



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

RENATA PINHEIRO CHAVES

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
DUAS LECTINAS PERTENCENTES A FAMÍLIA DE LECTINAS HOMOLOGAS A
Oscillatoria agardhii AGGLUTININ (OAAH)**

**FORTALEZA
2018**

RENATA PINHEIRO CHAVES

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE DUAS
LECTINAS PERTENCENTES A FAMÍLIA DE LECTINAS HOMOLOGAS A *Oscillatoria*
agardhii AGGLUTININ (OAAH)

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano

FORTALEZA
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C439c Chaves, Renata Pinheiro.

Caracterização estrutural e potencial biotecnológico de duas lectinas pertencentes a família de lectinas homologas A *Oscillatoria agardhii* agglutinin (OAAH) / Renata Pinheiro Chaves. – 2018.
116 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano.

1. Algas marinhas vermelha. 2. Lectina. 3. Família OAAH. 4. Efeito antineoplásico e aglutinação bacteriana. 5. Estrutura tridimensional. I. Título.

CDD 660.6

RENATA PINHEIRO CHAVES

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE DUAS
LECTINAS PERTENCENTES A FAMÍLIA DE LECTINAS HOMOLOGAS A *Oscillatoria*
agardhii AGGLUTININ (OAAH)

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia de Recursos Naturais.

Aprovada em: 06 / 09 / 2018 .

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha (Interno)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Pro^a. Dr^a. Oscariana Viana de Sousa (Externo)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bruno Lopes de Sousa (Externo)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

A minha mãe guerreira, Elizene.

Ao meu esposo Rômulo e minha família.

Aos amigos e a todos que me deram alguma
oportunidade na vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as oportunidades e maravilhas que aconteceu na minha vida.

Ao meu marido, Rômulo Farias, por todas as alegrias, companheirismo, amizade, força, muitas ajudas e “puxões de orelha”. Não tem como descrever o que ele realmente representa para mim.

À minha família, especialmente minha mãe, Elizene, pela força e apoio incondicional em todos os momentos de minha vida. Ao meu irmão querido, Rafael, por todas as travessuras, brigas e companheirismo. E aos meus primos-irmãos por todas as alegrias, brincadeiras, brigas e momentos juntos.

A minha amiga Marilce Lopes por me aturar mesmo depois de muitos anos e que continue assim para sempre.

Ao meu orientador, Celso Shiniti Nagano, pela fé demonstrada em mim, oportunidades, ensinamentos, paciência e ajudas.

Aos professores Alexandre Sampaio, André Coelho, Bruno Anderson, Edson Texeira, Oscarina Viana e Silvana Saker, pelas oportunidades e ensinamentos.

Aos companheiros dos laboratórios de Espectrometria de Massas Aplicada a Proteína e de Biotecnologia Marinha, Alexandra, Andressa, Ana Kátia, Jhonatas, Paulo, Maria Luiza, Lívia, Regi, Phillipe, Renato e Vitória pela contribuição e por todos os momentos vividos em laboratório.

Aos amigos e colegas de laboratório mais antigos, porém não esquecidos, Arthur, Bruno Lopes, Claudener, Helton, Ito, Mayron, Rafael, Sâmia e Raquel por todo o carinho, ajuda, ensinamentos, comemorações, conselhos e amizade.

Ao professor André Coelho e aos alunos do Laboratório de Biotecnologia Molecular pelo espaço e auxílio na execução dos experimentos de biologia molecular.

Ao professor Edson e os colegas do Laboratório Integrado de Biomoléculas, Luiz, Leonardo e Renally, pela contribuição na execução dos experimentos com células tumorais.

Ao professor Bruno Rocha e aos alunos do Laboratório de Biocristalização pela contribuição e auxílio na execução do projeto de cristalografia.

À professora Oscarina Viana e os alunos do Laboratório Microbiologia Ambiental e do Pescado pelo espaço e auxílio na execução dos experimentos de microbiologia.

À professora Silvana Saker e os alunos do Laboratório de Produtos Naturais Marinhos pelo espaço e auxílio em equipamentos.

À todos que participaram diretamente nesse trabalho, Suzete, Rômulo Farias, Bruno Lopes, Luiz Neto, Ito Liberato, Eduardo Salviano, Cristiane Teles, Jade Abreu e os professores pela imensa contribuição neste trabalho e ajuda. Sem vocês esse trabalho não seria realizado.

Aos professores e servidores do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, especialmente aos professores André e Bartolomeu e ao servidor Renato por todo o apoio ao longo destes quatro anos.

À todos os colegas professores e servidores do DEP, especialmente o professor Alexandre por aceitar participar da banca examinadora.

Ao professor Bruno Lopes por toda a contribuição na minha formação acadêmica e pela disponibilidade em participar da banca examinadora.

Ao professor Bruno Rocha e a professora Oscarina Viana pela disponibilidade em participar da banca examinadora.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela concessão da bolsa por 24 meses.

“Quando recebemos um ensinamento devemos receber como um valioso presente e não como uma dura tarefa.

Eis aqui a diferença que transcende.”

Albert Einstein

RESUMO

Lectinas são proteínas ubíquas que possuem domínio(s) de reconhecimento e ligação a carboidratos, sendo capazes de interagir com diversas moléculas dos fluidos biológicos e receptores de superfície celular, apresentando uma variedade de efeitos biológicos. Lectinas isoladas de algas possuem estruturas moleculares únicas, além de especificidades de ligação a carboidratos e atividades biológicas similares, sendo especialmente interessantes para aplicações bioquímicas e biológicas. As lectinas das algas marinhas vermelhas *Meristiella echinocarpa* (MeL) e *Solieria filiformis* (SfL) já possuem protocolo de purificação estabelecido e já foi observado efeito bacteriostático contra bactérias gram-negativas, atividade antinociceptiva, anti-inflamatória e antidepressiva para a SfL. O objetivo desse trabalho foi determinar as estruturas primárias das lectinas MeL e SfL, avaliar seus potenciais biotecnológicos contra bactérias e a linhagem tumoral MCF-7, expressar de forma recombinante a SfL-1 em *E. coli* e determinar sua estrutura tridimensional. A estrutura primária de uma isoforma da MeL e duas isoformas da SfL (SfL-1 e SfL-2) foram determinadas por combinação de espectrometria de massas e técnicas em biologia molecular. MeL, SfL-1 e -2 possuem quatro domínios internos repetidos em suas sequências de aminoácidos e apresentam alta identidade nos sítios de ligação a carboidrato com as lectinas da família da hemaglutinina de *Oscillatoria aghardii* (OAAH). A análise de dicroísmo circular demonstrou a presença predominante de estruturas β -folhas com espectros de proteínas- β_1 para ambas lectinas, que apresentaram T_m entre 50 ° e 60 ° C. As lectinas MeL e SfL não apresentaram atividade antibacteriana. MeL foi capaz de aglutinar células de *Salmonella* multirresistente e *V. alginolyticus* e a SfL foi capaz de aglutinar *E. coli* e *S. aureus*. A SfL apresentou efeitos antineoplásicos contra a linhagem celular MCF-7 inibindo 50 % da viabilidade celular na concentração de 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e induziu apoptose via caspase em 24 horas, enquanto que a inibição dos fibroblastos foi de 34% com o mesmo tratamento, e a MeL estimulou a citoproliferação da MCF-7 em concentrações até 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A isoforma SfL-1 foi produzida de forma recombinante, apresentou atividade hemaglutinante, inibição e estrutura secundária semelhante a nativa. A estrutura tridimensional foi determinada por difração de raios X e a lectina é composta de dois domínios tipo β -barril formados por cinco cadeias β antiparalelas que estão ligadas por um peptídeo curto entre os β -barris. Em relação a atividade antibacteriana a rSfL-1 também não apresentou atividade, mas foi capaz de uma maior aglutinação bacteriana das células *E. coli* e *S. aureus* do que a nativa e foi capaz de aglutinar a *V. alginolyticus*. Assim, as lectinas MeL e SfL, que apresentaram diferenças no reconhecimento a células bacterianas,

mostram um potencial na identificação inicial de bactérias em estudos de tipagem bacteriana. E a SfL ainda apresentou efeitos antineoplásicos contra a linhagem MCF-7 mostrando seu potencial anticancerígeno. E a SfL, que apresentou efeitos antineoplásicos contra a linhagem MCF-7, também possui um potencial anticancerígeno.

Palavras chaves: Algas marinhas vermelha. Lectina. Família OAAH. Efeito antineoplásico. Aglutinação bacteriana. Estrutura tridimensional.

ABSTRACT

Lectins are ubiquitous proteins that has domain(s) for recognition and binding to carbohydrates, being able to interact with various biological fluid molecules and cell surface receptors, presenting a variety of biological effects. Lectins isolated from algae have unique molecular structures, as well as carbohydrate binding specificities and similar biological activities, and are especially interesting for biochemical and biological applications. The lectins isolated from red marine algae *Meristiella echinocarpa* (MeL) *Solieria filiformis* (SfL) have purification protocols established and bacteriostatic effect against gram-negative bacteria, antinociceptive, anti-inflammatory and anti-depressive activity for SfL has already been observed. The objective of this work was to determine the primary structures of MeL and SfL, to evaluate their biotechnological potential, to express of recombinant form SfL-1 in *E. coli* and to determine its three-dimensional structure. The primary structure of a MeL isoform and two SfL isoforms (SfL-1 and SfL-2) were determined by combination of mass spectrometry and molecular biology techniques. MeL, SfL-1 and -2 have four internal repeated domains in their amino acid sequences and showed high identity at the carbohydrate binding sites with lectins from the hemagglutinin family of *Oscillatoria aghardii* (OAAH). The analysis of circular dichroism demonstrated the predominant of β -strands structures with spectra of proteins- β I for both lectins, which presented T_m between 50° and 60 °C. This lectins MeL and SfL did not exhibit antibacterial activity. MeL was able to agglutinate cells of multidrug resistant *Salmonella* and *V. alginolyticus*, and SfL was able to agglutinate *E. coli* and *S. aureus*. SfL showed antineoplastic effects against MCF-7 cell line inhibiting 50% cell viability at 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and induced apoptosis via caspase in 24 hours, while the inhibition of fibroblasts was 34% with the same treatment, while MeL stimulated the cytoproliferation of MCF-7 in concentrations up to 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The SfL-1 isoform was produced of recombinant form, exhibited hemagglutinating activity, inhibition for sugars, and secondary structure similar to native. The three-dimensional structure was determined by X-ray diffraction and the lectin is composed of two β -barrel type domains formed by five antiparallel β -strands, which are bound by a short peptide between the β -barrels. In relation to the antibacterial activity, rSfL-1 also showed no activity, but was able to cause a greater bacterial agglutination of the *E. coli* and *S. aureus* than the native one. Furtehertmore, rSfL was able to agglutinate *V. alginolyticus*. Thus, MeL and SfL lectins, which showed differences in bacterial cell recognition, show potential in the initial identification of bacteria in bacterial typing studies. And SfL, which presented antineoplastic effects against the MCF-7 cell line, also has an anticancer potential.

Key words: Marine red algae. Lectin. OAAH family. Antineoplastic effect. Bacterial agglutination. Three-dimensional structure.

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 - Lectinas de algas com estrutura primária determinada.....	25
Quadro 02 - Lectinas de algas produzidas de forma recombinante.....	30
Quadro 03 - Lectinas da família OAAH produzidas de forma recombinante.....	78

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Dímero da lectina da alga vermelha <i>Grifthisin sp.</i>	31
Figura 02 - Monômero da lectina da cianobactéria <i>Oscillatoria agardhii</i>	32
Figura 03 - Alga marinha vermelha <i>Solieria filiformis</i>	32
Figura 04 - Alga marinha vermelha <i>Meristiella echinocarpa</i>	33
Figura 05 - Eletroforese SDS-PAGE da MeL e SfL.....	53
Figura 06 - Cromatografia de exclusão molecular da MeL e SfL.....	54
Figura 07 - Espectro de massas de MeL e SfL.....	56
Figura 08 - Eletroforese em gel de agarose 1% da extração do DNA genômico.....	58
Figura 09 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos fragmentos de PCR da MeL.....	58
Figura 10 - Sequenciamento de nucleotídeos de uma isolectina da alga vermelha <i>Meristiella echinocarpa</i>	59
Figura 11 - Estrutura primária da MeL.....	60
Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 1%: extração de RNA total.....	61
Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação do 3'RACE da SfL...	62
Figura 14 - Sequenciamento de nucleotídeos de isolectinas da alga vermelha <i>Solieria filiformis</i>	62
Figura 15 - Estrutura primária das isolectinas SfL-1 e SfL-2.....	64
Figura 16 - Domínios repetidos das lectinas MeL, SfL-1 e SfL-2.....	65
Figura 17 - Alinhamento múltiplo de lectinas de algas da família OAAH.....	66
Figura 18 - Espectros de dicroísmo circular da MeL e SfL.....	68
Figura 19 - Espectros de dicroísmo circular em função da temperatura de MeL e SfL na presença e ausência de manana.....	70
Figura 20 - Teste de aglutinação da MeL contra <i>Salmonella</i> e <i>V. alginolyticus</i>	72
Figura 21 - Teste de aglutinação da SfL contra <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	72
Figura 22 - Efeito das lectinas MeL e SfL na proliferação e viabilidade celular de MCF-7.....	74
Figura 23 - Efeito da SfL na proliferação e viabilidade celular de MCF-7 e HDF.....	75
Figura 24 - Efeitos apoptóticos induzidos por SfL em células MCF-7.....	76
Figura 25 - Efeitos da SfL na expressão de mRNA de genes pró-apoptóticos.....	77
Figura 26 - Estruturas tridimensionais de membros da família OAAH.....	80
Figura 27 - Sítio de ligação a carboidratos da família OAAH.....	81
Figura 28 - Vetor de expressão pET28a-c(+) e SfL-1 recombinante.....	82

Figura 29 -	Teste de expressão com variação de IPTG.....	86
Figura 30 -	Teste de expressão com variação de temperatura.....	87
Figura 31 -	Teste de expressão com diferentes clones.....	87
Figura 32 -	Purificação da rSfL-1 em coluna de HisTrap.....	88
Figura 33 -	Expressão e purificação da rSfL-1.....	88
Figura 34 -	Cromatografia de exclusão molecular da rSfL-1.....	89
Figura 35 -	Expressão e purificação da rSfL-1.....	89
Figura 36 -	Espectros de dicroísmo circular da rSfL-1.....	90
Figura 37 -	Espectros de dicroísmo circular em função da temperatura de SfL e rSfL-1 na presença e ausência de manana.....	91
Figura 38 -	Cristais obtidos da rSfL-1 para difração de raios X.....	91
Figura 39 -	Estrutura primária da rSfL-1 na estrutura cristalográfica.....	93
Figura 40 -	Gráfico de Ramachandran das coordenadas da SfL-1.....	93
Figura 41 -	Estrutura cristalográfica da rSfL-1.....	94
Figura 42 -	Alinhamento estrutural da rSfL-1 com a BOA e MBHA.....	95
Figura 43 -	Interações relacionadas a união dos dois β -barris da rSfL-1.....	96
Figura 44 -	Aminoácidos envolvidos na ligação ao carboidrato.....	97
Figura 45 -	Teste de aglutinação contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>V. alginolyticus</i>	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Sequências de aminoácidos dos peptídeos de MeL.....	57
Tabela 02 - Sequências de aminoácidos dos peptídeos de SfL.....	61
Tabela 03 - Estatísticas cristalográficas da coleta de dados e do refinamento para resolução da estrutura da rSfL-1.....	92
Tabela 04 - Interações polares e apolares entre os β -barris da rSfL-1.....	96

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Algas.....	18
1.2	Lectinas.....	19
1.3	Lectinas de algas.....	20
1.3.1	<i>Propriedades físico-químicas</i>	23
1.3.2	<i>Atividades biotecnológicas</i>	23
1.3.3	<i>Estruturas primárias</i>	25
1.3.4	<i>Expressão recombinante</i>	29
1.3.5	<i>Estruturas terciárias</i>	31
1.4	Lectina da alga marinha vermelha <i>Meristiella echinocarpa</i>	32
1.5	Lectina da alga marinha vermelha <i>Solieria filiformis</i>	33
2	OBJETIVOS.....	35
3.	CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS MEMBROS DA FAMÍLIA OAAH: LECTINAS SFL E MEL.....	36
3.1	Família de lectinas OAAH.....	36
3.1.1	<i>Atividade biotecnológica das lectinas da família OAAH</i>	37
3.2	Atividade antibacteriana e aglutinação de bactérias de lectinas de algas.....	38
3.3	Atividade antineoplásica de lectinas de algas.....	40
4	METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	41
4.1	Material biológico.....	41
4.2	Purificação das lectina MeL e Sfl.....	41
4.2.1	<i>Atividade hemaglutinante e a inibição por manana</i>	42
4.2.2	<i>Estimativa de massa molecular por SDS-PAGE e cromatografia de exclusão molecular</i>	42
4.3	Sequenciamento dos aminoácidos do N-terminal.....	43
4.4	Análise por espectrometria de massas.....	43
4.4.1	<i>Determinação da massa molecular (MS)</i>	43
4.4.2	<i>Espectrometria de massas sequencial (MS/MS)</i>	44
4.5	Clonagem e sequenciamento de nucleotídeos.....	45
4.5.1	<i>Desenho de iniciadores específicos</i>	45
4.5.2	<i>Extração de DNA genômico da Meristiella echinocarpa e amplificação do fragmento de nucleotídeos que codificam a lectina</i>	45

4.5.3	<i>Extração de RNA total da Solieria filiformis e amplificação do fragmento de nucleotídeos que codificam a lectina</i>	46
4.5.6	<i>Purificação dos plasmídeos transformados e sequenciamento dos nucleotídeos</i>	47
4.6	Dicroísmo Circular	48
4.7	Atividade antibacteriana e aglutinação de bactérias.....	48
4.7.1	<i>MIC: Mínima concentração inibitória</i>	49
4.7.2	<i>Aglutinação de bactérias</i>	49
4.8	Atividade antineoplásica	50
4.8.1	<i>Cultivo das células</i>	50
4.8.2	<i>Avaliação do efeito das lectinas MeL e SfL na proliferação celular</i>	50
4.8.3	<i>Avaliação da apoptose/autofagia por citometria de fluxo da SfL</i>	51
4.8.3.1	<i>Extração de RNA mensageiro e qRT-PCR</i>	51
4.8.4	<i>Análise estatística</i>	52
5	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	53
5.1	Purificação das lectinas MeL e SfL.....	53
5.2	Determinação da estrutura primária de uma isolectina da MeL.....	57
5.3	Determinação da estrutura primária de duas isolectinas da SfL.....	60
5.4	Análise das estruturas primárias das lectinas MeL e SfL.....	65
5.5	Análise da estrutura secundária das lectinas MeL e SfL	68
5.6	Atividade antibacteriana e aglutinação de bactérias das lectinas MeL e SfL.....	71
5.7	Atividade antineoplásica das lectinas MeL e SfL	74
6	EXPRESSÃO RECOMBINANTE E CARACTERIZAÇÃO DA ISOFORMA SfL-1 DA ALGA VERMELHA <i>Solieria filiformis</i>	78
6.1	Expressão heteróloga das lectinas da família OAAH.....	78
6.1	Estrutura tridimensional das lectinas da família OAAH	80
7	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	82
7.1	Desenho do gene sintético para a isoforma SfL-1	82
7.2	Expressão e purificação da proteína recombinante rSfL-1.....	82
7.2.1	<i>Expressão da rSfL-1</i>	82
7.2.2	<i>Purificação da rSfL-1</i>	83
7.2.3	<i>Cromatografia de exclusão molecular da rSfL-1 e SfL nativa</i>	83
7.2.4	<i>Atividade hemaglutinante da rSfL-1 e sua inibição</i>	83
7.3	Dicroísmo Circular	83
7.4	Cristalografia por Difração em Raio-X: Obtenção da Estrutura terciária	84

7.4.1	<i>Cristalização: obtenção dos cristais de proteína</i>	84
7.4.2	<i>Difração de Raios X</i>	84
7.4.3	<i>Resolução da Estrutura</i>	84
7.5	Atividade antimicrobiana e aglutinação de bactérias	85
8	RESULTADO E DISCUSSÃO	86
8.1	Produção de proteína recombinante rSfL-1	86
8.2	Análise da estrutura secundária da rSfL-1	90
8.3	Determinação da estrutura cristalográfica da rSfL-1	91
8.4	Atividade antibacteriana e aglutinação de bactérias	98
9	CONCLUSÃO	100
	REFERÊNCIAS	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 Algas

As algas compõem uma multiplicidade de espécies que vão desde organismos unicelulares microscópicos e procarióticos, incluindo as cianobactérias, a eucarióticos, como as algas gigantes kelps (conjunto de grandes algas pardas). Estes organismos apresentam ampla variedade morfológica, estrutural e metabólica, possuindo diferentes ciclos de vida. São seres fotossintetizantes, porém não possuem folhas, raízes ou mesmo tecidos vasculares. Habitam os oceanos, corpos de água doce, solos, rochas e até árvores. As algas possuem clorofila e pigmentos denominados de acessórios, estes últimos podendo proporcionar as algas as mais variadas colorações, dependendo da espécie e das condições ambientais (HOEK *et al.*, 1995).

As algas são encontradas em uma variedade de nichos ecológicos, e assim, nas mais diversas condições ambientais em que estão submetidas, como variações de intensidade de luz, concentrações de oxigênio (O₂) e dióxido de carbono (CO₂) ao longo da coluna de água. Com isso, obtiveram uma adaptação para a sobrevivência, incluindo a biossíntese de vários tipos de substâncias e metabólitos secundários (CARDOZO *et al.*, 2007). Assim, as algas têm sido reveladas como fonte dos mais variados metabólitos secundários, que funcionam como sistema de defesa química, e a investigação desses produtos naturais demonstraram que muitos possuem propriedade bioativa.

Já foram isolados, a partir de algas, agentes terapêuticos naturais que incluem classes de compostos como, por exemplo, terpenóides, ácido ribonucleico, proteínas, carboidratos e lípidos, com as mais diversas atividades biológicas: antibacterianas, antioxidantes, antifúngicas, antimaláricas, antitumorais e anti-inflamatórias, entre outras (FUSETANI, 2000; MAYER *et al.*, 2009; MAYER *et al.*, 2011).

É esta diversidade na composição de metabólitos, características bioquímicas de seus cloroplastos, substância de reserva, estrutura física, ciclo reprodutivo e quantidade de pigmentos, que confere às algas a grande variedade de espécies, sendo classificadas em Rhodophyta (algas vermelhas), Phaeophyta (algas pardas), Chlorophyta (algas verdes) e Cyanobacteria (algas azuis) (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Os compostos mais explorados são ácidos graxos e esteróis, carotenoides, polissacarídeos, ficocoloides, policetídeos, compostos halogenados e lectinas (CARDOZO *et al.*, 2007).

1.2 Lectinas

A primeira definição de lectinas foi proposta por Boyd e Shapleigh em 1954, sendo tratadas como proteínas que se ligam reversivelmente a carboidratos, aglutinam células e/ou precipitam polissacarídeos e glicoconjugados, apesar de ter sido Stillmark em 1888 o primeiro autor a relatar na literatura sobre substâncias protéicas em plantas com atividade hemaglutinante. Posteriormente essa atividade foi amplamente utilizada para detecção e quantificação de lectinas.

A definição de lectinas vegetais mais utilizada é a proposta por Peumans e Van Damme em 1995, que define essas moléculas como proteínas de origem não imune contendo pelo menos um domínio não catalítico capaz de se ligar reversivelmente a mono- ou oligossacarídeos específicos, podendo ou não apresentar outros tipos de sítios com domínios catalíticos.

Sampaio (1997) combinando várias definições propôs que lectinas são em geral, proteínas de origem não imune que se ligam e/ou precipitam carboidratos e glicoconjugados, exibindo uma atividade ligante reversível, não covalente a carboidratos e substâncias que os contenham, livres em solução ou na superfície de células, sem alterar a estrutura covalente das ligações glicosídicas.

As lectinas, por terem a capacidade de se ligar a mono- e oligossacarídeos, são capazes de interagir com diversas moléculas dos fluidos biológicos e receptores de superfície celular, agindo como decodificadores das informações trocadas entre moléculas, células e organismos, e assim apresentando uma variedade de efeitos biológicos (SELL; COSTA, 2000). Lectinas foram relatadas primariamente em plantas, mas essas moléculas ocorrem em todas as classes e famílias de seres vivos, desde bactérias e vírus até mamíferos (LIENER; SHARON; GOLDSTEN, 1986). Em algas marinhas há poucos estudos de isolamento e caracterização estrutural quando comparado com plantas superiores.

1.3 Lectinas de algas

O primeiro relato da atividade hemaglutinante em algas marinhas foi observada por Boyd, Almodóvar e Boyd (1966), onde dentre 24 extratos aquosos testados, seis algas pardas e uma cianobactéria aglutinaram eritrócitos dos grupos A e O, uma alga verde e duas algas pardas aglutinaram eritrócitos de todos os grupos, e uma alga vermelha aglutinou apenas eritrócitos humanos do grupo A. Rogers e Blunden (1980) observou que tratamentos enzimáticos podem causar incrementos na atividade hemaglutinante. Isso se deve a remoção de compostos na superfície celular tornando acessíveis carboidratos e glicoproteínas após o tratamento enzimático (LIS; SHARON, 1986). Após alguns estudos comparativos para analisar a atividade hemaglutinante em algas, Hori, Miyazawa e Ito (1981) testaram diferentes sangues de animais e demonstraram que extratos de algas possuem atividade mais efetiva contra eritrócitos de coelhos.

A ocorrência de lectinas em algas marinhas no nordeste brasileiro foi estudada pela primeira vez por Ainouz e Sampaio em 1991. Vinte espécies de algas marinhas foram analisadas em relação a atividade hemaglutinante contra eritrócitos humanos (A, B, O e AB) tratados com tripsina e contra eritrócitos de galinha, coelho, ovelha, cabra e vaca. Extratos salinos de dez algas marinhas aglutinaram eritrócitos de coelhos, enquanto sete extratos aglutinaram eritrócitos de galinha, seis com eritrócitos de vaca e quatro extratos com eritrócitos de ovelha. Já para o sistema sanguíneo humano foi observado nos extratos das algas marinhas vermelhas *Gracilaria ferox* e *Hypnea musciformis* e no extrato da alga verde *Caulerpa cupressoides*.

A presença de lectinas foi analisada em aproximadamente 800 espécies de algas no entanto, este número ainda é pequeno, considerando que existem milhares de espécies de algas marinhas distribuídos nas classes Chlorophyceae, Rhodophyceae e Phaeophyceae, além da Cyanophyceae. Em conjunto, estes estudos demonstraram que aproximadamente 60% das espécies analisadas exibiram hemaglutinação. O número de espécies positivas poderia ser maior, uma vez que nos primeiros estudos, os autores usaram um tipo limitado de eritrócitos e, em geral sem utilização de eritrócitos tratados com enzimas (TEIXEIRA *et al.*, 2012). O aprimoramento dos protocolos de extração e a utilização de diferentes tipos de eritrócitos animais poderia aumentar o número de espécies positivas.

Em geral, as hemácias de animais (principalmente as de coelho) tratadas enzimaticamente são as mais utilizadas para a detecção da atividade hemaglutinante em extratos de macroalgas marinhas (NAGANO; SANZ; CALVETE, 2011), pois maioria das lectinas de algas não aglutinam as células do sistema sanguíneo humano.

A lectina da alga vermelha *Ptilota plumosa* foi a primeira lectina de alga purificada e caracterizada parcialmente (ROGERS; BLUNDEN; EVANS, 1977). A obtenção e isolamento de proteínas é um procedimento imprescindível para o estudo e caracterização de uma proteína de interesse e para tal pode recorrer-se a diversas técnicas analíticas. Os protocolos clássicos para purificar lectinas de algas marinhas incluem métodos tais como precipitação de proteínas (utilizando o sal ou etanol), cromatografia líquida e eletroforese. A cromatografia de troca iônica tem sido utilizada eficientemente no isolamento de lectinas de macroalgas, principalmente nos estágios iniciais de purificação, como em muitas das algas vermelhas (SINGH; WALIA, 2017), a da alga verde *Chlorella pyrenoidosa* (ZHENG; YU; LIU, 2003) e da alga parda *Hizikia fusiformis* (WU *et al.*, 2016).

Além da cromatografia de troca iônica a cromatografia de afinidade tem sido utilizada como uma ferramenta útil, ainda que, a maioria das lectinas de algas apresentem especificidade de ligação a açúcares complexos. Essa técnica foi utilizada para a purificação das lectinas presentes em espécies do gênero *Codium* (ROGERS; LOVELESS; BALDING, 1986; FÁBREGAS *et al.* 1988), *Ulva* (SAMPAIO; ROGERS; BARWELL, 1998a; WANG *et al.*, 2004), *Bryopsis* (KIM; KLOCHKOVA, 2005; NIU *et al.*, 2009; HAN *et al.*, 2010, 2011), algumas lectinas das algas vermelhas como a gênero *Ptilota* e das espécies *Pterocladia capilacea* e *Vidalia obtusiloba*, entre outras (OLIVEIRA *et al.*, 2002; MELO *et al.*, 2004; SINGH; WALIA, 2017), e da cianobactéria *Microcystis viridis* (YAMAGUCHI *et al.*, 1999). Algumas das lectinas de cianobactérias são purificadas por cromatografias de interação hidrofóbica ou fase reversa com exclusão molecular, como as lectinas das cianobactérias *Nostoc ellipsoforum* (BOYD *et al.*, 1997) *Oscillatoria agardhii* (SATO *et al.*, 2000) e *Scytonema varium* (BOKESCH *et al.*, 2003).

Apesar das lectinas de algas marinhas apresentarem o conteúdo proteico semelhante às lectinas de plantas terrestres, eles diferem em alguns aspectos. Em geral, as lectinas de macroalgas são monoméricas possuindo baixo peso molecular, a atividade hemaglutinante é inibida por glicoproteínas e açúcares complexos e não dependem de cátions divalentes (ROGERS; HORI, 1993; HORI; MIYAZAWA; ITO, 1990).

Lectinas de algas pardas são difíceis de detectar devido, principalmente, à quantidade de polifenóis presente. É bem conhecido que os polifenóis são liberados na extração e que estes compostos e seus produtos de oxidação, as quinonas, se ligam fortemente às proteínas, causando uma falsa hemaglutinação (LOOMIS, 1974; ROGERS; LOVELESS, 1991).

Em vegetais superiores foi relatado que as lectinas estão envolvidas na defesa do organismo vegetal contra micro-organismos patógenos, por meio do reconhecimento glicoprotéico celular e a imobilização dos patógenos reduzindo o seu crescimento e os tornando incapazes de se multiplicar (ETZLER, 1986). Em algas, ainda que lectinas possuam atividades antiviral, antifúngicas, antibacterianas, hemolíticas, entre outras, o envolvimento delas em relação à função fisiológicas de algas é muito pouco estudado (VIANA *et al.*, 2002). Uma função fisiológica foi proposta para a alga verde *Bryopsis plumosa*, onde a lectina bryohealina está envolvida na agregação de organelas celular da alga e proteção contra contaminações bacterianas para o sucesso da regeneração de protoplastos, sendo um papel chave na fase inicial da regeneração do protoplastos (KLOCHKOVA *et al.*, 2005). A mesma regeneração de protoplastos também foi observada nas algas verdes *Microdictyon umbilicatum* (KIM; KLOCHKOVA; WEST, 2002) e *Chaetomorpha aerea* (KLOCHKOVA *et al.*, 2003). Outra função proposta para uma lectina de alga está no processo de reprodução da alga vermelha *Aglaothamnion callophyllidicola* e *A. oosumiense*, que estão envolvidas no reconhecimento dos gametas masculino e feminino (HAN *et al.*, 2012a; HAN *et al.*, 2012b).

Em relação a aplicações biológicas, as lectinas de algas podem ser utilizadas no reconhecimento de células malignas, na tipagem sanguínea e como agentes mitogênicos e imunossupressores (ROGERS; LOVELESS; BALDING, 1986; DALTON; LONGLEY; BIRD, 1995). As lectinas purificadas da alga verde *Codium fragile* spp. *tomentosoides* têm sido produzidas e comercializadas e são rotineiramente usadas em estudos bioquímicos, incluindo tipagem sanguínea e caracterização de polissacárideos da superfície das células (HARNEDY; FITZGERALD, 2011).

1.3.1 Propriedades físico-químicas

Estudos bioquímicos revelaram que muitas das lectinas de algas e cianobactérias são especialmente interessantes para aplicação biológica, pois apresentam baixo peso molecular (assim induzem menor imunogenicidade), geralmente tem forma monomérica, termoestabilidade (em parte devido a suas diversas pontes dissulfeto), grande proporção de aminoácidos ácidos (com ponto isoeletrico, *pI*, entre o pH 4 e 6), independência de cátions divalentes para atividade biológica, e afinidade para glicanos complexos, mas não para os monossacáridos.

Essas propriedades sugerem que as lectinas de algas e de cianobactérias possuem estruturas moleculares e domínio de ligação a carboidratos distintos de lectinas conhecidas de outras fontes (SATO; HORI, 2009). Estas manifestações sugerem que as algas são uma importante fonte de substâncias com potencial para aplicações farmacológicas.

1.3.2 Atividades biotecnológicas

Na literatura podemos encontrar atividades de lectinas de algas marinhas com efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos, como a *Phaeodactylum tricornutum* (GUZMAN; GATO; CALLEJA, 2001), *Amansia multifida* (NEVES *et al.*, 2007), *Caulerpa cupressoides* (VANDERLEI *et al.*, 2010), *Pterocladia capillacea* (SILVA *et al.*, 2010), *Hypnea cervicornis* (BITENCOURT *et al.*, 2008), *Bryothamnion triquetrum* e *B. seaforthii* (VIANA *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2004), *Solieria filiformis* (ABREU *et al.*, 2016). A indução da migração de neutrófilos *in vitro* e *in vivo* na cavidade peritoneal de ratos ou camundongos por lectinas das algas *Amansia multifida*, *Gracilaria caudata*, *Bryothamnion triquetrum* e *B. seaforthii* foi observada por Neves e colaboradores em 2001. A lectina da alga *Bryothamnion seaforthii* também mostrou ter efeito relaxante em anéis da aorta de ratos Wistar machos, ocorrendo através da interação específica do sítio de ligação a carboidratos com o endotélio, por meio da ativação da enzima óxido nítrico sintase (LIMA *et al.*, 2010). As lectinas da *Kappaphycus alvarezzi* e da *Eucheuma serra* apresentaram atividade antiviral contra cepas de influenza (SATO *et al.*, 2011a; SATO *et al.*, 2015).

A atividade antioxidante foi demonstrada em lectinas de algas do gênero *Sargassum* (LIM *et al.* 2002). Atividade inseticida foi observado para lectinas das algas vermelhas *Gracilaria cornea* (LIMA *et al.*, 2005) e *Gracilaria ornata* (LEITE *et al.*, 2005) afetando os insetos *Boophilus microplus* e *Callosobruchus maculatus*, respectivamente. A lectina da alga vermelha *Hypnea musciformis* possui atividade antifúngica contra *Trichophyton rubrum* e *Colletotrichum lindemuthianum* perdendo a atividade quando incubada previamente com fetuina (MELO *et al.*, 1997). A alga vermelha *Ptilota plumosa*, por exemplo, possui uma lectina específica à galactose que apresenta uma pequena atividade contra células cancerígenas, obtendo fraca atividade contra as linhagens de células de osteossarcoma, coriocarcinoma e hepatoma (WANG *et al.*, 2000).

Lectinas das algas vermelhas *Bryothamnion triquetrum* e *Bryothamnion seaforthii* exibem capacidade de reconhecer células de carcinoma do cólon humano diferenciando-as das demais células devido ao reconhecimento de glicorreceptores da membrana celular (PINTO *et al.*, 2009).

A lectina recombinante da cianobactéria *Microcystis viridis* apresentou atividade antineoplásica contra várias linhagens celulares: HT-29, HepG2, SGC-7901 e SK-OV-3 (LI; ZHANG, 2010). A atividade anti-tumoral apresentado pela lectina se deve ao reconhecimento dos glicanos da superfície celular de células tumorais, seguido de atividade apoptótica (WANG *et al.*, 2000). A lectina da alga vermelha *Griffithsia sp* (griffithsin), que é específica a manose e glicose, apresenta um grande potencial biomédico possuindo atividade antiviral contra uma ampla variedade de espécies (SINGH; WALIA, 2017).

As lectinas das cianobactérias *Nostoc ellipsosporum* (Boyd *et al.*, 1997), *Microcystis viridis* (BEWLEY *et al.*, 2004), *Scytonema varium* (BOKESCH *et al.*, 2003), *Microcystis aeruginosa* (HUSKENS *et al.*, 2010) e *Oscillatoria agardhii* (SATO; OKUYAMA; HORI, 2007), têm atraído a atenção por causa de suas fortes atividades anti-HIV (LEE *et al.*, 2013). Esse grupo de lectinas não só inibe a infecção de células pelo vírus, mas também podem evitar a transmissão do vírus a partir de células infectadas com vírus para células não infectadas. Uma característica estrutural comum a essas lectinas é a presença de domínios repetidos (HUSKENS; SCHOLS, 2012).

1.3.3 Estruturas primárias

Entre as lectinas purificadas e caracterizadas, apenas 27 espécies de algas apresentam estruturas primárias completas de lectinas determinadas na literatura. Onde 16 espécies são de algas vermelhas, 6 espécies de algas verdes e 5 espécies de cianobactérias (QUADRO 01).

Quadro 01 – Lectinas de algas com estrutura primária determinada (Continua).

Lectina	Espécie	Metodologia	Especificidade	Referências
Algas vermelhas				
AML	<i>Amansia multifida</i>	Clonagem de cDNA	Manana de levedura	SILVA, 2016
AOL1	<i>Aglaothamnion oosumienses</i>	Clonagem de cDNA	N-acetil galactosamina (GalNAc)	HAN <i>et al.</i> , 2012b
Rhodobindin	<i>Aglaothamnion callophyllidicola</i>	Clonagem de cDNA	Fetuina e Asialofetuina	HAN <i>et al.</i> , 2015
BTL	<i>Bryothamnion triquetrum</i>	Degradação de Edman e MS	Fetuina e Mucina	CALVETE <i>et al.</i> , 2000
BSH	<i>Bryothamnion seaforthii</i> (Venezuela)	Degradação de Edman e MS	Fetuina, Avidina e Mucina	MEDINA-RAMIREZ; GIBBS; CALVETE, 2007
BSL2 BSL3 BSL4	<i>Bryothamnion seaforthii</i> (Brasil)	MS/MS	Fetuina, Avidina e Mucina	NASCIMENTO-NETO <i>et al.</i> , 2012
ESA-2	<i>Eucheuma serra</i>	Degradação de Edman	N-glicanos ricos em manose	HORI <i>et al.</i> , 2007
EDA-2	<i>Eucheuma denticulatum</i>	Clonagem de cDNA	N-glicanos ricos em manose	HUNG <i>et al.</i> , 2015a
(GAL) anti-mycobacterial lectin	<i>Gelidium amansii</i>	Clonagem de cDNA	N.D.	MASSI; AHMAD, 2012
GFL	<i>Gracilaria fisheri</i>	Clonagem de cDNA	N.D.	SUTTISRISUNG <i>et al.</i> , 2011
GRFT	<i>Grifthisin sp.</i> (estirpe Q66D336)	Degradação de Edman e MS	Manose e N-acetil D-glicosamina (GlcNAc)	MORI <i>et al.</i> , 2005
Hypnin A-1 Hypnin A-2 Hypnin A-3	<i>Hypnea japonica</i>	Degradação de Edman	Transferrina, Fetuina e α 1-glicoproteína acida e suas formas desializadas	HORI; MATSUBARA; MIYASAWA, 2000; OKUYAMA <i>et al.</i> , 2009
HML	<i>Hypnea musciformis</i>	Degradação de Edman e MS/MS	Mucina	NAGANO <i>et al.</i> , 2005
HCA	<i>Hypnea cervicornis</i>	Degradação de Edman e MS/MS	Mucina	NAGANO <i>et al.</i> , 2005

Quadro 01 – Lectinas de algas com estrutura primária determinada (Conclusão).

Lectina	Espécie	Metodologia	Especificidade	Referências
Algas vermelhas				
KAA-1 KAA-2	<i>Kappaphycus alvarezii</i>	Clonagem de cDNA	N-glicanos ricos em manose	HIRAYAMA <i>et al.</i> , 2016
KSA-2	<i>Kappaphycus striatum</i>	Clonagem de cDNA	N-glicanos ricos em manose	HUNG <i>et al.</i> , 2015b
Algas verdes				
Bryohealina BPL2 BPL3 BPL4	<i>Bryopsis plumosa</i>	Clonagem de cDNA	Manose, GalNAc e GlcNAc	YOON <i>et al.</i> , 2008; HAN <i>et al.</i> , 2010, 2011, 2012c
BHL	<i>Bryopsis hypnoides</i>	Clonagem de cDNA	Mucina, GalNAc e GlcNAc	NIU <i>et al.</i> , 2009
BCA	<i>Boodlea coacta</i>	Clonagem de cDNA	N-glicanos ricos em manose	SATO <i>et al.</i> , 2011b
CBA	<i>Codium barbatum</i>	Clonagem de cDNA	N-glicanos ricos em manose	PRASEPTIANGGA; HIRAYAMA; HORI, 2012
UPL1	<i>Ulva pertusa</i>	Clonagem de cDNA	GlcNAc e tiroglobulina	WANG <i>et al.</i> , 2004
ULL	<i>Ulva liminetica</i>	Clonagem de cDNA	Mucina e Fucose	ISHIHARA; ARAI; SHIMADA, 2009
Algas azuis (Cianobactérias)				
Microvirin (MVN)	<i>Mycrocystis aeruginosa</i>	Clonagem de DNA genômico	Manana	KEHR <i>et al.</i> , 2006
MVL	<i>Mycrocystis viridis</i>	Clonagem de DNA genômico	Manose	YAMAGUCHI <i>et al.</i> , 1999
Cyanovirin-N (CV-N)	<i>Nostoc ellipsosporum</i>	Degradação de Edman	N-glicanos ricos em manose	GUSTAFSON <i>et al.</i> , 1997
OAA	<i>Oscillatoria agardhii</i>	Clonagem de DNA genômico	N-glicanos ricos em manose	SATO <i>et al.</i> , 2000
Scytovirin (SVN)	<i>Scytonema varium</i>	Degradação de Edman	N-glicanos ricos em manose	BOKESCH <i>et al.</i> , 2003

Fonte: Elaborada pela autora. N.D. – Não determinado. As técnicas utilizadas para determinação da estrutura primária são: Sequenciamento N-terminal de peptídeos por degradação de Edman e sobreposição dos peptídeos, sequenciamento *de novo* por espectrometria de massas sequencial (MS/MS) e clonagem de DNA complementar - cDNA ou de DNA genômico.

Estruturas primárias parciais foram relatadas na literatura, tais como a lectina HFL da alga parda *Hizikia fusiformis* (WU *et al.*, 2016), EPL-1 e EPL-2 da alga verde *Enteromorpha prolifera* (AMBROSIO *et al.*, 2003), CiL-2 da alga verde *Codium isthmocladum* (SILVA, 2013) e Sjoestedina da alga vermelha *Gracilariopsis sjoestedii* (PAULA, 2011).

A primeira lectina de alga a ter estrutura primária determinada foi da cianobactéria *Nostoc ellipsosporum* por Gustafson e colaboradores em 1997. E entre as macroalgas foi da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum* por Calvete e colaboradores em 2000. Os estudos vêm demonstrando a existência de homologia nas sequências e composição de diferentes famílias de lectinas.

As isolectinas de algas do gênero *Bryothamnion* (BTL e BSL, da costa do Brasil e da Venezuela), e as isolectinas da espécie *Hypnea japonica* (HJA) possuem homologia de sequências e podem ser agrupadas em uma família (CALVETE *et al.*, 2000; MEDINA-RAMIREZ; GIBBS; CALVETE, 2007; NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012; HORI; MATSUBARA; MIYASAWA, 2000; OKUYAMA *et al.*, 2009). Já as lectinas HML e HCA de algas do gênero *Hypnea* da costa do Brasil, interessantemente, não possuem homologia com a HJA e formam outro grupo de família, evidenciando a existência de lectinas diferentes entre espécies do mesmo gênero (NAGANO *et al.*, 2005).

As lectinas das algas da família Solieriaceae, ESA-2, EDA-2, KAA-1 e -2 e KSA-2, a lectina da *Amansia multifida* (AML) e a lectina da *Oscillatoria agardhii* (OAA) possuem homologia de sequência entre si e com lectinas das bactérias *Myxococcus xanthus* (MBHA), *Burkholderia oklahomensis* (BOA) e três do gênero *Pseudomonas*: *P. fluorescens* (PFL), *P. mandelli* (PML) e *P. taiwanensis* (PTL) e formam uma família de lectinas denominada de OAAH (homólogas a OAA) (SATO *et al.*, 2000; HORI *et al.*, 2007; KOHARUDIN *et al.*, 2012; WHITLEY *et al.*, 2013; HUNG *et al.*, 2015a; HUNG *et al.*, 2015b; SILVA, 2016; HIRAYAMA *et al.*, 2016; MORIMOTO; SATO, 2016). Essas lectinas também apresentam homologia com outras lectinas com estruturas primárias depositadas em banco de dados do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia, NCBI: *Agardhiella subulata* (ASL-1: BAX08598.1 e ASL-2: BAX08599.1) e *Meristotheca papulosa* (MPA-1: BAX08601.1 e MPA-2: BAX08602.1). Ambas as espécies são da família de algas Solieriaceae.

As isolectinas BPL-3 e BPL-4 possuem 60,6% de similaridade e formam outro grupo de lectinas. Ambas apresentam similaridade com lectinas do grupo H, que foram descritos primeiramente em lectinas de caracóis (HAN *et al.*, 2011; HAN *et al.*, 2012c). A Bryohealin e BPL-2 não mostraram similaridade entre si e com as outras lectinas, mas BPL-2 mostrou ser similar a uma proteína BML-17 da alga *Bryopsis maxima* (EPA nº. 06714741.3) em relação a estrutura primária, contudo não apresentaram a mesma especificidade (YOON *et al.*, 2008; HAN *et al.*, 2010).

Em outro grupo pode ser incluído a GFL, que apresentou 68% de identidade com a lectina da alga *Griffithsia japonica* (AAM93989), 30 a 68 % de homologia com lectinas tipo L e baixa identidade com lectinas de animal do filo Artrópode e Cordata (SUTTISRISUNG *et al.*, 2011). As lectinas de espécies do gênero *Ulva*, (UPL1 e ULL) apresentaram 31 % de identidade entre suas estruturas primárias e podem ser agrupadas em mais uma família (ISHIHARA; ARAI; SHIMADA, 2009). Em um último grupo estão as lectinas das cianobactérias MVN e CV-N que apresentam 33% de identidade (KEHR *et al.*, 2006).

As demais lectinas não apresentaram homologia de sequências com lectinas de algas reportada na literatura, mas algumas apresentaram similaridade com lectinas de outros filos, que estão depositadas nos bancos de dados. A lectina GAL apresentou similaridade com sequências de aminoácidos das lectinas de invertebrados marinhos *Penaeus monodons* (68%), *Pteria penguin* (24%) e de cordata *Anguilla japonica* (22%) (MASSI; AHMAD, 2012). A GRFT apresentou homologia de sequência com a lectina de planta *Artocarpus integrifolia* (MORI *et al.*, 2005). Assim como a lectina BCA com a lectina da planta *Galanthus nivalis* (SATO *et al.*, 2011).

Algumas lectinas não apresentam similaridade com proteínas depositadas em bancos de dados. As lectinas AOL1 e Rhodobindin, que pertencem a espécies do gênero *Aglaothamnion* não possuem homologia de sequência entre si e nem com nenhuma outra proteína reportada (HAN *et al.*, 2012b; HAN *et al.*, 2015). As lectinas BHL, CBA, MVL e SVN também não apresentaram homologia de sequência com outras lectinas (YAMAGUCHI *et al.*, 1999; BOKESCH *et al.*, 2003; NIU *et al.*, 2009; PRASEPTIANGGA *et al.*, 2012).

A diversidade estrutural encontrada nas lectinas de algas sugere que o reconhecimento específico a açúcares surgiu, de maneira independente, durante o curso da evolução (evolução convergente) em uma grande variedade de módulos estruturais.

1.3.4 Expressão recombinante

Lectinas tem sido amplamente utilizadas em uma variedade de estudos e aplicações biotecnológicas e com isso há um interesse da produção em larga escala. Além disso, a existência de isoformas e reduzidas técnicas convencionais que consigam isolá-las em bons rendimentos faz com que alternativas, como a produção de lectinas recombinantes em sistemas heterólogos, seja uma metodologia vantajosa, pois fornece proteínas homogêneas, com melhores rendimentos e que permitem a sua caracterização (MARTÍNEZ-ALARCÓN; BLANCO-LABRA; GARCÍA-GASCA, 2018).

O primeiro organismo mais amplamente utilizado para produzir proteínas recombinantes foi a *Escherichia coli*, devido as vantagens como a sua simplicidade, custo, conhecimento da sua fisiologia e genoma, bem como sua rápida taxa de multiplicação. No entanto, há desvantagens, como na produção de proteínas grandes ou complexas (com processamentos pós-traducionais) e em alta concentrações tendem a formar agregados insolúveis (corpos de inclusão). Com isso, novas estratégias tem sido propostas para evitar essa formação de corpos de inclusão, como cepas geneticamente modificadas, induções em temperaturas abaixo do padrão (37°C) e fusão da proteína com “tags” que podem proporcionar um aumento da expressão e solubilidade. (MARTÍNEZ-ALARCÓN; BLANCO-LABRA; GARCÍA-GASCA, 2018).

A primeira lectina de alga a ser produzida de forma recombinante foi a da microalga *Nostoc ellipsosporum* (Cyanovirin-N), uma cianobactéria, por Colleluori e colaboradores em 2005 e, em seguida, a primeira de alga marinha vermelha *Griffithia sp* (GRFT) por Mori e colaboradores em 2005. Ambas lectinas recombinantes apresentaram características essencialmente idênticas a das lectinas nativas. A partir destes estudos outras lectinas de algas foram produzidas de forma recombinante (QUADRO 02).

A maioria das lectinas foram eficientemente expressa na forma solúvel em *Escherichia coli* e purificadas em coluna de afinidade à níquel, com exceção da CV-N e da BPL-3, que foram produzidas a partir de corpos de inclusão (insolúvel) e tiveram que ser recuperadas com condições desnaturantes e com metodologias de “*refold*” (COLLELUORI *et al.*, 2005; HWANG *et al.*, 2018).

Quadro 02 – Lectinas de algas produzidas de forma recombinante

Lectina	Espécie	Metodologia	Classificação	Referências
Cyanovirin-N (CV-N)	<i>Nostoc ellipsoforum</i>	<i>E. coli</i> B834 (DE3)::pET30b IPTG 0,1 mM a 37° C	Cianobactéria	COLLELUORI <i>et al.</i> , 2005
GRFT	<i>Grifthisin sp.</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)::pET28c	Alga vermelha	MORI <i>et al.</i> , 2005
Scytovirin (SVN)	<i>Scytonema varium</i>	<i>E. coli</i> BL21 TRXB(DE3)pLysS::pET32c IPTG 1,0 mM a 37° C	Cianobactéria	XIONG <i>et al.</i> , 2006
Microvirin (MVN)	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)::pET15b IPTG 1,0 mM a 37° C	Cianobactéria	KEHR <i>et al.</i> , 2006
Bryohealina	<i>Bryopsis plumosa</i>	<i>E. coli</i> M15 + pREP4::pET15b IPTG 1,0 mM a 37° C	Alga verde	YOON <i>et al.</i> , 2008
OAA	<i>Oscillatoria agardhii</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)::pET28a IPTG 0,5 mM a 37° C	Cianobactéria	SATO; HORI, 2009
MVL	<i>Microcystis viridis</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)::pET30a IPTG 0,5 mM a 23° C	Cianobactéria	LI <i>et al.</i> , 2011
(GAL) anti- mycobacteria I lectin	<i>Gelidium amansii</i>	<i>E. coli</i> BL21::pGEX-2TK IPTG 0,06 mM a 37° C	Alga vermelha	MASSI; AHMAD, 2012
Rhodobindin	<i>Aglaothamnion callophyllidicola</i>	<i>E. coli</i> BL21 (λDE3)::pET28a IPTG 0,5 mM a 20° C	Alga vermelha	HAN <i>et al.</i> , 2015
KAA-1	<i>Kappaphycus alvarezii</i>	<i>E. coli</i> SHuffle T7 Express::pET28a IPTG 0,1 mM a 20° C	Alga vermelha	HIRAYAMA <i>et al.</i> , 2016
rD1BPL-3 rD2BPL-3	<i>Bryopsis plumosa</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)::pET28a IPTG 1 mM a 20° C	Alga verde	HWANG <i>et al.</i> , 2018

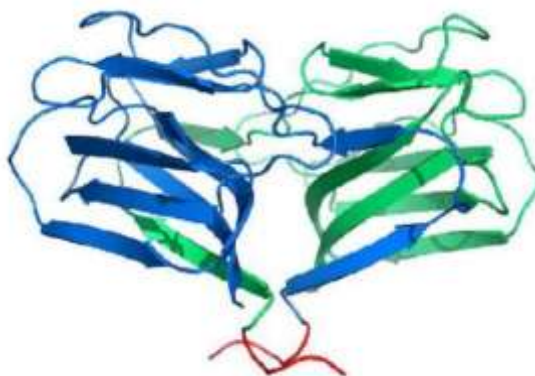
Fonte: Elaborada pela autora.^a Metodologia: Cepa e Vetor de expressão utilizados e Indução da expressão

Diferente das demais lectinas, que foram produzidas de forma similar às nativas, a GAL recombinante (lectina antimicobacteriana) não apresentou a mesma atividade antimicobacteriana que a nativa (MASSI; AHMAD, 2012). Em análises de *Glycoarray*, a lectina recombinante rD2BPL-3 (desenhada com repetição interna para simular a forma dimérica da nativa) possui especificidade a GlcNAc e GalNAc, mas apresentou preferência de ligação a conformações ligações glicosídicas de conformação beta (β -), enquanto a nativa teve preferência a conformações alfa (α -) (HWANG *et al.*, 2018).

1.3.5 Estruturas terciárias

A primeira estrutura tridimensional de uma lectina de macroalga foi descrita por Ziółkowska e Wlodawer em 2006 para a lectina GRFT da alga marinha vermelha *Grifthisin sp.* A estrutura foi resolvida a 1,3Å de resolução pela técnica de SAD (Single-wavelength Anomalous Dispersion) a partir da lectina recombinante marcada com seleniometinina. A proteína possui um enovelamento estrutural denominado de β -prisma, que consiste em três repetições de quatro fitas beta antiparalelas que formam um prisma retangular e apresenta um dímero formado por fitas das cadeias dos monômeros compondo o prisma, onde duas fitas betas de uma cadeia estão associadas com as 10 fitas da outra cadeia (FIGURA 01).

Figura 01 – Dímero da lectina da alga vermelha *Grifthisin sp.*



Fonte: ZIÓLKOWSKA; WLODAWER, 2006. Estrutura tipo β -prisma da GRFT, as cores das fitas representam as estruturas secundárias de cada monômero.

A segunda estrutura tridimensional de lectina de alga foi descrita por Koharudin, Furey e Gronenborn em 2011 para a lectina OAA da cianobactéria *Oscillatoria agardhii*. A proteína OAA foi produzida de forma recombinante em *Escherichia coli* e marcada com selenometionina para os experimentos cristalográficos. A estrutura tridimensional foi determinada a 1,2 Å de resolução pela técnica de MAD (Multi-wavelength Anomalous Dispersion). A proteína possui um enovelamento estrutural que compreende dez folhas betas que se doblam em único e compacto domínio do tipo β -barril (FIGURA 02).

Figura 02 – Monômero da lectina da cianobactéria *Oscillatoria agardhii*.



Fonte: KOHARUDIN; FUREY; GRONENBORN, 2011. Estrutura tipo β -barril com dez folhas betas da OAA.

1.4 Lectina da alga marinha vermelha *Meristiella echinocarpa*

A classificação taxonômica da alga marinha vermelha *Meristiella echinocarpa* (Areschoug) D.P.Cheney & P.W.Gabrielson pelo AlgaeBase (<http://www.algaebase.org/>) (FIGURA 03):

Domínio: Eukaryota **Chatton**

Reino: Plantae **Haeckel**

Filo: Rhodopyta **Wettstein**

Classe: Florideophyceae **Cronquist**

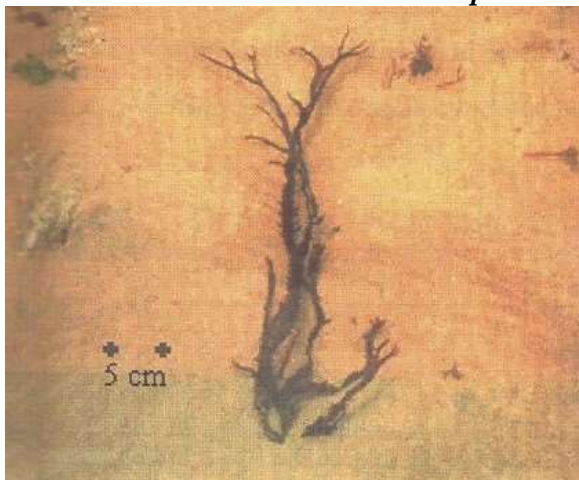
Ordem: Gigartinales **F.Schmitz**

Família: Areschougiaceae **J.Agardh**

Gênero: *Meristiella* **D.P.Cheney**

Espécie: *Meristiella echinocarpa* (Areschoug) **D.P.Cheney & P.W.Gabrielson**

Figura 03 – Alga marinha vermelha *Meristiella echinocarpa*.



Fonte: FARIAS,1995

A atividade hemaglutinante contra eritrócitos enzimaticamente tratados de coelho em extrato salino da *Meristiella echinocarpa* foi descrita em 1992 por Ainouz e colaboradores. A purificação da lectina da *M. echinocarpa* foi descrita por Farias (1995), onde utilizou da combinação das cromatografias de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose e de afinidade em coluna de Manana-Sepharose CL-4B. A massa molecular estimada por SDS-PAGE foi de 30 kDa e a estimada por filtração em gel Sephadex G-75 foi de 15,8 kDa. A lectina tem a atividade hemaglutinante inibida por manan de levedura, avidina e clara de ovo. O experimento com focalização isoelétrica mostrou a presença de 5 bandas protéicas sugerindo a existência de 5 isoformas. As isolectinas apresentaram efeito mitogênico para linfócitos de humanos em baixas concentrações (12,5 e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

1.5 Lectina da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*

A classificação taxonômica da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W.Gabrielson pelo AlgaeBase (<http://www.algaebase.org/>) (FIGURA 04):

Domínio: Eukaryota **Chatton**
 Reino: Plantae **Haeckel**
 Filo: Rhodopyta **Wettstein**
 Classe: Florideophyceae **Cronquist**
 Ordem: Gigartinales **F.Schmitz**
 Família: Solieriaceae **J.Agardh**
 Gênero: *Solieria* **J.Agardh**
 Espécie: *Solieria filiformis* (**Kützinger**) **P.W.Gabrielson**

Figura 04 – Alga marinha vermelha *Solieria filiformis*.



Fonte: <www.algaemarisbrasilis.ccb.ufsc.br>

A atividade hemaglutinante em extrato salino da *Solieria filiformis* foi descrita em 1992 por Ainouz e colaboradores. A lectina da *Solieria filiformis* foi purificada através da combinação de precipitação por sulfato de amônio a 70% e cromatografias de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose e de afinidade em coluna de Manana-Sepharose CL-4B. A massa molecular estimada por SDS-PAGE foi de 29 kDa e a estimada por filtração em gel Superose 12R foi de 21,9 kDa. A lectina tem a atividade hemaglutinante inibida por manan de levedura, avidina e ovalbumina. (BENEVIDES; LEITE; FREITAS, 1996).

Em 1998, Benevides e colaboradores estudaram 10 espécies de algas pertencentes a diferentes famílias. Os dados demonstraram que o extrato total dialisado da alga *Solieria filiformis* foi tóxico quando injetado em camundongos por via intraperitoneal no período de 8 à 20 horas. A atividade hemaglutinante foi testada no extrato e houve aglutinação contra eritrócitos tratados enzimaticamente (humano do tipo O e de coelho). Os autores sugeriram que todos os extratos testados continham fatores tóxicos e/ou antinutricionais.

Posteriormente, Holanda e colaboradores (2005) avaliaram a lectina quanto a sua toxicidade contra bactérias patógenas para humanos. A lectina purificada foi capaz de reduzir a densidade de células das bactérias gram-negativas *Serratia marcescens*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus sp* e *Pseudomonas aeruginosa*, na concentração 1 mg.mL⁻¹. Os autores relataram ser possível que a interação da lectina com os receptores da superfície celular de bactérias gram-negativas promova alterações no fluxo de nutrientes, o que explicaria o efeito bacteriostático.

Um estudo com a lectina da alga marinha *Solieria filiformis* demonstrou que a alga apresenta seis isoformas e o peso molecular da mais abundante foi de 26,18 kDa e o pI de 5,18 (ABREU, 2012). No mesmo ano, Abreu e colaboradores, mostraram que a lectina tem efeito anti-inflamatório. Além disso, o Sfl parece ter importante atividade antinociceptiva *in vivo* e pode representar um potencial agente terapêutico para efeitos imunomodulatórios *in vitro* e *in vivo* (ABREU *et al.*, 2016). Em 2018, Abreu e colaboradores, relataram que a lectina possui ação antidepressiva.

2 OBJETIVOS

Aprofundar nos aspectos estruturais e de atividades biológicas (antibacteriano e/ou antitumoral) de lectinas de algas marinhas vermelhas.

O primeiro objetivo consistiu na caracterização estrutural (primária e secundária) das lectinas purificadas a partir das algas marinhas vermelhas *Solieria filiformis* (SfL) e *Meristiella echinocarpa* (MeL) e na avaliação de suas atividades biológicas contra bactérias e células tumorais. A exposição e discussão dos resultados desta parte da Tese constituem o capítulo I e resultaram em duas publicações (Artigo 1 – Structural characterization of two isolectins from the marine red alga *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W. Gabrielson and their anticancer effect on MCF-7 breast cancer cells; Artigo 2 – *Meristiella echinocarpa* lectin (MEL): a new member of the OAAH-lectin family).

O segundo objetivo se centralizou na expressão recombinante da isolectina SfL-1, avaliação do rendimento de cultivo, da atividade hemaglutinante e inibição e do efeito contra bactérias e na determinação da estrutura tridimensional mediante cristalografia de raios X. A exposição e discussão dos resultados constituem o capítulo II da Tese.

3. CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS MEMBROS DA FAMÍLIA OAAH: LECTINAS SFL E MEL

3.1 Família de lectinas OAAH

A lectina da cianobactéria *Oscillatoria agardhii* foi a primeira dessa família a ter a estrutura tridimensional resolvida, dando origem ao nome dessa família de lectinas homólogas a OAA, OAAH. Essa família é um grupo de lectinas caracterizadas por apresentar uma grande semelhança estrutural, contêm sequências de repetição interna em média de 66 aminoácidos altamente conservados, mas com o número de repetições diferentes para diferentes membros da família (2 ou 4 domínios de reconhecimento a carboidratos - CRDs) e possuem especificidade de ligação restrita para *N*-glicanos ricos em manose, com uma estrutura mínima contendo o pentassacarídeo $\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\alpha 1-6)\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNac}(\beta 1-4)\text{GlcNac}$ (KOHARUDIN *et al.*, 2012).

Dentre as lectinas pertencentes à família OAAH estão as lectinas das algas marinhas vermelha *Amansia multifida* (AML), *Eucheuma serra* (ESA-2), *Eucheuma denticulatum* (EDA-2), *Kappaphycus striatus* (KSA-2), *Kappaphycus alvarezii* (KAA-1 e KAA-2), *Agardhiella subulata* (ASL-1 e ALS-2) e *Meristotheca papulosa* (MPA-1 e MPA-2), que apresentam 4 CRDs cada, a lectina da cianobactéria *Oscillatoria agardhii* (OAA) com 2 CRDs, as lectinas das bactérias *Myxococcus xanthus* (MBHA) e *Burkholderia oklahomensis* (BOA) com 4 CRDs e três lectinas do gênero *Pseudomonas*: *P. fluorescens* (PFL), *P. mandelli* (PML) e *P. taiwanensis* (PTL) com 2 CRDs cada.

Esta família de lectinas também é conhecida por apresentar atividade antiviral contra o vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1) (SATO *et al.*, 2007; KOHARUDIN *et al.*, 2012; WHITLEY *et al.*, 2013; HIRAYAMA *et al.*, 2015). O interessante dessa família é o reconhecimento e ligação a *N*-glicanos ricos em manose, que é único quando comparada com as outras lectinas anti-virais. Muitas lectinas conhecidas como inibidoras do vírus HIV podem reconhecer as extremidades de manoses redutoras ou não redutoras das porções finais das oligomanoses, enquanto que para as OAAHs, o reconhecimento dos resíduos de GlcNAc da porção inicial do oligomanosídeo é essencial para a ligação (KOHARUDIN *et al.*, 2012).

3.1.1 Atividade biotecnológica das lectinas da família OAAH

As lectinas OAAH apresentam atividades antivirais, como anti-HIV, contra as cepas HIV-1 X4 e HIV-1 (R9), e anti-influenza, contra cepas de influenza A (H1N1s e H3N2s) e influenza B (Ibaraki/2/85). A atividade anti-HIV foi exibida primeiramente pelas lectinas OAA e ESA, que inibiram a replicação viral do HIV-1 X4 em células MT-4 com IC₅₀ de 44,5 nM e 165 nM, respectivamente (SATO *et al.*, 2007). A cepa do HIV-1 (R9) em células TZM-bl teve sua replicação viral inibida pelas lectinas OAA, MBHA, PFL e BOA com IC₅₀ de 12nM, 12nM, 15 nM e 12nM, respectivamente (KOHARUDIN *et al.*, 2012; WHITLEY *et al.*, 2013). As isolectinas KAA-1, KAA-2 e a recombinante da KAA-1 (rKAA-1) possuem um IC₅₀ de 9,2 nM, 7,3 nM e 12,9 nM para a inibição da replicação do HIV-1 X4 em células Jurkat, respectivamente (HIRAYAMA *et al.*, 2015). A atividade anti-HIV entre as lectinas dessa família realizados até o momento demonstraram que o potencial antiviral para todos os membros da família OAAH investigado é similar e que não é alterada significativamente entre lectinas que possuem 2 ou 4 sítios CDR (WHITLEY *et al.*, 2013).

Em relação à atividade anti-influenza: a isolectina KAA-2 inibiu a infecção com IC₅₀ a níveis nanomolares, 1 a 14 nM, das cepas de influenza A H1N1 (FM/1/47, Kyoto/1/81, Bangkok/10/83, Beijing/262/95, Oita/OU1 P3-3/09) e H3N2 (Aichi/2/68, Udorn/72, Philippines/2/82) e influenza B (Ibaraki/2/85) (SATO *et al.*, 2011). A PFL inibiu eficientemente a entrada do vírus com IC₅₀ de 19,4 nM e 4,5 nM para as cepas Influenza A/Udorn/72 (H3N2) e A/Beijing/262/95 (H1N1), respectivamente (SATO *et al.*, 2012). A ESA-2 apresentou atividade contra várias cepas de influenza A e B com IC₅₀ a níveis nanomolares, 1 a 35 nM (SATO *et al.*, 2015). Outras lectinas do gênero *Pseudomonas*, PML e PTL, também apresentaram atividade anti-influenza contra vários subtipos das cepas de influenza A/H1N1 e A/H3N2 a 100 mM e inibiram eficientemente a propagação do vírus nas células no estágio inicial da infecção com a cepa A/H1N1/Oita/OU1P3-3/09 (MORIMOTO; SATO, 2016).

Efeitos antineoplásicos também foram relatados. Sugahara e colaboradores em 2001 mostraram que a ESA inibiu o crescimento celular de HeLa (adenocarcinoma do colo do útero humano) e induziu a morte celular de Colo201 (adenocarcinoma do cólon humano) de forma dose-dependente. Fukuda e colaboradores em 2006 apresentaram resultados da ESA contra as células do Colon26 *in vitro* e *in vivo* com ratos BALB/c.

A lectina PFL apresentou efeitos contra células MKN28 (adenocarcinoma gástrico humano) acompanhada de perda de adesão celular, que desencadeou uma via de sinalização que induziu a morte celular (SATO *et al.*, 2012).

Em 2016, Sato e colaboradores demonstraram que a PFL está envolvida na regulação negativa da integrina e do receptor do fator de crescimento epidérmico da superfície celular, que contribui para a inibição do crescimento do tumor *in vitro* e *in vivo*. Silva (2016) mostrou que a AML foi capaz de reduzir 50 % da viabilidade celular das células LS174T (Adenocarcinoma do cólon humano) em concentrações acima de 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Outras atividades também foram relatadas, como mitogênica, antinociceptiva e antimicrobiana. AML estimulou a proliferação de células mononucleares do sangue periférico humano com concentrações de 3,12 a 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, com uma redução da capacidade mitogênica em concentrações acima de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, mas que não resultou em efeito tóxico as células (LIMA *et al.*, 1998). Em 2001, Neves e colaboradores, relataram que a AML induziu a migração de neutrófilos *in vivo* e *in vitro* de maneira dose-dependente. E em 2007, Neves e colaboradores, mostraram ainda que a lectina tinha propriedades antinociceptivas em camundongos, onde a lectina foi capaz de inibir as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético de maneira dose-dependente após administração intraperitoneal ou oral.

Atividade antibacteriana foi relatada para as lectinas ESA, KSA-2 e EDA-2 contra cepas de bactérias marinhas patogênicas do gênero *Vibrio*. A ESA apresentou atividade contra a *V. vulnificus*, e a EDA e KSA-2 contra a *V. alginolyticus*. A KSA-2 também apresentou atividade contra a bactéria patogênica humana *Enterobacter cloacae* (LIAO *et al.*, 2003; HUNG *et al.*, 2014; HUNG *et al.*, 2015a).

3.2 Atividade antibacteriana e aglutinação de bactérias de lectinas de algas

Na literatura, as lectinas tem demonstrado atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e essa atividade tem sido reportada em lectinas de várias fontes biológicas, como, por exemplo, a lectinas da planta *Archidendron jiringa*, da esponja *Chondrilla caribensis*, do molusco *Aplysia dactylomela*, do crustáceo *Macrobrachium rosenbergii*, entre outros organismos (CHARUNGCHITRAK *et al.*, 2011; MARQUES *et al.*, 2017; CARNEIRO *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2018).

A atividade antibacteriana ocorre através de interações com os ácidos teicóicos e teicurônicos e peptidoglicanos nas membranas das Gram-positivas e em lipopolissacarídeos das Gram-negativas (LIU, 2008). As lectinas de algas tem demonstrando alguns efeitos contra vários tipos de cepas bacterianas, incluindo o gênero *Vibrio*. As bactérias do gênero *Vibrio* são proteobactérias Gram-negativas halofílicas encontradas em vários tipos de nichos ecológicos e em associação com outros organismos simbiotes ou patogênicos (HAZEN *et al.*, 2007).

Os víbrios marinhos podem causar doenças em espécies cultiváveis e causar grandes impactos econômicos, devido a altas mortalidades na aquicultura em todo mundo. Entre as espécies que foram identificadas como agentes etiológicos estão *Vibrio anguillarum*, *V. ordalii*, *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* e *V. salmonicida*, sendo denominados de vibrioses. Além disso, esses microrganismos podem se acumular na carne do animal cultivado e torná-la uma ameaça para a saúde humana. Por exemplo, o *Vibrio vulnificus* é considerado um dos piores patógenos de origem alimentar, causando principalmente gastroenterite (CARVALHO *et al.*, 2012).

Algumas lectinas de algas apresentaram efeitos antibacterianos contra vibrios, como as lectinas GMA e ESA, das algas vermelhas *Galaxaura marginata* e *Eucheuma serra*, respectivamente, que foram capazes de inibir o crescimento bacteriano do *Vibrio vulnificus* (LIAO *et al.*, 2003). A EDA da alga vermelha *Eucheuma denticulatum* foi capaz de inibir o crescimento bacteriano do *V. alginolyticus* (HUNG *et al.*, 2014). A KSA alga vermelha *Kappaphycus striatum* inibiu o crescimento das cepas *Enterobacter cloacae* e do *V. alginolyticus* (HUNG *et al.*, 2015b). A GPE da alga vermelha *Gracilaria fisheri* foi capaz de inibir o crescimento bacteriano e apresentou efeitos aglutinantes contra a cepa *V. parahaemolyticus* (BOONSRI *et al.*, 2017).

As lectinas também foram exploradas como ferramenta de tipagem bacteriana, devido a sua seletividade para reconhecer resíduos de carboidratos na superfície microbiana. Essa especificidade de ligação tem demonstrado ser útil em estudos epidemiológicos de doenças causadas por bactérias do gênero *Neisseria*, *Haemophilus*, *Campylobacter*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* e a espécie *Helicobacter pylori*. (DOYLE *et al.*, 1984; SCHALLA *et al.*, 1985; KORTING *et al.*, 1988; O'SULLIVAN, BENJAMIN, SKIRROW, 1990; JARLOV *et al.*, 1992; MUÑOZ, LÓPEZ, LLOVO, 1994; MUÑOZ *et al.*, 1999; KHIN *et al.*, 2000).

A tipagem por lectina é um procedimento simples e econômico, sendo adequado para uso em laboratórios não especializados. Os estudos epidemiológicos utilizando lectinas de plantas mostrou ser um método eficiente para diferenciar cepas de espécies relacionadas. Entretanto, os métodos de aglutinação e precipitação mediados por lectina provavelmente não são tão sensíveis quanto ensaios com enzimas, como o ensaio de imunoabsorção enzimática, ELISA. Outros métodos mais eficientes mediadas por lectinas tem sido utilizadas, como biossensores a partir de sondas e microarray (LIU, 2008; TEMPLIER *et al.*, 2016).

3.3 Atividade antineoplásica de lectinas de algas

Recentemente, um interesse crescente tem sido demonstrado nas lectinas marinhas devido a seus efeitos pró-apoptóticos, citotóxicos e antiproliferativos sobre diferentes linhagens de células (BAH *et al.*, 2011; MATSUMOTO *et al.*, 2012; RABELO *et al.*, 2012; YAO; PAN; ZHOU, 2012). Essas lectinas apresentam alta especificidade para carboidratos complexos e, conseqüentemente, a sua interação com células malignas, em comparação com células não malignas, é melhor tendo em conta o grande número de receptores de glicoproteínas nas membranas das células tumorais (FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2011; CHEUNG *et al.*, 2015).

Algumas lectinas de algas, como ESA e, BTL e BSL, apresentaram efeitos contra as linhagens Colo201 e LS-180, respectivamente. E algumas lectinas da família OAAH também apresentam atividades anticancerígenas, como a ESA já mencionada e a PFL que apresentou efeitos contra a linhagem MKN28 (SUGAHARA *et al.*, 2001; PINTO *et al.*, 2009; SATO *et al.*, 2012).

O câncer de mama, principal causa de morte em mulheres, é uma doença heterogênea caracterizada por uma variedade de alterações moleculares e genéticas que induzem crescimento e sobrevida (SAMENI; HANDE; 2016; TORRE *et al.*, 2016). Atualmente, a quimioterapia é o método mais comumente usado para tratar o câncer. Entretanto, as técnicas quimioterápicas são limitadas por sua alta toxicidade celular, assim como a ocorrência de efeitos colaterais (AMEN *et al.*, 2016). Portanto, tratamentos biológicos seletivos surgiram para tratar certos tipos de câncer ou para direcionar determinantes específicos expressos por muitos tumores diferentes (SCOTT; ALLISON; WOLCHOK, 2012).

4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1 Material biológico

Espécimes da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* foram coletados no período de baixa-mar na região entre marés da praia do Pacheco, Caucaia, Ceará. E as espécimes da alga marinha vermelha *Meristiella echinocarpa* foram coletados no período de baixa-mar na região entre marés da praia do Paracuru, Ceará. As algas foram transportadas em água do mar até o laboratório onde foram armazenadas a -80°C até o uso. As coletas foram autorizadas e certificadas por instituições ambientais responsáveis como o SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade, ID: 33913-8) e SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, ID: AC14AF9).

4.2 Purificação das lectina MeL e SfL

A lectina da alga marinha vermelha *Meristiella echinocarpa* (MeL) foi purificada usando a metodologia de Farias (1995) com modificações. Espécimes congelados foram macerados em almofariz e o macerado ressuspendido com vinte volumes (p/v) de etanol 70 % e submetido a agitação por 30 minutos. A mistura foi filtrada e os resíduos sólidos foram lavados novamente com etanol 70 %, como descrito anteriormente, mais duas vezes. A mistura foi novamente filtrada e os resíduos sólidos foram ressuspendidos com dez volumes de etanol 20 % e mantido sob agitação por 4 horas a 4°C , para extração de proteínas. O extrato de proteínas foi filtrado e centrifugado a $8.000 \times g$ por 20 minutos a 4°C , o sobrenadante foi dialisado contra tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 (PB) e utilizado para purificação da lectina em matriz cromatográfica de DEAE-Sephacel (1,0 x 7,0 cm) previamente equilibrada com tampão PB. A cromatografia foi conduzida a um fluxo de $1,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, a fração não retida (P1) foi eluída com o tampão de equilíbrio e as duas frações retidas (P2 e P3) foram eluídas com tampões PB contendo NaCl 0,5 M e NaCl 1,0 M, respectivamente.

A lectina da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (SfL) foi purificada de acordo com a metodologia empregada por Benevides, Leite e Freitas (1996), com pequenas modificações. Para extração, espécimes congelados foram macerados em almofariz, homogeneizados em tampão PB, contendo NaCl 150 mM, na proporção de 1:3 (p/v) e incubados por 4 horas a temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a $5.000 \times g$ por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante (extrato total) utilizado para purificação da lectina.

O extrato total foi submetido à precipitação com sulfato de amônio (70%) por 4 horas e centrifugado por 30 minutos a $5.000 \times g$ e a 4°C sendo, então, solubilizado em tampão PB. A fração 0/70 foi dialisada contra água destilada e depois contra tampão PB. O dialisado foi aplicado na matriz cromatográfica de DEAE (Diethylaminoethyl)-Sephacel (1,0 x 7,0 cm) previamente equilibrada com tampão PB. A cromatografia foi conduzida a um fluxo de $1,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, a fração não retida (P1) foi eluída com o tampão de equilíbrio e a fração retida (P2) foi eluída com tampão PB contendo NaCl 1,0 M.

As cromatografias foram monitoradas por absorvância a 280 nm. Todas as frações foram avaliadas quanto a atividade hemaglutinante contra eritrócitos tripsinizados de coelhos e quantificadas quanto à concentração de proteínas totais solúveis segundo o método de Bradford (1976). As frações ativas foram dialisadas exaustivamente contra água destilada e contra água tipo I e liofilizada para posteriores experimentos.

4.2.1 Atividade hemaglutinante e a inibição por manana

Os ensaios de atividade hemaglutinante e de inibição foram conduzidos de acordo com Sampaio e colaboradores (1998b) em placas de 96 poços usando eritrócitos de coelhos tratados com tripsina. A especificidade por manana de levedura foi realizada para confirmar e comparar com os resultados das lectinas purificadas por Farias (1995) e Benevides e colaboradores (1996). A especificidade foi determinada através da inibição da atividade hemaglutinante em placas. Os resultados são expressos como a concentração mínima de manana capaz de inibir a atividade hemaglutinante da lectina.

4.2.2 Estimativa de massa molecular por SDS-PAGE e cromatografia de exclusão molecular

O SDS-PAGE (gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio) foi realizado na ausência e presença de β -mercaptoetanol (0,1 M) com objetivo de estimar a massa molecular aparente, assim como avaliar a homogeneidade da lectina purificada. A eletroforese foi conduzida segundo descrito por Laemmli (1970) e no cálculo da massa molecular aparente foram utilizadas proteínas padrões de massa conhecida do marcador LMW 17044601 (GE Healthcare), MW-SDS-70L (Sigma-Aldrick) e SigmaMarker Low Range (Sigma-Aldrick). As massas das proteínas padrões, após a migração no gel, foram comparadas com a migração da lectina, obtendo uma estimativa da massa molecular.

A cromatografia de exclusão molecular foi conduzida em Tris-HCl 20 mM pH 8,0 contendo NaCl 150 mM e Glicerol 5% a um fluxo de 0,4 mL por minuto na coluna BioSuite 250 SEC (0,78 x 30cm, 5 µm de tamanho de partícula; Waters Cop.) acoplada ao sistema H-Class UPLC (Waters Cop.). A coluna foi calibrada previamente com um kit de marcador de gel de filtração para proteínas de 29 a 700 KDa (Sigma-Aldrich, MO, USA).

4.3 Sequenciamento dos aminoácidos do N-terminal

A sequência de aminoácidos do N-terminal foi determinada por degradação de Edman em um sequenciador de proteínas e peptídeos Shimadzu model PPSQ-31A (Shimadzu Corp., Japan). Os aminoácidos feniltiohidantoínas (PTH-AA) foram separados numa coluna Wakosil ODS (2.0 × 250 mm; Wako Pure Chemical Corp., Osaka, Japan) conectada a uma bomba LC-20AT. A absorvância foi detectada a 269 nm com um detector UV-Vis SPD-20A.

A similaridade da sequência do N-terminal foi avaliada online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e sequências homologas foram identificadas com o programa básico de ferramentas de busca de alinhamento local (Basic Local Alignment Search Tool - BLAST) usando o PROTEIN BLAST do NCBI.

4.4 Análise por espectrometria de massas

4.4.1 Determinação da massa molecular (MS)

A massa isotópica média da MeL foi determinada por espectrometria de massas por dessecção/ionização a laser auxiliada por matriz (MALDI) e analisador por tempo de voo (TOF) utilizando um equipamento Autoflex III mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany). A proteína foi solubilizada a uma concentração de 1 pmol/µL em uma solução contendo 50% de acetonitrila (ACN) e 0,3 % de ácido trifluoroacético (TFA). Foi utilizada a matriz ácido α-4-ciano-hidroxicinamico a 10 mg/mL solubilizada em 50% ACN e 0,3% TFA. A proporção matriz/analito para a análise foi 3:1 e a solução foi depositada na placa e seca a temperatura ambiente. O instrumento operou com voltagem de 20 kV com analisador em modo linear e na faixa de relação massa/carga (m/z) de 20.000 a 80.000. Aquisição e processamento de dados foi com o Flex Analysis 3.4 software (Bruker Daltonics, Germany).

A massa isotópica média da SfL foi determinada por espectrometria de massas por uma fonte de nano electrospray (nESI) de um espectrômetro de massas híbrido (SYNAPT HDMS – Waters Corp). Para os experimentos com cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (nESI-LC/MS), a lectina foi solubilizada em solução de 5% de (ACN) contendo 0,1 % de ácido fórmico (AF) para uma concentração final de 5 mg.mL⁻¹, sendo, em seguida, centrifugada para retirar da solução as proteínas que não foram solubilizadas. Após centrifugação, 5 µL da solução de lectina foi aplicada a uma coluna de fase reversa C18 (75 µm x 100 mm) acoplada a um espectrômetro de massas híbrido com fonte de nano electrospray (ESI-Q-ToF) (Synapt HDMS, Waters Corp, MA, USA), e eluída a um fluxo de 0,5 µL.min⁻¹. A lectina foi eluída através de gradiente linear de 10 % a 85 % de ACN contendo AF 0,1 %. O espectrômetro foi ajustado a uma tensão de 3 kV no capilar e 40 V no cone. A temperatura da fonte foi mantida em 373 K e o gás de dessolvatação utilizado foi o nitrogênio (fluxo de 150 L.h⁻¹). A aquisição dos dados foi realizada na faixa de 500 a 3500 *m/z* a 2 scan.s⁻¹, com o auxílio do programa Mass Lynx 4.1. O equipamento foi calibrado com os fragmentos do íon de [Glu1] fibrinopeptídeo B. Os espectros de massas deconvoluídos foram obtidos por maximização da entropia usando a ferramenta Max Ent1.

4.4.2 Espectrometria de massas sequencial (MS/MS)

Uma eletroforese em gel de poli(acrilamida) foi conduzida conforme descrito na etapa 4.2.2 para a preparação das amostras. O gel foi descorado e as bandas referente à MeL e SfL foram excisadas com auxílio de uma ponteira plástica. Então, as bandas foram transferidas para tubos limpos e os spots de proteínas foram digeridos com tripsina e quimiotripsina de acordo com a metodologia de Shevchenko e colaboradores (2007). As soluções contendo os peptídeos foram injetadas em um sistema nanoAcquity (Waters Corp) conectado a nESI no espectrômetro de massas híbrido. O espectrômetro foi calibrado na faixa de 50 a 1600 *m/z* com os fragmentos do íon de [Glu1]-fibrinopeptídeo B. O analito foi aplicado em uma coluna de fase reversa C18 (75 µm x 100 mm) e os peptídeos eluídos através gradiente linear de 10 % a 85 % de ACN contendo AF 0,1 % a um fluxo de 0,5 µL/min.

O espectrômetro de massas operou como descrito por Carneiro e colaboradores (2013). Os espectros coletados foram processados pelos programas MassLynx v4.1 e ProteinLynx v2.4 (Waters Corp.). Os espectros de fragmentação CID foram interpretados manualmente pelo uso da ferramenta PepSeq (Waters).

4.5 Clonagem e sequenciamento de nucleotídeos

4.5.1 Desenho de iniciadores específicos

O alinhamento das sequências de lectinas similares juntamente com os dados obtidos por espectrometria de massas foram utilizados para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores. O oligonucleotídeo iniciador senso foi desenhado a partir da sequência de aminoácidos VQNQWG (Upstr_FW_VQ; 5'-GTICAGAATCARTGGGGIGG-3'; Sigma-Genosys, TX, USA) e o anti-senso foi desenhado a partir da sequência EGPIGF (Down_RV; 5'-RAAGCCGATBGGWCCTTC-3'; Sigma-Genosys, TX, USA).

4.5.2 Extração de DNA genômico da *Meristiella echinocarpa* e amplificação do fragmento de nucleotídeos que codificam a lectina

O ácido desoxirribonucleico (DNA genômico) foi isolado a partir de talos da alga *Meristiella echinocarpa*, utilizando-se o método baseado no detergente brometo de cetiltrimetilamonio (CTAB), descrito por Doyle e Doyle (1987). O DNA genômico extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1 %, contendo 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de brometo de etídio (EtBr), para análise de sua integridade e visualizado através de exposição do gel à iluminação ultravioleta utilizando um transluminador, e quantificado pelo NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences) a partir da absorbância a 260 nm e contendo a razão A260/A280 entre 1,8 e 2,2.

Para a amplificação do fragmento da lectina MeL foi utilizada a estratégia de reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do DNA genômico. A reação de PCR consistiu em 0,4 μM de cada iniciador (Upstr_FW_VQ e Down_RV), 1 unidade de Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen™, CA, USA), 0,4 mM de dNTP e 100 ng de DNA genômico e com as seguintes condições: desnaturação do DNA (5 min a 94°C), seguido por 35 ciclos de amplificação (94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos e 72°C durante 60 segundos). Após o último ciclo foi realizado uma última fase de extensão prolongada (72°C por 7 min). As reações foram observadas em eletroforese em gel de agarose 1 %, contendo 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de brometo de etídio e o fragmento amplificado foi purificado utilizando o PureLink™ QuickGel Extration kit (Invitrogen™, CA, USA), através de extração em gel de agarose, seguindo-se as instruções do fabricante.

O fragmento purificado foi ligado ao vetor pGEM-T easy (Promega, WI, USA) no qual foi utilizado para transformar células de *Escherichia coli* DH5 α por choque térmico, seguindo a metodologia de Sambrook (2002) utilizando placas de LB ágar contendo 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina (Thermo Scientific, USA), 0.5 mM.mL^{-1} IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida; Thermo Scientific) e 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo; Thermo Scientific). Os clones transformados foram selecionados de acordo com o perfil colorimétrico das colônias (branco/azul).

4.5.3 Extração de RNA total da Solieria filiformis e amplificação do fragmento de nucleotídeos que codificam a lectina

O ácido ribonucléico total (RNAt) foi obtido a partir de talos da alga *Solieria filiformis* utilizando o AxyPrep Multisource Total RNA Miniprep kit (Axygen Biosciences, CA, USA) de acordo do fabricante. O RNA total foi estocado em ultrafreezer a -80°C , após a extração. O RNA total extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1 % contendo EtBr e quantificado pelo NanoVue™ Plus.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado mediante a reação de transcrição reversa descrito por Scotto–Lavino, Du e Frohman (2006). A solução inicial de 10 μL foi composta de 0,5 μg de RNAt, 1 μL de dNTP (10 mM cada) e 1 μL de oligonucleotídeo Qt (10 mM; 5'- CCA GTG AGC AGA GTG ACG AGG ACT CGA GCT CAA GCT (T)₁₆ - 3'; Sigma-Genosys, TX, USA) em água DEPC 0,01%. A mistura foi incubada inicialmente a 70°C durante 10 minutos para desnaturar a estrutura secundária do RNA, resfriada em banho de gelo durante 5 minutos e foi adicionado 4 μL de tampão concentrado 5 X, 2 μL de 0,1 M DTT e 200 unidades de transcriptase reversa M-MLV (Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transcriptase; Sigma-Aldrich, MO, USA). O volume final foi ajustado a 20 μL com água DEPC 0,01% e a mistura foi incubada a 42°C durante 1 hora, seguido de incubação a 50°C durante 10 minutos para inativação da enzima.

Para a amplificação do fragmento da extremidade 3' da lectina SfL, foi utilizada a estratégia de reação em cadeia da polimerase (PCR) por meio de rápida amplificação das extremidades do cDNA (3' RACE) (SCOTTO–LAVINO; DU; FROHMAN, 2006). A reação de PCR 3' RACE ocorreu a partir do cDNA com o iniciador Upstr_FW_VQ e o iniciador adaptador Q0 (5'-CCA GTG AGC AGA GTG ACG-3').

A reação de PCR consistiu em 0,4 μ M de cada iniciador, 1 unidade de Platus *Taq* DNA polimerase (Sinapse Biotecnologia, Brasil), 0,4 mM de dNTP e 2,0 μ L de cDNA com as seguintes condições: desnaturação do DNA (5 min a 94°C), seguido por 35 ciclos de amplificação (94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos e 72°C durante 90 segundos). Após o último ciclo foi realizada uma última fase de extensão prolongada (72°C por 7 min).

As reações foram observadas em eletroforese em gel de agarose 1 %, contendo EtBr e o fragmento amplificado foi purificado utilizando o GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, IL, USA), através de extração em gel de agarose. O fragmento purificado foi ligado ao vetor pGEM-T easy (Promega, WI, USA), seguindo as instruções do fabricante. O vetor resultante foi utilizado para transformar células de *Escherichia coli* DH5 α por choque térmico, seguindo a metodologia de Sambrook (2002).

4.5.6 Purificação dos plasmídeos transformados e sequenciamento dos nucleotídeos

As clonagens foram realizadas em laboratório com certificação de qualidade em biossegurança, de acordo com os requisitos nacionais (CQB: R007-2016). As colônias selecionadas foram submetidas a extração do DNA plasmidial de acordo com o *illustra*TM plasmidPrep Mini Spin (GE healthcare, IL, USA). Os clones foram confirmados através de reações de digestão de 1 μ g de plasmídeos extraídos com 2 unidades da enzima de restrição EcoRI (Promega, WI, USA), tampão H e BSA (2,0 mg.mL⁻¹). A digestão foi incubada por 3 horas a 37° C e a reação foi confirmada por gel de agarose 1 % na presença de um marcador de DNA (870 e 500 pb). Os plasmídeos confirmados pela digestão foram enviados para a empresa Helixxa (<http://www.helixxa.com.br/>, SP, Brasil) para serem sequenciados no sequenciador automático Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer.

As *reads* foram analisadas quanto à qualidade de bases utilizando o programa Phred-Phrap-Consed (EWING *et al.*, 1998; EWING; GREEN, 1998; GORDON *et al.*, 1998) e escore superior a 20. As *contigs* formadas foram traduzidas em aminoácidos pelo programa online Expasy translation tool (<http://web.expasy.org/translate/>) e a sequência de nucleotídeo foi avaliada pelo programa online NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) para detecção dos possíveis sítios de enzima de restrição. As massas moleculares médias teóricas foram calculadas pelo programa PeptideMass do Expasy (http://web.expasy.org/peptide_mass).

O programa NetNGlyc foi usado para identificar sítios de glicosilação (NXT) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>) (GUPTA; JUNG; BRUNAK, 2004). Repetições sequências nas estruturas primárias foram identificadas pelo programa RADAR (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/radar>) (HEGER; HOLM, 2000).

A similaridade das sequências foram analisadas pelo programa BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) do NCBI. Alinhamentos múltiplos com as sequências das lectinas ESA-2 (*Eucheuma serra* agglutinin; P84331.1), EDA-2 (*E. denticulatum* agglutinin; BAR91516.1), KAA-1 e KAA-2 (*Kappaphycus alvarezii* agglutinin 1 e 2; BAU19430.1, BAU19431.1), KSA-2 (*K. striatus* agglutinin; BAR91206.1), ASL-1 e ASL-2 (*Agardhiella subulata* lectin 1 e 2; BAX08598.1, BAX08599.1), MPA-1 e MPA-2 (*Meristotheca papulosa* agglutinin 1 e 2; BAX08601.1, BAX08602.1) foram realizados nos programas MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/>) (CORPET, 1988) e EsPript 2.2 (Easy Sequencing in Postscript) (<http://escript.ibcp.fr/>) (GOUET *et al.*, 1999).

4.6 Dicroísmo Circular

A determinação da composição de estrutura secundária de MeL e SfL na concentração de 0,4 mg.mL⁻¹ em tampão fosfato 60 mM pH 7,0 foi realizada utilizando um espectropolarímetro, Jasco J-810, equipado com sistema de controle de temperatura. A aquisição foi realizada de 190-250 nm (UV distante) em cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,5 mm e cada espectro foi adquirido com uma média de 8 acumulações, com resolução 1 nm e velocidade de varredura de 50 nm.min⁻¹. As porcentagens das estruturas secundárias, α -hélice, folha- β e conformação desordenada foram estimados utilizando o algoritmo e base de dados Selcon 3 (SCREERAMA; WOODY, 1993) acessado pelo DichroWeb (WHITMORE; WALLACE, 2008).

O estudo de estabilidade térmica foi realizado com variações de temperatura de 25° C até 80° C. O processo de desnaturação foi monitorado a 216 nm e os valores de T_m (Temperatura de melting definida como a temperatura na qual metade das proteínas está na forma desnaturada) foi calculada segundo Greenfield (2007).

4.7 Atividade antibacteriana e aglutinação de bactérias

As cepas utilizadas nos testes pertencem à coleção de culturas microbiana do Laboratório Microbiologia Ambiental e do Pescado.

Os ensaios foram realizados com as cepas padrões *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, a cepa *Salmonella* ser. Brandeirup Lamap 18 multirresistente (tetraciclina, oxitetraciclina, nittrofurantoína e ampicilina) e as cepas do gênero *Vibrio*: *V. cholerae* IOC 19582, *V. parahaemolyticus* IOC 18950, *V. harveyi* ATCC 14126 e *V. alginolyticus* ATCC 17749. A atividade antibacteriana e a capacidade de aglutinar bactérias das proteínas SfL e rSfL foram realizados no laboratório Microbiologia Ambiental e do Pescado do Labomar, UFC.

4.7.1 MIC: Mínima concentração inibitória

A atividade antibacteriana foi realizada em placas de microtitulação pelo método de diluição de meio de acordo com Balouiri, Sadiki e Ibnsouda (2016). O inóculo bacteriano foi preparado em tubos contendo 0,85% de NaCl para as cepas *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella* e 1% de NaCl para as cepas de *Vibrio*.

A turbidez bacteriana foi ajustada de acordo com 0.5 da escala de McFarland em espectrofotômetro. Cada poço continha meio Muller-Hinton (Difco, Leeuwarden, NL) e foi adicionado 50 µL de inóculo bacteriano e 50 µL de proteína para a concentração final de 500, 250, 100 e 50 µg.mL⁻¹. O antibiótico canamicina, na concentração final de 30 µg.mL⁻¹, foi utilizado como controle positivo da atividade e somente o inóculo bacteriano foi adicionado com controle negativo. O experimento foi realizado em triplicata e o ensaio foi incubado a 28° C por 48h. Como indicador de crescimento bacteriano foi utilizado o Cloreto de trifeniltetrazólio a 0,5% (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e incubado a 28° C por 3h. A mudança de cor para vermelho era indicativo de crescimento bacteriano e portanto atividade bactericida negativa.

4.7.2 Aglutinação de bactérias

A aglutinação de bactérias foi conduzida de acordo com Melo e colaboradores (2014), sendo as cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella* inoculadas em meio LB caldo e as cepas de *Vibrio* com meio LB caldo enriquecido com NaCl 1,0 %. A contagem bacteriana foi realizada pelo método de diluição em série e a turbidez ajustada de acordo com a escala 0.5 de McFarland em espectrofotômetro.

A aglutinação de bactérias foi testada com a mistura de 50 μL de proteína a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ com o mesmo volume de suspensão bacteriana na ausência e presença de manana de levedura a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, que foi incubada previamente com as proteínas por 1 hora antes da adição da suspensão bacteriana. Os resultados foram observados após incubação de uma hora com a suspensão celular num microscópio de luz (Olympus CBB).

4.8 Atividade antineoplásica

4.8.1 Cultivo das células

As células utilizadas nos ensaios foram as células da linhagem tumoral MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano) e as células de HDF (fibroblastos dérmicos primários humanos) foram comprados da American Type Culture Collection (ATCC, VA, EUA). Os experimentos foram realizados no Centro de Estudos de Doenças Crónicas da Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

As células foram cultivadas em frascos T-25 contendo meio Dulbecco's Eagle Modificado (DMEM; Gibco®, TX, USA) suplementados com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (FBS; Gibco®, TX, USA), 1% de L-glutamine, 100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ penicilina e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ estreptomicina (Sigma Aldrich, MO, USA). As células foram crescidas a 37 °C numa atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO_2 . O meio foi rotineiramente trocado a cada 3 dias e as células com 90 % de confluência foram subcultivadas após tripsinização (0,025% de tripsina e 0,1% de EDTA) das células. Em todos os experimentos, as células foram usadas entre a terceira e a décima quarta passagem.

4.8.2 Avaliação do efeito das lectinas MeL e Sfl na proliferação celular

A viabilidade celular foi determinada utilizando o CellTiter 96® Aqueous MTS Reagent Powder (Promega, WI, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As células (2×10^4 por poço) foram semeadas numa placa de fundo plano de 96 poços em meio DMEM contendo 10% de FBS e incubadas de um dia para o outro. Depois, o sobrenadante foi removido e substituído por DMEM suplementado com 2% de FBS contendo diferentes concentrações das lectinas, que foram diluídas de forma seriada (500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62 e 7,81 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). O ensaio MTS foi realizado durante 24 h para células MCF-7 e HDF.

Três experimentos independentes foram realizados em triplicata. A densidade óptica foi lida a 490 nm num leitor de microplacas. A viabilidade foi calculada de acordo com a equação 1.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Média OD 490nm (Lectinas)}}{\text{Média OD 490nm (controle)}} \times 100 \quad (1)$$

4.8.3 Avaliação da apoptose/autofagia por citometria de fluxo da SfL

A apoptose celular e a necrose foram avaliadas com o método de dupla coloração 7-AAD pelo APC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BioLegend, CA, USA). Assim, as células MCF-7 ($2,25 \times 10^5$ por poço) foram semeadas em placas de 6 poços contendo DMEM suplementado com 10% de FBS e cultivadas durante 24 h.

As células foram, em seguida, colhidas e incubadas com SfL a $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em DMEM contendo 2% de FBS por 24 h. As células do controle foram incubadas apenas com DMEM suplementado com 2% de FBS. Após o tratamento as células foram tripsinizadas e depois centrifugadas ($206 \times g$ por 5 min) e lavadas duas vezes com tampão fosfato 20 mM contendo NaCl 150 mM (PBS; pH 7,4). As células foram ressuspensas em PBS com CaCl_2 25 mM e foram adicionados 5 μL de anexina V-APC e 5 μL de 7AAD a cada poço. As células foram incubadas no escuro durante 20 minutos em temperatura ambiente e depois o potencial pro-apoptótico de SfL foi determinado por citometria de fluxo (FCM).

4.8.3.1 Extração de RNA mensageiro e qRT-PCR

A extração de RNA foi realizada pelo GenElute Mammalian Total RNA Purification kit e tratada com a DNAase (Sigma-Aldrich, MO, USA). O cDNA foi sintetizado com primers randômicos a partir da High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). A quantificação da expressão gênica relativa foi realizada por PCR via transcriptase reversa quantitativa em tempo real (qRT-PCR) como descrito por Videira e colaboradores (2007). Os genes analisados foram BAX (Hs00180269_m1), BCL-2 (Hs00608023), CASP 3 (Hs00234387_m1), CASP 8 (Hs01018151_m1), CASP 9 (Hs00609647_m1) e TP53 (Hs01034249_m1). Cada reação foi realizada em duplicata. Todos os genes, incluindo os controles endógenos (β -actina e GAPDH) e as células tratadas ou não tratadas, foram analisadas para excluir as variações entre as análises de qRT-PCR. A expressão relativa para cada gene foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, conforme Livak e Schmittgen (2001). A eficiência de amplificação para cada iniciador/sonda foi acima de 95%.

4.8.4 Análise estatística

Todos os resultados foram confirmados por pelo menos três experimentos independentes. As estatísticas foram apresentadas como a média \pm SEM. Os dados experimentais foram analisados pelo teste t de Student e one-way ANOVA. $P < 0,01$ e $P < 0,05$ foram adotados como nível de significância. Os valores de IC50 foram calculados usando o software GraphPad Prism® 5.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

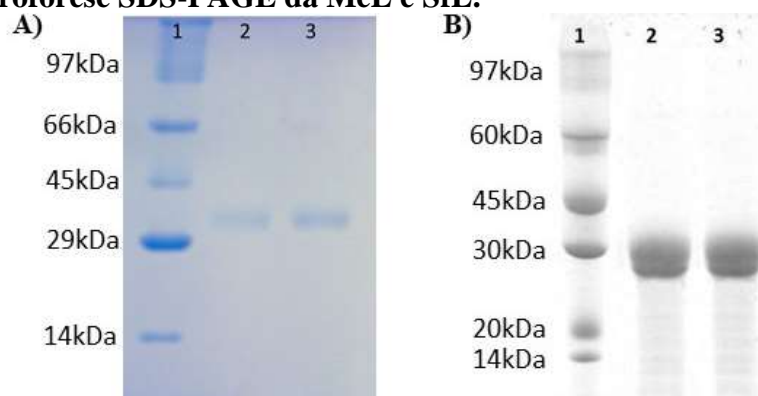
5.1 Purificação das lectinas MeL e SfL

A lectina MeL da alga marinha vermelha *Meristiella echinocarpa* foi purificada por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel e a atividade hemaglutinante foi observada nos dois picos retidos, P2 (eluído com 0,5M NaCl) e P3 (eluído com 1M NaCl), mas foi no P2 que a lectina foi recuperada isenta de pigmentos e contaminantes protéicos e com maior rendimento. A lectina SfL da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* também foi purificada por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel e a atividade hemaglutinante foi observada na fração não adsorvida, enquanto que na fração retida pela matriz apresentou-se pigmentada.

A cromatografia de troca iônica tem sido utilizada eficientemente no isolamento de lectinas de algas marinhas, principalmente nas etapas iniciais de purificação e retirada de pigmentos e, muitas vezes, da purificação da lectina, como pode ser observado para maioria das lectinas de algas vermelhas (SINGH; WALIA, 2017).

As lectinas purificadas foram submetida à eletroforese SDS-PAGE na presença e ausência de β -mercaptoetanol para analisar possível existência de subunidades e estimar o peso molecular (FIGURA 05).

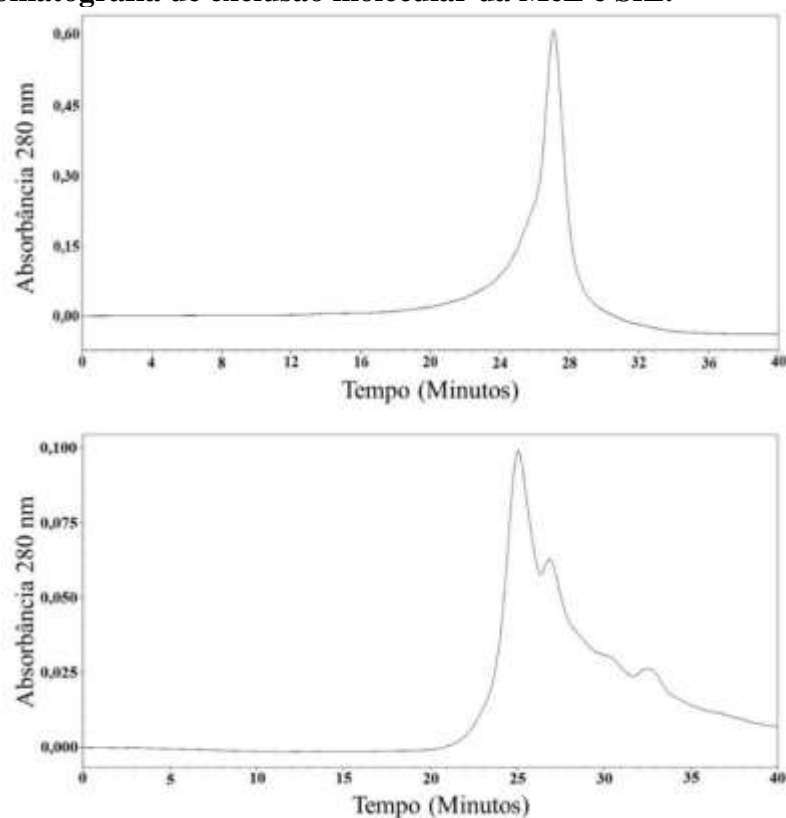
Figura 05 – Eletroforese SDS-PAGE da MeL e SfL.



Fonte: Elaborado pela autora. A - Poço 1 marcador, Poço 2 MeL na presença de β -mercaptoetanol e Poço 3 MeL na ausência de β -mercaptoetanol. B - Poço 1 marcador, Poço 2 SfL na presença de β -mercaptoetanol e Poço 3 SfL na ausência de β -mercaptoetanol.

As massas estimadas de MeL e SfL por SDS-PAGE foram de 30 kDa e 28 kDa, respectivamente. As lectinas não apresentaram subunidades, como as demais lectinas das algas, que geralmente são monoméricas e apresentam baixo peso molecular (ROGERS; HORI, 1993). O perfil eletroforético e as massas moleculares aparentes são semelhantes as lectinas de algas marinhas *Solieria robusta* (HORI *et al.*, 1988), *Amansia multifida* (COSTA *et al.*, 1999), *Eucheuma serra* (KAWAKUBO *et al.*, 1997) *E. amakusaensis*, *E. cottonii* (KAWAKUBO *et al.*, 1999), *E. denticulatum* (HUNG *et al.*, 2014), *Kappaphycus alvarezii* (HUNG *et al.*, 2009) e *K. striatum* (HUNG; SATO; HORI, 2011). Uma cromatografia de exclusão molecular foi realizada para avaliar a pureza das lectinas e a massa molecular aparente. (FIGURA 06).

Figura 06 – Cromatografia de exclusão molecular da MeL e SfL.



Fonte: Elaborado pela autora. Cromatografia de exclusão molecular em coluna BioSuite 250 SEC acoplado no sistema Acquity UPLC. A – Perfil cromatográfico da MeL-1; B – Perfil cromatográfico da SfL nativa.

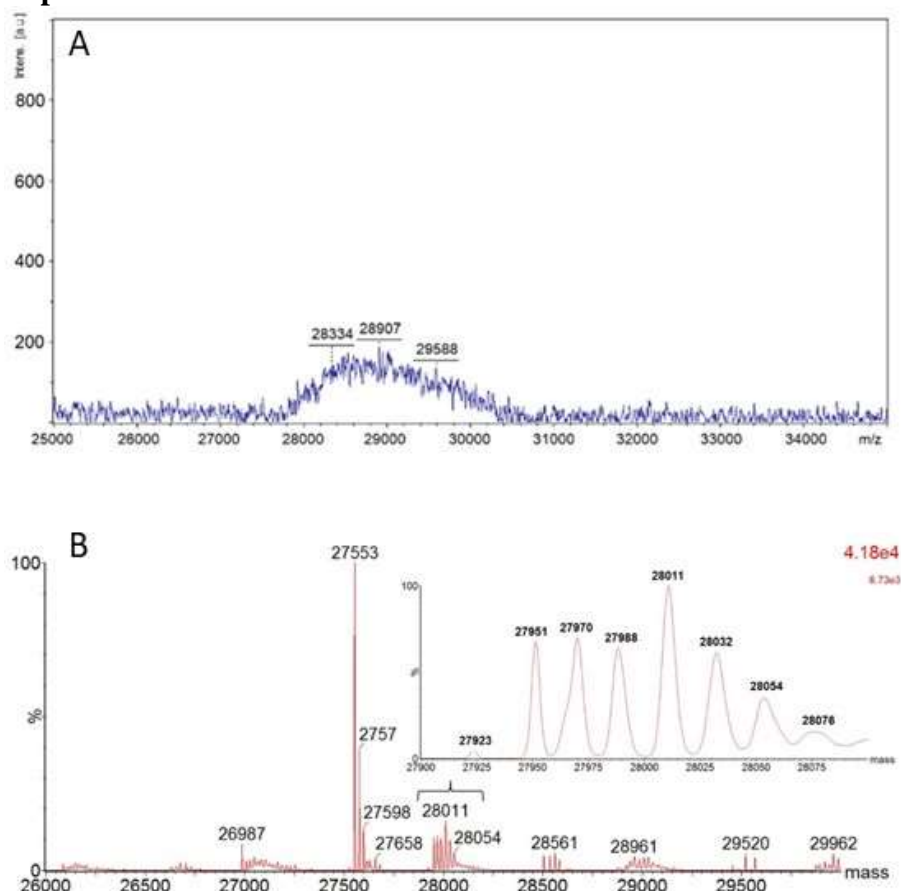
A MeL apresentou um tempo um tempo de retenção de 27,3 minutos com massa calculada em aproximadamente 20,8 kDa, sendo menor que a estimada por SDS-PAGE com 30 kDa. Farias em 1995, mostrou o mesmo comportamento, onde a MeL apresentou a mesma massa estimada por SDS-PAGE de 30 kDa e uma massa calculada de 15,8 kDa em coluna de Sephadex G-75.

Essa diferença pode ser devido à características hidrodinâmicas ou interações anômalas da proteína com a matriz (iônicas ou hidrofóbicas) coluna que pode ter retardado a eluição. A SfL apresentou um pico majoritário em 25 minutos com massa calculada de 30 kDa, que é aproximado ao estimado por SDS-PAGE, um segundo pico em 26,9 minutos com massa calculada de 22 kDa com um arrastado causado provavelmente pelas isoformas e/ou interações anômalas com a coluna, e um terceiro pico em torno de 32,5 minutos com massa calculada de 9 kDa. A massa estimada para a SfL por Benevides, Leite e Freitas (1996) em coluna Superose 12R foi de 21,9 kDa, mesmo apresentando 29 kDa em SDS-PAGE, evidenciando a interação da proteína com a coluna causando um retardo na eluição.

As lectinas MeL e SfL apresentaram atividade hemaglutinante contra eritrócitos tripsinizados de coelho. A MeL e SfL foram inibidas por manana de levedura com concentração mínima de $62,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $31,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Farias (1995) também mostrou a inibição de MeL por manana a $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e Benevides, Leite e Freitas (1996) mostrou que SfL foi inibida por manana a $19,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Outras lectinas de algas também foram inibidas por manana, como a OAA, KAAs, KSAs, ESA, EDA e AML, que pertencem a família OAAH (KAWAKUBO *et al.*, 1997; COSTA *et al.*, 1999; SATO; HORI, 2009; HUNG *et al.*, 2009; HUNG *et al.*, 2011; HUNG *et al.*, 2014). Lectinas da família OAAH são conhecida por apresentar reconhecimento exclusivo a *N*-glicanos ricos em manose e a inibição por manana de levedura mostra que as lectinas MeL e SfL apresentam tal especificidade, pois a manana é um oligomanossídeo altamente ramificado com cadeias laterais com ligação $\alpha(1\rightarrow2)$ e $\alpha(1\rightarrow3)$ a partir de uma cadeia principal com ligação $\alpha(1\rightarrow6)$ (JONES; BALLOU, 1969).

A análise da massa molecular da MeL intacta por espectrometria de massas MALDI-TOF/MS demonstrou a presença de vários íons, que sugere ser referentes à isoformas. Contudo, o espectro possui baixa intensidade e resolução, não permitindo uma avaliação mais apurada. A ionização MALDI favorece a formação de íons monocarregados (KARAS; GLÜCKMANN; SCHÄEFER, 2000) e a análise foi realizada através de um analisador linear que possui um baixo poder de resolução (HOLCAPEK; JIRASKO; LISA, 2012). A análise da massa intacta da SfL por espectrometria de massas em LC/MS demonstrou a presença de vários íons em séries, que podem ser assinados à isoformas e/ou aductos. Ambos os espectros podem ser observados na Figura 07.

Figura 07 - Espectro de massas de MeL e SfL.



Fonte: Elaborado pela autora. A – Espectro de massas da MeL obtido por MALDI-ToF e B – Espectro de massas ESI deconvolvido da SfL obtidos por LC-MS e a ampliação dos íons em série de 28011 Da do espectro de massas deconvolvido.

A análise de MALDI-ToF revelou um sinal amplo entre 28.000 Da e 30.000 Da com intensidade máxima em 28.907 Da e este amplo sinal pode ser devido a presença de isoformas. Farias (1995) mostrou a existência de isoformas para a *Meristiella echinocarpa* por focalização isoeétrica, que mostrou a presença de 5 bandas, sugerindo 5 isoformas. A análise da massa intacta da SfL por espectrometria de massas em LC/MS mostra a possível presença de isoformas, corroborando com resultados obtidos por Abreu (2012) onde foi visualizado a presença de seis isoformas para a SfL através de eletroforese bidimensional. A análise de LC/MS revelou várias séries de íons entre 26.987 Da e 29.962 Da e o íon de massa majoritário da SfL foi de 27.553 Da.

As massas de MeL e SfL são próximas as massas moleculares determinadas por espectrometria de massas das lectinas de *Eucheuma serra* com 27.949 Da (HORI *et al.* 2007), *E. denticulatum* com 27.834 Da (HUNG *et al.*, 2014), *Amansia multifida* com 28.388 Da (SIVA, 2016), *Kappaphycus alvarezii* com 28.016 Da (LE *et al.*, 2009) e *K. striatum* com 28.020 Da (HUNG; SATO; HORI, 2011).

A presença de isoformas de lectinas de algas também foram observadas em algas verdes (YOON *et al.*, 2008; HAN *et al.*, 2010, 2011, 2012c) e vermelhas (HORI; MATSUBARA; MIYASAWA, 2000; NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012, HUNG *et al.*, 2015a,b; HIRAYAMA *et al.*, 2016).

5.2 Determinação da estrutura primária de uma isolectina da MeL

A digestão realizada com a enzima tripsina e quimiotripsina originou peptídeos de variados tamanhos, mas apenas 26 foram peptídeos sequenciados por MS/MS foram utilizados posteriormente em combinação com dados de clonagem de DNA para confirmação de uma isoforma sequenciada e, assim, confirmando a existência de isoformas (TABELA 06).

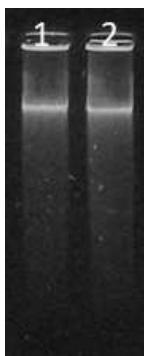
Tabela 01 – Sequências de aminoácidos dos peptídeos de MeL.

Peptídeo	Sequência de aminoácidos	Massa		Δ (Da)
		Calculada	Observada	
Q1	GRYTVQNQWGGSSAPW	1792,82	1793,81	0,01
Q2	SGEGPIGF	762,35	762,35	0,00
Q3	VIGSRSGQGVVGLDIKSSDNGKTL	2386,28	2386,80	-0,52
Q4	TGTMYEREGPIGF	1557,40	1557,39	0,01
Q5	KGTQSGGDTYNVENQWGGSSAPW	2425,04	2425,05	-0,01
Q6	EREGPIGFKGTQSGGDTY	1897,88	1897,85	0,03
Q7	NKAGVWALGDRSSEAMNKL	2062,05	2062,38	-0,33
Q8	NKLEVSSSDGGSTLEGTMQY	2101,95	2102,39	-0,44
Q9	KGEGPIGF	803,41	803,33	0,08
Q10	RAKLASANNY	1849,91	1849,27	0,64
Q11	SVENQWGGSSAPW	1403,61	1403,59	0,02
Q12	DKAGDWLIGDRYNQNITAVNVSSDDGKNL	3264,56	3265,33	-0,77
Q13	AREGPIGFKGSAV	1287,69	1287,06	0,63
T1	YTVQNQWGGSSAPWNDAGLYVLGGR	2695,27	2695,30	-0,03
T2	DLSGTMTYSGEGPIGFK	1758,81	1758,54	0,27
T3	NQWGGSSAPWHDGGDFVIGSR	2288,99	2288,93	0,06
T4	SGQGVVGLDLK	1071,59	1071,55	0,04
T5	TLTGTMTYER	1171,55	1171,52	0,03
T6	EGPIGFK	746,39	746,39	0,00
T7	GTQSGGDTYNVENQWGGSSAPWNK	2539,10	2539,03	0,07
T8	AGVWALGDR	943,48	943,46	0,03
T9	LEVTSDDGGSTLEGTMQYK	2011,94	2011,87	0,07
T10	GEGPIGFR	831,42	831,41	0,01
T11	AGDWLLGDR	1001,49	1001,49	0,00
T12	YNQNITAVNVSSDDGK	1810,83	1810,83	0,00
T13	NLEGTCTYAR	1183,52	1183,52	0,00

Fonte: Elaborado pela autora.

A existência de isoformas e repetições de domínios torna complexa a sobreposição de peptídeos na determinação da estrutura primária pelo sequenciamento por MS/MS, uma vez que não se poderia atribuir a localização dos peptídeos nos domínios e/ou a qual isoforma pertencia. Portanto, experimentos de clonagem de DNA foram necessários para a determinação da estrutura primária da lectina juntamente com os dados obtidos pelo MS/MS. A metodologia abordada para obter maior informação da estrutura primária foi de PCR a partir do DNA genômico, pois tentativas de extração de RNA total não foram bem sucedidas. Assim, o DNA genômico foi extraído (FIGURA 08) e usado como molde nas reações de PCR com os iniciadores Upstr_FW_VQ e Down_RV desenhados a partir das sequencias de aminoácidos determinados por MS/MS.

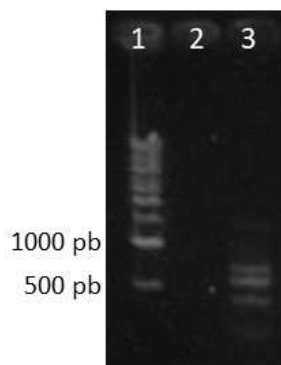
Figura 08 - Eletroforese em gel de agarose 1% da extração do DNA genômico.



Fonte: Elaborado pela autora. 1 e 2 – DNA genômico da *M. echinocarpa* (305 e 300 ng.µL⁻¹).

O produto da amplificação produziu três fragmentos de aproximadamente 400, 600 e 750 pares de base (FIGURA 09).

Figura 09 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos fragmentos de PCR da MeL.



Fonte: Elaborado pela autora. 1 – Marcador de DNA; 2 – Branco e 3 – PCR da MeL

As regiões onde os iniciadores podem se anelar são correspondentes às sequências de aminoácidos conservados no início e no final de cada domínio, além de poder se anelar na região N- e C-terminal da lectina, contendo os quatro domínios. A existência de três fragmentos de tamanhos diferentes demonstra que os iniciadores se anelaram em três possíveis regiões. Logo, o maior fragmento (aproximadamente 750 pb) provavelmente contém os quatro domínios da lectina, o segundo fragmento contém três domínios e o terceiro fragmento com dois domínios, não sendo observado fragmento com apenas um domínio. A banda referente ao fragmento com 750 pb foi purificado e clonado para o sequenciamento de nucleotídeos. Após a confirmação dos clones transformados, 15 clones foram sequenciados. As *reads* foram analisadas pelo programa Phred-Phrap-Consed e resultou na formação de uma *contig* com 372 pb (FIGURA 10).

Figura 10 – Sequenciamento de nucleotídeos que codifica uma isolectina da alga vermelha *Meristiella echinocarpa*.

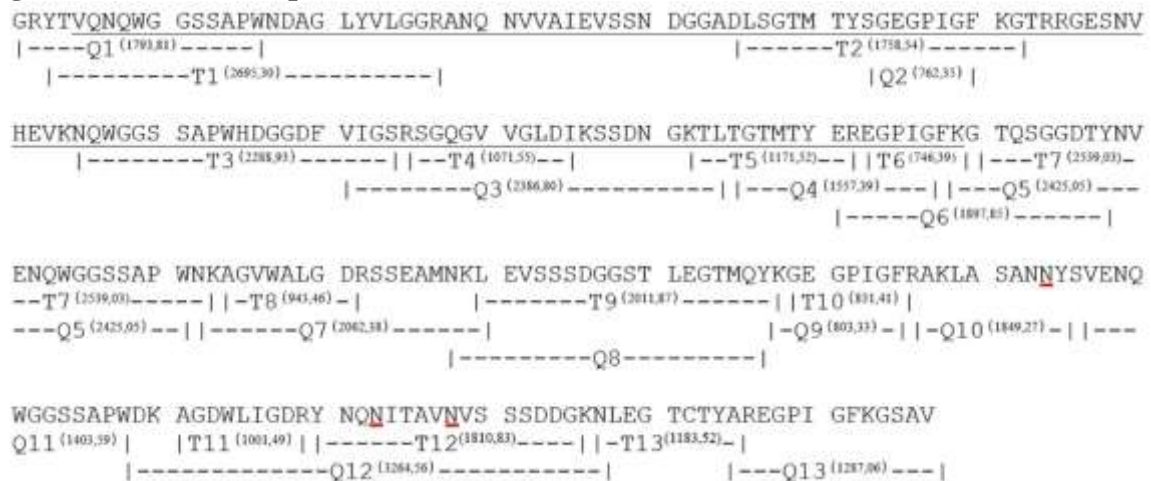
```

1  V Q N Q W G G S S A P W N D A G L Y V L
1  GTGCAGAATCAGTGGGGGGGCTCTTCTGCTCCCTGGAATGATGCCGGTTTGTATGTGCTC
21  G G R A N Q N V V A I E V S S N D G G A
61  GGCGGCCGTGCCAATCAAACGTCGTGGCAATTGAAGTCAGCTCCAACGATGGCGGCGCT
41  N L S G T M T Y S G E G P I G F K G T R
121 AATCTCAGTGGGACGATGACGTA CTCTGGTGAGGGCCCCATTGGGTTCAAGGGCACACGC
61  R G E S N V H E V K N Q W G G S S A P W
181 CGGGGTGAGTCCAACGTCATGAAGTCAAGAACCAGTGGGGCGGGTCTCGGGCGCCCTGG
81  H D G G D F V I G S R S G Q G V V G L D
241 CACGATGGTGGTGACTTTGTGATCGGGTCTCGGTCTGGGCAGGGGGTGGTTGGATTGGAT
101 I K S S D N G K T L T G T M T Y E R E G
301 ATCAAGTCATCTGATAACGGGAAGACCTTGACC GGA ACTATGACTTACGAGAGGGGAAGGG
121  P I G F
361  CCGATCGGCTTT

```

Fonte: Elaborado pela autora. Sequência de nucleotídeos que codifica a sequência de aminoácidos de MeL. Os aminoácidos sublinhados em preto e vermelho correspondem às sequências utilizadas para o desenho dos iniciadores para a PCR.

A tradução dos nucleotídeos mostrou a sequência de 124 aminoácidos com a presença de dois domínios de ligação a carboidrato e que possui 97 % de identidade com a lectina MPA-2 da alga *Meristotheca papulosa* (BAX08602.1). Integrando a sequência da *contig* obtida pelo sequenciamento juntamente com os dados de espectrometria de massas e a sequência da MPA-2 como modelo, foi possível determinar a estrutura primária da lectina da alga *M. echinocarpa* (MeL). Os aminoácidos isobáricos, indistinguíveis por MS/MS, como leucina (L) de isoleucina (I), foram assinalados conforme a tradução de aminoácidos da *contig* sequenciada e a sequência modelo. O mapa com a estrutura primária está representado na Figura 11.

Figura 11 – Estrutura primária da MeL.

Fonte: Elaborado pela autora. A estrutura primária foi obtida por combinação dos dados MS/MS de peptídeos trípticos (T) e quimiotríptico (Q) com a sequência de aminoácidos traduzida da contig (sublinhado em preto) e a sequência da MPA-2 como modelo. Os aminoácidos asparagina (N) sublinhados em vermelho representa possíveis sítios de glicosilação.

A estrutura primária é composta de 267 resíduos de aminoácidos, quatro domínios internos repetidos e três possíveis sítios de glicosilação (NXT/NXS) nas posições 204, 233 e 238. A massa molecular calculada de MeL foi de 27.942 Da.

Outras estruturas primárias de lectinas também foram determinadas por amplificação a partir do DNA genômico, como a Microvirin, MVL e a OAA, conforme foi observado na tabela 01.

5.3 Determinação da estrutura primária de duas isolectinas da SFL

Os quinze primeiros aminoácidos do N-terminal da proteína foram determinados por degradação de Edman: GRY(T/N)(A/V)QNQWGGGSXAP. A heterogeneidade observada na posição 4 e 5 indica a existência de isoformas. Os aminoácidos Thr e Asn foram observados na posição 4 e Ala e Val na posição 5. O resíduo na posição 13 não foi identificado. A pesquisa por similaridade no NCBI PROTEIN BLAST mostrou alta similaridade com a ESA-2 (P84331.1).

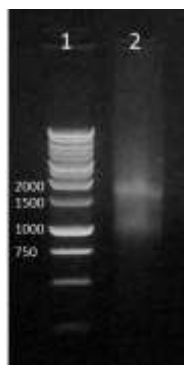
A digestão tríptica originou vários peptídeos, mas apenas 22 peptídeos sequenciados por MS/MS foram utilizados posteriormente em combinação com dados de clonagem de cDNA para confirmação da sequência de aminoácidos de duas isoformas, corroborando com a indicação da existência de isoformas sugeridas pelo espectro de massas da proteína intacta e pela análise de N-terminal. (TABELA 07).

Tabela 02 – Sequências de aminoácidos dos peptídeos de SfL.

Peptídeo	Sequência de aminoácidos	Massa		Δ (Da)
		Calculada	Observada	
T1	YTVQNQWGGSSAPWNDAGLWILGSR	2762,30	2762,31	-0,01
T2	GRYTVQNQWGGSSAPWNDAGLWILGSR	2975,43	2975,44	-0,01
T3	GDSNNYDVENQWGGSSAPWHAGGTFVIGSR	3164,39	3164,36	0,03
T4	SGQGVAVDVNSSDGGK	1574,71	1574,62	0,11
T5	TLTGMTYANEGPIGFK	1799,87	1799,85	0,02
T6	GTQSGGDSYNVENQWGGSSAPWNK	2525,08	2525,02	0,06
T7	AGAWALGDR	915,45	915,67	-0,22
T8	DGQGVIGVDVTSSDGGK	1589,75	1589,56	0,19
T9	TLTGMTQYQNEGPFGK	1883,90	1883,84	0,06
T10	VENQWGGSSAPWNPAGNWLIGDR	2510,17	2510,20	-0,03
T11	EGPIGFK	746,35	746,39	-0,04
T12	YSVQNQWGGSSAPWNDAGVFLGGR	2651,25	2651,17	0,08
T13	ANQNVMAIDVSSSDGGK	1691,77	1691,36	0,41
T14	TLTGMTYSGEGPLGFK	1758,84	1758,78	0,06
T15	RGESNNYVENQWGGSSAPWHPAGTFVIGSR	3388,56	3388,65	-0,11
T16	SGQAVVAMNVTSHDGGK	1656,78	1656,82	-0,04
T17	TLSGHMTYENEGPLGFK	1879,87	1880,77	-0,90
T18	GTQAEGDTYNVENQWGGSSAPWNK	2595,12	2595,08	0,04
T19	ASQGVVKLDVSSSDGGK	1632,83	1632,82	0,01
T20	TLTGMTQYQNEGPLGFR	1911,91	1911,97	-0,06
T21	AENQWGGSSGAWNPAGLWLIGDR	2441,15	2441,09	0,06
T22	TLEGTCTYYR	1262,56	1262,48	0,07

Fonte: Elaborado pela autora.

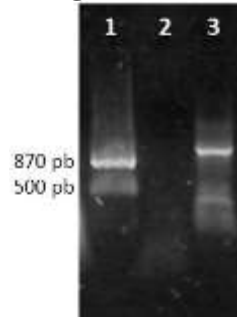
A existência de isoformas e repetições de domínios também tornou complexa a determinação da estrutura primária da SfL e assim também foi abordado experimentos de clonagem de DNA para a combinação dos dados obtidos por degradação de Edman e MS/MS. A metodologia abordada para obter maior informação da sequência de nucleotídeos que codificam a lectina foi de PCR 3' RACE com iniciador que anelasse na região N-terminal da proteína. Para isso o RNA total da alga foi extraído (FIGURA 12) e utilizado para a síntese de cDNA através da reação da transcriptase reversa M-MLV.

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 1%:extração de RNA total.

Fonte: Elaborado pela autora. 1 – Marcador 1 Kb; 2 – RNA total de *S. filiformis* (82,4 ng/ μ L).

A amplificação produziu um fragmento de aproximadamente 1000 pb (FIGURA 13), que foi purificado e clonado para o sequenciamento de nucleotídeos.

Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação do 3' RACE da SfL.



Fonte: Elaborado pela autora. 1 – Marcador; 2 – Branco e 3 – PCR 3' RACE

O sequenciamento do produto 3'RACE revelou a presença de duas seqüências com regiões codificadoras de 789 nucleotídeos, seguidas por um códon de parada, região 3' não codificadora (3'UTR) e a cauda poli-A (FIGURA 14).

Figura 14 – Sequência de nucleotídeos das isolectinas da alga vermelha *Solieria filiformis* (Continua).

A) SfL-1

```

1  V Q N Q W G G S S A P W N D A G L W L L
1  GTGCAGAATCAGTGGGGGGCTCCAGTGCCCCATGGAACGATGCCCGGCTTATGGTTGCTT
21  G S R A N Q N V M D V S V T S S D G G A
61  GGCAGCCGCGCCAACCAGAATGTCATGGACGTTTCAGTCACCTCAAGCGATGGCGGAGCT
41  T L T G T M T Y S G E G P I G F K G T R
121  ACTCTCACCAGTACCATGACCTATTCCGGGTGAGGGTCCCATTGGATTCAAGGGCACCCGC
61  R G D S N N Y D V E N Q W G G S S A P W
181  CGCGGTGACTCCAACACTATGATGTTGAAAACAGTGGGGAGGCTCATCTGCTCCTTGG
81  H A G G T F V I G S R S G Q G V V A V D
241  CACGCCGGCGGTACCTTCGTGATCGGCTCCAGGTCAGGCCAGGGTGTGGTTCGTGTGGAT
101  V N S S D G G K T L T G T M T Y A N E G
301  VTGAACCTCCTCTGATGGAGGGAAAACCTCACTGGGACTATGACATACCGAACGAGGGG
121  P I G F K G T Q S G G D S Y N V E N Q W
361  CCGATCGGGTTCAAGGGGACGCAGTCTGGTGGTGACAGCTACAACGTTGAGAACAGTGG
141  G G S S A P W N K A G A W A L G D R D G
421  GGAGGATCTTCGTCCGTGGAACAAGGCGGGCGCTTGGGCGCTTGGTGATCGTGATGGG
161  Q G V I G V D V T S S D G G K T L T G T
481  CAAGGCGTAATCGGTGTGGATGTGACGTCATCAGATGGGGTAAGACGTTAACAGGGACG
181  M Q Y Q N E G P I G F K G T S T G G S N
541  ATGCAGTACCAGAATGAAGGACCGATTGGATTCAAGGGGACGTCGACCGGAGGCAGCAAC
201  Y K V E N Q W G G S S A P W N P A G N W
601  TACAAGGTTGAAAATCAGTGGGGTGGGTCTTCGGCGCCGTGGAATCCCGCTGGGAATTGG
221  L I G D R H N Q N I V A V K V T S S D N
661  CTCATTGGTGACCGTCACAACCAGAACATAGTCGCAGTGAAAGTTACATCCAGTGACAAC
241  G K T L G G T C T Y E R E G P I G F K G
721  GGAAGACCCTAGGAGGAACCTGCACCTACGAGAGGGAGGGCCCAATTGGGTTCAAGGGC
261  T A I -
781  ACTGCTATCTGAAGTGTCCACATTCCTCCGCAAAGAGAAGCTGTGCCGCCAAAGACATG
841  TGCAATTCAGCAGTCTTACCTAGTCTAGTCTTCGAACTGTTCCCTTTTCGAGGCTGATCTT
901  GTTGCTTGAGCCCGAGGACGACTTTCTGACATCTATCATTAGATATCGTAAGCTGTTTT
961  TGGTACTTTCAGAAATAAACGAGAAGGCTCATTATCATCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```


Figura 14 – Sequência de nucleotídeos das isolectinas da alga vermelha *Solieria filiformis* (Conclusão).

B) SfL-2

```

1  V Q N Q W G G S S A P W N D A G V F V L
1  GTGCAGAATCAGTGGGGGGCTCCTCTGCTCCTTGGAACGATGCCGGAGTGTTTGTGCTT
21  G G R A N Q N V M A I D V S S S D G G K
61  GGTGGTCGTGCCAACCAAAACGTATGGCAATCGATGTCTCCTCTAGCGACGGGGTAAA
41  T L T G T M T Y S G E G P I G F K G T R
121  ACTCTCACCGGCACAATGACCTACTCTGGTGAGGGTCCCATCGGATTCAAGGGCACCCGC
61  R G E S N N Y E V E N Q W G G S S A P W
181  CGCGGGGAATCCAACAACACTACGAGGTTGAGAACCAGTGGGGAGGCTCATCCGCCCTGG
81  H P A G T F V I G S R S G Q A V V A M N
241  CACCCGGCCGGTACCTTCGTTCATCGGGTCCAGGTCCGGCCAGGCCGTAGTTGCCATGAAT
101  V T S H D G G K T L S G H M T Y E N E G
301  GTGACTTCCCATGACGGAGGCAAGACCCTCAGTGGACATATGACGTACGAGAATGAGGGG
121  P I G F K G T Q A E G D T Y N V E N Q W
361  CCCATCGGATTCAAGGGAACGCAAGCTGAAGGTGATACCTATAATGTGAGAACCAAGTGG
141  G G S S A P W N K A G V W A L G S R A S
421  GGAGGGTCGTCCGGCCCGTGGAAACAAGGCTGGTGTGTGGGCTCTGGGATCTCGTGCCAGT
161  Q G V V K L D V S S S D G G K T L T G T
481  CAGGGCGTGGTGAAGTTGGACGTGTCTTCGGATGGTGGAAAGACATTGACAGGGACG
181  M Q Y Q N E G P I G F R G T L T G A N N
541  ATGAGTATCAGAACGAGGGCCCGATCGGATTCAGGGGCACTCTCACTGGTGCGAACAAC
201  Y K A E N Q W G G S S G A W N P A G L W
601  TACAAAGCTGAGAATCAGTGGGGTGGATCCTCTGGAGCCTGGAATCCGGCTGGGCTGTGG
221  L I G D R H N Q N I I G V K V T S D D N
661  CTCATTGGGGATCGCCACAACCAAAACATTATTGGGGTGAAGGTGACGTCTGATGACAAAC
241  G K T L E G T C T Y Y R E G P I G F K G
721  GGGAAAGACCTTGAAGGAACGTGCACTTACTACAGGGAGGGGCCGATCGGGTTTAAGGGC
261  V A N -
781  GTTGCCAACACTAGATGTGTCCAGTGTCTGTACTCCGGCAGAATCCGAATGGAGATGAAGCC
841  TAGGTTACAATTCCTTCCTTTCCTTTATTGATATCAATTCGGATTCGGGACATTTTCAGGA
901  GAGTGTGGATGCGAGAATAAAATTGCTAGTGTCCAGGCCGaaaAAAAAAAAAAAAAAAAAA
961  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

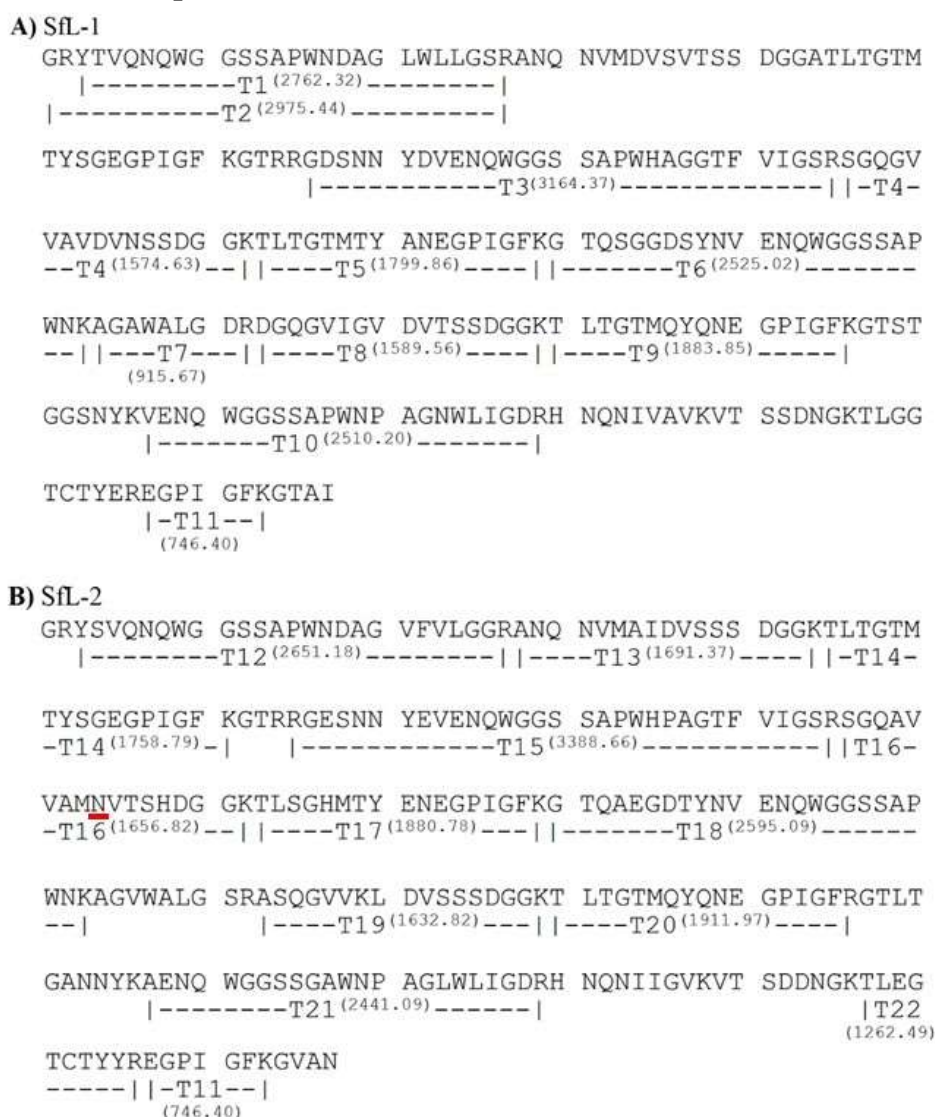
```

Fonte: Elaborado pela autora. A – Sequência de nucleotídeos da SfL-1 e B – Sequência nucleotídeos da SfL-2. Os aminoácidos sublinhados correspondem a sequência utilizada para o desenho do iniciador degenerado (iniciador-SfL3').

A tradução do produto de 3' RACE revelou duas sequência de 263 aminoácidos, que foram confirmadas pelas sequências dos peptídeos determinadas por MS/MS. A isoforma SfL-1 possui 82,4 e 84,3% de identidade com as duas isoformas determinadas por Chaves (2013) e SfL-2 possui 99,3 e 97,4% de identidade. Chaves (2013) utilizou a metodologia de PCR a partir do DNA genômico, como utilizado para a MeL, e RACE, mas com iniciadores que anelou no meio da proteína e não no N-terminal.

Integrando as sequências das *contigs* obtidas do 3' RACE, juntamente com os dados de degradação de Edman e de espectrometria de massas foi possível determinar a estrutura primária de duas isolectinas da alga *Solieria filiformis* (SfL-1 e SfL-2). Os dois mapas com as estruturas primárias referentes a duas isoformas estão representados na Figura 15.

Figura 15 – Estrutura primária das isolectinas SfL-1 e SfL-2.



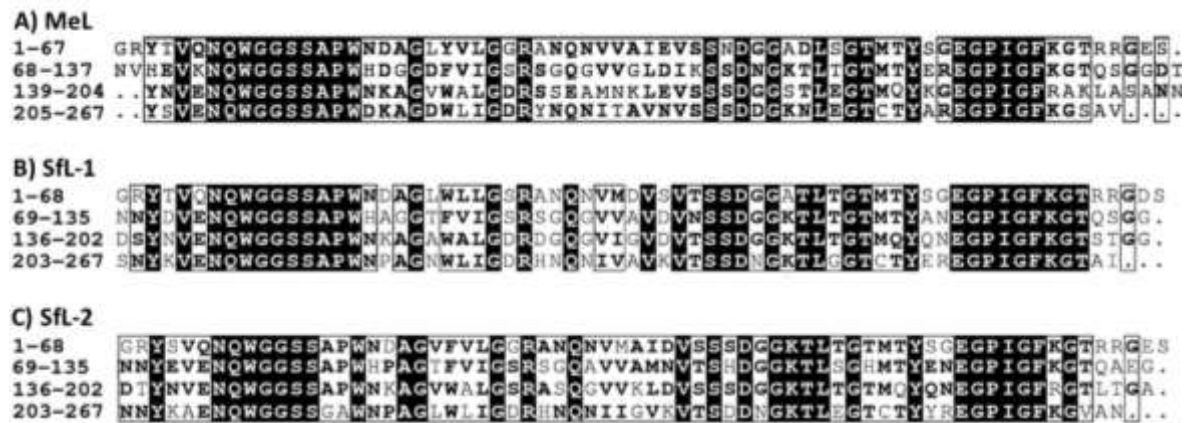
Fonte: Elaborado pela autora. As duas estruturas primárias foram obtidas por combinação dos dados por degradação de Edman e de sobreposição de sequências de peptídeos trípticos (T) com as sequências de aminoácidos traduzidas das contigs 3' RACE. A – Estrutura primária da SfL-1 e B – Estrutura primária da SfL-2. O aminoácido asparagina (N) sublinhado em vermelho representa um possível sítio de glicosilação.

Os aminoácidos isobáricos Ile/Leu foram assinalados conforme a tradução de aminoácidos das *contigs* sequenciadas. As duas estruturas primárias são compostas de 267 resíduos de aminoácidos com quatro domínios internos repetidos e a SfL-2 possui um possível sítio de glicosilação (NXT) na posição 104. As massas moleculares calculadas de SfL-1 e SfL-2 foram 27.552 Da e 27.985 Da, respectivamente, as quais foram consistentes com os íons 27.553 Da e 27.988 Da determinado por ESI-MS. Outras estruturas primárias de lectinas também foram determinadas pelo método de RACE, como a UPL-1, ULL, BHL, GFL, BCA, CBA, EDA-2, KSA-2, AML, KAA-1 e KAA-2, conforme observado no Quadro 01.

5.4 Análise das estruturas primárias das lectinas MeL e Sfl

A análise dos domínios tandem identificou quatro domínios repetidos internos nas estruturas primárias e cada domínio consiste de aproximadamente 67 aminoácidos (FIGURA 16). Assim, a lectina MeL e as isolectinas Sfl-1 e Sfl-2 são multivalentes na estrutura primária, uma exigência para todas as hemaglutininas monoméricas.

Figura 16 – Domínios em série das lectinas MeL, Sfl-1 e Sfl-2.



Fonte: Elaborado pela autora. Alinhamento de seqüências internas de MeL, (A), Sfl-1 (B) e Sfl-2 (C).

O grau de conservação de aminoácidos observado é alto e em algumas posições há identidade entre todos os quatro domínios. A MeL tem 40 % de identidade entre os domínios. Em Sfl-1 os domínios compartilham 53,7 % de identidade, enquanto em Sfl-2 a identidade entre os domínios foi de 44,7 %. As isoformas de Sfl-1 e Sfl-2 apresentam 82,4 % de identidade entre si e 78 e 76 % de identidade com a MeL, respectivamente.

As seqüências foram submetidas ao programa BLASTp para comparar e identificar outras proteínas similares e MeL, Sfl-1 e Sfl-2 apresentam alta identidade com outras lectinas de algas vermelhas da família OAAH. Um alinhamento das lectinas de algas desse grupo demonstrou regiões muito conservadas entre as seqüências (FIGURA 17).

Figura 17 – Alinhamento múltiplo de lectinas de algas da família OAAH.

	1	10	20	30	40	50	60
SfL-1	.GRY	TVQN	QWGGSSAPW	NDA	GLWL	LGSR	ANQNVMDVSV
SfL-2	.GRYS	VQNQ	WGGSSAPW	NDA	GVFL	GRAN	QNVMAIDVSS
KAA-1	MGRY	TVQN	QWGGSSAPW	NDA	GLWL	LGSR	ANQNVMAIDVNS
KAA-2	MGRY	TVQN	QWGGSSAPW	NDA	GLWL	LGSR	ANQNVMAIDVNS
KSA2	MGRY	TVQN	QWGGSSAPW	NDA	GLWL	LGSR	ANQNVMAIDVNS
ESA-2	.GRY	TVQN	QWGGSSAPW	NDA	GLWL	LGSR	ANQNVMAIDVNS
EDA2	MGRY	TVQN	QWGGSSAPW	NDA	GLWL	LGSR	ANQNVMAIDVNS
ASL-1	MGRY	TVQN	QWGGSSAPW	NDA	GLWL	LGSR	ANQNVMAIDVNS
ASL-2	MGRY	TVQN	QWGGSSAPW	NDA	GLWL	LGSR	ANQNVMAIDVNS
MPA-1	MGRY	TVQN	QWGGSSAPW	NDA	GLYL	LGSR	ANQNVVAIEVSS
MPA-2	MGRY	TVQN	QWGGSSAPW	NDA	GLYL	LGSR	ANQNVVAIEVSS
MEL	.GRY	TVQN	QWGGSSAPW	NDA	GLYL	LGSR	ANQNVVAIEVSS
consensus>50	mgRyT	VQNQ	WGGSSAPW	NDA	GLWL	LGSR	ANQNVma!dV.SsDGGanLtGTMTYSGEGPIGFKGARRG#

	70	80	90	100	110	120	130
SfL-1	SNVYD	VENQ	WGGSSAPW	HAGG	TFVIG	SRSG	CGVAVDVNS
SfL-2	SNVY	VENQ	WGGSSAPW	HAGG	TFVIG	SRSG	CGAVVAMNVTSS
KAA-1	SNVYD	VENQ	WGGSSAPW	HAGG	TFVIG	SRSG	CGVAVDVNS
KAA-2	SNVYD	VENQ	WGGSSAPW	HAGG	TFVIG	SRSG	CGVAVDVNS
KSA2	SNVYD	VENQ	WGGSSAPW	HAGG	TFVIG	SRSG	CGVAVDVNS
ESA-2	SNVYD	VENQ	WGGSSAPW	HAGG	TFVIG	SRSG	CGVAVDVNS
EDA2	SNVYD	VENQ	WGGSSAPW	HAGG	TFVIG	SRSG	CGVAVDVNS
ASL-1	SNVY	VENQ	WGGSSAPW	HAGG	TFVIG	SRSG	CGVAVDVNS
ASL-2	SNVY	VENQ	WGGSSAPW	HAGG	TFVIG	SRSG	CGVAVDVNS
MPA-1	SNVY	VENQ	WGGSSAPW	HAGG	TFVIG	SRSG	CGVAVDVNS
MPA-2	SNVY	VENQ	WGGSSAPW	HAGG	TFVIG	SRSG	CGVAVDVNS
MEL	SNVY	VENQ	WGGSSAPW	HAGG	TFVIG	SRSG	CGVAVDVNS
consensus>50	SnvY#	VeNQ	WGGSSAPW	HagG	TfVIG	SrSg	CgVvAln!tSsDgGXTLtGtMTYereGPiGFKGTQsgG

	140	150	160	170	180	190	200
SfL-1	DSYN	VENQ	WGGSSAPW	NKAG	IWAL	GRDR	NGQVIGV
SfL-2	DTYN	VENQ	WGGSSAPW	NKAG	IWAL	GRDR	NGQVIGV
KAA-1	DTYN	VENQ	WGGSSAPW	NKAG	IWAL	GRDR	NGQVIGV
KAA-2	DTYN	VENQ	WGGSSAPW	NKAG	IWAL	GRDR	NGQVIGV
KSA2	DTYN	VENQ	WGGSSAPW	NKAG	IWAL	GRDR	NGQVIGV
ESA-2	DTYN	VENQ	WGGSSAPW	NKAG	IWAL	GRDR	NGQVIGV
EDA2	DTYN	VENQ	WGGSSAPW	NKAG	IWAL	GRDR	NGQVIGV
ASL-1	DSYN	VENQ	WGGSSAPW	NKAG	IWAL	GRDR	NGQVIGV
ASL-2	DSYN	VENQ	WGGSSAPW	NKAG	IWAL	GRDR	NGQVIGV
MPA-1	DSYN	VENQ	WGGSSAPW	NKAG	IWAL	GRDR	NGQVIGV
MPA-2	DTYN	VENQ	WGGSSAPW	NKAG	IWAL	GRDR	NGQVIGV
MEL	DTYN	VENQ	WGGSSAPW	NKAG	IWAL	GRDR	NGQVIGV
consensus>50	DtYN	VENQ	WGGSSAPW	NkAg	IwAlG	DRng	QvIGV!tSsDgGXTLeGtMqYkEGPIGFRKlsgan

	210	220	230	240	250	260
SfL-1	NYK	VENQ	WGGSSAPW	NKAG	DWLI	GRDR
SfL-2	NYKA	ENQW	GGSSAPW	NKAG	DWLI	GRDR
KAA-1	NYSV	ENQW	GGSSAPW	NKAG	DWLI	GRDR
KAA-2	NYSV	ENQW	GGSSAPW	NKAG	DWLI	GRDR
KSA2	NYSV	ENQW	GGSSAPW	NKAG	DWLI	GRDR
ESA-2	NYSV	ENQW	GGSSAPW	NKAG	DWLI	GRDR
EDA2	NYSV	ENQW	GGSSAPW	NKAG	DWLI	GRDR
ASL-1	NYSV	ENQW	GGSSAPW	NKAG	DWLI	GRDR
ASL-2	NYSV	ENQW	GGSSAPW	NKAG	DWLI	GRDR
MPA-1	NYSV	ENQW	GGSSAPW	NKAG	DWLI	GRDR
MPA-2	NYSV	ENQW	GGSSAPW	NKAG	DWLI	GRDR
MEL	NYSV	ENQW	GGSSAPW	NKAG	DWLI	GRDR
consensus>50	Nyav	ENQW	GGSSapW	NkAG	DwLI	GRDR

Fonte: Elaborado pela autora. Alinhamento múltiplo pelo programa EsPrript 2.2. SfL-1 e SfL-2 – *Solieria filiformis* lectin; KAA-1 e KAA-2 – *Kappaphycus alvarezii* agglutinin; KSA-2 – *Kappaphycus striatus* agglutinin; ESA-2 – *Euclidean serra* agglutinin; EDA2 – *Euclidean denticulatum* agglutinin; ASL-1 e ASL-2 – *Agardhiella subulata* lectin; MPA-1 e MPA-2 – *Meristotheca papulosa* agglutinin e MEL – *Meristiella echinocarpa* lectin. Os aminoácidos sublinhado estão diretamente relacionados com a ligação a carboidrato (WHITLEY *et al.*, 2013).

A MeL apresentou identidade de 97 % com a MPA-2, 93 % com a MPA-1, 84 % com as ESA-2, ASL-1, KAA-2, KSA-2 e EDA-2 e 83 % com a ASL-2. A SfL-1 apresentou identidade de 84% com a ASL-2, 83% com as KAA-2, KSA-2 e ESA-2, 82% com as KAA-1, EDA-2 e ASL-1, 79% com a MPA-1 e 78% com a MPA-2. A SfL-2 apresentou identidade de 80% com a KSA-2 e ASL-1, 79% com as ESA-2, KAA-1, KAA-2 e ASL-2, 78% com as EDA_2 e MPA-2 e 76% com a MPA-1.

Também apresentaram identidade com lectinas de cianobactérias e bactérias. A MeL apresentou identidade de 63 % com lectina de cianobactéria OAA (*Oscillatoria agardhii* agglutinin; 30BL_A) e 61 %, 60 % e 58 % com as lectinas de bactérias PFL (*Pseudomonas fluorescens* agglutinin; WP_065258757.1), MBHA (*Myxococcus xanthus* - Myxobacterial hemagglutinin; WP_011556980.1) e BOA (*Burkholderia oklahomensis* agglutinin; 4GK9_A), respectivamente. A Sfl-1 apresentou identidade de 66 % com OAA e 67 %, 64 % e 63 % com as PFL, MBHA e BOA, respectivamente. A Sfl-2 apresentou identidade de 63 % com a OAA e 68 %, 61 % e 61 % com as PFL, MBHA e BOA, respectivamente.

Alguns autores sugerem que lectinas com domínios repetidos, com especificidade a *N*-glicanos ricos em manose e atividade antivirais podem ser agrupadas em uma família de lectinas chamada homólogas a OAA (OAAH), que foi a primeira lectina do grupo a ter a estrutura terciária resolvida (SATO *et al.*, 2012). Semelhantemente à OAA, as proteínas da família contêm uma sequência de repetição em média de 66 aminoácidos, mas com o número de repetições diferentes para diferentes membros da família.

A grande semelhança estrutural se dá a um grau significativo de identidade de aminoácidos ao longo das sequências dessas proteínas. Contudo, as lectinas com atividades antivirais de algumas cianobactérias, como a cyanovirin-N, a MVL, a scytovirin, a microvirin, e a griffithsin da alga vermelha *Griffithsia sp.*, que também possuem repetições em tandem dos domínios e ligação a *N*-glicanos ricos em manose, não mostraram homologia de sequência com OAA. Todas as lectinas OAAH são monoméricas, enquanto que outras lectinas antivirais, como as de plantas, podem consistir de duas ou quatro subunidades. Já foi visto que os aminoácidos envolvidos diretamente na ligação ao carboidrato são ¹⁵²WGG¹⁵⁴, a ²³⁶R e ²⁶⁴EGP²⁶⁶ e as lectinas MeL, Sfl-1 e Sfl-2 também apresentam esse sítio de ligação conservado conforme visto na Figura 17 (WHITLEY *et al.*, 2013).

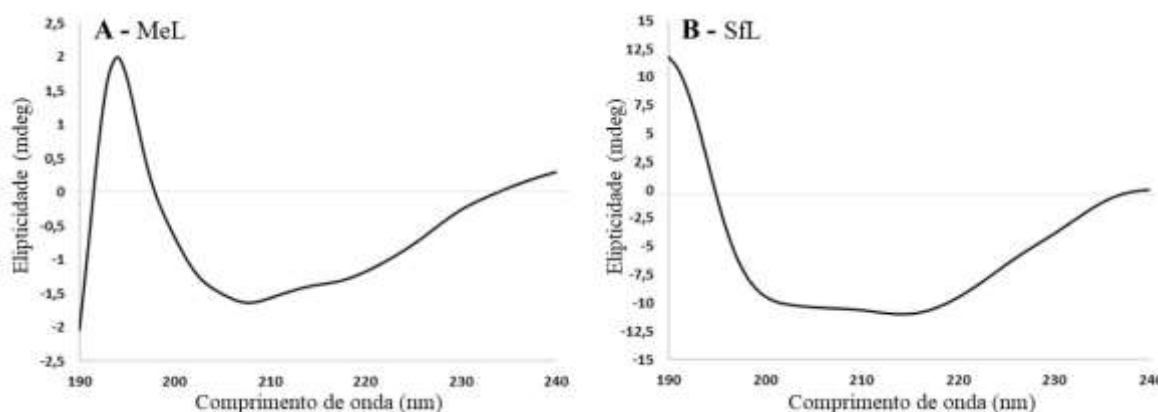
Com isso, podemos sugerir que a MeL, a Sfl-1 e a Sfl-2 também podem apresentar afinidade específica a *N*-glicanos ricos em manose como as lectinas OAAH, uma vez que já foi observado que essa lectinas tem a atividade hemaglutinante inibida por manana de levedura. Esta família de lectinas proporciona uma nova visão sobre a base molecular do reconhecimento de oligossacarídeos ricos em manose, assim como a função biológica e evolução molecular de lectinas (SATO *et al.*, 2007).

5.5 Análise da estrutura secundária das lectinas MeL e SfL

A técnica de dicroísmo circular é utilizada para obter informações sobre a estrutura secundária de proteínas, como os percentuais de α -hélice e β -folha. O perfil da curva espectral, bem como os máximos positivos e máximos negativos, fornecem informações sobre a proteína. Assim, proteínas com estruturas helicoidais tem espectros com picos, geralmente, em forma de “w”, em torno de 222 e 208 e proteínas com estruturas tipo β tem forma de “v” em torno de 217-220 nm (RANJBAR; GILL, 2009).

Os espectros de dicroísmo circular das proteínas MeL e SfL exibiram absorção máxima negativa em 207 nm e 214 nm e um máxima positiva em torno de 193 e 190 nm, respectivamente (FIGURA 18).

Figura 18 – Espectros de dicroísmo circular da MeL e SfL.



Fonte: Elaborado pela autora. Espectros de dicroísmo circular em UV distante (190-240 nm). A – MeL e B – SfL.

Um estudo mostrou a possibilidade de dois tipos de espectros de dicroísmo circular para proteínas com predominância de estruturas tipo β : proteínas- β_I e proteínas- β_{II} , onde os espectros do tipo - β_I são semelhantes aos de modelo β -folha, com um máximo positivo em 190 nm e máximo negativo em torno de 210 a 220 nm, e os tipo - β_{II} tem espectros aos de proteínas desdobradas, com um máximo negativo em 200 nm ou um pequeno pico positivo em 190 nm e alguns com positivo ou ombro negativo em torno de 220 nm (SREERAMA; WOODY, 2003).

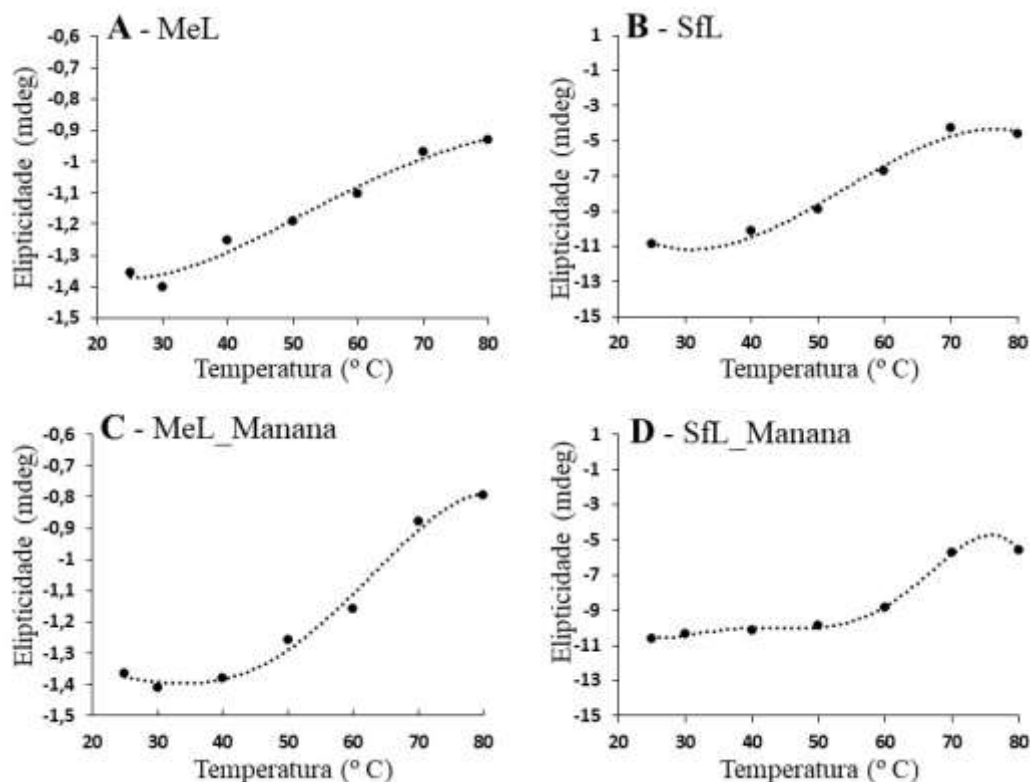
As lectinas apresentam um absorção com máximos negativos e positivos próximos aos de proteínas com predominância de estruturas β -folha e se assemelham aos espectros de proteínas- β_I . Outras lectinas de algas com estudos de dicroísmo circular mostraram o mesmo perfil de predominância de estruturas β -folha com espectros que assemelham aos de proteínas- β_I : a *Agardhiella* agglutinin com absorção máximo negativo em 212 nm e a AML em 215 nm (SHIOMI; KAMIYA; SHIMIZU, 1979; SILVA, 2016).

A BTL mostrou um máximo negativo a 197 nm e uma absorção mínima negativa adicional a 215 nm e foi considerada uma proteína com predominância de estruturas β -folha com espectros que assemelham aos de proteínas- β_{II} (FONTENELLE *et al.*, 2018).

A análise da estrutura secundária teórica por dicroísmo circular das proteínas mostrou uma composição de 3,0 % para α -hélice, 59 % de β -folha e 38 % de conformação desordenada para a MeL e 1,7% para α -hélice, 72,1% de β -folha e 25,4% de conformação desordenada para a SfL. Ambas as proteínas apresentaram composição baixa para α -hélice, predominância de β -folha e presença substancial de uma conformação desordenada na estrutura. Abreu *et al.*, em 2016, mostrou resultados semelhantes para a SfL, sendo composta por 9 % de α -hélice, 61 % de β -folha e 30% de conformação desordenada. Essa composição estrutural se assemelha a composição das estruturas tridimensionais resolvidas das lectinas da família OAAH (KOHARUDIN; FUREY; GRONENBORN, 2011; KOHARUDIN *et al.*, 2012; WHITLEY *et al.*, 2013).

A técnica também foi utilizada para acompanhar a estabilidade térmica sendo submetida a diferentes temperaturas e isso é possível devido aos espectros da proteínas enovelada e desnaturada serem diferentes (GREENFIELD, 2006). As proteínas apresentaram pouca resistência térmica e houve um aumento dessa estabilidade quando as lectinas foram complexadas com a manana de levedura. A MeL apresentou Tm de 54° C e 61° C e a SfL uma Tm de 53° C e 56° C, na ausência e presença de manana, respectivamente (FIGURA 19). Dados semelhantes para a SfL foram observados por Abreu (2016) com dicroísmo circular, que apresentou início de desnaturação por volta de 50° C e completa desnaturação aos 65° C.

Figura 19 – Espectros de dicroísmo circular em função da temperatura de MeL e SfL na presença e ausência de manana.



Fonte: Elaborado pela autora. Análise de Tm em dicroísmo circular (UV distante - 216 nm) com variações de temperatura das proteínas a $0,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A – MeL nas temperaturas 25°, 30°, 40°, 50°, 60°, 70° e 80° C; B – SfL nas temperaturas de 25°, 30°, 40°, 50°, 60°, 70° e 80° C; C e D – MeL e SfL previamente incubadas com manana por 1 hora, respectivamente.

Em 1995, Farias também avaliou a MeL quanto a termoestabilidade, por meio da perda da atividade hemaglutinante, após ser submetida a determinadas temperaturas, e mostrou que a lectina permanecia estável até 50° C e completa inatividade com 60° C. Benevides, Leite e Freitas (1996), também avaliaram a termoestabilidade da SfL e observaram a estabilidade térmica até 50° C com decréscimo de 75 % da atividade com 60° C e completa inatividade aos 90° C.

As lectinas de macroalgas da família OAAH apresentam moderada estabilidade térmica. As lectinas ESA, AML, KAA, KSA e EDA apresentaram início de desnaturação com temperaturas acima de 60° C, 40° C, 50° C, 60° C e 50° C, respectivamente (KAWAKUBO *et al.*, 1997; COSTA *et al.*, 1999; LE *et al.*, 2009; HUNG; SATO; HORI, 2011; HUNG *et al.*, 2014). Já a lectina OAA apresentou alta estabilidade térmica, permanecendo com 50 % da atividade aglutinante mesmo após 30 minutos a 100° C (SATO *et al.*, 2000). Lectinas de bactérias da família não tiveram estudos de termoestabilidade relatada na literatura.

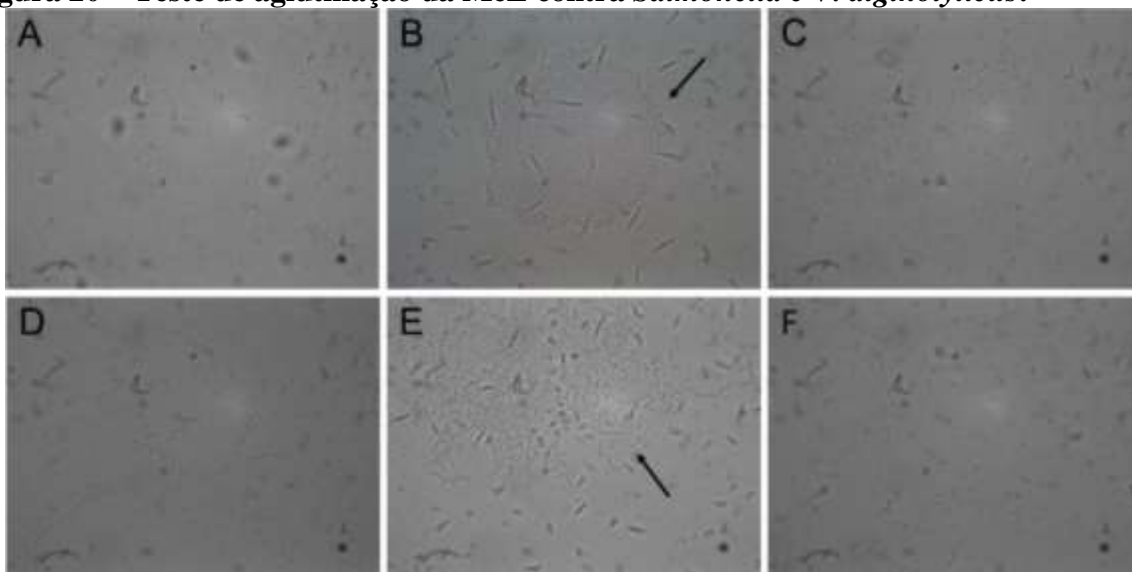
5.6 Atividade antibacteriana e aglutinação de bactérias das lectinas MeL e SfL

As lectinas MeL e SfL, em concentrações de até 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, não apresentaram atividade antibacteriana contra as cepas testadas. Em 2005, Holanda e colaboradores investigaram o efeito da SfL contra o crescimento bacteriano de várias cepas e mostraram o envolvimento do domínio de ligação a carboidratos na inibição do crescimento celular contra as cepas Gram-negativas *Serratia marcescens*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus sp* e *Pseudomonas aeruginosa*. O efeito bacteriostático foi observado em uma alta concentração da lectina, 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, reduzindo o crescimento bacteriano em torno de 25%, e perdendo o efeito quando incubada previamente com manana de levedura. Possivelmente as lectinas poderiam apresentar alguma atividade antibacteriana em concentrações superiores a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra as cepas de *Vibrio*.

Contudo, outras lectinas de algas da mesma família mostraram atividade antibacteriana contra cepas patogênicas do gênero *Vibrio*, como a ESA, EDA e KSA-2, com valores abaixo de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A ESA foi capaz de reduzir o crescimento celular de *V. vulnificus* na concentração de 102 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, mas não de *V. pelagius* e o *V. neresis*. A EDA reduziu o crescimento celular de *V. alginolyticus* a 60,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, mas não de *V. parahaemolyticus* e o *V. hareyi*, e a atividade contra *V. alginolyticus* foi inibida por manana de levedura. A KSA-2 foi capaz de reduzir o crescimento celular de uma cepa patogênica humana, *Enterobacter cloacae*, na concentração de 101,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e a cepa *V. alginolyticus* a 25,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, mas não inibiu as cepas *S. aureus*, *E. coli*, *V. parahaemolyticus* e *V. harveyi* (LIAO *et al.*, 2003; HUNG *et al.*, 2014; HUNG *et al.*, 2015b).

Os ensaios de aglutinação bacteriana mostraram que a MeL foi capaz de reconhecer a membrana da bactéria e aglutinar células da cepa *Salmonella* multirresistente e da cepa *V. alginolyticus* a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (FIGURA 20), mas não foi capaz de aglutinar as cepas *E. coli*, *S. aureus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* e *V. cholera*.

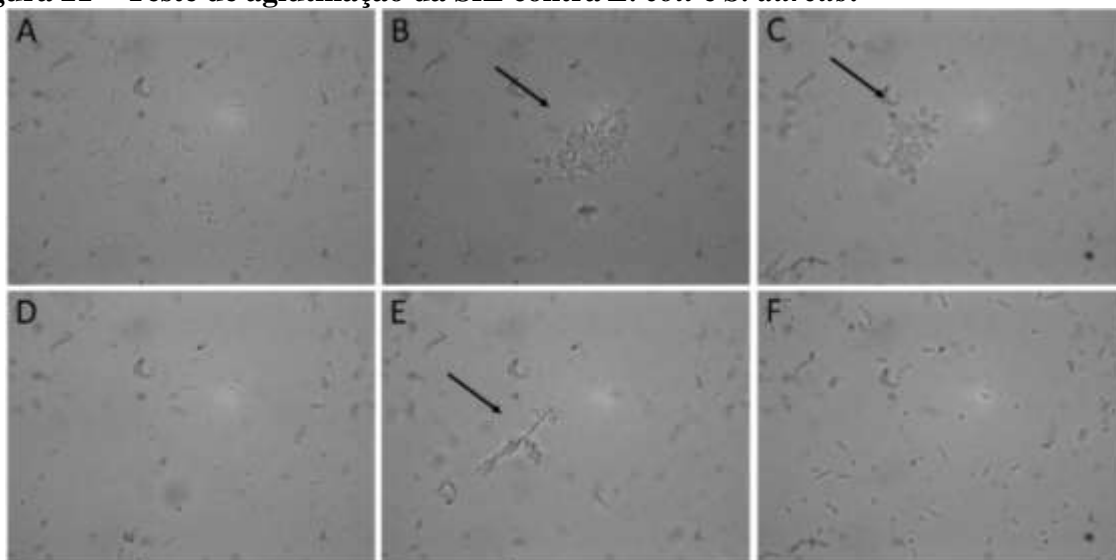
Figura 20 – Teste de aglutinação da MeL contra *Salmonella* e *V. alginolyticus*.



Fonte: Elaborado pela autora. A – Cepa *Salmonella* em solução de NaCl 0,85%; B – *Salmonella* com MeL; C – *Salmonella* com MeL complexada com manana; D – Cepa *V. alginolyticus* em solução de NaCl 1.0%; E – *V. alginolyticus* com SfL e F – *V. alginolyticus* com SfL complexada com manana.

Já a SfL foi capaz de aglutinar a cepa *E. coli* a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e uma fraca aglutinação foi observada para a cepa *S. aureus* (FIGURA 21). Já as cepas *Salmonella* multirresistente, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* e *V. cholera* não foram reconhecidas e aglutinadas pela SfL.

Figura 21 – Teste de aglutinação da SfL contra *E. coli* e *S. aureus*.



Fonte: Elaborado pela autora. A – Cepa de *E. coli* em solução de NaCl 0,85%; B – *E. coli* com SfL; C – *E. coli* com SfL complexada com manana; D – Cepa de *S. aureus* em solução de NaCl 0,85%; E – *S. aureus* com SfL e F – *S. aureus* com SfL complexada com manana.

A inibição da capacidade aglutinante de MeL contra as cepas *Salmonella* e *V. alginolyticus* e de SfL contra cepa padrão *S. aureus*, quando incubadas previamente com manana de levedura, mostra o envolvimento dos domínios de ligação a carboidratos no reconhecimento e aglutinação das células bacterianas, sugerindo a presença de oligomanosídeos ou estruturas semelhantes na superfície bacteriana das cepas, atuando como receptores para lectinas. Hung e colaboradores (2015a) também sugeriram a presença de oligomanosídeos na superfície bacteriana do *V. alginolyticus*, após a lectina EDA-2 perder sua habilidade de reduzir o crescimento bacteriano quando incubada previamente com a manana de levedura.

Já a aglutinação da cepa padrão *E. coli* com a SfL mostra a capacidade da lectina de reconhecer a membrana da bactéria e aglutinar mesmo quando incubada previamente com manana de levedura, sugerindo que membrana das células bacterianas possuem complexos de carboidratos mais específicos para a lectina do que a manana de levedura ou que a aglutinação acontece por outras interações entre a lectina e a membrana bacteriana.

Mesmo pertencendo a mesma família de lectinas o resultado do ensaio de aglutinações da MeL e SfL foram diferentes e pode ser devido a pequenas diferenças estruturais da superfície celular das cepas, como o antígeno O dos lipopolissacarídeos, que pode ser muito variável na sua composição entre diferentes famílias, espécies e mesmo dentro das mesmas espécies de bactérias gram-negativas, e as variações de ácidos teicóicos e peptidoglicanos nas bactérias gram-positivas (PÍREZ; MOTA, 2000). Além disso, foi observado em um estudo de especificidade de ligação uma certa diferença na afinidade de carboidratos entre os sítios de ligação da PFA e da MBHA e os autores sugeriram ser devido a pequenas variações nas sequências de aminoácidos entre os domínios (KOHARUDIN *et al.*, 2012). Assim, é possível que as pequenas diferenças nos aminoácidos, que estão envolvidos indiretamente na ligação das lectinas, possam influenciar no reconhecimento e ligação aos possíveis receptores bacterianos.

Outras lectinas de algas também apresentaram capacidade aglutinante contra bactérias, como a GPE e BHL. A GPE, além de ser capaz de inibir o crescimento bacteriano a uma concentração de 35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentou efeitos aglutinantes na concentração de 100 a 2.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra a cepa *V. parahaemolyticus* (BOONSRI *et al.*, 2017). A lectina BHL na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi capaz de aglutinar a cepa de *E. coli* JM 109 (NIU *et al.*, 2009).

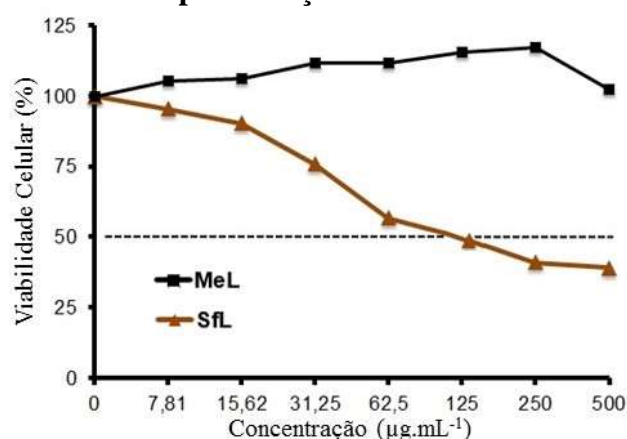
A aglutinação bacteriana exibida pelas lectinas reside no reconhecimento e interação com o polissacarídeo ou lipopolissacarídeo na superfície da célula bacteriana, e essa habilidade pode ser usada para identificar e distinguir microrganismos de acordo com os diferentes compostos expostos na superfície celular. Assim, as lectinas podem ser um método alternativo para identificar microrganismos com instalações mínimas especializadas.

Em particular, o ensaio de aglutinação é um ensaio rápido, barato, reprodutível de simples execução e um método útil para estudos epidemiológicos e biodeteção de bactérias (OTTENSOOSER *et al.* 1974; SCHAEFER; KELLER; DOYLE, 1979; DAVIDSON; KELLER; DOYLE, 1982; KHIN *et al.*, 2000; TEMPLIER *et al.*, 2016).

5.7 Atividade antineoplásica das lectinas MeL e SfL

Ensaio antineoplásico preliminar foi realizado com as lectinas MeL e SfL para avaliar seus efeitos na viabilidade celular de MCF-7. Nas concentrações testadas apenas a SfL foi capaz de reduzir em 50 % a viabilidade celular, enquanto a MeL induziu a proliferação celular em relação ao controle (FIGURA 22).

Figura 22 – Efeito das lectinas na proliferação e viabilidade celular de MCF-7.

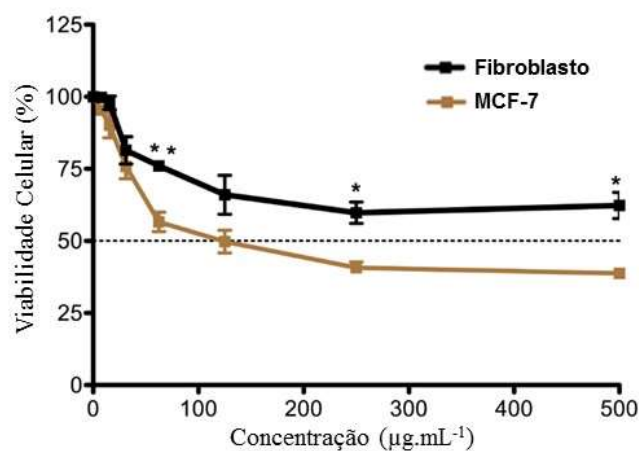


Fonte: Elaborado pela autora. As células viáveis (%) foram mensuradas por ensaio de MTS em 24 horas (n= 3, Média ± EPM).

A MeL induziu de 5,45 até 17,13 % da proliferação celular da MCF-7 em relação ao controle de forma dose-dependente, nas concentrações de 7,81 a 250 µg.mL⁻¹, mas não foi observado efeito na concentração de 500 µg.mL⁻¹. Já a SfL mostrou ser capaz de reduzir 50 % da viabilidade celular em doses acima de 62,6 µg.mL⁻¹.

Novos ensaios foram realizados com SfL para avaliar seus efeitos contra MCF-7 e HDF. A SfL promoveu perdas significativas de viabilidade celular da MCF-7 em 43,40 %, 50,23 %, 58,27 % e 61,20 % nas doses de 62,5, 125, 250 e 500 µg.mL⁻¹, respectivamente (* P <0,05) e, assim, estabeleceu-se a concentração que promoveu 50 % de inibição da viabilidade celular tumoral (IC₅₀), revelando que o tratamento com 125 µg.mL⁻¹ resultou em 50% de inibição da viabilidade do MCF-7. Já com as células HDF os tratamentos não foram capazes de reduzir mais de 50 % da população celular, como pode ser observado na Figura 23.

Figura 23 – Efeito da SfL na proliferação e viabilidade celular de MCF-7 e HDF.



Fonte: Elaborado pela autora. As células viáveis (%) foram mensuradas por ensaio de MTS em 24 horas (n= 3, Média ± EPM) (*P< 0.05 and ** P< 0.01).

A viabilidade das células HDF tratadas com SfL a 125 e 250 µg.mL⁻¹ foi reduzida em 34 % e 40,2 %, respectivamente. E em 500 µg.mL⁻¹, observou-se discreto aumento na população de fibroblastos, sugerindo que a lectina pode estimular a citoproliferação em doses maiores. Assim, o baixo efeito de SfL em células não malignas indica uma maior seletividade de SfL para células MCF-7. Este é um ponto muito importante, uma vez que muitas drogas anticâncer geralmente não diferenciam entre células normais e malignas (FERREIRA *et al.*, 2013). Os dados corroboram com resultados previamente relatados para lectinas similares, que mostram atividades contra outras linhagens de células cancerígenas (SUGAHARA *et al.*, 2001; SATO *et al.*, 2012; SILVA, 2016).

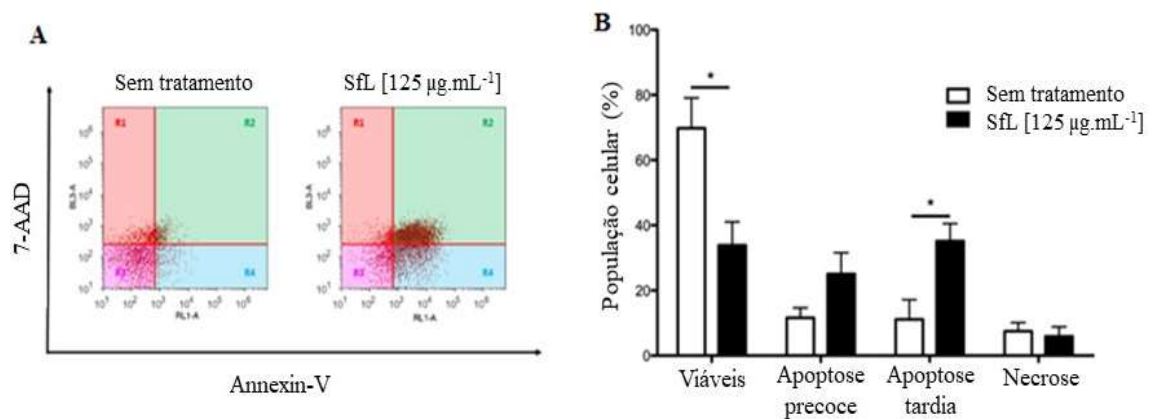
Sugahara e colaboradores (2001) verificaram que o ESA induz a morte celular contra células Colo201 (Adenocarcinoma colorretal) e HeLa (carcinoma epitelóide do colo do útero humano) em concentrações acima de 1,2 µg.mL⁻¹. No entanto, as células MCF-7 mostraram tolerância relativamente alta ao ESA. A morte de células Colo201 foi investigada por detecção da degradação do DNA em células apoptóticas e atividade de caspase-3, indicando que o ESA foi capaz de induzir apoptose nas células após 3 dias.

Sato e colaboradores (2012) verificaram que PFL apresentou um efeito significativo na redução da viabilidade das células de MKN28 (adenocarcinoma gástrico humano) pós-tratamento de 0,5 µM (cerca de 6,94 µg.mL⁻¹) ou mais elevada por 72 h, a qual foi acompanhada por a perda de adesão celular, desencadeando uma via de sinalização que induziu a morte celular semelhante ao *anoikis*. Além disso, o tratamento com baixas doses (0,1 a 0,3 µM) estimulou a proliferação de células MKN28.

Silva (2016) mostrou efeitos da AML contra células LS174T (Adenocarcinoma do cólon humano) em concentrações acima de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, onde foi observado a redução de 50 % da viabilidade celular.

Para abordar a questão do potencial pró-apoptótico de SfL sobre células MCF-7 ensaios quantitativos de PCR foram realizados para verificar se o mecanismo subjacente à morte celular induzida por SfL ocorre por vias intrínseca ou extrínseca. Assim, as células MCF-7 foram duplamente coradas com anexina V-APC/7AAD e 24 horas após o tratamento com SfL a $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (FIGURA 24).

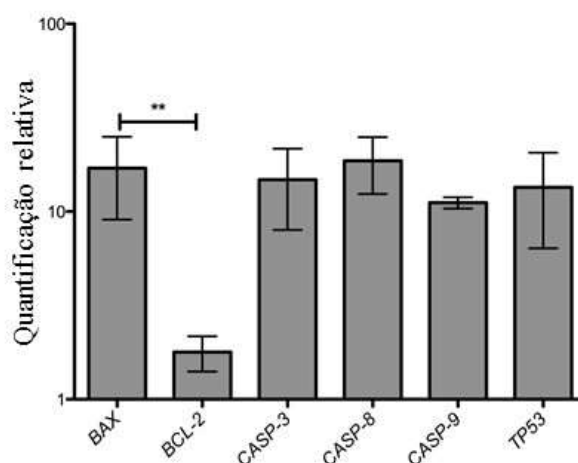
Figura 24 – Efeitos apoptóticos induzidos por SfL em células MCF-7.



Fonte: Elaborado pela autora. A – Dot blots mostram estágios de apoptose/necrose: R1 (Necrose), R2 (Apoptose tardia), R3 (Células viáveis) e R4 (Apoptóticas) e B – Estágios de apoptose/necrose em valores de % (n=4, Média ± EPM) (*P< 0.05).

Os resultados mostraram que 33,87 % das células permaneceram viáveis, enquanto que a SfL induziu a morte de 60,23 % da população celular, com aproximadamente 25,07 % na apoptose precoce e 35,16 % na apoptose tardia. A expressão relativa de CASP 3, CASP 8, CASP 9, BCL-2, BAX e TP53 foi avaliada por PCR em tempo real. Células MCF-7 24 h após o tratamento com SfL foram comparadas com células não tratadas. Como pode ser observado na Figura 25, após 24 horas, o gene anti-apoptótico Bcl-2 foi reprimido, enquanto que o gene pró-apoptótico Bax sofreu superexpressão.

Figura 25 – Efeitos da SfL na expressão de mRNA de genes pró-apoptóticos.



Fonte: Elaborado pela autora. Análise do nível de mRNA em relação às células não tratadas foi determinada por PCR em tempo real, usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (** P < 0,01). O RNA mensageiro foi extraído e usado na síntese de cDNA para as análises em qRT-PCR.

A expressão de CASP 3, -8 e -9, que estão envolvidas nas vias de apoptose intrínseca e extrínseca, também foram superexpressas em 24 horas de tratamento. Estes resultados indicam que a SfL induziu apoptose dependente de caspases, onde as caspases-8 e -9 foram fortemente ativadas. Esses dados corroboram com o relato de que as lectinas, que se ligam especificamente às porções de carboidratos *N*-glicano nas células cancerígenas, podem atuar como potenciais agentes terapêuticos via indução de apoptose (CHEUNG *et al.*, 2015). Os estudos de Sugahara e colaboradores (2001) e Sato e colaboradores (2012) mostraram o envolvimento de glicanos com alto teor de manose na interação entre lectina e células tumorais. A viabilidade celular induzida por lectina ESA foi inibida após o tratamento de células Colo201 com α -manosidase, β -manosidase e endoglicosidase H. Da mesma forma, o efeito de PFL em células MKN28 foi inibida na presença de manana de levedura.

Assim, o tratamento com ambas as lectinas não mostrou nenhum efeito sobre a viabilidade celular após a remoção das porções de carboidratos das células tumorais ou na presença de ligantes específicos de carboidratos (SUGAHARA *et al.*, 2001; SATO *et al.*, 2012). Portanto, o fato de que SfL também ser capaz de se ligar especificamente a oligossacarídeos ricos em manose presentes nas células MCF-7 sugere fortemente que pode potencialmente exercer atividade antitumoral. No entanto, para obter uma melhor compreensão desse potencial, precisamos realizar estudos independentes de cada isoforma.

6. EXPRESSÃO RECOMBINANTE E CARACTERIZAÇÃO DA ISOFORMA SfL-1 DA ALGA VERMELHA *Solieria filiformis*

6.1 Expressão heteróloga das lectinas da família OAAH

A produção de proteínas recombinantes das lectinas da família OAAH foram realizados em sistemas pET (sistema Operon Lac) com cepas de expressão de *E. coli* e todas foram expressas na forma solúvel e ativa. Todas as lectinas de bactérias da família foram expressas de forma recombinante, enquanto apenas duas lectinas de algas, uma de cianobactéria e outra de alga vermelha, foram produzidas na forma recombinante (QUADRO 03).

Quadro 03 – Lectinas da família OAAH produzidas de forma recombinante.

Lectina	Espécie	Metodologia	Classificação	Referências
OAA	<i>Oscillatoria agardhii</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)::pET28a IPTG 0,5 mM a 37° C	Cianobactéria	SATO; HORI, 2009
PFL*	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>E. coli</i> BL21 Star (DE3)::pET101 IPTG 0,8 mM a 37° C	Bactéria	SATO <i>et al.</i> , 2012
PFA*	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3)::pET26b IPTG 1,0 mM a 16° C	Bactéria	KOHARUDIN <i>et al.</i> , 2012
MBHA	<i>Myxococcus xanthus</i>	<i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3)::pET26b IPTG 1,0 mM a 16° C	Bactéria	KOHARUDIN <i>et al.</i> , 2012
BOA	<i>Burkholderia oklahomensis</i>	<i>E. coli</i> BL21 Star (DE3)::pET15b IPTG 1,0 mM a 18° C	Bactéria	WHITLEY <i>et al.</i> , 2013
PML	<i>Pseudomonas mandelii</i>	<i>E. coli</i> BL21 Star (DE3)::pET101 IPTG 0,8 mM a 37° C	Bactéria	MORIMOTO; SATO, 2016
PTL	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	<i>E. coli</i> BL21 Star (DE3)::pET101 IPTG 0,8 mM a 37° C	Bactéria	MORIMOTO; SATO, 2016
KAA-1	<i>Kappaphycus alvarezii</i>	<i>E. coli</i> SHuffle T7 Express::pET28a IPTG 0,1 mM a 20° C	Alga vermelha	HIRAYAMA <i>et al.</i> , 2016

Fonte: Elaborada pela autora. *A lectina PFA é a mesma lectina PFL, mas foram publicadas por diferentes autores no mesmo ano.

A OAA foi produzida de forma recombinante para estudos de ligação a carboidratos pelo método de ultracentrifugação-HPLC (Cromatografia Líquida de alta performance) e os resultados mostraram que a rOAA teve especificidade a *N*-glicanos ricos em manose, com preferência a oligosmanosídeos contendo uma manose (α 1-3) exposta do braço (α 1-6) do núcleo trimanosídeo e dois resíduos de GlcNAc (*N*-acetilglicosamina) terminal redutor, apresentando alta afinidade a $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (SATO; HORI, 2009).

A rPFL foi utilizada em ensaios de antiinfluenza e antineoplásicas e estudo de ligação a carboidrato pelo método Glycan array. Os dados mostram uma atividade contra as cepas de influenza A/Udorn/73 (H3N2) e A/Beijing/262/95 (H1N1) e contra a linhagem celular MKN28 de câncer gástrico e uma especificidade de ligação para $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ e $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ contendo a manose (α 1-3) exposta do braço (α 1-6) do núcleo trimanosídeo (SATO *et al.*, 2012).

As lectinas recombinantes rPFA e rMBHA foram cristalizadas para determinação de estrutura, avaliadas em relação a atividade anti-HIV e estudos de ligação a carboidrato foram realizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (espectroscopia RMN). Os resultados mostram que rPFL apresentam uma estrutura tipo β -barril como a OAA e a MBHA apresentou um β -barril a cada duas sequências de repetição. Ambas as proteínas apresentaram forte ligação ao α 3, α 6 manopentose do $\text{Man}_{8/9}\text{GlcNAc}_2$ e apresentaram atividade anti-HIV contra a cepa HIV-1 (R9) a níveis nanomolares (KOHARUDIN *et al.*, 2012).

Com a rBOA foi realizado ensaios para determinação da estrutura, atividade anti-HIV e estudos de ligação a carboidratos espectroscopia RMN. Os resultados mostrarm que a rBOA possui estrutura com β -barril duplo que também foi observado para a MBHA, apresentou atividade contra a cepa HIV-1 (R9) a níveis nanomolares e possui especificidade de ligação ao α 3, α 6 manopentose do $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (WHITLEY *et al.*, 2013).

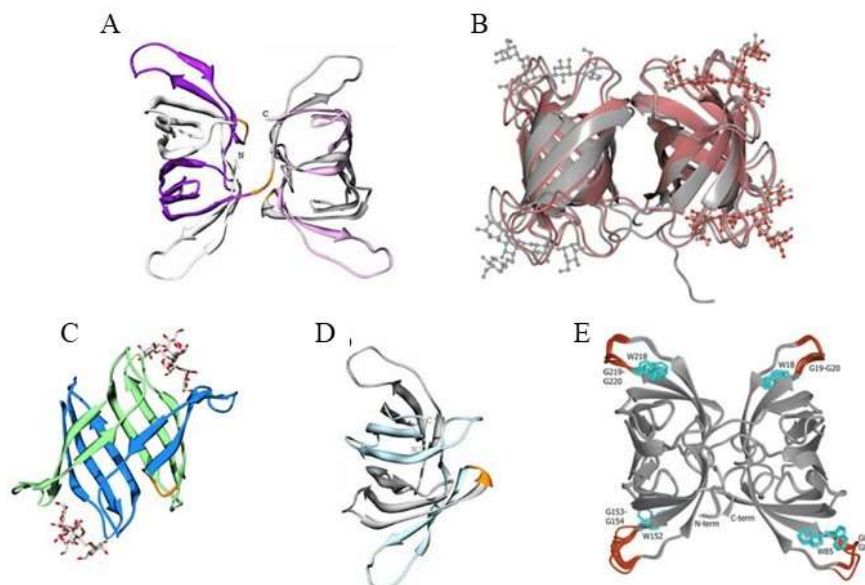
As recombinantes PML e PTL foram avaliadas em relação a atividade antiinfluenza e apresentaram efeitos contra várias cepas de influenza A/H1N1 e A/H3N2 (MORIMOTO; SATO, 2016). E estudos de ligação ao carboidratos pelo método de ultracentrifugação-HPLC foi realizado com a rKAA-1, que foi específica a $\text{Man}_{5/6/7/8}\text{GlcNAc}_2$ contendo a manose (α 1-3) exposta do braço (α 1-6) do núcleo trimanosídeo, como as demais membros da família (HIRAYAMA *et al.*, 2016).

Curiosamente, as construções de OAA, KAA-1 e BOA continham a cauda de histidina na porção N-terminal da proteína e foram purificadas com um único passo cromatográfico em coluna de níquel imobilizado, enquanto que as lectinas das PFA/PFL, PML, PTL e MBHA tinham em sua construção a cauda de histidina na porção C-terminal e não foram purificadas em coluna de níquel imobilizado (SATO; HORI, 2009; KOHARUDIN *et al.*, 2012; WHITLEY *et al.*, 2013; MORIMOTO; SATO, 2016; HIRAYAMA *et al.*, 2016). As lectinas das *Pseudomonas* foram purificadas por exclusão molecular (Superose 12 column) e a MBHA com três etapas de purificação: troca iônica (SP(HP) column), exclusão molecular (Superdex 75 column) e novamente troca iônica (SP(HP) column).

6.1 Estrutura tridimensional das lectinas da família OAAH

A família OAAH é um grupo de lectinas caracterizadas por apresentar uma grande semelhança estrutural. As lectinas OAA (KOHARUDIN; FUREY; GRONENBORN, 2011), PFL (KOHARUDIN *et al.*, 2012), MBHA (KOHARUDIN *et al.*, 2012) e BOA (WHITLEY *et al.*, 2013) apresentam estrutura tridimensional determinada (FIGURA 26).

Figura 26 – Estruturas tridimensionais de membros da família OAAH.



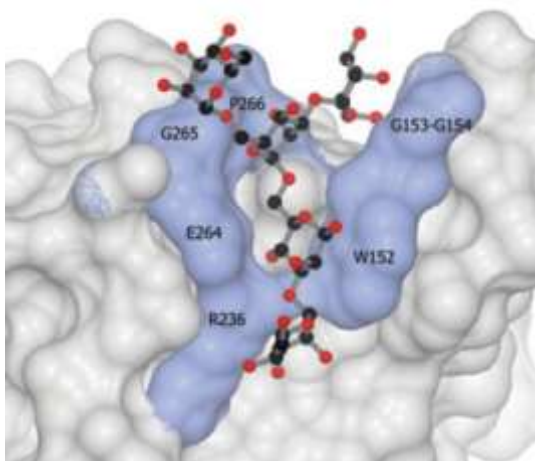
Fonte: KOHARUDIN; FUREY; GRONENBORN, 2011; KOHARUDIN *et al.*, 2012; WHITLEY *et al.*, 2013. (A) MBHA, (B) BOA com os CRDs ocupados, (C) OAA com os CRDs ocupados, (D) PFL, (E) BOA com os aminoácidos dos CRDs destacados.

A PFL e a OAA possuem dois CRDs, e uma estrutura tridimensional com uma única e compacta estrutura tipo β -barril, enquanto que a MBHA e a BOA, que apresentam quatro CRDs, possuem um β -barril a cada duas sequências de repetição, resultando em um arranjo paralelo de dois β -barris.

A estrutura β -barril é estabilizada através de numerosas interações de cadeias laterais alifáticas no interior do cano, e assim contribuindo para um núcleo hidrofóbico da proteína (KOHARUDIN; FUREY; GRONENBORN, 2011). A especificidade estrita das lectinas OAAH para oligossacarídeos ricos em manose pode ser estabelecida através de um sítio de ligação hidrofílico. Os resíduos de aminoácidos diretamente envolvidos na ligação do carboidrato são altamente conservados, e estes resíduos fazem parte de um sítio hidrofílico (SATO *et al.*, 2007).

A caracterização do sítio de ligação a carboidratos da família OAAH foi feita por WHITLEY *et al.* (2013) pelo estudo estrutural do quarto CRD da lectina BOA, que apresentou o CRD ocupado pelo oligossacarídeo. Os autores demonstraram quais aminoácidos estariam envolvidos na ligação ao carboidrato no sítio 4 da BOA: ¹⁵²WGG¹⁵⁴, a ²³⁶R e ²⁶⁴EGP²⁶⁶ (FIGURA 27). Estes aminoácidos são altamente conservados entre os domínios e entre as estruturas das lectinas OAAH.

Figura 27 – Sítio de ligação a carboidratos da família OAAH.



Fonte: WHITLEY *et al.*, 2013. Sítio CRD da lectina BOA ligado ao α 3, α 6-manopentose.

7 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

7.1 Desenho do gene sintético para a isoforma SfL-1

A sequência final obtida, junto com os resultados da degradação de Edman e dos dados de MS/MS foi utilizada para desenho do gene sintético da isoforma SfL-1. O gene sintético foi adquirido pela empresa FastBio (<http://www.fastbio.com.br/>, SP, Brasil) já no vetor de expressão pET28a(+) (FIGURA 28) flanqueadas pelas enzimas de restrição NcoI e XhoI e contendo sítio para a protease TEV.

Figura 28 – SfL-1 recombinante.

```

1  MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MENLYFQGRY TVQNQWGGSS APWNDAGLWL
51  LGSRANQNMV DVSVTSSDGG ATLTGTMTYS GEGPIGFKGT RRGDSNNYDV
101 ENQWGGSSAP WHAGGTFVIG SRSGQGVVAV DVNSSDGGKT LTGTMTYANE
151 GPIGFKGTQS GGDSYNVENQ WGGSSAPWNK AGAWALGDRD GQGVIGVDVT
201 SSDGGKTLTG TMQYQNEGPI GFKGTSTGGS NYKVENQWGG SSAPWNPAGN
251 WLIGDRHNQN IVAVKVTSSD NGKTLGGTCT YEREGPIGFK GTAI

```

Fonte: Elaborado pela autora. SfL-1 recombinante com tag de expressão sublinhado. O sítio ENLYFQ para a proteinase TEV foi adicionado junto ao gene sintético no vetor pET28a(+).

7.2 Expressão e purificação da proteína recombinante rSfL-1

O gene sintético foi diluído para a concentração de 50 ng.μL⁻¹ e inserida na cepa de clonagem *Escherichia coli* DH5a e de expressão *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, Germany) por transformação de choque térmico, conforme item 4.5.5.

7.2.1 Expressão da rSfL-1

Para a expressão, clones de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com pET28a:rSfL-1 foram inoculadas 1:100 em 170 mL de meio LB caldo em erlenmeyer de 0,5 L contendo 50μg.mL⁻¹ de canamicina e crescimento a 37° C por 16 horas sob agitação constante. Testes de expressão foram feitas em relação a concentração de isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (0,05 mM; 0,1 mM; 0,5 mM e 1,0 mM), variação de temperaturas (37° por 4 h, 30° por 16h, 25° por 20h e 18° C por 24 horas) e melhor clone. Alíquotas de células foram coletadas para análise da expressão da proteína recombinante em SDS-PAGE.

Após a escolha do melhor método para a expressão foi preparado um pré-inoculo em 5 mL de LB caldo contendo canamicina a 37° C por 16 horas sob agitação constante e utilizado em um inoculo de 500 mL de LB caldo contendo canamicina. As células foram crescidas a 37 C até uma absorbância de 0,5 a 0,6 em 600 nm e a indução foi realizada para a expressão da proteína recombinante na melhor condição.

7.2.2 Purificação da rSfL-1

A purificação da proteína recombinante foi realizada através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel imobilizado (HisTrap FF Crude 5ml – GE Healthcare) previamente equilibrada com o tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 com 150 mM de NaCl e 10 % de glicerol (TBS) contendo 20 mM imidazol e a eluição foi realizada com o tampão TBS contendo 150 mM de imidazol. O SDS-PAGE a 12 % da purificação da rSfL-1 foi realizado de acordo com item 4.2.1. A proteína recombinante purificada com a cauda de fusão foi dialisada contra água destilada, liofilizada e guardada em temperatura ambiente até sua utilização.

7.2.3 Cromatografia de exclusão molecular da rSfL-1 e SfL nativa

A fração eluída da cromatografia HisTrap foi submetida a uma cromatografia de exclusão molecular, para avaliar a homogeneização da proteína, na coluna BioSuite 250 SEC (0,78 x 30cm, 5 µm; Waters Cop.) acoplada ao sistema Acquity UPLC (Waters Cop.) de acordo com o item 4.2.2. Um gel SDS PAGE a 12% foi realizado para avaliar as frações obtidas.

7.2.4 Atividade hemaglutinante da rSfL-1 e sua inibição

Os eritrócitos de coelho utilizados para o ensaio da atividade hemaglutinante e sua inibição por manana de levedura foram preparadas de acordo com o item 4.2.1

7.3 Dicroísmo Circular

A determinação da composição de estrutura secundária de rSfL-1 na concentração de 0,4 mg.mL⁻¹ em tampão fosfato 60 mM pH 7,0 e o processo de desnaturação foram realizadas de acordo com o item 4.6 de 25° C até 55° C.

7.4 Cristalografia por Difração em Raio-X: Obtenção da Estrutura terciária

7.4.1 *Cristalização: obtenção dos cristais de proteína*

A proteína purificada em coluna de HisTRap foi dialisada e concentrada por ultrafiltração em Vivaspin20 (10.000 MW CO; Sartorius, DE) com tampão Tris-HCl pH 8,0 contendo 10% de glicerol até a concentração aproximada de 7 mg.mL⁻¹. Para esta etapa foi utilizado os Crystal Screen e Screen 2 do kit PCT™ Pre-Crystallization Test (Hampton Research, CA, EUA) e o JBScreen Wizard (Jena Bioscience, GER). A condição de formação do cristal da proteína foi obtida através do método da matriz esparsa inicialmente descrito por JANCARIK & KIM (1991). O método de cristalização utilizado foi o de difusão de vapor com gota suspensa, utilizando placas de cristalização com 24 poços. Em cada poço da placa de cristalização foram colocados 500µL da condição do poço e a gota com 2 µL da solução de proteína e 2 µL da condição do poço. O poço foi então coberto por lamínulas siliconadas utilizando graxa de silicone para vedação e deixadas em repouso a temperatura de 22° C. As placas montadas foram semanalmente monitoradas em uma lupa estereoscópica.

7.4.2 *Difração de Raios X*

Os cristais foram levados ao Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS), em Campinas-SP para a difração de raios X e foram mergulhados em uma solução crioprotetora composta da solução de cristalização adicionada de 25 % de glicerol. Os dados foram coletados nas linhas de luz MX2 no LNLS (Campinas -SP) em uma temperatura de 100 K e 1.800 imagens foram obtidas, integrados com XDS (KABSCH, 2010) e escalonados usando o SCALA do compilado de softwares CCP4 (EVANS; MURSHUDOV, 2013). O ângulo de oscilação foi de 0,2° para cada imagem.

7.4.3 *Resolução da Estrutura*

A determinação da estrutura foi feita por substituição molecular usando como modelo a estrutura da lectina BOA (4GU8, PDB). Para determinação das fases iniciais foi utilizado o programa MOLREP (VARGIN & TEPLYAKOV, 1997). O modelo inicial foi submetido a refinamentos de corpo rígido, de restrição e posicional através do programa Phenix Refine, onde foram monitorados usando os valores do R_{fator} e R_{free} (AFONINE *et al.*, 2012).

As análises estéreo-químicas, dos ângulos de ligação, distâncias interatômicas e interações foram checadas manualmente com ajuda do gráfico de Ramachandran e a análise final realizada através do programa Prochek (LASKOWSKI *et al.*, 1993). Alinhamentos estruturais e figuras foram elaboradas utilizando o programa PyMOL Molecular Graphics System (DELANO, 2002). As interações de Van der Waals, hidrofóbicas e pontes de hidrogênio foram analisadas utilizando o programa CONTACT do pacote CCP4 e o programa PyMOL com distâncias até 4,0 Å, 4,0 Å e 3,5 Å, respectivamente.

7.5 Atividade antimicrobiana e aglutinação de bactérias

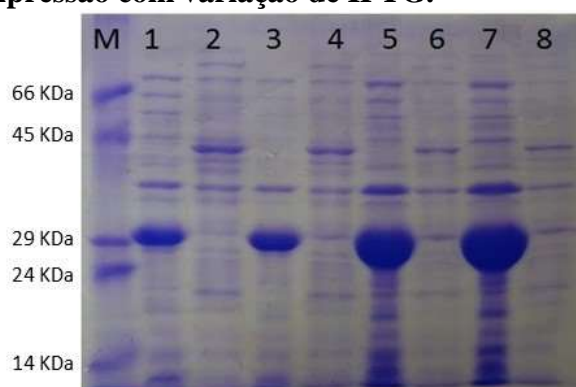
A atividade antibacteriana e a capacidade de aglutinar bactérias da rSfL foi avaliada com as cepas padrões *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, a *Salmonella* ser. Brandeirup Lamap 18 multirresistente (tetraciclina, oxitetraciclina, nitrofurantoína e ampicilina) e cepas do gênero *Vibrio*: *V. cholerae* IOC 19582, *V. parahaemolyticus* IOC 18950, *V. harveyi* ATCC 14126 e *V. alginolyticus* ATCC 17749 de acordo com o item 4.7.

8 RESULTADO E DISCUSSÃO

8.1 Produção de proteína recombinante rSfL-1

A região codificadora da isoforma SfL-1 foi sintetizada no vetor pET28a, utilizada para a transformação em células *E. coli* DH5 α e estocadas em glicerol 20 % no freezer para uma eventual recuperação do DNA plasmidial caso necessário. Para a expressão e purificação da lectina recombinante com cauda de histidina, o gene sintético foi transformado em células de *E. coli* BL21 (DE3). Testes de expressão foram realizados para se ter o melhor rendimento da rSfL-1 na forma solúvel, como a variação de IPTG, temperatura e clones, e durante os teste foram retiradas aliquotas para análise da expressão em SDS-PAGE 12%. O teste de IPTG mostrou que a proteína de fusão (~30 kDa) pode ser produzida a uma concentração de 0,05 mM, mas de forma insolúvel a 37° C por 4 horas em agitação constante (FIGURA 29).

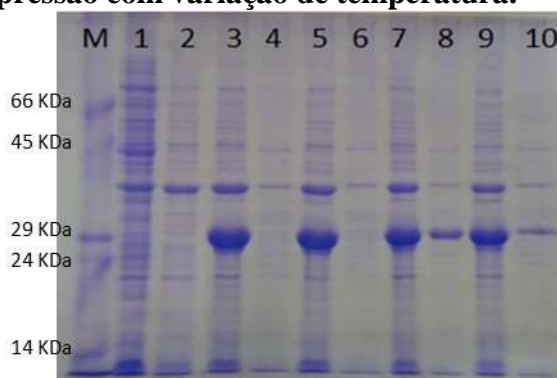
Figura 29 – Teste de expressão com variação de IPTG.



Fonte: Elaborado pela autora. SDS PAGE 12% da indução da rSfL-1 a 37° C por 4 horas com variação de IPTG. M – Marcador MW-SDS-70L; 1 e 2 – Indução com IPTG 0,05 mM fração insolúvel e solúvel; 3 e 4 - Indução com IPTG 0,1 mM fração insolúvel e solúvel; 5 e 6 – Indução com IPTG 0,5 mM fração insolúvel e solúvel; 7 e 8 – Indução com IPTG 1,0 mM fração insolúvel e solúvel.

Após identificar a melhor concentração de IPTG para as induções foram feitos testes para encontrar a melhor condição de expressão da recombinante na forma solúvel. A indução em várias temperaturas mostrou que tanto a 25° C por 20 horas ou 18° C por 24 horas sob agitação contante a rSfL-1 se apresenta tanto na forma solúvel quanto insolúvel (FIGURA 30). A condição de 25° C foi escolhida por apresentar visualmente uma maior concentração da recombinante na forma solúvel.

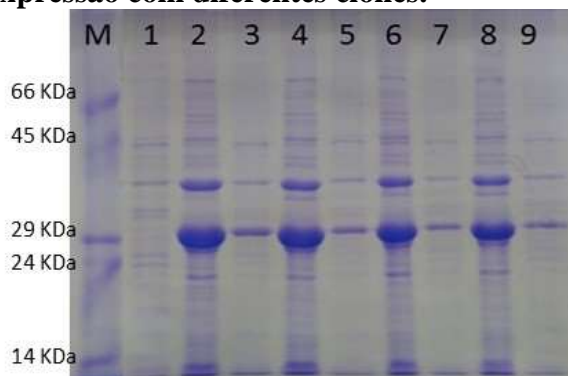
Figura 30 – Teste de expressão com variação de temperatura.



Fonte: Elaborado pela autora. SDS PAGE 12% da Indução com IPTG 0,05 mM. M – Marcador MW-SDS-70L; 1 e 2 – Fração insolúvel e solúvel no tempo 0 horas da indução; 3 e 4 - Fração insolúvel e solúvel da indução a 37° C por 4 horas; 5 e 6 – Fração insolúvel e solúvel da indução a 30° C por 16 horas; 7 e 8 – Fração insolúvel e solúvel da indução a 25° C por 20 horas; 9 e 10 – Fração insolúvel e solúvel da indução a 14° C por 24 horas.

Por fim, foi avaliado a diferença de expressão entre os clones transformados (FIGURA 31). Não foi observado uma diferença significativa na expressão entre os clones e foi selecionado o clone 1 para os experimentos de produção da lectina recombinante.

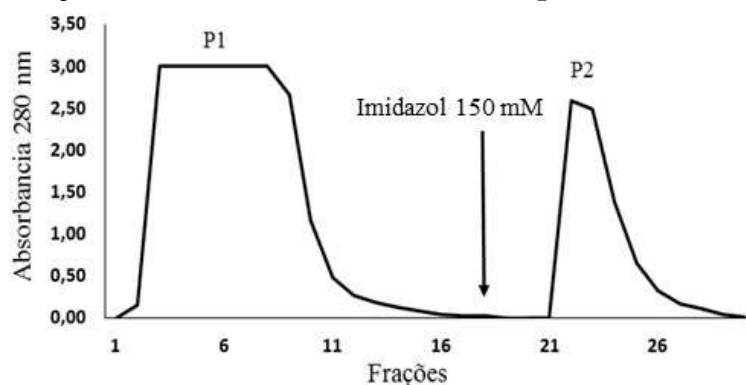
Figura 31 – Teste de expressão com diferentes clones.



Fonte: Elaborado pela autora. SDS PAGE 12% da Indução com IPTG 0,05 mM a 25° C por 20 horas. M – Marcador MW-SDS-70L; 1 – Indução no tempo 0 horas; 2 e 3 - Fração insolúvel e solúvel do clone 01; 4 e 5 – Fração insolúvel e solúvel do clone 02; 6 e 7 – Fração insolúvel e solúvel do clone 03; 8 e 9 – Fração insolúvel e solúvel do clone 04.

A proteína recombinante foi obtida de forma solúvel a partir de um lisado de células de 250 mL de indução e purificada em um único passo cromatográfico em coluna de afinidade de níquel (HisTrap FF Crude) com eluição em tampão TBS contendo 150 mM de imidazol (FIGURA 32) com rendimento de aproximadamente 60 mg por litro de indução.

Figura 32 – Purificação da rSfL-1 em coluna de HisTrap.

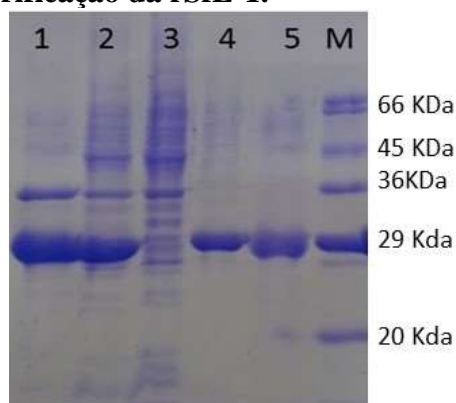


Fonte: Elaborado pela autora. Purificação da rSfL-1 em coluna HisTrap FF Crude. P1 – Pico não retido sendo lavado com tampão Tris-HCl pH8,0 contendo NaCl 150 mM, imidazol 20 mM e glicerol 10%; P2 – Pico retido sendo eluído com tampão Tris-HCl pH8,0 contendo NaCl 150 mM, imidazol 150 mM e glicerol 10%; Seta indica o momento da troca de tampão para eluição da recombinante.

O P2 da cromatografia de HisTrap apresentou atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho tratados com tripsina, sendo inibida por manana de levedura a uma concentração mínima de $31,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Assim, a rSfL-1 se apresenta ativa e com a mesma especificidade de ligação que a SfL.

A rSfL-1 foi eficientemente purificada por único passo cromatográfico em coluna de afinidade a níquel, como pode ser visto na eletroforese de SDS-PAGE na Figura 33.

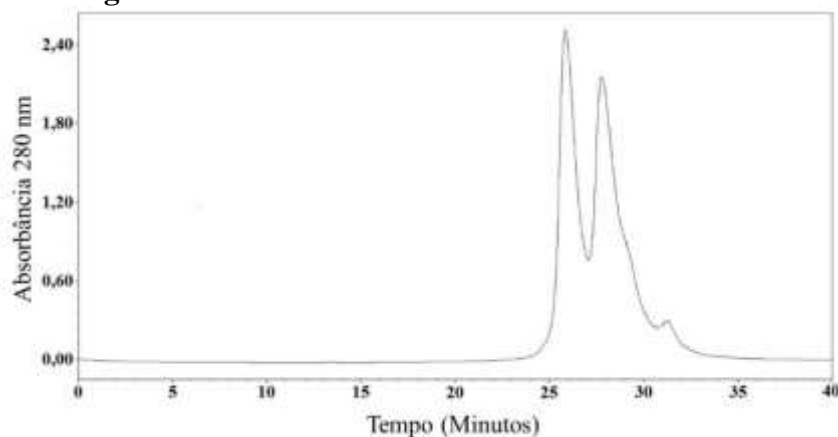
Figura 33 – Expressão e purificação da rSfL-1.



Fonte: Elaborado pela autora. SDS PAGE 12% da indução, da purificação em cromatografia HisTrap e da SfL nativa. 1 – Fração insolúvel, 2 – Fração solúvel, 3 – P1 da HisTrap, 4 – P2 Histrap, 5 – SfL nativa e M – Marcador Sigma Marker Low Range.

A rSfL-1 apresentou um rendimento 60 mg por litro de cultivo e indução com baixa concentração de IPTG (0,05 mM). Uma cromatografia de exclusão molecular foi realizada para avaliar a pureza da lectina recombinante (FIGURA 34).

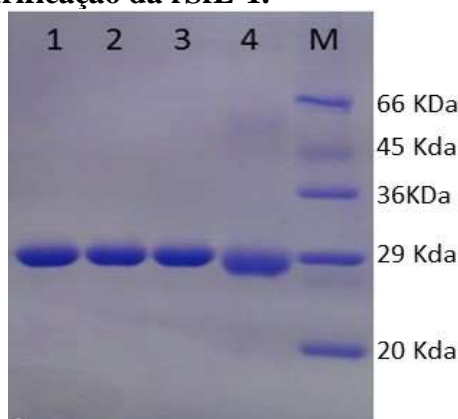
Figura 34 – Cromatografia de exclusão molecular da rSfL-1.



Fonte: Elaborado pela autora. Perfil cromatográfico da rSfL-1 em cromatografia de exclusão molecular na coluna BioSuite SEC acoplado em sistema Acquity UPLC.

A rSfL-1 apresentou um tempo de retenção de de 25,7 minutos com massa calculada de 26,8 kDa e um segundo pico aos 27,9 minutos com massa de 18,7 kDa. O perfil cromatográfico foi parecido com a da SfL, que também apresentou dois picos, sendo o segundo acompanhado por um arrastado, mas com massas calculadas maiores para ambos os picos, 30 e 22 kDa. Os picos da exclusão molecular foram avaliados em SDS-PAGE junto com o P2 da HisTrap e a SfL nativa, e mostrou ser a lectina rSfL-1 em ambos os picos da cromatografia na coluna BioSuite (FIGURA 35).

Figura 35 – Expressão e purificação da rSfL-1.



Fonte: Elaborado pela autora. SDS PAGE 12% da cromatografia em BioSuite com o P2 da HisTrap e a SfL nativa. 1 – P2 Histrap 2 – P1 BioSuite, 3 – P2 BioSuite, 4 – SfL nativa, M – Marcador Sigma Marker Low Range.

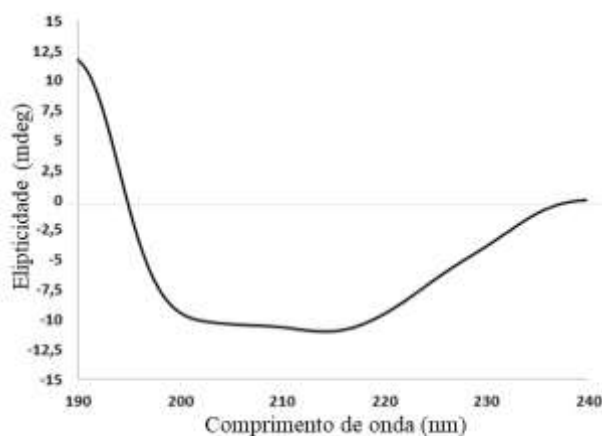
Outras lectinas de algas da mesma família foram produzidas de forma semelhante, como a rOAA e a rKAA-1 com rendimento de 48 mg e 115 mg por litro de indução, respectivamente. Ambas foram purificadas em um único passo cromatográfico em coluna de níquel imobilizado (SATO; HORI, 2009; HIRAYAMA *et al.*, 2016).

Como a rOAA e a rKAA-1, a rSfL-1 foi purificada em um único passo cromatográfico em coluna de níquel imobilizado com ótimo rendimento (60 mg.L^{-1}). A rSfL-1 purificada por HisTrap foi utilizada nos demais experimentos de dicroísmo circular, cristalização e avaliação do potencial biotecnológico.

8.2 Análise da estrutura secundária da rSfL-1

Os espectros de dicroísmo circular da rSfL-1 mostrou uma absorção máxima negativa em 216 nm e com um máxima positiva em torno de 190 nm (FIGURA 36).

Figura 36 – Espectros de dicroísmo circular da rSfL-1.



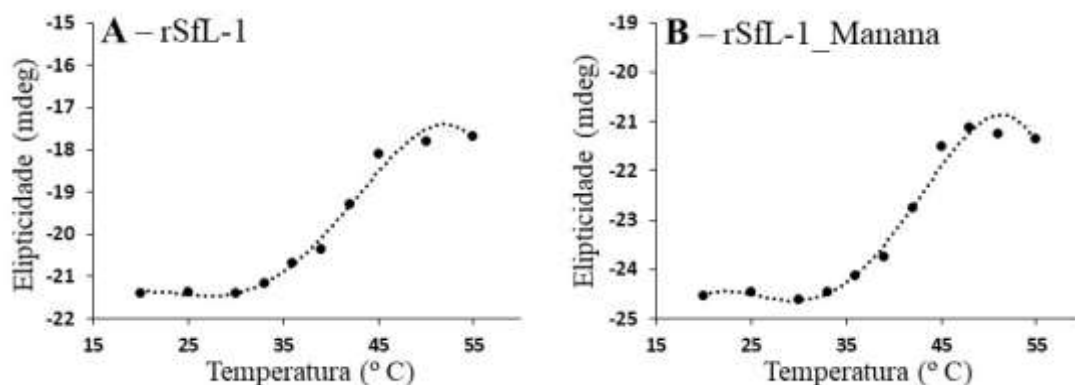
Fonte: Elaborado pela autora. Espectros de dicroísmo circular em UV distante (190-240 nm).

A rSfL-1 apresentou um absorção com máximo negativo próximo aos de proteínas com predominância de estruturas β -folha e que se assemelham aos espectros de proteínas- β_1 , como a SfL nativa e MeL. A leve diferença nos espectros da proteína nativa com a recombinante pode ser explicado pelas pequenas diferenças estruturais, que podem existir, entre as a mistura de isoformas nativas e a isoforma recombinante.

A análise da estrutura secundária teórica por dicroísmo circular mostrou uma composição de 2,2% para α -hélice, 72% de β -folha e 25,3% de conformação desordenada para a rSfL-1, sendo valores bem próximos dos valores obtidos para a mistura de isolectinas.

Em relação a estabilidade térmica a rSfL apresentou termoestabilidade menor que a SfL e a MeL e a adição de manana reduziu levemente a sua termoestabilidade. A rSfL-1 apresentou T_m de 41°C e $40,5^\circ \text{C}$, na ausência e presença de manana, respectivamente (FIGURA 37).

Figura 37 – Espectros de dicroísmo circular em função da temperatura de SfL e rSfL-1 na presença e ausência de manana.

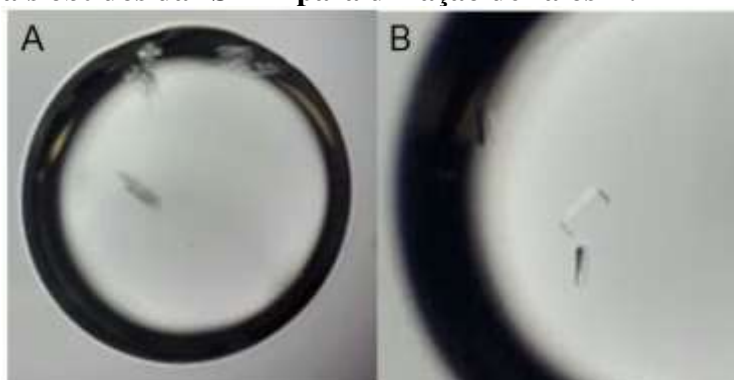


Fonte: Elaborado pela autora. Análise de Tm em dicroísmo circular (UV distante - 216 nm) com variações de temperatura das proteínas a $0,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A – rSfL nas temperaturas de 25°, 30°, 33°, 36°, 39°, 42°, 45°, 50° e 55° C; C e B – rSfL-1 previamente incubadas com manana por 1 hora, respectivamente.

8.3 Determinação da estrutura cristalográfica da rSfL-1

A determinação da estrutura cristalográfica da rSfL-1 foi obtida através de difração de raios X de cristais obtidos após um mês na condição 32 (0,1 M de Ácido 4-(2-HidroxiEtil)-1-PiperazinEtanolSulfônico (HEPES) pH 7,5 com 0,1 M de cloreto de sódio e 1,6 M de sulfato de amônio) do Hampton Research crystallization screen 2. Cristais regulares foram obtidos quando foi realizado a repetição da condição 32, após um mês de incubação (FIGURA 38).

Figura 38 – Cristais obtidos da rSfL-1 para difração de raios X.



Fonte: Elaborado pela autora. Formação de Cristais da rSfL-1 na concentração de 7 mg.mL^{-1} . A – Cristais formados na condição 32 do screen 2; B – Cristais da rSfL-1, após a repetição da cristalização na condição 32.

Os cristais difrataram a uma resolução de $1,88 \text{ \AA}$ usando radiação Síncrotron do LNLS e um conjunto de dados foram obtidos e utilizados na resolução da estrutura.

O cristal apresentou um sistema ortorrômbico $P2_12_1$ com dimensões de célula unitária de $a = 48.05 \text{ \AA}$, $b = 62.43 \text{ \AA}$, $c = 90.70 \text{ \AA}$ e a presença de uma única molécula por unidade assimétrica. As estatísticas dos dados cristalográficos estão descritas na Tabela 03.

Tabela 03 - Estatísticas cristalográficas da coleta de dados e do refinamento para resolução da estrutura da rSfL-1.

Coleta de dados	
Fonte	LNLS - MX2
Comprimento de onda (Å)	1.458
Resolução (Å)	45.35– 1.88 (1.98 - 1.88)
Grupo espacial	$P 2_1 2_1$
Célula unitária (Å)	$a = 48.05$, $b = 62.43$, $c = 90.70$
Moléculas / u.a.	1
Reflexões únicas	22337 (2678)
Completeza (%)	97.9 (95.9)
R_{meas}^a	0.124 (0.597)
R_{pim}^b	0.035 (0.163)
R_{merge}	0.119 (0.573)
CC(1/2)	0.998 (0.958)
Multiplicidade	12.7 (13.2)
$I/\sigma(I)$	17.6 (5.3)
B_{Wilson} (Å ²)	11.6
Software para integração	XDS
Software para escalonamento	Scala
Refinamento de dados	
R_{cryst}^c / R_{free}^d	0.1918/ 0.2292
Nº de reflexões para R_{free} (%)	5
R.m.s.d. ligações (Å)	0.002
R.m.s.d. angulos (°)	0.514
Software para refinamento	PHENIX
Método de refinamento	ML/TLS

Fonte: Elaborado pela autora. Valores em parêntesis são relativos a camada de maior resolução.

$$R_{meas}^a = \frac{\sum_h \sqrt{\frac{n_h}{n_h - 1}} \sum_i |\hat{I}_h - I_{h,i}|}{\sum_h \sum_i I_{h,i}} \quad \text{com} \quad \hat{I}_h = \frac{1}{n_h} \sum_i I_{h,i} \quad R_{pim}^b = \sum_{hkl} \sqrt{\frac{1}{N-1}} \sum_i |I_i(hkl) - \overline{I(hkl)}| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$$

Onde $I(hkl)$ é a intensidade de múltiplas $I_i(hkl)$ observações de reflexões simetricamente relacionadas, N é redundância, n_h é a multiplicidade, \hat{I}_h é intensidade média e $I_{h,i}$ é intensidade observada.

^c $R_{cryst} = \Sigma |F_o - F_c| / \Sigma F_o$

^d R_{free} é a validação cruzada de R_{factor} computado por um conjunto de reflexões (5 %) omitidas do processo de refinamento.

A estrutura exibiu densidade eletrônica clara para os resíduos a partir do aminoácido Q²⁷ da lectina recombinante, sendo o resíduo nomeada como Q¹ para as demais discussões (FIGURA 39).

Figura 39 – Estrutura primária da rSfL-1 na estrutura cristalográfica.

```

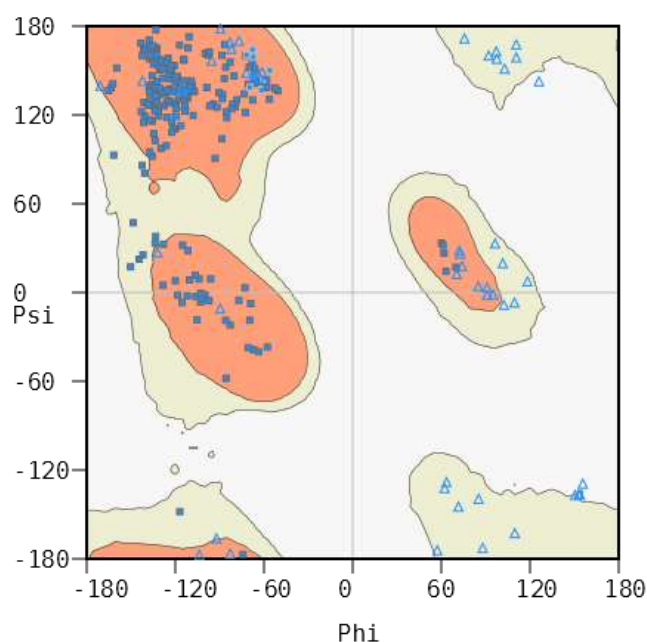
1   QGRYTVQNQW GGSSAPWNTA GLWLLGSRAN QNVMDVSVTS SDGGATLTGT
51  MTYSGEGPIG FKGTRRGDSN NYDVENQWGG SSAPWHAGGT FVIGSRSGQG
101 VVAVDVNSSD GGKTLTGMTT YANEGPIGFK GTQSGGDSYN VENQWGGSSA
151 PWNKAGAWAL GDRDGQGVIG VDVTSDDGGK TLTGTMQYQN EGPIGFKGTS
201 TGGSNYKVEN QWGGSSAPWN PAGNWLIGDR HNQNIVAVKV TSSDNGKTLG
251 GTCTYEREGP IGFKGTAI

```

Fonte: Elaborado pela autora.

A qualidade estereoquímica da estrutura foi avaliada no programa Coot do pacote CCP4 baseado nas torções psi (Ψ) e phi (Φ) das ligações do carbono- α e apresentou 93,61 % dos resíduos em regiões mais favorecidas e 6,39 % em regiões permitidas, não apresentando resíduos em regiões não permitidas além dos resíduos de glicina, que podem ter grande mobilidade, devido a sua pequena cadeia lateral e, assim, ausência de repulsão estérica (FIGURA 40).

Figura 40 – Gráfico de Ramachandran das coordenadas da SfL-1.

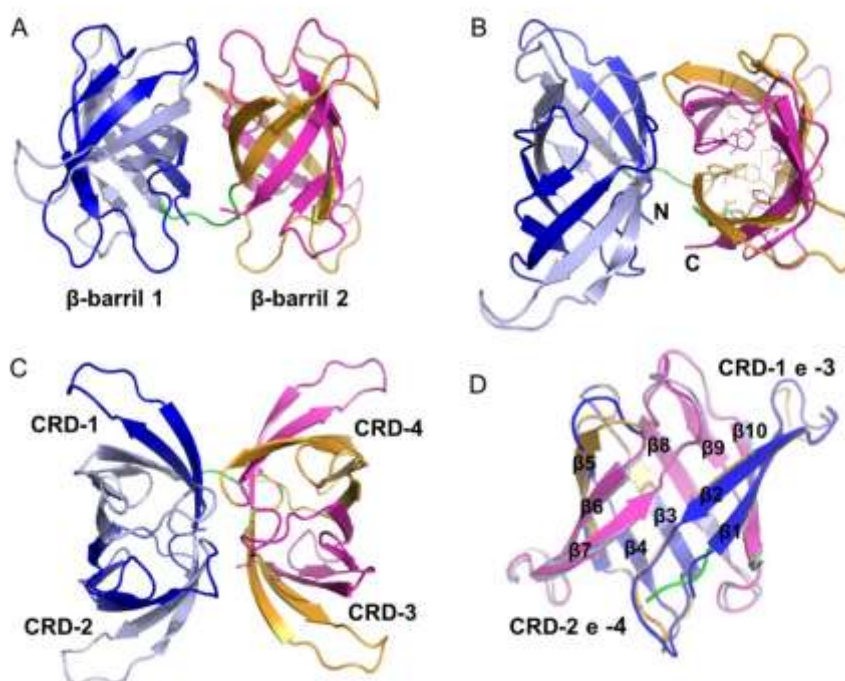


Fonte: Elaborado pela autora. Regiões na cor laranja são as mais favorecidas, as regiões na cor cinza são permitidas e a branca é a região não permitida.

O gráfico de ramachandran mostra que os resíduos estão em regiões mais favorecidas e em regiões permitidas validando a estrutura da rSfL-1. Assim, a rSfL é a primeira lectina de macroalga da família OAAH a ter a estrutura tridimensional determinada, segunda das macroalgas, terceira entre as algas e a quinta entre os membros da família de lectinas OAAH.

Semelhante a BOA e a MBHA, a SfL-1 não apresentou arranjos oligoméricos e possui estrutura quaternária na forma monomérica composta de dois domínios tipos β -barril formados por cinco cadeias antiparalelas que estão ligadas por um peptídico curto entre os β -barris (FIGURA 41-A), que é característico das lectinas que apresentam quatro CRDs, enquanto a OAA e a PFA, que apresentam dois CRDs, possuem apenas um domínio tipo β -barril (KOHARUDIN *et al.*, 2010; KOHARUDIN *et al.*, 2012; WHITLEY *et al.*, 2013).

Figura 41 – Estrutura cristalográfica da rSfL-1.



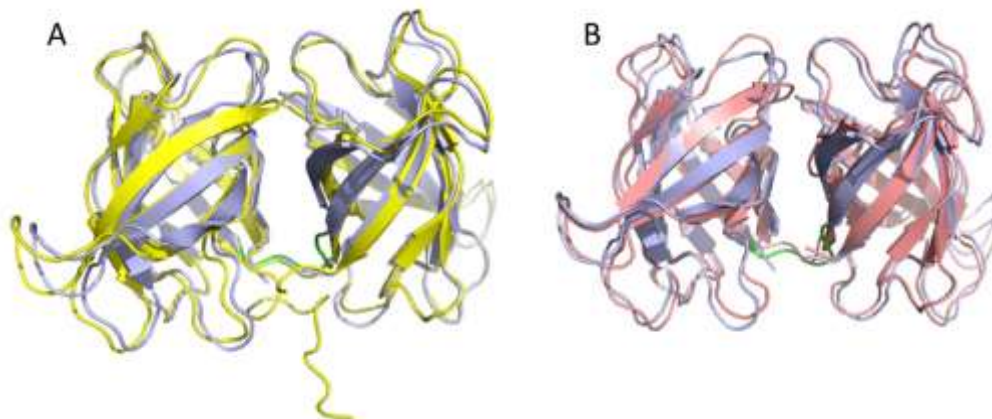
Fonte: Elaborado pela autora. A – Estrutura da rSfL-1 com os dois β -barris (β -barril 1 em tons de azul e β -barril 2 em tons de violeta e laranja); B – Rotação da estrutura no eixo x em aproximadamente 45° em relação A mostrando a localização N- e C- terminal da proteína e cadeias laterais no interior do β -barril 2; C – Rotação da estrutura no eixo x de aproximadamente 90° em relação A e mostrando a localização dos domínios de reconhecimento a carboidratos (CRD-1 a -4); D – Alinhamento dos dois β -barris e a enumeração das fitas- β . Os quatro domínios tandem apresentam cores diferentes: azul escuro para a primeira sequência de repetição interna da estrutura primária, azul claro para a segunda, laranja claro para a terceira, violeta para a quarta e verde para o curto peptídeo que liga os β -barris.

Na Figura 41-B podemos observar no β -barril 2 as interações de cadeias laterais alifáticas e aromáticas no interior do barril, que contribui para estabilizar o β -barril e formar um núcleo hidrofóbico. Os aminoácidos envolvidos são Y¹³⁹, V¹⁴¹, W¹⁵⁸, L¹⁶⁰, V¹⁶⁸, V¹⁷¹, V¹⁷³, L¹⁸², M¹⁸⁶, Y¹⁸⁸, I¹⁹⁴ e F¹⁹⁶ da primeira repetição em laranja claro e Y²⁰⁶, V²⁰⁸, W²²⁵, I²²⁷, I²³⁵, V²³⁸, V²⁴⁰, L²⁴⁸, C²⁵³, Y²⁵⁵, I²⁶¹ e F²⁶³ da segunda repetição em violeta.

Entre as quatro sequências repetidas esses aminoácidos são idênticos exceto o W¹⁵⁸ que é F⁹² no segundo domínio tandem, L¹⁶⁰ que é I⁹⁵ e I²²⁷ no segundo e quarto, V¹⁶⁸ que é I²³⁵ no quarto e M¹⁸⁶ que é uma C²⁵³ no quarto domínio tandem. Esses aminoácidos se mantem conservados também entre os membros da família com poucas variações (KOHARUDIN *et al.*, 2010; KOHARUDIN *et al.*, 2012; WHITLEY *et al.*, 2013).

A Figura 41-C é demonstrado a troca de fitas β entre duas repetições de sequência em cada β -barril, como já foi visto para os demais membros da família (KOHARUDIN *et al.*, 2010; KOHARUDIN *et al.*, 2012; WHITLEY *et al.*, 2013). Assim, podemos observar que o CRD-1 está localizado nos loops entre as fitas β 1- β 2 (azul escuro), β 7- β 8 e β 9- β 10 (azul claro), enquanto o CRD-2 está nos loops das β 6- β 7 (azul claro), β 2- β 3 e β 4- β 5 (azul escuro). O mesmo acontece com os CRD-3 e -4 no segundo β -barril. Na Figura 41-D podemos observar a alta similaridade entre os β -barris, que apresentaram R.M.S.D. (Root Mean Square Deviations) do C α de 0,451 Å. A estrutura da rSfL-1 apresentou R.M.S.D dos C α de 0,943 Å e 1,069 Å com a BOA e MBHA, respectivamente, mostrando a alta similaridade existente entre os membros da família (FIGURA 42).

Figura 42 – Alinhamento estrutural da rSfL-1 com a BOA e MBHA.

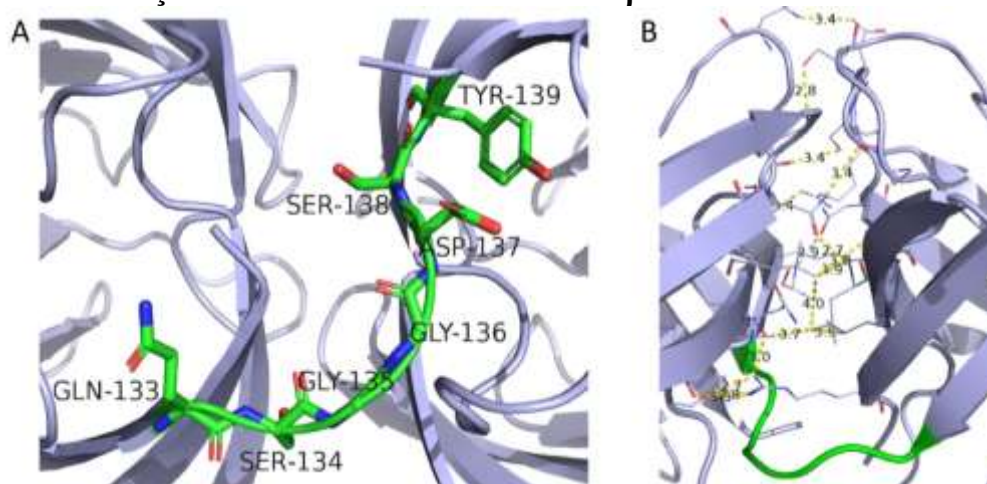


Fonte: Elaborado pela autora. A – Alinhamento de estrutura entre a rSfL-1 (azul claro) e a BOA (amarelo); B – Alinhamento de estrutura entre a rSfL-1 (azul claro) e a MBHA (salmão). Ambos alinhamentos foram feitos pelo PyMOL.

A estrutura apresenta uma pequena sequência peptídica de sete aminoácidos (¹³³QSGGDSY¹³⁹) entre os β -barris, que apresenta pouca similaridade com a BOA, que possui cinco (¹⁴⁰QADGG¹⁴⁴), e a MBHA, que também possui cinco (¹³²VTDGD¹³⁶).

O peptídeo de ligação dos β -barris e as interações relacionadas a união dos β -barris podem ser observados na Figura 43.

Figura 43 – Interações relacionadas a união dos dois β -barris da rSfL-1.



Fonte: Elaborado pela autora. A – Estrutura mostrando uma curta sequência de aminoácidos em verde entre os β -barris (azul claro); B – Interações dos aminoácidos entre os β -barris.

Além do peptídeo de ligação foram observados pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas e de Van der Waals entre os β -barris, que podem ser os responsáveis pela estabilidade estrutural dos β -barris. As interações observadas foram listadas na Tabela 04.

Tabela 04 – Interações polares e apolares entre os β -barris da rSfL-1 (Continua).

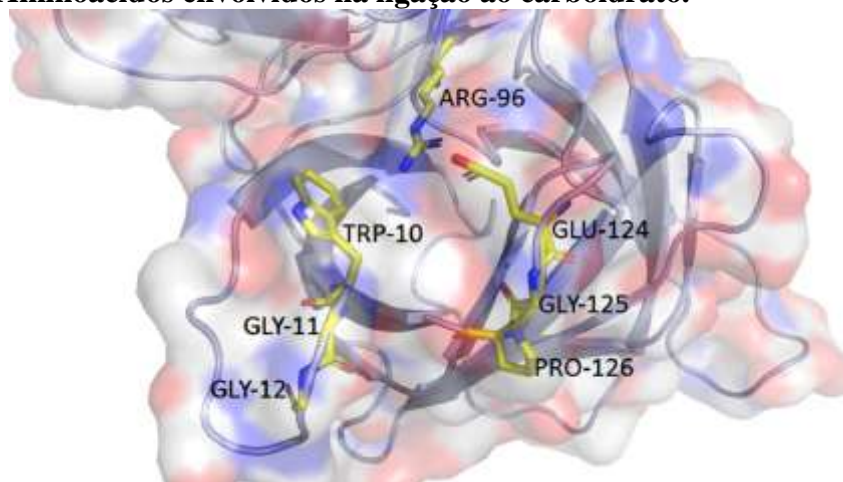
Aminoácido (β -barril 1)	Aminoácido (β -barril 2)	Distância (Å)
ARG ³ NH1	ALA ¹⁵⁹ CA	3,97
ARG ³ NH1	ALA ¹⁵⁹ CB	3,75
ARG ³ NH1	ALA ¹⁵⁹ C	3,81
ARG ³ NH1	LEU ¹⁶⁰ O	3,50
ARG ³ NH1	GLY ¹⁶¹ O	2,80
ARG ³ NH1	GLY ¹⁶¹ C	3,76
ARG ³ NH2	GLY ¹⁶¹ O	2,74
ARG ³ NH2	ASN ²²⁴ O	3,02
ARG ³ CZ	GLY ¹⁶¹ O	2,74
ARG ³ CZ	ASN ²²⁴ O	3,60
LEU ²² N	ASN ²⁰⁵ OD1	2,68
LEU ²² N	ASN ²⁰⁵ CG	3,69
LEU ²² CB	ASN ²⁰⁵ OD1	3,72
LEU ²² CD1	ASN ²²⁴ O	3,94
LEU ²² CD2	ALA ¹⁵⁹ CB	3,66
LEU ²² CD2	ASN ²²⁴ O	3,51
LEU ²² CD2	LEU ²²⁶ CD1	4,03
LEU ²² C	ASN ²⁰⁵ OD1	3,98
LEU ²² O	LEU ²²⁶ CD1	3,72
LEU ²² O	LEU ²²⁶ CD2	3,89
LEU ²⁴ CD1	LEU ²²⁶ CD1	3,68
LEU ²⁴ CD2	ALA ¹⁵⁷ CB	3,89
ARG ⁶⁶ NH1	LYS ¹⁵⁴ CE	3,62
ARG ⁶⁶ NH2	LYS ¹⁵⁴ O	3,37
ASP ⁶⁸ OD2	ASN ²³² ND2	3,45

Tabela 04 – Interações polares e apolares entre os β -barris da rSfL-1 (Conclusão).

Aminoácido (β -barril 1)	Aminoácido (β -barril 2)	Distância (Å)
SER ⁶⁹ OG	ASP ²²⁹ O	3,40
ASN ⁷¹ OD1	ALA ¹⁵⁷ N	2,87
ASN ⁷¹ OD1	ASP ²²⁹ CB	3,68
ASN ⁷¹ ND2	ASP ²²⁹ CB	3,59
VAL ⁹² CG1	LEU ²²⁶ CD1	3,77
VAL ⁹² CG2	LEU ²²⁶ CD1	3,89
SER ⁹⁵ CB	ASN ²⁰⁵ ND2	3,98
SER ⁹⁵ O	ASN ²⁰⁵ ND2	3,41
SER ⁹⁷ CA	GLY ²⁰³ N	3,81
SER ⁹⁷ OG	GLY ²⁰³ N	2,81
SER ⁹⁷ OG	GLY ²⁰³ CA	3,63
SER ⁹⁷ OG	GLY ²⁰² CA	3,78
SER ⁹⁷ OG	GLY ²⁰² C	3,74

Fonte: Elaborada pela autora. Distâncias de até 4,0 Å, 4,0 Å e 3,5 Å foram consideradas para interações de Van der Waals, hidrofóbicas e pontes de hidrogênio, respectivamente.

Em relação ao sítio de ligação ao carboidrato foi possível observar que os aminoácidos envolvidos diretamente na ligação do α 3, α 6 manopentose a BOA estão conservados na rSfL-1, mostrando mais uma vez que a lectina pode ter a mesma especificidade de ligação que os demais membros da família OAAH (FIGURA 44).

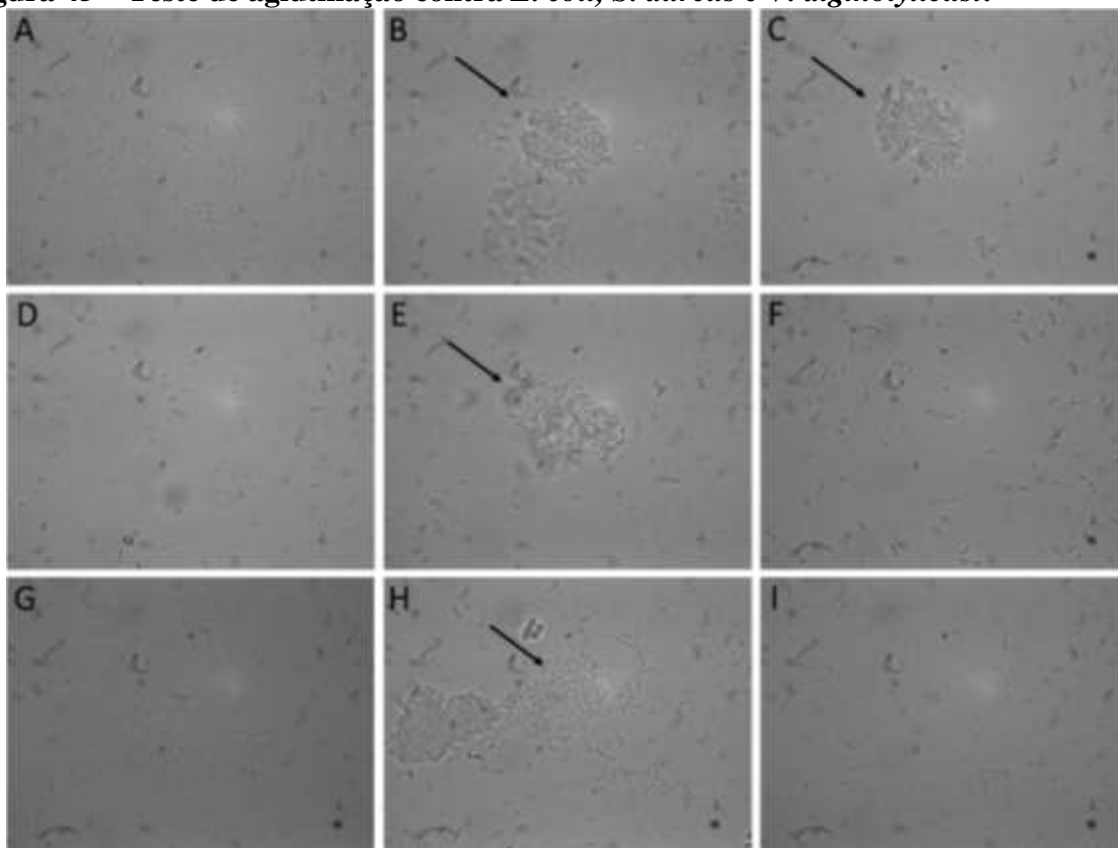
Figura 44 – Aminoácidos envolvidos na ligação ao carboidrato.

Fonte: Elaborado pela autora. Estrutura mostrando os aminoácidos envolvidos a ligação a carboidratos segundo Whitley e colaboradores, 2013.

8.4 Atividade antibacteriana e aglutinação de bactérias

A rSfL-1, em concentrações de até $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, também não apresentou atividade antibacteriana contra as cepas testadas, como a SfL e a MeL, mas foi capaz de aglutinar as cepas de bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *V. alginolyticus* a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (FIGURA 45).

Figura 45 – Teste de aglutinação contra *E. coli*, *S. aureus* e *V. alginolyticus*.



Fonte: Elaborado pela autora. A – Cepa de *E. coli* em solução de NaCl 0,85%; B – *E. coli* com rSfL; C – *E. coli* com rSfL complexada com manana; D – Cepa de *S. aureus* em solução de NaCl 0,85%; E – *S. aureus* com rSfL; F – *S. aureus* com rSfL complexada com manana; G – Cepa de *V. alginolyticus* em solução de NaCl 1.0%; H – *V. alginolyticus* com rSfL e I – *V. alginolyticus* com rSfL complexada com manana.

A aglutinação contra a cepa padrão *E. coli* demonstrou que a rSfL-1 foi capaz de reconhecer a membrana da bactéria e aglutinar mesmo quando incubada previamente com manana de levedura, da mesma forma que a SfL nativa. Em relação a cepa padrão *S. aureus* a rSfL-1 apresentou maior capacidade aglutinante, enquanto que a SfL nativa mostrou baixa capacidade de aglutinar.

A rSfL-1 ainda foi capaz de reconhecer e aglutinar a cepa *V. alginolyticus*, o que não foi observado para a SfL, sugerindo que a isoforma SfL-1 possui maior capacidade aglutinante em comparação com a mistura de isoformas para ambas as cepas.

As aglutinações contra as cepas *S. aureus* e a *V. alginolyticus* foram inibidas na presença de manana de levedura, demonstrando o envolvimento dos domínios de ligação a carboidratos da rSfL-1 no reconhecimento e aglutinação das células bacterianas.

Esses resultados sugerem que a isoforma SfL-1 pode ser capaz de ter um potencial aglutinate contra bactérias e efeitos antineoplásicos maiores do que a mistura de isoformas, mostrando a necessidade de estudar cada isoforma separadamente para ter um perfil da capacidade biotecnológica comparando-as entre si e com as isoformas juntas, e assim tendo um estudo relacionando estrutura e função das lectinas em questão.

9 CONCLUSÃO

Nesse trabalho foram caracterizadas uma isoforma da MeL e duas isoformas da SfL, SfL-1 e SfL-2, que são novos membros da família de lectinas homologas a *Oscillatoria agardhii* agglutinin. As lectinas MeL e SfL, que apresentaram diferenças no reconhecimento a células bacterianas, mostram um potencial na identificação inicial de bactérias em estudos de tipagem bacteriana. A SfL, que apresentou efeitos antineoplásicos contra a linhagem MCF-7, também possui um potencial anticancerígeno. A recombinante SfL-1, se apresentou bioquímicamente semelhante a nativa, teve sua estrutura cristalográfica determinada e revelou uma estrutura com β -barril duplo típico das lectinas com quatro domínios da família OAAH, sendo a primeira lectina de macroalga da família OAAH a ter a estrutura quartenária determinada, segunda das macroalgas, terceira entre as algas e a quinta entre os membros da família de lectinas OAAH. A rSfL-1 apresentou maior poder aglutinante do que a nativa, sugerindo que a isoforma isolada pode apresentar maior potencial que a mistura de isoforma.

REFERÊNCIAS

- ABREU, T. C. **Efeitos da lectina da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson na nocicepção e inflamação em animais.** 2012, 113f. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular) - Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza, 2012.
- ABREU, T. C. **Lectina da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson: caracterização parcial e efeito antidepressivo em modelos experimentais de depressão.** 2016, 134f. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular) - Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza, 2016.
- ABREU, T. C. *et al.* Cytokine production induced by marine algae lectins in BALB/c mice splenocytes. **Protein and peptide letters**, v. 19, n. 9, p. 975-981, 2012.
- ABREU, T. C. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the lectin from marine red alga *Solieria filiformis*. **Planta medica**, v. 82, n. 07, p. 596-605, 2016.
- ABREU, T. C. *et al.* Involvement of the dopaminergic system in the antidepressant-like effect of the lectin isolated from the red marine alga *Solieria filiformis* in mice. **International journal of biological macromolecules**, v. 111, p. 534-541, 2018.
- AFONINE, Pavel V. *et al.* Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 68, n. 4, p. 352-367, 2012.
- AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H. Screening of Brazilian marine algae for hemagglutinins. **Botanica Marina**, v. 34, n. 3, p. 211-214, 1991.
- AINOUZ, I. L. *et al.* Agglutination of Enzyme Treated Erythrocytes by Brazilian Marine Algal Extracts. **Botanica Marina**, v. 35, n. 6, p. 475-480, 1992.
- AMBROSIO, A. L. *et al.* Isolation of two novel mannan- and L-fucose-binding lectins from the green alga *Enteromorpha prolifera*: biochemical characterization of EPL-2. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 415, p. 245-250, 2003.
- AMEN, Y. M. *et al.* New cytotoxic lanostanoid triterpenes from *Ganoderma lingzhi*. **Phytochemistry Letters**, v. 17, p. 64-70, 2016.
- BAH, C. S. F. *et al.* Purification and characterization of a rhamnose-binding chinook salmon roe lectin with antiproliferative activity toward tumor cells and nitric oxide-inducing activity toward murine macrophages. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5720-5728, 2011.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016.

- BENEVIDES, N. M. B. LEITE, A. M.; FREITAS, A. L. P. Atividade hemaglutinante na alga vermelha *Solieria filiformis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, p. 117-122, 1996.
- BENEVIDES N. M. B. *et al.* Proximate analysis, toxic and antinutritional factors of ten Brazilian marine algae. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, p. 31-36, 1998.
- BEWLEY C. A. *et al.* New carbohydrate specificity and HIV-fusion blocking activity of the cyanobacterial protein MVL: NMR, ITC and sedimentation equilibrium studies. **Journal of Molecular Biology**, v. 339, p. 901–914, 2004.
- BITENCOURT, F. S. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 377, p. 139–148, 2008.
- BOKESCH, H. R. *et al.* A potent novel anti-HIV protein from the cultured cyanobacterium *Scytonema varium*. **Biochemistry**, v. 42, n. 9, p. 2578–2584, 2003.
- BOONSRI, N. *et al.* Protein extract from red seaweed *Gracilaria fisheri* prevents acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) infection in shrimp. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 3, p. 1597-1608, 2017.
- BOYD, W. C., SHAPLEIGH, E. Antigenic relations of bood group antigens suggested by tests with lectins. **Plant Physiology**, v.36, p. 209 - 234, 1954.
- BOYD, W. C.; ALMODÓVAR, L. R.; BOYD, L. G. Agglutinin in marine algae for human erythrocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 6, p. 82-83, 1966.
- BOYD, M. R. *et al.* Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 1521–1530, 1997.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- CALVETE, J. J. *et al.* The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, p. 343-350, 2000.
- CARDOZO, K. H. M., *et al.* Metabolites from algae with economic impact. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology Pharmacology**, v. 146, p. 60 - 78, 2007.
- CARNEIRO, R. F. *et al.* H-3, a new lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*: Purification and mass spectrometric characterization. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, n. 12, p. 2864-2873, 2013.

- CARNEIRO, R. F. *et al.* Purification, biochemical characterization, and amino acid sequence of a novel type of lectin from *Aplysia dactylomela* eggs with antibacterial/antibiofilm potential. **Marine biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 49-64, 2017.
- CHARUNGCHITRAK, S. *et al.* Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1025-1032, 2011.
- CHEUNG, R. C. F. *et al.* Marine lectins and their medicinal applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 9, p. 3755-3773, 2015.
- COLLELUORI, D. M. *et al.* Expression, purification, and characterization of recombinant cyanovirin-N for vaginal anti-HIV microbicide development. **Protein expression and purification**, v. 39, n. 2, p. 229-236, 2005.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids**, v. 16, n. 22, p. 10881-90, 1988.
- COSTA, *et al.* Purification and characterization of a lectin from the red marine alga *Amansia multifida*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 5, p. 53-61, 1999.
- DALTON, S. H.; LONGLEY, R. E.; BIRD, K. T. Hemagglutinins and immunomitogens from marine algae. **Journal of Marine Biotechnology**, v. 2, p. 149-155, 1995.
- DAVIDSON, S. K.; KELLER, K. F.; DOYLE, R. J. Differentiation of coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci by lectins and plant agglutinins. **Journal of clinical microbiology**, v. 15, n. 4, p. 547-553, 1982.
- DELANO, W. L. Pymol: An open-source molecular graphics tool. **CCP4 Newsletter On Protein Crystallography**, v. 40, p. 82-92, 2002.
- DOYLE, R. J. *et al.* Diagnostic value of interactions between members of the family Neisseriaceae and lectins. **Journal of clinical microbiology**, v. 19, n. 3, p. 383-387, 1984.
- DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12. p.13-15, 1987.
- ETZLER, M. E. Distribution and function of plant lectins. **The lectins: Properties, Functions, and applications in Biology and Medicine**, p. 371-435, 1986.
- EVANS, P. R.; MURSHUDOV, Garib N. How good are my data and what is the resolution?. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 69, n. 7, p. 1204-1214, 2013.
- EWING, B. *et al.* Base-calling of automated sequencer traces using Phred I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.
- EWING B., GREEN P. Basecalling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194, 1998.

FÁBREGAS J. *et al.* Purification and partial purification of tomentine. An N-acetylglucosamine-specific lectin from green alga *Codium tomentosum* (huds) Stackh. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 124, p. 21-30, 1988.

FAHEINA-MARTINS, G. V. *et al.* Influence of fetal bovine serum on cytotoxic and genotoxic effects of lectins in MCF-7 cells. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 25, n. 5, p. 290-296, 2011.

FARIAS, W. R. L. **Purificação, caracterização parcial e atividade biológica da lectina da alga marinha vermelha *Meristiella echinocarpa* (Areschoug) Cheney et Gabrielson.** 1995, 104f. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular) - Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza, 1995.

FERREIRA, R. S. *et al.* Crystal structure of Crataeva tapia bark protein (CrataBL) and its effect in human prostate cancer cell lines. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e64426, 2013.

FONTENELLE, T. P. C. *et al.* Lectin obtained from the red seaweed *Bryothamnion triquetrum*: Secondary structure and anti-inflammatory activity in mice. **International journal of biological macromolecules**, v. 112, p. 1122-1130, 2018.

FUKUDA, Y. *et al.* The anti-tumor effect of *Euchema serra* agglutinin on colon cancer cells in vitro and in vivo. **Anti-cancer drugs**, v. 17, n. 8, p. 943-947, 2006.

FUSETANI, N. *Drugs From The Sea*. Basel, Karger, 2000.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195-202, 1998.

GOUET, P. *et al.* ESPript: multiple sequence alignments in PostScript. **Bioinformatics**, v. 15, p. 305-8, 1999.

GREENFIELD, N. J. Determination of the folding of proteins as a function of denaturants, osmolytes or ligands using circular dichroism. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2733, 2006.

GUPTA, R.; JUNG, E.; BRUNAK, E. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. 2004.

GUSTAFSON, K. R. *et al.* Isolation, primary sequence determination, and disulfide bond structure of cyanovirin-N, an anti-HIV (human immunodeficiency virus) protein from the cyanobacterium *Nostoc ellipsosporum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 238, p. 223-228, 1997.

GUZMAN, S.; GATO, A.; CALLEJA, J. M. Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricorutum*. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 224-230, 2001.

HAN, J. W. *et al.* Purification and characterization of a D-mannose specific lectin from the green marine alga, *Bryopsis plumosa*. **Phycological Research**, v. 58, n. 2, p. 143-150, 2010.

- HAN, J. W. *et al.* Purification and characterization of a lectin, BPL-3, from the marine green alga *Bryopsis plumosa*. **Journal Applied of Phycology**. v.23, p.745-753, 2011.
- HAN, J. W. *et al.* Purification of a sex-specific lectin involved in gamete binding of *Aglaothamnion callophyllidicola* (RHODOPHYTA). **Phycological Society of America**. v. 48, p. 916-924, 2012a.
- HAN, J. W. *et al.* Isolation and Characterization of a sex-specific lectin in a marine red alga, *Aglaothamnion oosumienses* Itono. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78, n. 20, p. 7283-7289, 2012b.
- HAN, J. W. *et al.* Molecular characterization of a lectin, BPL-4, from the marine green Alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta). **Algae**, v. 27, n. 1, p. 55-62, 2012c.
- HAN, J. W. *et al.* Functional recombinants designed from a fetuin/asialofetuin-specific marine algal lectin, Rhodobindin. **Marine drugs**, v. 13, n. 4, p. 2183-2195, 2015.
- HARNEDY, P. A.; FITZGERALD R. J. Bioactive proteins, peptides, and amino acids from macroalgae. **Journal Phycology**. v. 47, p. 218–232, 2011.
- HAZEN, T. H. *et al.* Sequence characterization and comparative analysis of three plasmids isolated from environmental *Vibrio* spp. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 23, p. 7703-7710, 2007.
- HEGER A.; HOLM L. Rapid automatic detection and alignment of repeats in protein sequences. **Proteins**. v. 41, n. 2, p. 224-237, 2000.
- HIRAYAMA, M. *et al.* High-mannose specific lectin and its recombinants from a carrageenophyta *Kappaphycus alvarezii* represent a potent anti-HIV activity through high-affinity binding to the viral envelope glycoprotein gp120. **Marine biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 144-160, 2016.
- HOEK, C. *et al.* Algae: an introduction to phycology. Cambridge university press, 1995.
- HOLANDA, M. L. *et al.* Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**. v. 38, n. 12, p. 1769-1773, 2005.
- HOLCAPEK, M.; JIRÁSKO, R.; LÍSA, M. Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. **Journal of Chromatography A**. v. 1259, p. 3-15, 2012.
- HORI, K.; MIYAZAWA K.; ITO, K. Hemagglutinins in marine algae. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 47, p. 793-798, 1981.
- HORI, *et al.* Mitogenic and antineoplastic isoagglutinins from red alga *Solieria robusta*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 7, p. 2063-2067, 1988.
- HORI, K.; MIYAZAWA, K.; ITO, K. Some common properties of lectins from marine algae. **Hydrobiologia**, v. 204/205, p. 561-566, 1990.

HORI, K.; MATSUBARA, K.; MIYASAWA, K. Primary structures of two hemagglutinins from marine red alga *Hypnea japonica*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1474, p. 226-236, 2000.

HORI, *et al.* Strict specificity for high-mannose type N-glycans and primary structure of a red alga *Eucheuma serra* lectin. **Glycobiology**, v. 17, n. 5, p. 479–491, 2007.

HUANG, X. *et al.* Novel L-type lectin from fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* participates in antibacterial and antiviral immune responses. **Fish & shellfish immunology**, v. 77, p. 304-311, 2018.

HUNG, L. D.; SATO, Y.; HORI, K. High-mannose N-glycan-specific lectin from the red alga *Kappaphycus striatum* (Carrageenophyte). **Phytochemistry**, v.72, p. 855–861, 2011.

HUNG, L. D. *et al.* Purification, primary structure, and biological activity of the high-mannose N-glycan-specific lectin from cultivated *Eucheuma denticulatum*. **Journal of Applied Phycology**, v.27, p. 1657–1669, 2014.

HUNG, L. D. *et al.* Purification, primary structure, and biological activity of the high-mannose N-glycan-specific lectin from cultivated *Eucheuma denticulatum*. **Journal of applied phycology**, v. 27, n. 4, p. 1657-1669, 2015a.

HUNG, L. D. *et al.* Biological activity, cDNA cloning and primary structure of lectin KSA-2 from the cultivated red alga *Kappaphycus striatum* (Schmitz) Doty ex Silva. **Phytochemistry Letters**. v.14, p. 99–105, 2015b.

HUSKENS, D. *et al.* Microvirin, a novel alpha(1,2)-mannose specific lectin isolated from *Microcystis aeruginosa*, has anti-HIV-1 activity comparable with that of cyanovirin-N but a much higher safety profile. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 24845-24854, 2010.

HUSKENS D.; SCHOLS, D. Algal Lectins as Potential HIV Microbicide Candidates. **Marine Drugs**, v. 10, p. 1476-1497, 2012.

HWANG, H. *et al.* Functional Expression and Characterization of the Recombinant N-Acetyl-Glucosamine/N-Acetyl-Galactosamine-Specific Marine Algal Lectin BPL3. **Marine drugs**, v. 16, n. 1, p. 13, 2018.

ISHIHARA K.; ARAI S.; SHIMADA, S. cDNA cloning of a lectin-like gene preferentially expressed in freshwater from macroalga *Ulva limnetica* (Ulcales, Chlorophyta). **Phycological Research**. v. 57, p. 104-110, 2009.

JANCARIK, J. A. K. S.; KIM, S.-H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. **Journal of applied crystallography**, v. 24, n. 4, p. 409-411, 1991.

JARLOV, J. O. *et al.* The typing of *Staphylococcus epidermidis* by a lectin-binding assay. **Journal of medical microbiology**, v. 37, n. 3, p. 195-200, 1992.

JONES, G. H.; BALLOU, C. E. Studies on the structure of yeast mannan I. Purification and some properties of an α -mannosidase from an *Arthrobacter* species. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 4, p. 1043-1051, 1969.

KABSCHA, K. XDS. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. 2, p. 125–132, 2010.

KARAS M., GLÜCKMANN, M., SCHÄFER, J., Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the luck survivors. **Journal of Mass Spectrometry**.v.35, p. 1-12, 2000.

KAWAKUBO, A. *et al.* The marine red alga *Eucheuma serra* J. Agardh, a high yielding source of two isolectins. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 331–338, 1997.

KAWAKUBO, A. *et al.* Occurrence of highly yielded lectins homologous within the genus *Eucheuma*. **Journal of Applied Phycology**. v. 11, p. 149–156, 1999.

KEHR, J. C. *et al.* A mannan binding lectin is involved in cell-cell attachment in a toxic strain of *Microcystis aeruginosa*. **Molecular Microbiology**. v. 59, n. 3, p. 893–906, 2006.

KHIN, M. M. *et al.* Agglutination of *Helicobacter pylori* coccoids by lectins. **World journal of gastroenterology**, v. 6, n. 2, p. 202, 2000.

KIM, G. H.; KLOTCHKOVA, T. A.; WEST, J. A. From protoplasm to swarmer: regeneration of protoplasts from disintegrated cells of the multicellular marine green alga *Microdictyon umbilicatum* (Chlorophyta). **Journal Phycology**, v. 38, p. 174–84, 2002.

KIM G. H.; KLOCHKOVA T. A. Purification and Characterization of a Lectin, Bryohealin, Involved in the Protoplast Formation of a Marine Green Alga *Bryopsis Plumosa* (Chlorophyta). **Journal Phycology**, v. 42, p. 86–95, 2005.

KLOCHKOVA, T. A. *et al.* Cytochemical and ultrastructural studies on protoplast formation from disintegrated cells of a marine green alga *Chaetomorpha aerea* (Chlorophyta). **Journal Phycology**, v. 38, p. 205–16, 2003.

KLOCHKOVA, T. A. *et al.* Experimental hybridization between some marine coenocytic green algae using protoplasts extruded in vitro. **Algae**, v.20, p. 239–49, 2005.

KOHARUDIN, L. M. I.; FUREY, W.; GRONENBORN, A. M. Novel Fold and Carbohydrate Specificity of the Potent Anti-HIV Cyanobacterial Lectin from *Oscillatoria agardhii*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 2, p. 1588–1597, 2011.

KOHARUDIN, L. M. I. *et al.* Structural Insights into the Anti-HIV Activity of the *Oscillatoria agardhii* Agglutinin Homolog Lectin Family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 40, p. 33796–33811, 2012.

KORTING, H. C. *et al.* Lectin typing of *Haemophilus ducreyi*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 7, n. 5, p. 678-680, 1988.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.

LASKOWSKI, R. A. *et al.* AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. **Journal of biomolecular NMR**, v. 8, n. 4, p. 477-486, 1996.

LE, H. D. *et al.* Biochemical comparison of lectins among three different color strains of the red alga *Kappaphycus alvarezii*. **Fish Science**, v. 75, p. 723–730, 2009.

LEE, J. C. *et al.* Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. **Cancer Cell International**, v. 13, p. 55, 2013.

LEITE, Y. F. *et al.* Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochim Biophys Acta**, v. 1724, p.137–145, 2005.

LI Y.; ZHANG, X. Recombinant *Microcystis viridis* lectin as a potential anticancer agent. **Pharmazie**, v. 65, n. 12, p. 922-3, 2010.

LI, Y. *et al.* Cloning, expression and purification of *Microcystis viridis* lectin in *Escherichia coli*. **Molecular biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 105-110, 2011.

LIAO, *et al.* Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 433–439, 2003.

LIM, S. N.; CHEUNG, P. C.; OOI, V. E.; ANG, P. O. Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed *Sargassum siliquastrum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3862–3866, 2002.

LIENER, I. E; SHARON, N.; GOLDSTEN, I. J. The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine, **Eds Academic Press Inc.**, New York, p. 35-244, 1986.

LIMA, H. C. Induction and inhibition of human lymphocyte transformation by the lectin from the red marine alga *Amansia multifida*. **Journal of Applied Phycology**, v. 10, p. 153–162, 1998.

LIMA, M. E. *et al.* Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria cornea* and its effects on the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6414–6419, 2005.

LIMA, R. F. *et al.* *Bryothamnion seaforthii* lectin relaxes vascular smooth muscle: involvement of endothelium and NO synthase. **Protein & Peptide Letters**, v. 17, p. 305–310, 2010.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins as molecules and as tools. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 35-67, 1986.

LIU, H. Haiying. Pathogenic bacterial sensors based on carbohydrates as sensing elements. In: **Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems**. Springer, New York, NY, p. 659-687, 2008.

LOOMIS, W. D. Overcoming problems of phenolics and quinines in the isolation of plant enzymes and organelles. **Methods in Enzymology**, v. 16, p. 528-544, 1974.

MARQUES, D. N. *et al.* Antibacterial activity of a new lectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis*. **International journal of biological macromolecules**, v. 109, p. 1292-1301 2017.

MARTÍNEZ-ALARCÓN, D.; BLANCO-LABRA, A.; GARCÍA-GASCA, T. Expression of Lectins in Heterologous Systems. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 616, 2018.

MASSI, M. N.; AHMAD, A. Cloning and in vitro anti-mycobacterial activity of lectin protein in combination with streptomycin to increase sensitivity against *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 8, n. 2, p. 101-111, 2012.

MATSUMOTO, R. *et al.* Cytotoxicity and glycan-binding properties of an 18 kDa lectin isolated from the marine sponge *Halichondria okadai*. **Toxins**, v. 4, n. 5, p. 323-338, 2012.

MAYER, A. M. S.; RODRÍGUEZ, A. D.; BERLINCK, R. G. S.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2005–6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1790, p. 283–308, 2009.

MAYER, A. M. S.; RODRÍGUEZ, A. D.; BERLINCK, R. G. S.; FUSETANI, N. Marine pharmacology in 2007–8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v.153, p. 191–222, 2011.

MEDINA-RAMIREZ, G.; GIBBS, R.V.; CALVETE, J.J. Micro-heterogeneity and molecular assembly of the haemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seforthii* and *B. triquetrum* from the Caribbean Sea. **European Journal of Phycology**. v. 42, n. 1, p.105-112, 2007.

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

MELO, F. R. *et al.* Purification and partial characterisation of a lectin from the red marine alga *Vidalia obtusiloba* C. Agardh. **Brazilian Journal of Botany**, v. 27, n. 2, p. 263-269, 2004.

MELO, V. M. M. *et al.* Antifungal Properties of Proteins (Agglutinins) from the Red Alga *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux. **Botanica Marina**, v. 40, n. 1-6, p. 281-284, 1997.

- MORI, T. *et al.* Isolation and characterization of Griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia* sp. **Journal of Biological Chemistry**, v.280, p. 9345-9353, 2005.
- MORIMOTO, K.; SATO, Y. Anti-influenza virus activity of high-mannose binding lectins derived from genus *Pseudomonas*. **Virus research**, v. 223, p. 64-72, 2016.
- MUÑOZ, A.; LOPEZ, A.; LLOVO, J. Lectin typing of β -haemolytic streptococci of groups A and B. **Journal of medical microbiology**, v. 41, n. 5, p. 324-328, 1994.
- MUÑOZ, A. *et al.* Lectin typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of medical microbiology**, v. 48, n. 5, p. 495-499, 1999.
- NAGANO, C.S. *et al.* HCA and HML isolated from the red marine algae *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis* define a novel lectin family. **Protein Science**. v.14, p.2167–2176, 2005.
- NAGANO, C. S., SANZ, L., CALVETE, J. J. **Estudios estructurales de lectinas de algas y de Vegetales Superiores**. Editorial Académica Española, 133 pp. 2011.
- NASCIMENTO-NETO, L. G. *et al.*, Characterization of isoforms of the lectin isolated from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and its pro-healing effect. **Marine Drugs**, v. 10, p 1936-1954, 2012.
- NEVES, S. A. *et al.* Neutrophil migration induced in vivo and in vitro by marine algal lectins. **Inflammation Research**, v. 50, n. 10, p. 486-490, 2001.
- NEVES, S. A. *et al.* Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 127–134, 2007.
- NIU, *et al.* Characterization of a new lectin involved in the protoplast regeneration of *Bryopsis hypnoides*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 27, n. 3, p. 502-512, 2009.
- OLIVEIRA, S. R. M. *et al.* Purification and characterisation of a lectin from the red marine alga *Pterocladia capillacea* (SG Gmel.) Santel. & Hommers. **Brazilian Journal of Botany**, v. 25, n. 4, p. 397-403, 2002.
- OKUYAMA, S. *et al.* Strict binding specificity of small-sized lectins from the red alga *Hypnea japonica* for core (alpha1-6) fucosylated N-glycans. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, n. 4, p. 912-20, 2009.
- O'SULLIVAN, N.; BENJAMIN, J.; SKIRROW, M. B. Lectin typing of *Campylobacter* isolates. **Journal of clinical pathology**, v. 43, n. 11, p. 957-960, 1990.
- OTTENSOOSER, F. *et al.* Lectins detecting group C streptococci. **Infection and immunity**, v. 9, n. 5, p. 971-973, 1974.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. N. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347-352, 1995.

PAULA, G. L. **Análise estrutural mediante espectrometria de massa da lectina da alga marinha vermelha *Gracilariopsis sjoestedtii***. 2011, 48f. Monografia (Graduação no Curso de Engenharia de Pesca) - Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

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

PÍREZ, M.; MOTA, M. Morfología y estructura bacteriana. **Revista en internet**, v. 3, n. 2, p. 23-42, 2000.

PRASEPTIANGGA, D.; HIRAYAMA, M.; HORI, K. Purification and characterization and c-DNA cloning of a novel lectin from the green alga *Codium barbatum*. **Bioscience, Biotechnology, Biochemistry**. v. 76, n. 4, p. 805-811, 2012.

RABELO, L. *et al.* A lactose-binding lectin from the marine sponge *Cinachyrella apion* (Cal) induces cell death in human cervical adenocarcinoma cells. **Marine drugs**, v. 10, n. 4, p. 727-743, 2012.

RANJBAR, B.; GILL, P. Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses-A Review. **Chemical biology & drug design**, v. 74, n. 2, p. 101-120, 2009.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7^a. ed. Ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 830pp. 2007.

ROGERS, D. J.; BLUNDEN, B.; EVANS, P. R. *Ptilota plumosa*, a new source of a blood-group B specific lectin. **Medical Laboratory Sciences**, v. 34, p. 193-200, 1977.

ROGERS, D. L.; BLUNDEN, G. Structural properties of the anti-b lectin from the red alga *Ptilota plumose* (Huds). C. Ag. **Botanica Marina**, v. 23, n. 7, p. 459-462, 1980.

ROGERS D. J., LOVELESS R.W., BALDING P. Isolation and characterization of the lectins from sub-species of *Codium fragile*. **Walter de Gruyter**, v. 5, p. 155-160, 1986.

ROGERS D. J., LOVELESS R.W. Electron microscopy of human erythrocytes agglutinated by lectin from *Codium fragile* ssp. *tomentosoides* and pseudo-haemagglutinin from *Ascophyllum nodosum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 3, p. 83-86. 1991.

ROGERS D. J., HORI K. Marine algal lectins: new developments. **Hydrobiologia**, v. 260/261, p. 589-593. 1993.

SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2222 p. 2002.

- SAMENI, S.; HANDE, M. P. Plumbagin triggers DNA damage response, telomere dysfunction and genome instability of human breast cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 82, p. 256-268, 2016.
- SAMPAIO, A. H. Lectins from *Ulva* and *Ptilota* species. Ph.D Thesis. University of Portsmouth, Inglaterra, p. 191, 1997.
- SAMPAIO A. H., ROGERS D. J., BARWELL C. J. Isolation and characterization of the lectin from the green marine alga *Ulva lactuca*. **Botanica Marina**, v. 41, p. 765-769, 1998a.
- SAMPAIO A. H., ROGERS D. J., BARWELL C. J. A galactose specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 765-769, 1998b.
- SAMPAIO, A. H. *et al.* A new isolation and further characterization of the lectin from the red marine alga *Ptilota serrata*. **Journal of Applied Phycology**, v. 10, p. 539-546, 1999.
- SAMPAIO, A. H. *et al.* New affinity procedure for the isolation and further characterization of the blood group B specific lectin from the red marine alga *Ptilota plumosa*. **Journal of Applied Phycology**, v. 14, p. 489-496, 2002.
- SATO, Y. *et al.* Purification and characterization of a novel lectin from a fresh water cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. v. 125, p. 169-177, 2000.
- SATO, Y.; OKUYAMA, S.; HORI, K. Primary structure and carbohydrate-binding specificity of a potent anti-HIV lectin isolated from the filamentous cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 11021–11029, 2007.
- SATO, T.; HORI, K. Cloning, expression, and characterization of a novel anti-HIV lectin from the cultured cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. **Fish Science**, v. 75, p. 743–753, 2009.
- SATO, Y. *et al.* High mannose-specific lectin (KAA-2) from the red alga *Kappaphycus alvarezii* potently inhibits influenza virus infection in a strain-independent manner. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 405, p. 291–296, 2011a.
- SATO, Y. *et al.*, High Mannose-binding Lectin with Preference for the Cluster of α 1-2-Mannose from the Green Alga *Boodlea coacta* Is a Potent Entry Inhibitor of HIV-1 and Influenza Viruses. **The journal of Biological Chemistry**. v. 286, n. 22, 19446-19458, 2011b.
- SATO, Y. *et al.* High mannose-binding antiviral lectin PFL from *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 promotes cell death of gastric cancer cell MKN28 via interaction with α 2-integrin. **PLoS one**, v. 7, n. 9, p. e45922, 2012.
- SATO, Y. *et al.* Entry inhibition of influenza viruses with high mannose binding lectin ESA-2 from the red alga *Eucheuma serra* through the recognition of viral hemagglutinin. **Marine drugs**, v. 13, n. 6, p. 3454-3465, 2015.

SATO, Y. *et al.* High mannose-binding *Pseudomonas fluorescens* lectin (PFL) downregulates cell surface integrin/EGFR and induces autophagy in gastric cancer cells. **BMC cancer**, v. 16, n. 1, p. 63, 2016.

SCHAEFER, R. L.; KELLER, K. F.; DOYLE, R. J. Lectins in diagnostic microbiology: use of wheat germ agglutinin for laboratory identification of *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of clinical microbiology**, v. 10, n. 5, p. 669-672, 1979.

SCHALLA, W. O. *et al.* Epidemiological characterization of *Neisseria gonorrhoeae* by lectins. **Journal of clinical microbiology**, v. 22, n. 3, p. 379-382, 1985.

SCOTT, A. M.; ALLISON, J. P.; WOLCHOK, J. D. Monoclonal antibodies in cancer therapy. **Cancer Immunity Archive**, v. 12, n. 1, p. 14, 2012.

SCOTTO-LAVINO, E.; DU, G.; FROHMAN, M. 5' end cDNA amplification using classic RACE. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2555, 2006.

SELL, A. M., COSTA, C. P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 2, p. 297 - 303, 2000.

SHEVCHENKO, A. *et al.* In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes doi:10.1038/nprot.2006.468, **Nature Protocols**, v.1, p.2856-2860, 2007.

SHIOMI, K.; KAMIYA, H.; SHIMIZU, Y. Purification and characterization of an agglutinin in the red alga *Agardhiella tenera*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure**, v. 576, n. 1, p. 118-127, 1979.

SILVA L. M., *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from marine red alga *Pterocladia capillacea*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 5, p. 830-5, 2010.

SILVA, S. R. **Purificação e caracterização de CiL-2, uma nova lectina isolada da alga marinha verde *Codium isthmocladum* Vickers.** 2013, 72f. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca) - Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

SILVA, S. R. **Determinação da estrutura primária e análise do potencial biotecnológico de uma lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida* J. V. Lamouroux.** 2016, 91f. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca) - Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

SINGH, R. S.; WALIA, A. K. Lectins from red algae and their biomedical potential. **Journal of Applied Phycology**, p. 1-26, 2017.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. **Analytical biochemistry**, v. 209, n. 1, p. 32-44, 1993.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Structural composition of β I- and β II-proteins. **Protein Science**, v. 12, n. 2, p. 384-388, 2003.

SUGAHARA, T. *et al.* The cytotoxic effect of *Eucheuma serra* agglutinin (ESA) on cancer cells and its application to molecular probe for drug delivery system using lipid vesicles. **Cytotechnology**, v. 36, p.93-99, 2001.

SUTTISRISUNG, S. *et al.* Identification and characterization of a novel legume-like lectin cDNA sequence from the red marine algae *Gracilaria fisheri*. **Journal of Biosciences**, v. 36, n. 5, 2011.

TEIXEIRA, E. H. *et al.* Biological applications of plants and algae lectins: an overview. In: **Carbohydrates-Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology**. InTech, 2012.

TEMPLIER, V. *et al.* Ligands for label-free detection of whole bacteria on biosensors: A review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 71-79, 2016.

TORRE, L. A. *et al.* Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 25, n. 1, p. 16-27, 2016.

STILLMARK, P. H. **Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus comm. L. und einigen anderen Euphorbiaceen.** 1888. 125f. Thesis (Doctos der Medicin). Vol. University of Dorpat Dorpat (Estonian), 1888.

VANDERLEI, E. S. O. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. **International Immunopharmacology**, v. 10, i. 9, p. 1113-1118, 2010.

VIANA, G. S. B. *et al.* Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz. and *B. triquetrum* (S.G. Gmel.) M. Howe. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**. v. 35, n. 6, p. 713-722, 2002.

VIEIRA, L. A. P. *et al.* The alga *Bryothamnion seaforthii* contains carbohydrates with antinociceptive activity. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 37, n. 7, p. 1071-1079, 2004.

WANG, *et al.* Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines. **International Journal of Biochemistry e Cell Biology**. v. 32, n. 3, p. 365-372, 2000.

WANG, *et al.* Molecular Characterization of a New Lectin from the Marine Alga *Ulva pertusa*. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 36, n. 2, p. 111-117, 2004.

WHITLEY, *et al.* *Burkholderia oklahomensis* agglutinin is a canonical two-domain OAA-family lectin: structures, carbohydrate binding and anti-HIV activity. **FEBS Journal**, v. 280, p. 2056-2067, 2013.

WHITMORE, L; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392-400, 2008.

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

XIONG, C. *et al.* Overexpression and purification of scytovirin, a potent, novel anti-HIV protein from the cultured cyanobacterium *Scytonema varium*. **Protein expression and purification**, v. 46, n. 2, p. 233-239, 2006.

YAMAGUCHI, M. *et al.* Isolation and characterization of a mannan-binding lectin from the freshwater cyanobacterium (blue-green algae) *Microcystis viridis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 265, n. 3, p. 703-708, 1999.

YAO, D.; PAN, S.; ZHOU, M. Structural characterization and antitumor and mitogenic activity of a lectin from the gill of bighead carp (*Aristichthys nobilis*). **Fish physiology and biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 1815-1824, 2012.

YOON, K. S. *et al.* Molecular Characterization of the Lectin, bryohealin, involved in protoplast regeneration of the Marine alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 44, p. 103-112, 2008.

ZHENG, Y.; YU, P.; LIU, Y. Purification and partial characterization of *Chlorella pyrenoidosa* lectin. **Acta Hydrobiologica Sinica**, v. 27, n. 1, p. 36-40, 2003.

ZIÓŁKOWSKA, N. E.; WLODAWER, A. Structural studies of algal lectins with anti-HIV activity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, p. 617-626, 2006.