1 é predominantemente composta por folhas  $\beta$  organizadas em um arranjo do tipo  $\beta$ -sanduíche, formado por cadeias  $\beta$  antiparalelas conectadas por regiões de alças flexíveis (loops) (Figura 21).

Figura 21 – Predição estrutural tridimensional da lectina ApL-1



Fonte: O autor. Modelo estrutural tridimensional da lectina ApL-1 obtido por modelagem *in silico* utilizando o servidor AlphaFold2. (A) Representação em estilo *cartoon* evidenciando o dobramento global da proteína. (B) Vista do mesmo modelo sob orientação distinta, destacando a organização das folhas  $\beta$  e das regiões de loop.

A validação estereoquímica do modelo indicou elevada qualidade estrutural, com 98,51% dos resíduos de aminoácidos localizados em regiões favorecidas do gráfico de Ramachandran, conforme análise realizada pelo servidor MolProbity.

Adicionalmente, a avaliação global do modelo pelo servidor VoroMQA resultou em um escore de 0,569, valor compatível com modelos estruturais considerados confiáveis. A organização estrutural observada é consistente com o dobramento típico de galectinas do tipo proto descritas em esponjas marinhas, corroborando os dados experimentais obtidos por difração de raios-X, que indicaram predominância de conformações  $\beta$ .

## 4.6. Caracterização estrutural de ApL-2

### 4.6.1. Sequenciamento de ApL-2 por MS/MS

A digestão de ApL-2 com tripsina resultou na identificação de sete peptídeos distintos, cujas sequências foram determinadas com elevado grau de confiabilidade, apresentando baixos desvios entre as massas observadas e calculadas.

Diferente do observado para a ApL-1, os fragmentos identificados para a ApL-2 não apresentaram regiões de sobreposição suficientes para permitir a reconstrução de uma

sequência contínua. Dessa forma, os dados obtidos caracterizam um sequenciamento parcial (Figura 22).

Figura 22 – Mapa peptídico da lectina ApL-2 obtido por espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS)

MDTVELMSFN	ERGFGIYGIR	VAAVLAQLLA	ILLALASGMR	ELWSGILQKD	LQHCGIPTQR	FIHRGLIACG	
TSVLTLLQHR	ANTSEPAKHA	SVKTYKRRIG	NGNFGDDAYC	THSADHANVA	LESWFCKPLD	ACPKGFESTN	-----
IGGAQVCWKG	SVGCTGFSFP	SEQSYSVAVSG	FVEGYNFGSP	DGFRHRTHQR	NEAYVDGLSI	THGLARQHLE	-----T <sup>747,03</sup> -----   -----
-T <sup>827,37</sup> --							
SYASGWRIVA	CPCRGDDPP	DFVGDNYCYD	SVERSRNPEK	IWFPDTIIWH	AATGCSDTDI	ACRDHFRPWF	-----T <sup>903,03</sup> -----   -----
-T <sup>676,28</sup> --	-T <sup>445,25</sup> --	-----T <sup>1494,60</sup> -----					
SVETVGGSTS	DDVEVRSCQD	QAYDDEAIGI	ANLEIYVRVD				-----T <sup>874,71</sup> -----

Fonte: O autor. Peptídeos obtidos a partir da digestão com: T – tripsina. Os peptídeos identificados foram sobrepostos a uma sequência de referência baseada na lectina ACL, *Aplysina cauliformis*, utilizada apenas para fins comparativos (dados não publicados).

Para fins de representação gráfica do mapa peptídico, os fragmentos identificados experimentalmente foram sobrepostos a uma sequência de referência baseada na lectina ACL, obtida de *Aplysina cauliformis*, utilizada exclusivamente como modelo comparativo para visualização da distribuição dos peptídeos ao longo da cadeia polipeptídica. A sequência da ACL não corresponde à estrutura primária de ApL-2 e foi empregada apenas como ferramenta ilustrativa (dados não mostrados).

Os peptídeos identificados apresentaram comprimentos variando entre 7 e 26 resíduos de aminoácidos (Tabela 7).

Tabela 7 – Sequências de aminoácidos dos peptídeos de ApL-2

<i>m/z</i>	Sequência	Massa		$\Delta$ (Da)
		Observada	Calculada	
T <sub>1348.08</sub>	LVACPCR	888,39	888,44	0,05
T <sub>468.92</sub>	QHLSYASGWR	1350,53	1350,65	0,12
T <sub>749.37</sub>	THQRNEAYVDGLSITHGLAR	2237,03	2237,13	0,10
T <sub>724.51</sub>	GFESTNIGGAQVCWK	1652,70	1652,76	0,06
T <sub>779.92</sub>	DHFRPWFSVETVGGSTSDDVEVR	2621,11	2621,21	0,10
T <sub>790.19</sub>	IWFPDTIIWHAATGCSDTDIACR	2705,09	2705,24	0,15
T <sub>631.90</sub>	GGDDPPDFVGDNYCYDSVRSRNPEK	2987,16	2987,26	0,11

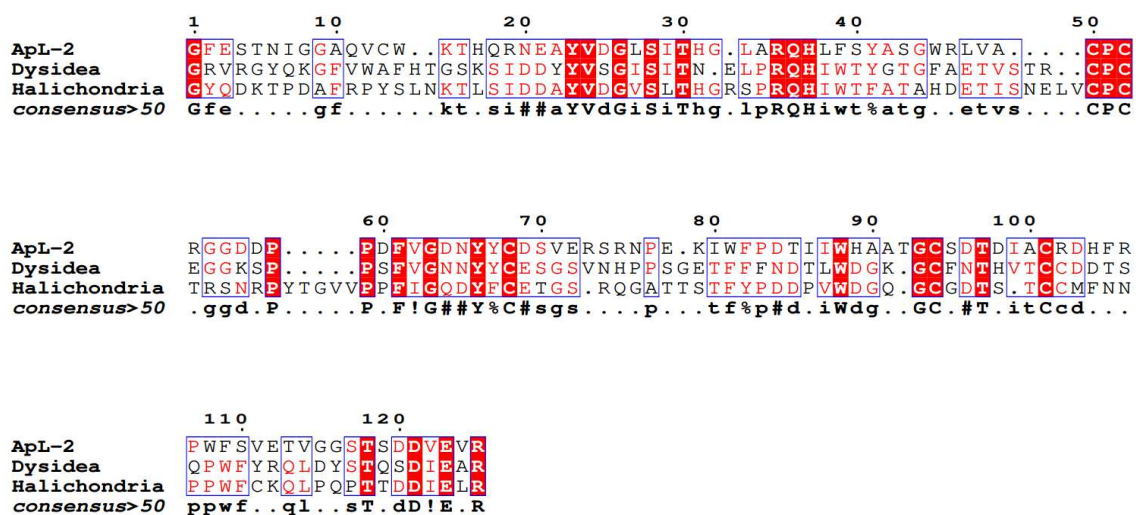
Fonte: O autor. *m/z*: massa/carga.  $\Delta$ : Massa cal. - Massa obs.

Foi observado ainda a presença recorrente de resíduos de cisteína em diferentes peptídeos, sugerindo a possível participação de pontes dissulfeto na estabilização estrutural de ApL-2, em concordância com o comportamento eletroforético observado para essa lectina sob condições redutoras e não redutoras. Em função da obtenção apenas parcial da sequência de estrutura primária, análises *in silico* adicionais de predição estrutural e de parâmetros físico-químicos globais não foram realizadas para a ApL-2.

#### 4.6.2. Análise de similaridade pelo BLASTp

Os peptídeos identificados de ApL-2 foram submetidos à análise de similaridade por meio do programa BLASTp, com o objetivo de identificar proteínas relacionadas depositadas em bancos de dados públicos. A sequência parcial de ApL-2 não apresentou similaridade com nenhuma família de lectinas previamente caracterizada. Entretanto, foram observados alinhamentos estatisticamente significativos com proteínas putativas codificadas nos genomas de esponjas marinhas (Figura 23).

Figura 23 – Alinhamento da sequência parcial de ApL-2 com proteínas putativas codificadas em genomas de esponjas marinhas



Fonte: O autor. Alinhamento da sequência parcial de ApL-2 com proteínas putativas codificadas nos genomas das esponjas marinhas *Dysidea avara* (XP\_065907136.1) e *Halichondria panicea* (XP\_064406700.1). O alinhamento evidencia regiões conservadas entre as sequências analisadas, destacando motivos ricos em resíduos de cisteína. O alinhamento foi realizado com o auxílio da ferramenta MultAlin, a partir dos resultados obtidos por BLASTp.

O alinhamento mais significativo ocorreu com uma proteína putativa codificada no genoma da esponja marinha *Dysidea avara* (acesso XP\_065907136.1), apresentando 41,07% de identidade, 58% de similaridade, 85% de cobertura da sequência de consulta e *E-value* de 3

$\times 10^{-14}$ . Adicionalmente, a ApL-2 apresentou alinhamento significativo com uma proteína putativa codificada no genoma da esponja marinha *Halichondria panicea* (acesso XP\_064406700.1), exibindo 34% de identidade, 54% de similaridade, alta cobertura da sequência de consulta e *E-value* de  $8 \times 10^{-14}$ .

Em ambos os alinhamentos, a similaridade se concentrou em regiões conservadas ricas em resíduos de cisteína, sugerindo a presença de regiões estruturais compartilhados entre as sequências analisadas.

## 5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, duas novas lectinas, denominadas ApL-1 e ApL-2, foram isoladas a partir da esponja marinha *Aplysina pseudolacunosa* por meio do estabelecimento de um protocolo de purificação a partir de extratos aquosos, baseado de combinação na precipitação com sulfato de amônio, bem como também cromatografia de afinidade em matriz de goma de guar e cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa.

A cromatografia de afinidade utilizando matrizes contendo resíduos galactosídicos constitui a principal etapa de purificação para lectinas desse gênero, em função da elevada especificidade dessas proteínas. Para a lectina ALL, isolada de *Aplysina lactuca*, a purificação envolveu cromatografia de afinidade em matriz de goma de guar seguida de cromatografia de exclusão molecular (Carneiro *et al.*, 2017; Duarte *et al.*, 2023). Entretanto, diferenças estruturais entre lectinas de *Aplysina* podem demandar estratégias cromatográficas complementares, como observado para as lectinas AaL e ALL, purificadas em matrizes mais específicas contendo  $\rho$ -aminobenzil- $\beta$ -1-tiogalactopiranosídeo-agarose (Miarons; Fresno, 2000), e para a lectina ACL de *Aplysina cauliformis*, cuja purificação exigiu a associação de cromatografia de afinidade, troca iônica e exclusão molecular (Viana, 2021).

A análise eletroforética por SDS-PAGE das lectinas isoladas evidenciou diferenças claras entre ApL-1 e ApL-2, indicando a coexistência de duas entidades estruturalmente distintas em *Aplysina pseudolacunosa*. Os perfis obtidos a partir da fração P2 e após a purificação por cromatografia em fase reversa corroboram com essa observação.

Quando comparados aos perfis eletroforéticos descritos para lectinas do gênero *Aplysina*, os resultados obtidos para ApL-1 e ApL-2 se inserem na diversidade estrutural previamente reportada. A lectina ALL (*Aplysina lactuca*), composta por isoformas, ALL-a e ALL-b, apresenta subunidades com massa aparente em torno de 15 kDa em SDS-PAGE sob condições redutoras, bem como a formação de espécies de maior massa molecular aparente sob condições não redutoras, indicando a participação de associações covalentes entre subunidades (Duarte *et al.*, 2023).

As lectinas AaL, isoladas de *Aplysina archeri* e ALL de *Aplysina lacunosa*, respectivamente, por sua vez, exibem subunidades com massas moleculares aparentes em torno de 15–16 kDa em SDS-PAGE, tanto sob condições redutoras quanto não redutoras, indicando que sua organização oligomérica não depende da formação de pontes dissulfeto. No estado

nativo, essas lectinas organizam-se como homotetrâmeros, com massa molecular total estimada em aproximadamente 60–65 kDa (Miarons; Fresno, 2000).

Em contraste, a lectina AFL, isolada de *Aplysina fulva*, apresenta um perfil eletroforético mais complexo. Em SDS-PAGE sob condições redutoras, foi observado uma banda majoritária em torno de 15 kDa, acompanhada de bandas adicionais próximas a 30 kDa, enquanto, sob condições não redutoras, predominam espécies com massas aparentes de aproximadamente 30 e 70 kDa. Esses resultados, em conjunto com a análise por MALDI-ToF, que revelou um íon principal em torno de 31,6 kDa, sustentam a presença de subunidades associadas por pontes dissulfeto, com formação de espécies diméricas e oligoméricas (Carneiro *et al.*, 2019).

De forma semelhante, a lectina ACL, isolada de *Aplysina cauliformis*, apresenta perfil eletroforético complexo, caracterizado por uma banda predominante em torno de 66 kDa sob condições não redutoras e dissociação em duas bandas de aproximadamente 30 e 35 kDa após redução. Adicionalmente, análises por cromatografia de exclusão molecular permitiram a identificação de duas lectinas distintas, ACL-1 e ACL-2, com massas moleculares nativas estimadas em aproximadamente 145 kDa e 120 kDa, respectivamente, indicando a existência de diferentes níveis de oligomerização em solução (Viana, 2021).

Já a lectina AfIL, isolada de *Aplysina fistularis*, apresenta em SDS-PAGE uma única banda com massa aparente de aproximadamente 70 kDa sob condições não redutoras, enquanto, na presença de agentes redutores, observa-se a dissociação em bandas próximas a 30 kDa. Quando esses dados são analisados em conjunto com o peso molecular nativo estimado em aproximadamente 224 kDa, os resultados sugerem uma organização oligomérica de ordem superior, dependente da formação de pontes dissulfeto, comportamento também descrito para a ACL (Andrade *et al.*, 2025; Viana, 2021).

O perfil de inibição da atividade hemaglutinante evidenciou diferenças funcionais marcantes entre as lectinas ApL-1 e ApL-2, refletindo estratégias distintas de reconhecimento de glicanos complexos. Em ambas as lectinas, a maior eficiência inibitória observada para glicoproteínas, quando comparadas a carboidratos simples, indica que o reconhecimento não se restringe à galactose isolada, mas depende da apresentação estrutural do epítipo galactosídico em um contexto glicânico mais elaborado.

No caso de ApL-1, a fetuína apresentou efeito inibitório significativamente superior ao da asialofetuína, indicando que a presença de resíduos terminais de ácido siálico contribui para a estabilização da interação lectina–glicano. A fetuína contém N-glicanos complexos com

terminações do tipo NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4 e NeuAc $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4, enquanto a asialofetuína difere essencialmente pela remoção do ácido siálico terminal (Abebe *et al.*, 2022; Baenziger; Fiete, 1979). Assim, os dados sugerem que o domínio de reconhecimento de carboidratos de ApL-1 é sensível à sialilação do epítipo galactosídico, seja por interações diretas com o ácido neuramínico, seja por efeitos conformacionais e eletrostáticos que favorecem a exposição e a orientação do motivo subjacente, como a N-acetil-lactosamina, contribuindo para a estabilização do complexo lectina-glicano (Bhide; Colley, 2017; Cummings *et al.*, 2015; Ideo *et al.*, 2011)

Esse comportamento aproxima a ApL-1 do perfil funcional descrito para a lectina ALL, isolada de *Aplysina lactuca*, e para a AcrL, uma proto-galectina de *Aiolochoiria crassa*, ambas caracterizadas por inibição eficiente por glicoproteínas sialiladas, como fetuína e mucina submaxilar bovina (Carneiro *et al.*, 2017; Duarte *et al.*, 2023; Torres *et al.*, 2025). Embora muitas galectinas de vertebrados apresentem sua ligação atenuada ou bloqueada pela sialilação terminal em decorrência de impedimentos estéricos, um subconjunto de galectinas marinhas parece ter evoluído para tolerar ou explorar funcionalmente esses resíduos (Bhide; Colley, 2017; Cummings *et al.*, 2015). Nesse contexto, os dados indicam que a ApL-1 apresenta afinidade preferencial por epítopos galactosídicos sialilados, possivelmente do tipo sialil-LacNAc, constituindo uma característica funcional relevante dessa lectina.

A inibição observada com mucina submaxilar bovina reforça essa interpretação. As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular, nas quais mais de 50% da massa corresponde a cadeias de O-glicanos, predominantemente iniciadas por resíduos de GalNAc ligados a serina ou treonina, frequentemente sialilados com Neu5Ac ou Neu5Gc (Tsuji; Osawa, 1986; Tran; Hagen, 2013; Zhang *et al.*, 2022). A afinidade de ApL-1 por essa glicoproteína é consistente com o perfil descrito para a lectina ALL, que também apresenta inibição eficiente por fetuína e mucina submaxilar bovina (Carneiro *et al.*, 2017). Em contraste, outras lectinas do gênero *Aplysina*, como AFL, isolada de *Aplysina fulva*, e AaL, de *Aplysina archeri*, geralmente não apresentam inibição significativa por essa mucina, embora reconheçam mucinas gástricas suínas (Carneiro *et al.*, 2019; Miarons; Fresno, 2000). A ausência de inibição de ApL-1 por lactulose e por tireoglobulina reforça que essa lectina possui baixo reconhecimento de galactosídeos livres.

Em contraste, a ApL-2 apresentou um perfil de inibição caracterizado por elevada afinidade às mucinas gástricas suínas dos tipos II e III. Essas mucinas exibem glicosilação altamente diversa, composta por resíduos de GalNAc, galactose, GlcNAc, fucose e ácido

siálico, organizados em glicanos extensamente ramificados (Karlsson *et al.*, 1997; Robbe *et al.*, 2003; Tailford *et al.*, 2015). A pequena diferença observada entre os valores de inibição obtidos com fetuína e asialofetuína indica que, para a ApL-2, o ácido siálico exerce papel secundário, sendo a densidade, a ramificação e a multivalência dos O-glicanos os principais determinantes da afinidade aparente. Esse comportamento está de acordo com modelos de interação lectina–glicano baseados na soma de múltiplos contatos fracos distribuídos ao longo de glicanos complexos, resultando em elevada avidéz, especialmente em mucinas ricas em estruturas do tipo core 1 a core 5 (Tailford *et al.*, 2015).

Perfis semelhantes de elevada afinidade por mucinas gástricas suínas foram descritos para outras lectinas do gênero *Aplysina*, como a ACL, isolada de *Aplysina cauliformis*, e a AFL, que também apresentam baixos valores de concentração inibitória mínima para essas glicoproteínas (Carneiro *et al.*, 2019; Viana, 2021). Nesse sentido, a ApL-2 se insere claramente nesse padrão funcional, caracterizado por reconhecimento fortemente dependente da multivalência e da complexidade estrutural dos O-glicanos, em contraste com o perfil mais seletivo e sensível à sialilação observado para a ApL-1.

De modo geral, as lectinas do gênero *Aplysina* exibem afinidade por galactose e seus derivados com ligação do tipo Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4, como observado para AfIL, AFL e ALL (Andrade *et al.*, 2025; Carneiro *et al.*, 2019; Duarte *et al.*, 2023). Contudo, ApL-1 e ApL-2 demonstram como essa especificidade pode ser refinada por estratégias funcionais distintas. Enquanto a ApL-1 direciona seu reconhecimento para epítomos galactosídicos sialilados, de forma semelhante à ALL e à AcrL, a ApL-2 adota uma estratégia baseada na multivalência e na complexidade estrutural dos O-glicanos, aproximando-se do perfil funcional descrito para ACL e AFL.

A estabilidade bioquímica das lectinas ApL-1 e ApL-2 frente a variações de pH e temperatura, aliada à independência de íons divalentes, reflete adaptações moleculares típicas de lectinas de esponjas marinhas. Em ambas, a manutenção da atividade hemaglutinante em ampla faixa de pH indica preservação da integridade conformacional do domínio de reconhecimento de carboidratos, sem comprometimento significativo da interação lectina–glicano.

ApL-1 e ApL-2 apresentaram maior estabilidade funcional em pH neutro a levemente alcalino, comportamento compatível com o descrito para lectinas do gênero *Aplysina*. A lectina ALL apresenta pH ótimo em torno de 7, mantendo atividade em condições moderadamente alcalinas (Carneiro *et al.*, 2017; Duarte *et al.*, 2023), enquanto AFL, ACL (*A.*

e AfIL exibem maiores títulos hemaglutinantes entre pH 7 e 9 (Andrade *et al.*, 2025; Carneiro *et al.*, 2019; Viana, 2021). Resultados semelhantes foram descritos para outras lectinas de esponjas marinhas, como AFL, ativa entre pH 4 e 10, com máximo entre pH 7 e 10 (Carneiro *et al.*, 2019), CCL (lectina de *Chondrilla caribensis*), com atividade ótima em pH 9 (Marques *et al.*, 2018), e CvL, isolada de *Cliona varians*, cujo melhor desempenho ocorre entre pH 6 e 8 (Moura *et al.*, 2006). Em conjunto, esses dados indicam que lectinas de esponjas marinhas tendem a apresentar atividade ótima em pH neutro a alcalino, refletindo ajustes às condições fisiológicas do ambiente marinho, cujo pH é mantido em torno de 8,0–8,2 pelo sistema tampão carbonato–bicarbonato.

Quanto à termoestabilidade, ApL-1 e ApL-2 mantiveram atividade hemaglutinante em temperaturas moderadas, com perda progressiva sob aquecimento mais intenso. Perfil comparável foi descrito para a ALL, estável até aproximadamente 60 °C e desnaturada em torno de 90 °C (Carneiro *et al.*, 2017), bem como para AFL e AfIL, que permanecem ativas até 60–70 °C (Carneiro *et al.*, 2019; Andrade *et al.*, 2025). A lectina ACL apresenta estabilidade térmica ainda mais elevada, mantendo atividade até cerca de 80 °C, padrão também observado em outras lectinas de esponjas marinhas, como a CvL (Moura *et al.*, 2006; Viana, 2021).

A atividade hemaglutinante de ApL-1 e ApL-2 não foi afetada pela presença de EDTA, indicando que o reconhecimento de carboidratos por essas lectinas é independente de íons divalentes. Perfil semelhante foi descrito para a maioria das lectinas do gênero *Aplysina*, incluindo ALL, AFL, ACL e AfIL (Andrade *et al.*, 2025; Carneiro *et al.*, 2017; Carneiro *et al.*, 2019; Viana, 2021), bem como para a proto-galectina AcrL (Torres *et al.*, 2025). Em contraste, lectinas como AaL e AIL apresentam dependência estrita de Ca<sup>2+</sup>, tendo sua atividade hemaglutinante inibida na presença de EDTA, o que evidencia a coexistência de diferentes estratégias de reconhecimento molecular dentro do gênero *Aplysina* (Miarons; Fresno, 2000).

Em conjunto, os resultados demonstram que ApL-1 e ApL-2 compartilham um perfil de estabilidade bioquímica compatível com lectinas marinhas, caracterizado por tolerância a variações moderadas de pH, resistência térmica e independência de íons divalentes. Essas propriedades reforçam a proximidade funcional dessas lectinas com ALL, AFL, AfIL e ACL, ao mesmo tempo em que fornecem suporte bioquímico às análises estruturais subsequentes por dicroísmo circular e modelagem molecular.

Os espectros de dicroísmo circular obtidos para as lectinas ApL-1 e ApL-2, na região do ultravioleta distante (*far*-UV), evidenciaram diferenças claras na organização de suas estruturas secundárias, indicando que, embora coexistam na mesma espécie, essas proteínas

apresentam arquiteturas conformacionais distintas. A ApL-1 exibiu um mínimo pronunciado entre 215 e 218 nm, sem bandas negativas bem definidas em 208 e 222 nm, padrão característico de proteínas ricas em folhas  $\beta$ . A deconvolução espectral indicou predominância de conformações  $\beta$ , com contribuição reduzida de  $\alpha$ -hélices e participação relevante de voltas  $\beta$ , perfil compatível com o descrito das galectinas e com os espectros publicados para lectinas marinhas como ALL, CCL e AcrL (Carneiro *et al.*, 2017; Marques *et al.*, 2018; Torres *et al.*, 2025).

Quando comparada a outras galectinas a ApL-1 apresenta algumas similaridades. A galectina ALL, isolada de *Aplysina lactuca*, apresenta espectros de dicroísmo circular que mostram, predominâncias de conformações  $\beta$ , com mínimo em torno de 216–218 nm e baixa quantidade de conformações  $\alpha$ -hélices (Carneiro *et al.*, 2017). De forma semelhante, a galectina AFL, exibe predominância de estruturas  $\beta$ , com mínimo próximo a 216 nm, sendo classificada como proteína do tipo  $\beta$ -I (Carneiro *et al.*, 2019). Perfis equivalentes foram descritos para a lectina CCL (Marques *et al.*, 2018), e para a proto-galectina AcrL, cujos espectros apresentam banda negativa próxima a 218 nm e elevado conteúdo de folhas  $\beta$ , associado a frações expressivas de voltas  $\beta$  e regiões desordenadas (Torres *et al.*, 2025). Nesse contexto, os dados de dicroísmo circular posicionam a ApL-1 de forma consistente dentro do conjunto de galectinas marinhas.

Em contraste com a ApL-1, a lectina ApL-2 apresentou um espectro de dicroísmo circular com mínimo amplo na região de 216–218 nm. A deconvolução espectral realizada pelo servidor BestSel revelou que a estrutura secundária da ApL-2 é majoritariamente composta por  $\alpha$ -hélices, correspondendo a aproximadamente 44,5% do conteúdo estrutural, associada a uma fração expressiva de regiões classificadas como desordenadas, 30,1%, enquanto as folhas  $\beta$  representaram uma parcela minoritária da estrutura total.

De fato, lectinas previamente caracterizadas no gênero *Aplysina*, como a ACL, apresentam estrutura secundária fortemente dominada por folhas  $\beta$ , com contribuição mínima de  $\alpha$ -hélices (Oton, 2023). De forma semelhante, a AfiL, não apresenta contribuição detectável de  $\alpha$ -hélices, enquanto a AFL, exibe apenas cerca de 2% de  $\alpha$ -hélice. Mesmo lectinas classificadas como galectinas, como a ALL e a CCL, apresentam percentuais relativamente baixos de  $\alpha$ -hélices, em torno de 9% e 10,4%, respectivamente, mantendo predominância de estruturas  $\beta$  (Carneiro *et al.*, 2017; Carneiro *et al.*, 2019; Marques *et al.*, 2018). Nesse contexto, o elevado conteúdo de  $\alpha$ -hélices observado para a ApL-2 representa uma característica estrutural atípica quando comparada às lectinas de esponjas marinhas previamente descritas.

A comparação entre os dados de espalhamento dinâmico de luz (DLS) das lectinas ApL-1 e ApL-2 e os dados de cromatografia de exclusão molecular (SEC) descritos para lectinas de esponjas marinhas evidencia padrões distintos de organização oligomérica. A ApL-1 apresentou perfil monodisperso em solução, com diâmetro hidrodinâmico compatível com uma organização dimérica, comportamento semelhante ao descrito para a proto-galectina AcrL, cuja massa molecular nativa estimada por SEC é de aproximadamente 36 kDa, indicando associação dimérica por interações fracas (Torres *et al.*, 2025). Esse perfil contrasta com o observado para diversas lectinas galactose-específicas do gênero *Aplysina*, como AaL (*A. archeri*) e ALL (*A. lacunosa*), que, embora não pertençam à família das galectinas, organizam-se predominantemente como tetrâmeros em solução, com massas nativas em torno de 63 kDa, conforme determinado por SEC (Miarons; Fresno, 2000).

Entre as galectinas marinhas, a lectina ALL, isolada de *Aplysina lactuca*, apresenta subunidades de massa semelhante às da ApL-1 (–15 kDa), porém organiza-se funcionalmente como um homotetrâmero de aproximadamente 60 kDa, de acordo com caracterização estrutural mais recente baseada em SEC (Duarte *et al.*, 2023). Estudos anteriores, baseados em espectrometria de massas, haviam sugerido uma possível organização dimérica para a ALL (Carneiro *et al.*, 2017), evidenciando que galectinas marinhas podem adotar diferentes estados oligoméricos dependendo do contexto estrutural e funcional. De forma semelhante, a galectina AFL também apresenta organização tetrâmera em solução, com massas nativas entre 54 e 64 kDa (Carneiro *et al.*, 2019).

Em contraste, a ApL-2 exibiu comportamento hidrodinâmico mais complexo, caracterizado por maior diâmetro hidrodinâmico e distribuição heterogênea, sugerindo a formação de oligômeros de maior ordem em solução. Esse padrão é compatível com os dados de SEC descritos para lectinas como ACL e AfiL, que apresentam massas moleculares nativas elevadas, variando entre aproximadamente 120 e 224 kDa, e múltiplos estados oligoméricos (Andrade *et al.*, 2025; Viana, 2021). Em particular, a AfiL apresenta massa molecular nativa elevada observada por SEC, associada a comportamento hidrodinâmico heterogêneo descrito por DLS, reforçando a tendência à oligomerização extensa em determinadas lectinas de esponjas marinhas.

Assim, à luz dos dados de DLS obtidos neste estudo e em comparação com os estados oligoméricos inferidos por SEC para lectinas de esponjas marinhas descritas na literatura, observa-se que, embora isoladas da mesma espécie, ApL-1 e ApL-2 adotam estratégias distintas de organização estrutural em solução. Enquanto a ApL-1 apresenta uma

organização oligomérica mais simples e homogênea, compatível com galectinas do tipo proto, a ApL-2 se destaca por uma organização oligomérica mais complexa e dinâmica, refletindo a diversidade conformacional observada entre lectinas marinhas.

A determinação completa da estrutura primária da lectina ApL-1 por espectrometria de massas em *tandem* representa um avanço relevante, considerando que apenas um número restrito de lectinas de esponjas marinhas possui a sequência de aminoácidos totalmente elucidada. A estratégia experimental baseada na combinação de digestões com tripsina e quimiotripsina permitiu a obtenção de peptídeos extensamente sobrepostos, possibilitando a reconstrução confiável da cadeia polipeptídica completa, composta por 145 resíduos de aminoácidos. Os baixos desvios entre as massas teóricas e experimentais reforçam a robustez e a confiabilidade dos dados obtidos.

A análise *in silico* da sequência completa de ApL-1 revelou massa molecular teórica de 15,64 kDa e ponto isoelétrico levemente ácido (pI 5,92), valores compatíveis com os reportados para galectinas de esponjas marinhas, como as isoformas de ALL, ALL-a e ALL-b e a galectina CCL, que apresentam massas na faixa de 15–16 kDa e caráter ácido moderado (Carneiro *et al.*, 2017; Duarte *et al.*, 2023; Marques *et al.*, 2018). Propriedades físico-químicas semelhantes também foram descritas para a galectina AcrL, isolada de *Aiolochoiria crassa*, reforçando a conservação dessas características entre proto-galectinas de esponjas marinhas (Torres *et al.*, 2025).

A composição de aminoácidos de ApL-1, associada ao valor negativo de GRAVY, indica uma proteína globalmente hidrofílica, compatível com lectinas solúveis envolvidas em interações proteína-carboidrato no meio extracelular (Gasteiger *et al.*, 2005). Perfil semelhante foi descrito para a AcrL, cuja composição favorece solubilidade em meio aquoso e estabilidade conformacional compatíveis com sua função lectínica (Torres *et al.*, 2025).

A identificação, por meio da análise no servidor SMART, de um domínio GLECT abrangendo praticamente toda a extensão de ApL-1 constitui evidência central para sua classificação como membro da família das galectinas. Esse domínio corresponde ao sítio típico de reconhecimento de carboidratos dessas lectinas e sustenta a arquitetura de proto-galectina, caracterizada pela presença de um único domínio funcional. Organização estrutural equivalente foi descrita para a AcrL, ainda que com modificações pontuais em regiões conservadas, sem comprometimento do dobramento global (Cummings *et al.*, 2022, Torres *et al.*, 2025).

A análise de similaridade por BLASTp confirmou essa atribuição, revelando elevada identidade de sequência de ApL-1 com as isoformas ALL-a e ALL-b, com cobertura

total da sequência e valores de *E-value* extremamente baixos,  $1 \times 10^{-85}$  para ALL-a e  $1 \times 10^{-76}$ , respectivamente, o que sugere indicativos de forte relação evolutiva. Esse padrão é consistente com o observado para a AcrL, que apresenta elevada identidade com ALLs, identidade intermediária com a CCL e menor similaridade com galectinas de outros gêneros de Porifera, como a *Geodia cydonium* e *Cinachyrella* sp., refletindo um gradiente de conservação associado à distância filogenética (Duarte *et al.*, 2023; Stalz *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2025; Ueda *et al.*, 2013).

O alinhamento múltiplo evidenciou, na sequência de ApL-1, a presença de regiões correspondentes aos motivos característicos de galectinas, ainda que com substituições em posições classicamente conservadas. O heptapeptídeo assinatura típico das galectinas (LHFNPR) apresentou substituições, sendo representado em ApL-1 pelos resíduos <sup>39</sup>H, <sup>40</sup>V, <sup>41</sup>D, <sup>42</sup>Y, <sup>43</sup>R, <sup>44</sup>K e <sup>45</sup>H. De forma semelhante, o segmento tradicionalmente descrito como VLN (posições 60–62) foi observado como LNS, e o motivo FPF (posições 80–82) apresentou substituições para ETP. Além disso, foi identificada a conservação do trecho correspondente ao segmento <sup>47</sup>G, <sup>48</sup>G, <sup>49</sup>K, <sup>50</sup>P, <sup>51</sup>S, <sup>52</sup>T, <sup>53</sup>G, <sup>54</sup>K, <sup>55</sup>P e <sup>56</sup>W, também associado ao domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC).

Essas variações pontuais não impedem a correspondência estrutural com galectinas descritas em esponjas marinhas, como ALL-a, ALL-b e, parcialmente, CCL, indicando que o arcabouço funcional do domínio lectínico permanece preservado. Situação semelhante foi descrita para a proto-galectina AcrL, na qual substituições em regiões canônicas não comprometeram o dobramento global típico (Duarte *et al.*, 2023; Torres *et al.*, 2025). Apesar dessas substituições, a AcrL preserva o dobramento característico das galectinas e sua organização funcional em solução (Torres *et al.*, 2025). De modo geral, galectinas podem formar dímeros ou estruturas oligoméricas de maior ordem, dependendo do contexto estrutural e das interfaces de associação, indicando que variações pontuais na sequência primária não comprometem o núcleo estrutural das proto-galectinas marinhas (Cummings *et al.*, 2022; Duarte *et al.*, 2023; Torres *et al.*, 2025).

A predição estrutural tridimensional de ApL-1 corrobora esses achados, revelando um dobramento característico de galectinas do tipo proto, composto predominantemente por folhas  $\beta$  organizadas em arranjo de  $\beta$ -sanduíche formado por cadeias antiparalelas conectadas por alças flexíveis. Esse padrão estrutural, amplamente descrito para galectinas de esponjas marinhas, incluindo ALL, CCL e AcrL, está diretamente associado à estabilidade

conformacional e à organização do sítio de reconhecimento de carboidratos (Carneiro *et al.*, 2017; Duarte *et al.*, 2023; Marques *et al.*, 2018; Torres *et al.*, 2025).

Esse comportamento é consistente com o descrito para a lectina ACL (*Aplysina cauliformis*), para a qual apenas um número limitado de peptídeos foi obtido a partir de diferentes estratégias proteolíticas, sem permitir a reconstrução completa da sequência primária (Viana, 2021).

A recorrente identificação de resíduos de cisteína nos peptídeos de ApL-2 sugere a presença de pontes dissulfeto como elementos relevantes para sua estabilização estrutural, em concordância com o comportamento eletroforético observado sob condições redutoras e não redutoras. Esse perfil aproxima a ApL-2 de AfiL, cuja estrutura primária parcial também apresenta abundância de resíduos de cisteína, associada à estabilização por ligações dissulfeto, apesar da ausência de similaridade com famílias clássicas de lectinas animais (Andrade *et al.*, 2025).

A análise de similaridade por BLASTp reforça essa interpretação, uma vez que a sequência parcial de ApL-2 não apresentou similaridade com lectinas previamente caracterizadas, mas exibiu alinhamentos estatisticamente significativos com proteínas putativas codificadas nos genomas de esponjas marinhas, como *Dysidea avara* e *Halichondria panicea*. Padrão semelhante foi descrito para a AfiL e para a lectina H-3 de *Haliclona caerulea*, que também não apresentaram homologia com lectinas conhecidas, mas exibiram elevada similaridade com proteínas putativas de *Amphimedon queenslandica* (Andrade *et al.*, 2025; Carneiro *et al.*, 2013a).

Em conjunto, os resultados indicam que a ApL-2 compartilha características estruturais e evolutivas com lectinas como ACL e AfiL, marcadas por sequenciamento primário incompleto, ausência de similaridade com famílias clássicas de lectinas animais e conservação de regiões ricas em cisteína. Esse conjunto de evidências aponta para a existência de um grupo funcionalmente relevante de lectinas de esponjas marinhas que não há uma classificação definida até o presente momento.

## 6 CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que *Aplysina pseudolacunosa* expressa um repertório lectínico funcionalmente e estruturalmente diverso, representado por duas proteínas inéditas, ApL-1 e ApL-2. A ApL-1 foi caracterizada como uma galectina do tipo proto, com estrutura dominada por folhas  $\beta$  e motivos conservados típicos dessa família, enquanto a ApL-2 apresentou propriedades estruturais e hidrodinâmicas incompatíveis com lectinas clássicas, sugerindo tratar-se de uma lectina não convencional ainda pouco explorada em Porifera.

A coexistência dessas duas lectinas na mesma espécie revela uma complexidade inesperada nos sistemas de reconhecimento glicídico de esponjas marinhas, ampliando a compreensão da diversidade molecular do gênero *Aplysina*. Esses achados fornecem um arcabouço sólido para estudos futuros sobre a organização estrutural, a evolução funcional e o potencial biotecnológico dessas lectinas marinhas.

## REFERÊNCIAS

- ABEBE, Endeshaw Chekol *et al.* The structure, biosynthesis, and biological roles of fetuin-A: a review. **Frontiers In Cell And Developmental Biology**, [s.l.], v. 10, p. 111034, 18 jul. 2022.
- AGUILAR-CAMACHO, Jose Maria; DOONAN, Liam; MCCORMACK, Grace P. Evolution of the main skeleton-forming genes in sponges (phylum Porifera) with special focus on the marine Haplosclerida (class Demospongiae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [s.l.], v. 131, p. 245–253, 1 fev. 2019
- 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.
- ANDRADE, F. R. N. *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.
- ANDRADE, F. R. N. *et al.* New lectin isolated from the tropical sponge *Haliclona* (Reniera) *implexiformis* (Hechtel, 1965) shows antibiofilm effect. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s.l.], v. 95, n. 1, 2023.
- ANGATA, T. Review: I-type lectins. **Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects**, [s.l.], v. 1565, n. 2–3, p. 94–115, 2002.
- BAENZIGER, J.; FIETE, D. Structure of the complex oligosaccharides of fetuin. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 254, n. 3, p. 789-795, fev. 1979.
- BARONDES, S.H. *et al.* Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 269, n. 33, p. 20807-20810, ago. 1994.
- BHATIA, Saurabh. History, scope and development of biotechnology. *In: Introduction to Pharmaceutical Biotechnology, Volume 1*. IOP Publishing, [s.l.], p. 1-1-1–6. 2018.
- BHIDE, Gaurang P.; COLLEY, Karen J. Sialylation of N-glycans: mechanism, cellular compartmentalization and function. **Histochemistry and Cell Biology**, [s.l.], v. 147, n. 2, p. 149–174, 2017.
- BIRHANU, Alemayehu Godana. Mass spectrometry-based proteomics as an emerging tool in clinical laboratories. **Clinical Proteomics**, [s.l.], v. 20, n. 1, p. 253, 26 ago. 2023.
- BRADFORD, Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRUSCA, Richard C.; MOORE, Wendy; SHUSTER, Stephen M. **Invertebrados**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

BOYD, W.C.; SHARPLEIGH, E. Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, [s.l.], v. 119, p. 419, 1954.

BURIAK, I. C-type lectins from marine bivalves: functional diversity and immune roles. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 22, n. 12, p. 527, 2024.

CARNEIRO, Rômulo Farias *et al.* A new mucin-binding lectin from the marine sponge *Aplysina fulva* (AFL) exhibits antibiofilm effects. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s.l.], v. 662, p. 169–176, 15 fev. 2019.

CARNEIRO, Rômulo Farias *et al.* Halilectin 1 (H-1) and Halilectin 2 (H-2): two new lectins isolated from the marine sponge *Haliclona caerulea*. **Journal of Molecular Recognition**, [s.l.], v. 26, n. 1, p. 51–58, 2013b.

CARNEIRO, Rômulo Farias *et al.* H-3, a new lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*: Purification and mass spectrometric characterization. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [s.l.], v. 45, n. 12, p. 2864–2873, 2013a.

CARNEIRO, Rômulo Farias *et al.* Isolation, biochemical characterization and antibiofilm effect of a lectin from the marine sponge *Aplysina lactuca*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 99, p. 213–222, 1 jun. 2017.

CARNEIRO, Rômulo Farias. *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. 253-265, 2024.

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.

CHEITRI, Dixita *et al.* Lectins: biological significance to biotechnological application. **Carbohydrate Research**, [s.l.], v. 506, p. 108367, ago. 2021.

CRUZ-BARRAZA, José Antonio *et al.* Integrative Taxonomy and Molecular Phylogeny of Genus *Aplysina* (Demospongiae: verongida) from mexican pacific. **PloS One**, [s.l.], v. 7, n. 8, p. 42049, 13 ago. 2012. Public Library of Science (PLoS).

CUMMINGS, Richard D. *et al.* C-type lectins. **Essentials of glycobiology**. 3. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, [s.l.], cap. 34. 2017.

CUMMINGS, Richard D. *et al.* Galectins. In: VARKI, Ajit *et al.* (ed.). **Essentials of glycobiology**. 3. ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, [s.l.], cap. 36. 2015.

DAHIHANDE, Azraj S.; THAKUR, Narsinh L. Differences in the Structural Components Influence the Pumping Capacity of Marine Sponges. **Frontiers in Marine Science**, [s.l.], v. 8, p. 125, 17 nov. 2021.

DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System**. San Carlos, CA: DeLano Scientific LLC, [s.l.], 2002. Disponível em: <https://pymol.org>. Acesso em: 30 dez. 2025.

DE VOOGD, N. J. *et al.* **World Porifera Database**. [s.l.], 2025. Disponível em: <https://www.marinespecies.org/porifera>. Acesso em: 23 dez. 2025. DOI: 10.14284/359.

DÍAZ, María Cristina; RÜTZLER, Klaus. Sponges: an essential component of Caribbean coral reefs. **Bulletin of Marine Science**, [s.l.], v. 69, n. 2, p. 535–546, 2001.

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

DODD, R. Y.; MACLENNAN, A. P.; HAWKINS, D. C. Haemagglutinins from marine sponges. **Vox Sanguinis**, [s.l.], v. 15, n. 5, p. 386-391, 1968.

DUARTE, Jéssica de Assis *et al.* Structural characterization of a galectin from the marine sponge *Aplysina lactuca* (ALL) with synergistic effects when associated with antibiotics against bacteria. **Biochimie**, [s.l.], v. 214, p. 165–175, 1 nov. 2023.

ELUMALAI, P.; LAKSHMI, S. Lectins: Innate immune defense and therapeutics. **Springer Nature**, 2022.

ERESKOVSKY, Alexander; LAVROV, Andrey. Porifera. In: LADOUCEUR, Elise E. B. (ed.). **Invertebrate Histology**. Hoboken: John Wiley & Sons, [s.l.], p. 19-54. 2021.

ESPOSITO, Roberta *et al.* Marine Demospongiae: a challenging treasure of bioactive compounds. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 20, n. 4, p. 244, 31 mar. 2022.

FLEMING, Patrick J.; FLEMING, Karen G. HullRad: fast calculations of folded and disordered protein and nucleic acid hydrodynamic properties. **Biophysical Journal**, [s.l.], v. 114, n. 4, p. 856-869, fev. 2018.

GABIUS, Hans-Joachim *et al.* The sugar code: functional lectinomics. **Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects**, [s.l.], v. 1866, n. 1, p. 130049, 2002.

GARDÈRES, J. *et al.* Porifera Lectins: diversity, physiological roles and biotechnological potential. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 13, n. 8, p. 5059-5101, 2015.

GASTEIGER, E. *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: WALKER, John M. (ed.). **The proteomics protocols handbook**. Totowa: Humana Press, [s.l.], p. 571–607. 2005.

GOMEZ-BANDERAS, J. Marine Natural Products: A Promising Source of Environmentally Friendly Antifouling Agents for the Maritime Industries. **Frontiers in Marine Science**, [s.l.], 24 fev. 2022.

GUPTA, G. S. Lectins: An Overview. In: Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications. **Springer Vienna**, [s.l.], p. 3–25. 2012.

- GURYANOVA, Svetlana V.; OVCHINNIKOVA, Tatiana V. Innate Immunity Mechanisms in Marine Multicellular Organisms. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 6, p. 1-11, 1 set. 2022.
- HATAKEYAMA, Tomomitsu; UNNO, Hideaki. Functional Diversity of Novel Lectins with Unique Structural Features in Marine Animals. **Cells**, [s.l.], v. 12, n. 14, p. 1814, 9 jul. 2023.
- HOOPER, John N. A. *et al.* Zootaxa 20 years: Phylum **Porifera**. *Zootaxa*, [s.l.], v. 4979, n. 1, p. 38–56, 28 maio 2021.
- IDEO, Hiroko *et al.* Galectin-8-N-domain recognition mechanism for sialylated and sulfated glycans. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 286, n. 13, p. 11346–11355, 2011.
- IDEO, Hiroko; TSUCHIDA, Akiko; TAKADA, Yoshio. Lectin-Based Approaches to Analyze the Role of Glycans and Their Clinical Application in Disease. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 25, n. 18, p. 10231, 23 set. 2024.
- JIANG, Y. *et al.* Comprehensive overview of bottom-up proteomics using mass spectrometry. **ACS Measures Science Au**, [s.l.], 2024.
- JUMPER, John *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, [s.l.], v. 596, n. 7873, p. 583-589, 15 jul. 2021.
- KARLSSON, Niclas G. *et al.* Glycosylation differences between pig gastric mucin populations: a comparative study of the neutral oligosaccharides using mass spectrometry. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 326, n. 3, p. 911-917, 15 set. 1997.
- KARTHIKEYAN, A.; JOSEPH, A.; NAIR, B. G. Promising bioactive compounds from the marine environment and their potential effects on various diseases. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. [s.l.], 1 dez. 2022.
- KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s.l.], v. 1572, p. 187–197, 2002.
- KLÖPPEL, Anne *et al.* Depth profile of *Aplysina* ssp.: morphological, histological and biochemical aspects and their role in species distinction. **Marine Biodiversity**, [s.l.], v. 39, n. 2, p. 121–129, 2009.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, [s.l.], v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.
- LEBRETON, Annie *et al.* A comprehensive phylogenetic and bioinformatics survey of lectins in the fungal kingdom. **Journal of Fungi**, [s.l.], v. 7, n. 6, p. 453, 2021.
- LETUNIC, Ivica; KHEDKAR, Supriya; BORK, Peer. SMART: recent updates, new developments and status in 2020. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 49, n. 1, p. 458-460, 26 out. 2020.
- LISACEK, Frédérique; SCHNIDER, Boris; IMBERTY, Anne. Tools for structural lectinomics: from structures to lectomes. **Bba Advances**, [s.l.], v. 7, p. 100154, 2025.

LÓPEZ-LUCENDO, María F. *et al.* Growth-regulatory Human Galectin-1: crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding. **Journal Of Molecular Biology**, [s.l.], v. 343, n. 4, p. 957-970, out. 2004.

LORBER, B. *et al.* Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, [s.l.], v. 40, n. 6, p. 372–382, nov. 2012.

MADDEN, Thomas L. The BLAST sequence analysis tool. In: MCENTYRE, Judy (ed.). *The NCBI Handbook* [Internet]. Bethesda, MD: **National Center for Biotechnology Information** (US), [s.l.], 2002. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em: 30 dez. 2025.

MANNELLI, Lorenzo di Cesare *et al.* Pharmacological activities of extracts and compounds isolated from Mediterranean sponge sources. **Pharmaceuticals**, [s.l.], v. 14, n. 12, p. 1329, 2021.

MARQUES, Dayara Normando *et al.* Antibacterial activity of a new lectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 109, p. 1292–1301, 1 abr. 2018.

MASANGKAY, F. R. *et al.* Sponges (Porifera: spongillida) as ecological indicators for parasitic protozoans cryptosporidium and giardia infective stages in freshwater ecosystems. **Ecological Indicators**, [s.l.], v. 139, p. 108895, jun. 2022.

MEHBUB, M. F. *et al.* Marine sponge-derived natural products: trends and opportunities for the decade of 2011-2020. **Frontiers in Marine Science**. [s.l.], v. 87, p. 143-152. 2024.

MIARONS, P. B.; FRESNO, M. Lectins from tropical sponges. Purification and characterization of lectins from genus *Aplysina*. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 275, n. 38, p. 29283–29289, 22 set. 2000.

MICSONAI, A. *et al.* Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s.l.], v. 112, n. 24, p. E3095–E3103, 2015.

MOURA, R. M. *et al.* CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 125, n. 3, p. 709-719, 2006.

MUÑOZ-MIRANDA, L. A.; IÑIGUEZ-MORENO, M. An extensive review of marine pigments: sources, biotechnological applications, and sustainability. **Aquatic Sciences**. [s.l.], v. 27, n. 6, p.], v.42 jul. 2023.

NEIGEL, J. E.; SCHMAHL, G. P. Allozyme variation in Caribbean sponges: patterns of geographic differentiation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, [s.l.], v. 75, p. 1–17, 1984.

OHKAWA, Mayuka *et al.* Characterization of HOL-30: a novel *tandem-repeat* galectin from the marine sponge *Halichondria okadai*. **BBA Advances**, [s.l.], v. 7, p. 100153, 2025.

OLECHNOVIČ, K.; VENCLOVAS, Č. VoroMQA: assessment of protein structure quality using interatomic contact areas. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s.l.], v. 85, n. 6, p. 1131–1145, 2017.

OTON, Levi Ferreira. Avaliação do potencial antimicrobiano de uma lectina da esponja marinha *Aplysina cauliformis* em combinação com antibióticos. 2023. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.

PEUMANS, Willy J.; VAN DAMME, Els J. M. The role of lectins in plant defence. **The Histochemical Journal**, [s.l.], v. 27, n. 4, p. 253-271, abr. 1995. Mensal. Springer Science and Business Media LLC.

PINHEIRO, U. S.; HAJDU, E.; CUSTÓDIO, M. R. *Aplysina* Nardo (Porifera, Verongida, Aplysinidae) from the Brazilian coast with description of eight new species. **Zootaxa**, [s.l.], v. 1609, n. 1, p. 33-35, 8 out. 2007.

PITA, L. *et al.* The chromosomal genome sequence of *Aplysina* spp. reveals pigment oxidation and phenotypic responses under environmental exposure. **Wellcome Open Research**, [s.l.], 2025.

PUYANA, Monica *et al.* Metabolite variability in caribbean sponges of the genus *Aplysina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 25, n. 6, p. 592–599, 1 nov. 2015.

RADHAKRISHNAN, A. *et al.* Classification of lectins. In: ELUMALAI, P.; LAKSHMI, S. (ed.). **Lectins**. Springer, [s.l.], 2021.

RATHINAM, R. B. *et al.* The immune system of marine invertebrates: earliest adaptation of animals. **Comparative Immunology Reports**, [s.l.], v. 7, p. 200163, dez. 2024.

RAPOSO, C. D. *et al.* Human lectins, their carbohydrate affinities and where to find them. **Biomolecules**, [s.l.], v. 11, n. 2, p. 188, 2021.

ROBBE, Catherine *et al.* Evidence of Regio-specific Glycosylation in Human Intestinal Mucins. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 278, n. 47, p. 46337-46348, nov. 2003.

ROTTER, A. *et al.* The Essentials of Marine Biotechnology. **Frontiers in Marine Science**. v. 66, n. 3, p. 63-74. mar. 2021.

SACO, A. *et al.* A genomic and transcriptomic analysis of the C-type lectin family in invertebrates: pattern recognition receptors in innate immunity. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], 2023.

SAMPAIO, A.H.; ROGERS, D.J.; BARWELL, C.J. A galactose specific lectin from the red marine algae *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**. [s.l.], v. 48, p. 765-769, 1998.

SANDES, Joana *et al.* Biodiversity of Porifera in Brazil. **Zoologia (Curitiba)**, [s.l.], v. 41, p. 1–16, 2024.

- SANTI MARTIGNAGO, C. C. *et al.* Exploring Antibacterial Properties of Marine Sponge Derived Natural Compounds: A Systematic Review. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 15, p. 75-81. 1 jan. 2025.
- SARAIVA, M. A. Determination of the size parameters of  $\alpha$ -synuclein amyloid precursor forms through DLS analysis. **European Biophysics Journal**, [s.l.], May, 2025.
- SHARON, N.; LIS, H. Lectins: Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science*, [s.l.], v. 177, p. 949-959, 1972.
- SHARON, N.; LIS, H. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 98, n. 2, p. 637–674, 1998.
- SHARON, N. Lectins: Past, present and future. **Glycobiology**. [s.l.], 2008.
- SHA], 2008 Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *The Journal of Biological Chemistry*, [s.l.], 2007.
- SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**. [s.l.], Nov. 2004.
- SRINIVASAN, R. *et al.* Marine bacterial secondary metabolites: A treasure house for structurally unique and effective antimicrobial compounds. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 17, p 58-65. Out. 2021.
- SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLI, J.; OLSEN, J.V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 1, n. 6, p. 2859-2860, 2007.
- STALZ, Holger *et al.* The *Geodia cydonium* galectin exhibits prototype and chimera-type characteristics and a unique sequence polymorphism within its carbohydrate recognition domain. **Glycobiology**, [s.l.], v. 16, n. 5, p. 402-414, 31 jan. 2006.
- SOUSA, Andressa Rocha de Oliveira *et al.* Structural characterization of a galectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis* with leishmanicidal potential. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - General Subjects**, [s.l.], v. 1865, n. 12, p. 129992, dez. 2021.
- TAILFORD, Louise E. *et al.* Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. **Frontiers In Genetics**, [s.l.], v. 6, n. 5, p. 413, 19 mar. 2015.
- TRAN, Duy T.; HAGEN, Kelly G. Ten. Mucin-type O-Glycosylation during Development. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 288, n. 10, p. 6921-6929, mar. 2013.
- TSUJI, Tsutomu; OSAWA, Toshiaki. Carbohydrate structures of bovine submaxillary mucin. **Carbohydrate Research**, [s.l.], v. 151, p. 391-402, ago. 1986.
- THOMPSON, Fabiano; THOMPSON, Cristiane. **Biotecnologia Marinha**. Rio Grande: Ed. FURG, 2020.

TORRES, Renato C. F. *et al.* Structural insights and antimicrobial synergy of a proto-galectin from the marine sponge *Aiolochoxia crassa*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, [s.l.], v. 275, p. 111034, 2025.

UEDA, Takuya *et al.* Isolation of novel prototype galectins from the marine ball sponge *Cinachyrella* sp. guided by their modulatory activity. **Glycobiology**, [s.l.], v. 23, n. 4, p. 412–425, 2013.

VAN SOEST, R. W. M. *et al.* Global Diversity of Sponges (Porifera). **PLOS ONE**, [s.l.], v. 7, n. 4, p. e35105, 27 abr. 2012.

VARKI, Ajit *et al.* Biological roles of glycans. **Glycobiology**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 3-49, 24 ago. 2016.

VARKI, Ajit *et al.* **Essentials of glycobiology**. 4. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, [s.l.], 2022.

VARIJAKZHAN *et al.* Bioactive compounds from marine sponges: fundamentals and applications. **Marine Drugs**, [s.l.], v.19, n. 246, p.2-38, 2021.

VASTA, G.; AHMED, H. Introduction to Animal Lectins. *Animal Lectins*, [s.l.], July 2017, p. 2–10, 2008.

VASTA, Gerardo R. Galectins as Pattern Recognition Receptors: structure, function, and evolution. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, [s.l.], p. 21-36, 23 set. 2011.

VASTA, Gerardo R. Lectins as Innate Immune Recognition Factors: Structural, Functional, and Evolutionary Aspects. *In: The Evolution of the Immune System: Conservation and Diversification*. **Elsevier Inc.**, [s.l.], 2016. p. 205–224.

VASTA, Gerardo R.; WANG, Jin Xing. Galectin-mediated immune recognition: Opsonic roles with contrasting outcomes in selected shrimp and bivalve mollusk species. *Developmental and Comparative Immunology* **Elsevier**. [s.l.], v. 99, p. 125- 132. set. 2020.

VIANA, J. T. *et al.*, v. structural and functional diversity of lectins associated with immunity in the marine shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, [s.l.], v. 129, p. 152–160, 2022.

Viana, L.A.A. Purificação, caracterização bioquímica e estrutura primária parcial de uma lectina da esponja marinha *Aplysina cauliformis*. 2021. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

WANG, Xian Wei; VASTA, Gerardo R.; WANG, Jin Xing. The functional relevance of shrimp C-type lectins in host-pathogen interactions. *Developmental and Comparative Immunology* **Elsevier**. [s.l.], v. 55, p. 26-34. ago. 2020.

WANG, Ying *et al.* A novel fuclectin from *Apostichopus japonicus* with broad PAMP recognition pattern. **Fish and Shellfish Immunology**, [s.l.], v. 77, p. 402–409, 1 jun. 2018.

WEBSTER, Nicole S.; THOMAS, Torsten. The Sponge Hologenome. **Mbio**, Australian Institute Of Marine Science, Townsville, Qld, Australiaa; Centre For Marine Bio-Innovation, University Of New South Wales, Sydney, Australiab, [s.l.], v. 7, n. 2, p. 16-30, 4 maio 2016. Mensal. American Society for Microbiology.

WEIS, William I.; DRICKAMER, Kurt. STRUCTURAL BASIS OF LECTIN-CARBOHYDRATE RECOGNITION. **Annual Review Of Biochemistry**, [s.l.], v. 65, n. 1, p. 441-473, jun. 1996. Annual Reviews.

WISNOVSKY, Simon; BERTOZZI, Carolyn R. Reading the glyco-code: new approaches to studying protein-carbohydrate interactions. **Current Opinion In Structural Biology**, [s.l.], v. 75, p. 102395, ago. 2022.

ZHANG, Yuhan *et al.* A Sweet Warning: mucin-type o-glycans in cancer. **Cells**, [s.l.], v. 11, n. 22, p. 3666, 18 nov. 2022.