



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

PHILIPPE LIMA DUARTE

LECTINA RELACIONADA AO FIBRINOGENÍO DO OURIÇO-DO-MAR
***Echinometra lucunter*: ISOLAMENTO, SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS E**
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

FORTALEZA

2021

PHILIPPE LIMA DUARTE

LECTINA RELACIONADA AO FIBRINOGÊNIO DO OURIÇO-DO-MAR *Echinometra*
lucunter: ISOLAMENTO, SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA

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

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.

FORTALEZA

2021

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

- D8741 Duarte, Philippe Lima.
Lectina relacionada ao fibrinogênio do ouriço do mar *Echinometra lucunter*: isolamento, sequência de aminoácidos e atividade antimicrobiana / Philippe Lima Duarte. – 2021.
66 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.
1. Equinodermos. 2. Lectina. 3. Espectrometria de massas. 4. Imunidade inata. 5. Bactérias patogênicas. I. Título.

CDD 639.2

PHILIPPE LIMA DUARTE

LECTINA RELACIONADA AO FIBRINOGENÍO DO OURIÇO-DO-MAR *Echinometra lucunter*: ISOLAMENTO, SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

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

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos
Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar meus passos e iluminar meu caminho.

Aos meus pais, Veraltina e José Mauro, pelo apoio em todos os momentos e por sempre acreditarem em mim. Amo vocês.

À minha família, especialmente aos meus irmãos, Amábyle e Matheus, pelas brigas, momentos felizes e companheirismo.

Às minhas saudosas tias, Meyrilande e Rivanda, pois sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado. Saudades.

Aos meus avós, Maria e Antônio, pelo carinho, amor e acolhimento.

Aos meus tios e tias que sempre me apoiaram. Em especial as minhas tias, Maria Neuziran e Erivânia.

Ao meu orientador, Rômulo Farias Carneiro, pelos ensinamentos, oportunidades, amizade e paciência. Gratidão por tudo.

Aos professores Celso Shiniti Nagano e Alexandre Holanda Sampaio, pelos ensinamentos e oportunidades.

À Renata, pela ajuda e ensinamentos.

Ao professor Alexandre Lopes, pela ajuda e ensinamentos.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Andressa, Alexandra, Jéssica, Juliana, Regivânio, Renato, Victoria Régia, Maria Luiza, Lívia, Pedro, Levi, Manoel, Maurilio e Vinícius, por tornarem os dias mais leves.

Aos meus amigos que fiz durante a graduação, Ana Larissa, Edson, Danilo, Larissa, Larissa Pinto, Jhonatas, Álvaro, Thifany e Bárbara, pelo carinho e apoio.

Ao professor participante da banca examinadora Mayron Alves de Vasconcelos pelo tempo, colaboração e sugestões.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por fomentar a bolsa.

GRATIDÃO.

“I’m Not Alone” (Calvin Harris)

RESUMO

Uma das primeiras linhas de defesa dos invertebrados está relacionada ao reconhecimento dos patógenos por receptores/proteínas de reconhecimento padrão (PRRs/PRPs) e moléculas de reconhecimento. Dentre elas, destacam-se as proteínas relacionadas ao fibrinogênio (FRePs) identificadas nos invertebrados e que, em sua maioria, atuam como PRPs desempenhando papéis importantes na aglutinação microbiana, lise e *clearance* bacteriano e na defesa antiparasitária. Uma lectina relacionada ao fibrinogênio chamada de ELL foi isolada do fluido celomático do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* por cromatografia de afinidade em goma de xantana. ELL é um dímero composto por subunidades de 25 kDa, unidas por uma ligação dissulfeto. A nova lectina foi inibida por glicoproteínas como mucinas tipo II e III de estômago de porco (PSM II e PSM III), mucina submaxilar bovina (BSM) e tiroglobulina. A sequência de aminoácidos de ELL foi determinada por espectrometria de massas. O monômero de ELL consiste de 229 aminoácidos, incluindo sete cisteínas envolvidas em três ligações dissulfeto intracadeia conservadas e uma ligação dissulfeto intercadeia. A sequência completa de ELL possui motivos conservados e domínio de fibrinogênio na porção C-terminal típico de proteínas relacionadas ao fibrinogênio. Um modelo tridimensional de ELL foi previsto por homologia, revelando que a proteína possui dois domínios de reconhecimento a carboidratos (DRCs), o DRC A está localizado na região N-terminal e parece interagir com *N*-acetil-manosamina e o DRC B encontra-se na porção C-terminal e pode ligar-se a *N*-acetil-galactosamina. Em ensaios de atividade antimicrobiana, ELL foi capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas patogênicas, além de reduzir a biomassa e viabilidade celular do biofilme formado por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, evidenciando sua capacidade de reconhecer patógenos, além da atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: equinodermos; lectina; espectrometria de massas; imunidade inata; bactérias patogênicas.

ABSTRACT

One of the first lines of defense for invertebrates is related to the recognition of pathogens by standard recognition receptors/proteins (PRRs/PRPs) and recognition molecules. Among them, fibrinogen-related proteins (FRePs) that are identified in invertebrates stand out, and that, in their majority, act as PRPs playing important roles in microbial agglutination, bacterial lysis and clearance and in antiparasitic defense. A fibrinogen-related lectin called ELL was isolated from the coelomic fluid of the sea urchin *Echinometra lucunter* by affinity chromatography on xanthan gum. ELL is a dimer composed of 25 kDa subunits, joined by a disulfide bond. The new lectin was inhibited by glycoproteins such as porcine stomach mucins type II and III (PSM II, PSM III), bovine submaxillary mucin (BSM) and thyroglobulin. The amino acid sequence of ELL was determined by mass spectrometry. The ELL monomer consists of 229 amino acids, including seven cysteines involved in three conserved intrachain disulfide bonds and an interchain disulfide bond. The complete ELL sequence has conserved motifs and fibrinogen domain in the typical C-terminal portion of fibrinogen-related proteins. A three-dimensional model of ELL was predicted by homology, revealing that the protein has two carbohydrate recognition domains (CRDs), CRD A is located in the N-terminal region and appears to interact with *N*-acetyl-mannosamine and CRD B is found in the C-terminal and can bind to *N*-acetyl-galactosamine. In assays of antimicrobial activity, ELL was able to inhibit the growth of pathogenic Gram-positive bacteria, in addition to reducing the biomass and cell viability of the biofilm formed by Gram-positive and Gram-negative bacteria, showing its ability to recognize pathogens, in addition to antimicrobial activity.

Keywords: echinoderms; lectin; mass spectrometry; innate immunity; pathogenic bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplos de equinodermos.....	12
Figura 2 – Morfologia do ouriço-do-mar.....	14
Figura 3 – SDS-PAGE da cromatografia de afinidade.....	34
Figura 4 – Espectro de massas de ELL.....	37
Figura 5 – Sequência de aminoácidos de ELL.....	39
Figura 6 – Comparação da sequência de aminoácidos de ELL com FRePs de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	40
Figura 7 – Comparação da sequência de aminoácidos de ELL com FRePs de equinodermos.....	41
Figura 8 – Comparação da sequência de aminoácidos de ELL com FRePs de cordados...	42
Figura 9 – Comparação da sequência entre ELL e XEEL.....	43
Figura 10 – Árvore filogenética de lectinas contendo domínio do tipo fibrinogênio.....	44
Figura 11 – Modelo da estrutura tridimensional de ELL.....	45
Figura 12 – Modelo tridimensional de ELL com seus ligantes.....	46
Figura 13 – Formação do biofilme de <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> e <i>E. coli</i> na presença de ELL.....	47

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Cromatografia de afinidade em matriz de goma de xantana do extrato de <i>Echinometra lucunter</i>	32
Gráfico 2 – Perfil cromatográfico de ELL em gel filtração.....	33
Gráfico 3 – Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante de ELL.....	35
Gráfico 4 – Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante de ELL.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade hemaglutinante de ELL contra eritrócitos humanos do tipo sanguíneo O.....	33
Tabela 2 – Inibição da atividade hemaglutinante de ELL.....	34
Tabela 3 – Sequência de aminoácidos dos peptídeos de ELL.....	37
Tabela 4 – Efeitos da ELL em células planctônicas de bactérias.....	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Equinodermos.....	12
1.2	Filo Echinodermata.....	13
1.3	Lectinas.....	15
<i>1.3.1</i>	<i>Histórico.....</i>	<i>15</i>
<i>1.3.2</i>	<i>Lectinas de animais.....</i>	<i>15</i>
<i>1.3.3</i>	<i>Lectinas de equinodermos.....</i>	<i>16</i>
<i>1.3.4</i>	<i>Estrutura de lectinas de equinodermos.....</i>	<i>18</i>
1.4	Proteínas relacionadas ao fibrinogênio em invertebrados.....	20
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	Objetivo geral.....	23
2.2	Objetivos específicos.....	23
3	METODOLOGIA	24
3.1	Coleta dos animais.....	24
3.2	Preparação do extrato.....	24
3.3	Determinação da atividade hemaglutinante.....	24
3.4	Estudo de inibição da atividade hemaglutinante.....	25
3.5	Purificação da lectina.....	25
3.6	Avaliação da pureza e estimativa da massa molecular da lectina purificada.....	26
3.7	Efeito do pH, temperatura e íons divalentes na atividade hemaglutinante..	26
3.8	Determinação da massa molecular através de espectrometria de massas....	27
3.9	Determinação da sequência de aminoácidos através de espectrometria de massas.....	27
3.10	Análises de sequência.....	28
3.11	Predição estrutural.....	28
3.12	Inibição da formação de biofilme bacteriano.....	29
<i>3.12.1</i>	<i>Microrganismos e condições de cultura.....</i>	<i>29</i>
<i>3.12.2</i>	<i>Efeito da lectina em células planctônicas.....</i>	<i>29</i>
<i>3.12.3</i>	<i>Ensaio de formação de biofilme.....</i>	<i>30</i>
<i>3.12.4</i>	<i>Quantificação da massa de biofilme.....</i>	<i>30</i>

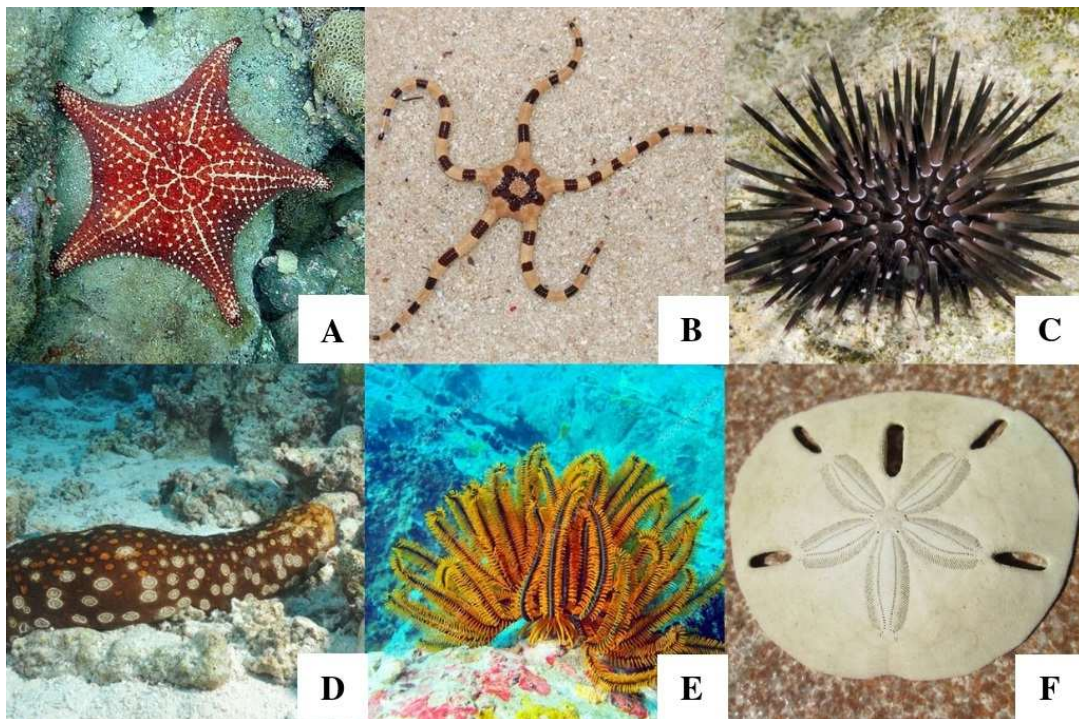
3.12.5	<i>Quantificação do número de células viáveis de biofilme</i>	30
3.13	Análise estatística.....	31
4	RESULTADOS	32
4.1	Purificação da lectina.....	32
4.2	Atividade hemaglutinante.....	33
4.3	Inibição da atividade hemaglutinante.....	33
4.4	Avaliação da pureza e estimativa de massa molecular da lectina purificada.....	34
4.5	Efeito do pH, temperatura e íons divalentes na atividade hemaglutinante..	35
4.6	Determinação da massa molecular através de espectrometria de massas....	36
4.7	Estrutura primária de ELL.....	37
4.8	Predição estrutural de ELL.....	44
4.9	Atividade antimicrobiana de ELL.....	46
4.9.1	<i>Efeito da lectina em células planctônicas</i>	46
4.9.2	<i>Quantificação da massa e do número de células viáveis de biofilme</i>	47
5	DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 Equinodermos

Os equinodermos (do grego *equino* [espinho, ouriço] e *dermo* [pele]) são animais deuterostômios com a pele coberta por tubérculos e espinhos (origem do nome), que possuem simetria radial (pentarradial em adultos) e esqueleto interno formado por ossículos calcários ou placas calcárias (CARY; HINMAN, 2017; KALININ, 2021). Apresentam um sistema de canais e tubos derivados do celoma (sistema hidrovacular) que se abre para o exterior permitindo a saída de apêndices utilizados para a locomoção (VARGAS; ZARDOYA, 2012; NEWTON; DENNIS, 2021). Os principais representantes do Filo Echinodermata são estrelas-do-mar, ofiuroides, ouriços-do-mar, pepinos-do-mar, bolachas-do-mar e os lírios-do-mar (Figura 1).

Figura 1- Exemplos de equinodermos.



Fonte: Compilação do autor¹. Legenda: A - Estrela-do-mar; B – Ofiuroides; C - Ouriço-do-mar; D - Pepino-do-mar; E - Lírios-do-mar; F - Bolacha-do-mar.

¹ Montagem de imagens coletadas dos sites: (A) <http://www.trilhasemergulho.com.br>; (B) <https://www.poissonor.com>; (C) <https://calphotos.berkeley.edu>; (D) <https://petfriends.com.br>; (E) <https://st.depositphotos.com>; (F) <https://c1.staticflickr.com>.

Além disso, o sistema hidrovascular é responsável por realizar funções básicas, como coleta e transporte de alimentos, locomoção e respiração, além de concentrar neurônios sensoriais nas extremidades dos pés (CLARK *et al.*, 2017).

O Filo Echinodermata compreende um grupo de animais marinhos com cerca de 7.000 espécies atuais e 13.000 espécies fósseis, classificados atualmente em 300 famílias e 2.000 gêneros (ITIS, 2013). São animais que possuem uma grande variedade de tamanho, sendo encontrados organismo com 10 mm de comprimento, *Rhabdomolgus ruber* (pepino-do-mar) até espécies com mais de 3,3 m de comprimento, *Synapta maculata* (pepino-do-mar) e 1 m de diâmetro *Evasterias echinosoma* (estrela-do-mar) (VARGAS; ZARDOYA, 2012).

Os equinodermos são exclusivamente marinhos e vivem da linha de costa às profundezas abissais. São especialmente interessantes por seu extenso registro fóssil, plano corporal pentarradial (com planos assimétricos intermediários), variedade de padrões morfológicos, propriedades biomecânicas incomuns e grande diversidade em ambientes marinhos (O'HARA; BYRNE, 2017; KALININ, 2021).

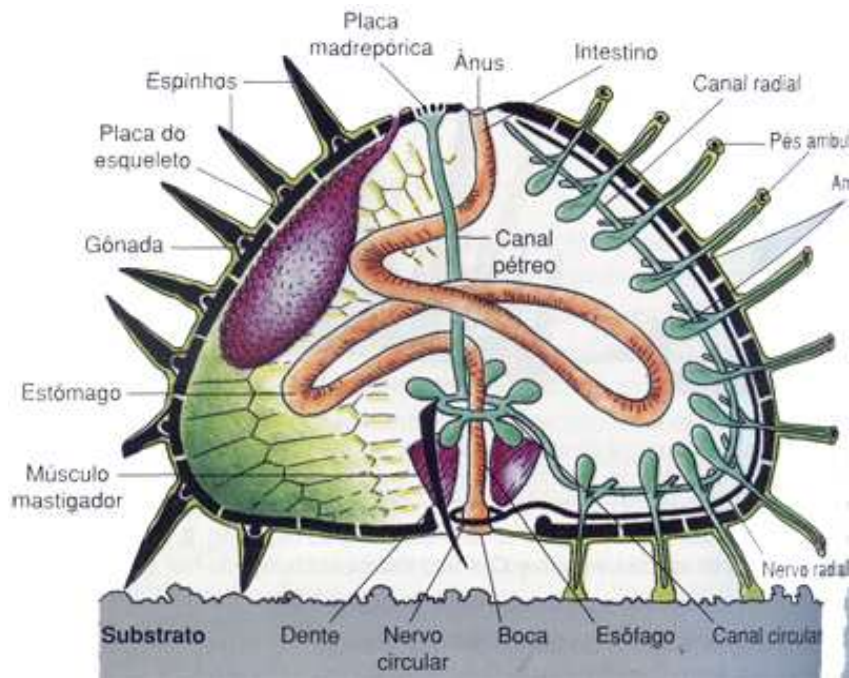
1.2 Filo Echinodermata

O filo Echinodermata surgiu no período Cambriano, há cerca de 600 milhões de anos e devido ao abundante registro fóssil, são reconhecidas cerca de 25 classes. Existem as formas pós-paleozóicas que podem ser observadas hoje e são classificados em cinco classes (Crinoidea, Asteroidea, Ophiuroidea, Holothuroidea e Echinoidea), enquanto que as demais classes são Paleozóicas (KUDTAKAR; CAMERON, 2017; O'HARA; BYRNE, 2017).

Os equinodermos atuais mantêm as características mais importantes do filo Echinodermata. Este filo divide-se, com base nas características morfológicas, em dois subfilos: 1) Eleuterozoa, que normalmente são de vida livre e os mais antigos têm a boca orientada para o substrato, e incluem quatro classes (Echinoidea, Asteroidea, Holothuroidea e Ophiuroidea); e 2) Pelmatozoários, no qual os indivíduos adultos vivem fixados ao substrato com a boca orientada para cima e têm como únicos representantes atuais os equinodermos da classe Crinoidea (VARGAS; ZARDOYA, 2012).

A classe Echinoidea representa os equinodermos de movimento livre, que possuem espinhos móveis que recobrem o corpo, forma circular ou oval, e o corpo é esférico ou achatado ao longo do eixo oral/aboral. A classe é interessante pois existem membros com simetrias tanto radial (característica do filo) quanto bilateral (RUPPERT *et al.*, 2005). (Figura 2).

Figura 2- Morfologia do ouriço-do-mar.



Fonte: <https://planetabiologia.com/wp-content/uploads/2014/12/Anatomia-do-Ouri%C3%A7o.jpg>.

Os equinodermos radiais da classe Echinoidea são conhecidos como ouriços-do-mar, estes animais possuem o corpo relativamente esférico com vários espinhos móveis. O corpo do ouriço pode ser dividido em dois polos (oral/aboral), no polo oral, encontra-se a boca que é voltada para o substrato e uma membrana peristomial, ainda neste polo pode-se observar a presença de pés ambulacrais bucais e projeções chamadas de brânquias. O polo aboral contém o periprocto (ânus) e cinco seções contendo pés ambulacrais para a movimentação (AGNELLO *et al.*, 2017; KALININ, 2021).

Equinoideos bilaterais conhecidas como bolachas-do-mar, apresentam adaptações para escavar na areia. Em contraste aos ouriços, as bolachas apresentam uma concha recoberta por pequenos espinhos, são achatadas e os pés ambulacrais são modificados para realizar trocas gasosas (O'HARA; BYRNE, 2017; RUPPERT *et al.*, 2005).

Em geral, ouriços e bolachas-do-mar alimentam-se principalmente de algas, porém podem ser generalistas dependendo da área em que vivem. O fluido celomático é o principal meio para o transporte interno e realização de trocas gasosas, quanto a reprodução, são animais dioicos e o desenvolvimento larval é externo (RUPPERT *et al.*, 2005).

1.3 Lectinas

1.3.1 Histórico

Proteínas aglutinantes de eritrócitos são conhecidas desde o final do século XIX, inicialmente eram denominadas de fitohemaglutininas ou fitoaglutininas por serem encontradas em extrato de plantas (SHARON; LIS, 2004). Porém, ao passar dos anos tais proteínas foram sendo descobertas em outros organismos, como fungos, algas, animais e vírus (SAMPAIO *et. al.*, 1998).

O termo lectina (do latim *legere*, escolher, selecionar, optar) foi proposto em 1954 para denominar aglutininas com habilidade de distinguir eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos (BOYD; SHAPLEIGH, 1972). O termo lectina foi generalizado para todas as aglutininas específicas de carboidratos e de origem não imune (SHARON; LIS, 1972).

As lectinas eram pouco evidenciadas no meio científico, até que duas grandes descobertas na década de 1960 mudaram este cenário. A primeira está relacionada a descoberta da PHA (*Phaseolus vulgaris agglutinin*) por Peter C. Nowell, lectina do feijão vermelho que é capaz de estimular linfócitos a entrarem em mitose. Tal descoberta impactou a imunologia, pois acreditava-se que os linfócitos eram células incapazes de dividir-se ou diferenciar-se (NOWELL, 1960).

A segunda foi a descoberta da WGA (*wheat germ agglutinin*) por Joseph Aub, lectina capaz de aglutinar preferencialmente células malignas (AUB *et al.*, 1965), assim iniciava-se a utilização de lectinas para estudo do câncer.

Em 1965, foi introduzida a cromatografia de afinidade, uma técnica que facilitava o isolamento das lectinas. Essa metodologia conduziu a um rápido aumento no número destas proteínas purificadas (SHARON, 2008). A partir daí a propriedade biológica das lectinas vem sendo utilizada como ferramenta bioquímica em estudos de interação com carboidratos, na imunologia e em diversas outras áreas.

1.3.2 Lectinas de animais

Em 1986, Mitchell e Reichert publicaram um artigo relatando o estudo sobre o veneno de cascavel, e nele havia a descrição explícita da aglutinação, apesar do termo lectina não ter sido usado. Este artigo foi publicado dois anos antes da primeira descrição de Herman Stillmark da atividade de lectina de planta (KILPATRICK; GREEN, 1992). Mitchell, na

verdade, observou a atividade de lectinas de veneno de cascavel antes de 1860, sendo assim, o primeiro pesquisador a explorar a atividade de lectina animal (KILPATRICK, 2002).

A primeira lectina animal foi isolada de uma enguia por Watkins e Morgan em 1952, que mostrou ser específica a L-fucose. Nos anos posteriores, foram isoladas as lectinas do caranguejo-ferradura, *Tachypleus tridentatus* (MARCHALONIS; EDELMAN, 1968) e do escargot, *Helix pomatia* (HAMMARSTROM; KABAT, 1969). David Kilpatrick definiu lectinas animais como “proteínas ou glicoproteínas que reconhecem e interagem com carboidratos específicos, sem participarem do metabolismo dos mesmos e nem pertencerem a qualquer das principais classes de imunoglobulinas” (KILPATRICK, 2000). Posteriormente, Sampaio definiu lectinas como proteínas capazes de se ligarem reversivelmente a carboidratos específicos, sem modificar a estrutura dos mesmos (SAMPAIO *et al.*, 2002).

Lectinas de animais apresentam diversas funções, tais como encaminhamento intracelular de glicoconjugados e chaperonas moleculares durante a síntese de glicoproteínas, dentre outras (KILPATRICK, 2002). Porém a principal função das mesmas é atuar como moléculas de reconhecimento dentro do sistema imunológico, e este papel pode ser dividido em quatro categorias: 1) defesa direta; 2) reconhecimento e tráfico dentro do sistema imunológico; 3) regulação imune; e 4) prevenção da auto-imunidade (KILPATRICK, 2002).

Inicialmente as lectinas de animais foram divididas em duas famílias, as lectinas do tipo S, dependentes de sulfidril e as lectinas tipo C, dependentes de cálcio. Todavia com os avanços dos estudos de caracterização estrutural, tais premissas citadas anteriormente se tornaram obsoletas. Atualmente, as lectinas de animais estão classificadas em famílias relacionadas aos domínios de reconhecimento a carboidratos, como: Calnexinas, tipo P, tipo M, tipo L, tipo C, tipo R, tipo S, tipo F, ficolinas e lectinas do tipo quitinase (KILPATRICK, 2000; LAVANYA *et al.*, 2014).

1.3.3 Lectinas de equinodermos

Nos últimos anos, um número significativo de lectinas presentes em invertebrados marinhos foi isolado, e os estudos sugerem que elas representam um componente importante na defesa destes organismos, sendo parte do sistema imune inato dos animais (PEES *et al.*, 2016).

Quando comparamos o número de lectinas isoladas de invertebrados marinhos com a diversidade de lectinas purificadas de vertebrados e plantas, notamos que há uma escassez em trabalhos voltados para esta categoria de animais (MELO *et al.*, 2014). Em

alguns filos de invertebrados, incluindo Echinodermata, existem trabalhos relacionados a detecção, isolamento e caracterização dessas moléculas.

Atualmente, apenas cerca de trinta lectinas foram isoladas de equinodermos, sendo este um número pequeno se levarmos em consideração a quantidade e a diversidade de espécies existentes. A classe Holothuroidea é a mais explorada pelos lectinologistas, enquanto as classes Asteroidea, Echinoidea, Crinoidea e Ophiuroidea possuem poucas espécies com lectinas isoladas (CARNEIRO, 2017).

A especificidade para galactosídeos parece ser uma característica comum entre as lectinas isoladas do Filo Echinodermata (WANG *et al.*, 2018; DE MELO *et al.*, 2014; HATAKEYAMA *et al.* 1994). Entretanto, já fora descrita a especificidade para manose (BULGAKOV *et al.*, 2013; BULGAKOV *et al.*, 2007; BULGAKOV *et al.*, 2000), GlcNAc (SEIKE; SHIBATA; SUYEMITSU, 1992) e carboidratos complexos (GIGA; IKAI; TAKAHASHI, 1987).

A organização estrutural e a massa molecular das lectinas de equinodermos podem ser muito variáveis, já tendo sido relatada a existência de subunidades entre 15.000 e 114.000 Da, formando ocasionalmente, dímeros, tetrâmeros e octâmeros (MOURA *et al.*, 2013; GOWDA; GOSWAMI; KHAN, 2008; SEIKE; SHIBATA; SUYEMITSU, 1992) ligados por pontes dissulfeto (BULGAKOV *et al.*, 2007). Além disso, a presença de isoformas foram observadas em lectinas de equinodermos (CARNEIRO *et al.*, 2015).

As lectinas de equinodermos apresentam atividades biológicas primordialmente relacionadas a ação antibacteriana, visto que as mesmas representam a primeira linha de defesa destes organismos contra infecções, atuando como opsoninas, reconhecendo e ligando-se a patógenos e posteriormente, desencadeando a fagocitose por células especializadas (BULGAKOV *et al.*, 2007; BULGAKOV *et al.*, 2013; PETROVA *et al.*, 2009). As lectinas isoladas dos equinodermos *Holothuria scabra*, *Echinometra lucunter* e *Apostichopus (Sticopus) japonicus* apresentaram, respectivamente, atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, aglutinação em *Staphylococcus aureus* e aglutinação em *Vibrio anguillarum*, *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* (CARNEIRO *et al.*, 2015; GOWDA; GOSWAMI; KHAN, 2008; ONO *et al.*, 2018).

A lectina do pepino-do-mar *Cucumaria echinata*, exibe atividade hemolítica contra eritrócitos de sangue humano e de coelho, além de estruturalmente assemelhar-se com proteínas citotóxicas de plantas (ricina e abrina) (NAKANO *et al.*, 1999). *Holothuria grisea*, possui uma lectina denominada HGA, considerada a primeira lectina de invertebrado marinho que exibe efeito anti-inflamatório (MOURA *et al.*, 2013).

1.3.4 Estrutura de lectinas de equinodermos

As lectinas de equinodermos têm representantes nas seguintes famílias: lectinas do tipo C, tipo R e RBLs (lectinas ligantes de ramnose) (CARNEIRO, 2017). Além destas, também são encontradas lectinas órfãs, isto é, lectinas com estrutura primária determinada, mas que não pertencem a qualquer família conhecida.

Lectinas do tipo C são proteínas que possuem um domínio lectínico do tipo C (*C-Type Lectin Domain* - CTLD), o qual é caracterizado estruturalmente por possuir um *loop* duplo estabilizado por duas pontes dissulfeto altamente conservadas. Anteriormente essas lectinas eram reconhecidas como dependentes de cálcio, porém hoje é notório que nem todo CTLD é capaz de ligar-se ao íon cálcio (ZELENSKY; GREASY, 2005). As lectinas dos equinodermos *Anthocidaris crassispina* e *Strongylocentrotus nudus* são exemplos de lectinas do tipo C (BULGAKOV *et al.*, 2013; GIGA; IKAI; TAKAHASHI, 1987).

Equinoidina, lectina assim isolada a partir do fluido celomático do ouriço-do-mar *Anthocidaris crassispina*, é uma proteína oligomérica do tipo C, com subunidades contendo 147 aminoácidos e uma massa molecular de aproximadamente 17kDa. Equinoidina teve sua estrutura primária elucidada por degradação de Edman e as previsões de estrutura secundária revelaram uma proteína rica em folhas beta com poucas estruturas em alfa-hélice. A proteína mostrou-se semelhante a porções de reconhecimento a carboidratos do C-terminal de lectinas de ligação à manose, com possível função de reconhecimento celular dentro do organismo (GIGA; IKAI; TAKAHASHI, 1987).

A lectina isolada do fluido celomático do ouriço-do-mar *Strongylocentrotus nudus*, SN-MBL, é uma proteína do tipo C ligante à manose, composta de monômeros com 144 aminoácidos e massa molecular de 17 kDa, na forma nativa a lectina forma tetrâmeros. A estrutura primária de SN-MLS foi determinada por técnicas de biologia molecular e a estrutura terciária proposta por modelagem revela uma proteína com duas cadeias, alfa e beta, compostas por oito fitas beta e duas alfa-hélices (ELISEIKINA *et al.*, 2004).

As lectinas do tipo R são membros de uma superfamília de proteínas, todas contendo um domínio de reconhecimento à carboidratos (DRC) que é estruturalmente semelhante ao DRC da ricina, proteína tóxica isolada de sementes da mamona *Ricinus communis* (CUMMINGS; ETZLER, 2009). No Filo Equinodermata, o pepino-do-mar *Cucumaria echinata* possui uma lectina (CEL-III) pertencente a esta família (NAKANO *et al.*, 1999).

CEL-III é uma lectina hemolítica do tipo R com 432 aminoácidos e um peso

molecular de 45 kDa. Em comparações com outras proteínas, a mesma apresenta similaridade com a cadeia beta de lectinas de plantas citotóxicas. CEL-III é uma das poucas lectinas de equinodermos que possuem estrutura tridimensional elucidada, sendo caracterizada por três domínios distintos, nos quais dois deles são domínios de reconhecimento a carboidratos que assemelham-se aos motivos conservados da cadeia beta da ricina e o terceiro domínio é constituído de uma estrutura do tipo beta-sanduiche com duas alfa-hélices (NAKANO *et al.*, 1999; UCHIDA *et al.*, 2004).

Um importante estudo realizado, a partir da caracterização estrutural de CEL-III, foi possível sua expressão no intestino de mosquitos transgênicos, sendo observado que a lectina foi capaz de inibir o desenvolvimento esporogônico de *Plasmodium berghei*, parasita causador da malária (YOSHIDA *et al.*, 2007).

As lectinas ligantes a ramnose (RBLs) estão inseridas na família de lectinas animais que se ligam especificamente a L-ramnose ou D-galactose. Representantes da família RBL foram encontrados em mais de 25 espécies de peixes, pertencentes às ordens Clupeiformes, Salmoniformes, Osmeriformes, Siluriformes, Perciformes e Cypriniformes (KILPATRICK, 2002; WATANABE *et al.*, 2009).

RBLs foram encontradas não apenas em peixes, mas também em ouriço-do-mar (*Anthocidaris crassispina*), ostra (*Pteria penguin*) e ascídia (*Botryllus schlosseri*) (NAGANUMA *et al.*, 2006; GASPARINI *et al.*, 2008). A maioria das RBLs é composta por dois ou três domínios de reconhecimento de carboidratos característicos repetidos em *tandem* (RBL DRCs), que consistem em cerca de 95 resíduos de aminoácidos e são classificados em 5 subgrupos com base em sua estrutura de domínio, atividade hemaglutinante em eritrócitos humanos e especificidade a açúcar (KILPATRICK, 2002; WATANABE *et al.*, 2009; OZEKI *et al.*, 1991; NAGANUMA *et al.*, 2006; GASPARINI *et al.*, 2008; NITTA *et al.*, 2007). As lectinas isoladas dos equinodermos *Toxopneustes pileolus* e *Echinometra lucunter*, pertencem a família das RBLs (CARNEIRO *et al.*, 2015; SAKAI *et al.*, 2013).

SUL-I, lectina do ouriço-do-mar *Toxopneustes pileolus*, é uma proteína ligante a ramnose composta por 308 aminoácidos e uma massa de 32 kDa. Sua estrutura primária foi determinada por técnicas de biologia molecular e sua estrutura terciária elucidada por cristalografia de raios-X. SUL-I é composta por três domínios distintos com uma estrutura dobrável semelhante à de CSL3, uma RBL de ovos de salmão (*Oncorhynchus keta*). A ligação da L-ramnose a lectina é mediada por pontes de hidrogênio nos locais de interação compostos pelos aminoácidos Asp, Asn e Glu, enquanto os resíduos Tyr e Ser participam do mecanismo de reconhecimento. SUL-I é capaz de formar dímeros em soluções (HATAKEYAMA *et al.*,

2015; HATAKEYAMA *et al.*, 2017).

ELEL, isolada dos ovos do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*, é uma lectina ligante a ramnose composta por 103 aminoácidos. ELEL é um homodímero unido por pontes dissulfeto com subunidades de 11 kDa. Sua estrutura primária foi determinada por espectrometria de massas e nela existem motivos conservados comumente encontrados em RBLs. Em ensaios de atividade biológica, ELEL mostrou-se capaz de aglutinar bactérias patogênicas Gram-positivas da espécie *Staphylococcus aureus* (CARNEIRO *et al.*, 2015).

1.4 Proteínas relacionadas ao fibrinogênio em invertebrados

Proteínas relacionadas ao fibrinogênio ou FRePs constituem uma grande família de moléculas, definidas pela presença de um domínio relacionado ao fibrinogênio. Essas moléculas são encontradas em todos os animais e são diversas em forma e função. Em invertebrados são importantes na imunidade inata, reconhecendo padrões moleculares associados a patógenos em superfícies de bactérias via domínio conservado semelhante a fibrinogênio (FBG) (GORDY; PILA; HANINGTON, 2015; JIANG *et al.*, 2018).

O sistema imune inato é ativado pelos chamados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que podem reconhecer os distintos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (OLIVE, 2012; BEUTLER, 2004). Atualmente, mais de 10 tipos de PRRs são encontrados em invertebrados, incluindo FRePs, proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos (PGRPs) (KURATA, 2014), proteínas de ligação a bactérias Gram-negativas (GNBP) (HUGHES 2012), lipopolissacarídeos e proteínas de ligação β -1,3-glucana (LGBPs) (PHUPET *et al.*, 2018; SIVAKAMAVALL *et al.*, 2015), lectinas do tipo C (WEI *et al.*, 2012), galectinas (SONG *et al.*, 2010), proteínas contendo tioéster (TEPs), receptores *scavenger* (SRs), moléculas de adesão celular da síndrome de Down (DSCAMs) e receptores *Toll like* (TLRs). Suas conexões com uma resposta imune inata também são investigadas em vertebrados (QIN *et al.*, 2020; TIAN *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2021).

Os domínios do tipo fibrinogênio foram conservados ao longo da evolução animal, estando presentes em eucariotos unicelulares, como o coanoflagelado *Monosiga brevicollis* e são encontrados em grande abundância em genomas de cordados, como exemplificado no anfioxus *Branchiostoma floridae* (KING *et al.*, 2008).

Os sistemas modelos de artrópodes e moluscos ajudaram a compreender os papéis funcionais que as proteínas relacionadas ao fibrinogênio (FRePs) desempenham na defesa de invertebrados contra o desafio de patógenos. As FRePs desses dois filos diferem em

sua composição estrutural, mas são unificados pela presença de domínios de fibrinogênio bem definidos (HUANG *et al.*, 2008).

Em invertebrados, muitas FRePs também foram identificadas de diferentes espécies, como molusco (*Biomphalaria glabrata*; *Argopecten irradians*), echinodermata (*Strongylocentrotus purpuratus*), artrópodes (*Pacifastacus leniusculus*; *Marsupenaeus japonicus*) e braquiópodes (*Lingua anatina*) (ADEMA *et al.*, 1997; TUCKER; CHIQUET-EHRISMANN, 2009). Elas comumente contêm um domínio FBG no C-terminal. O domínio FBG com aproximadamente 200 resíduos de aminoácidos é altamente conservado em todas as proteínas contendo o domínio FBG, que é responsável pela ligação a carboidratos e patógenos com os resíduos hidrofóbicos conservados (JIANG *et al.*, 2018). Suas funções em invertebrados têm sido demonstradas na defesa imunológica, como reconhecimento de patógenos e defesa bacteriana (DAI *et al.*, 2017).

Intelectinas, ficolinas e taquilectinas, são exemplos de FRePs. As intelectinas são proteínas pertencentes a superfamília das lectinas e atuam como receptores de ligação a glicanos, reconhecendo epítomos de glicanos em patógenos dentro do sistema imunológico inato (HAYASHIBE; NAKAYAMA; OGASAWARA, 2017). No entanto, as intelectinas não possuem quaisquer domínios conhecidos de reconhecimento a carboidratos (CRD), como os encontrados nas lectinas do tipo C ou do tipo S. Na estrutura do domínio, as intelectinas têm dois domínios altamente conservados denominados FReD (domínio relacionado ao fibrinogênio) e domínio da intelectina (ID) (CHEN; LI; YANG, 2020; LIN *et al.*, 2009). Embora o mecanismo de reconhecimento a carboidratos não seja totalmente compreendido em intelectinas, o domínio ID na região C-terminal, característico da família, foi avaliado como um local que possui especificidades para a ligação de sacarídeos (TSUJI *et al.*, 2007). Intelectinas foram isoladas de diferentes organismos, como anfioxos (AmphiITLN71469), peixes (zITLN e zITLN2) e humanos (hITLN1) (CHEN *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2016; YAN *et al.*, 2012; TSUJI *et al.*, 2001).

As ficolinas são uma família de proteínas oligoméricas que consiste em um domínio semelhante ao colágeno na região N-terminal e um domínio semelhante ao fibrinogênio na porção C-terminal. São lectinas que empregam o domínio C-terminal semelhante ao fibrinogênio como um domínio funcional (GARLATTI *et al.*, 2007, GARLATTI *et al.*, 2007, TANIO *et al.*, 2007). Até agora, foi demonstrado que quase todas as ficolinas identificadas apresentam especificidade para carboidratos acetilados como *N*-acetilglucosamina (GlcNAc). O resíduo GlcNAc terminal está amplamente presente em patógenos, mas não em células humanas (KILPATRICK; CHALMERS, 2012; ENDO;

MATSUSHITA; FUJITA, 2011). Ficolinas foram identificadas em várias espécies, incluindo humanos (ENDO *et al.*, 1996; LU *et al.*, 1996; MATSUSHITA *et al.*, 1996), roedores (FUJIMORI *et al.*, 1998; OHASHI; ERICKSON, 1998), porco (ICHIJO *et al.*, 1993), ouriço (OMORI-SATOH; YAMAKAWA; MEBS, 2000), rã (KAKINUMA *et al.*, 2003) e ascídia (KENJO *et al.*, 2001).

Taquelectinas são proteínas caracterizadas por possuírem seis domínios repetidos em tandem, cada uma compreendendo de 33-38 aminoácidos, sendo assim denominadas por serem identificadas inicialmente no caranguejo-ferradura *Tachypleus tridentatus* (KAWABATA; IWANAGA, 1999). Quatro taquelectinas foram isoladas dos hemócitos de *T. tridentatus* (taquelectinas 1, 2, 3 e 4) e uma do plasma (taquelectina-5) (KAWABATA; IWANAGA, 1999). Além das lectinas do caranguejo-ferradura, outra taquelectina foi identificada na esponja marinha *Suberites domuncula* (SCHRÖDER *et al.*, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Purificar, caracterizar bioquimicamente e determinar a estrutura primária de uma nova lectina presente no fluido celomático do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*, e avaliar a atividade antimicrobiana da lectina isolada.

2.2 Objetivos específicos

- Purificar uma nova lectina presente no fluido celomático de *Echinometra lucunter*;
- Caracterizar a proteína isolada, determinando seu pH e temperatura ótimos, bem como seus ligantes;
- Determinar a massa molecular da lectina;
- Determinar a sequência de aminoácidos da lectina;
- Construir um modelo tridimensional para a lectina e avaliar seus possíveis sítios de reconhecimento a carboidratos;
- Avaliar o potencial antimicrobiano da lectina sobre bactérias na sua forma planctônica e de biofilmes.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta dos animais

O material de estudo, espécimes do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*, foram coletados na região entre marés da praia do Pacheco, localizada no município de Caucaia, litoral oeste do Ceará. A coleta dos animais foi autorizada e regulada pelo órgão ambiental competente (SISBIO ID: 33913-8).

Após a coleta, os animais foram transportados dentro de caixas térmicas até o Laboratório de Biotecnologia Marinha – BioMar Lab, localizado no Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará.

3.2 Preparação do extrato

O fluido celomático foi extraído com uma pipeta plástica após a remoção da lanterna de Aristóteles e mantido à temperatura ambiente por 1 hora para que houvesse a coagulação de células. Os coágulos foram removidos e o fluido centrifugado a 8.000 xg, por 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi armazenado a -20 °C para posterior utilização. A utilização do patrimônio genético do animal foi autorizada e regulamentada pelo órgão competente (SISGEN ID: ACC97AD).

3.3 Determinação da atividade hemaglutinante

Os testes de hemaglutinação foram realizados com a utilização de eritrócitos humanos do sistema ABO, obtidos junto ao Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE). Após a obtenção dos tipos sanguíneos, suspensões de eritrócitos nativos a 3% em NaCl 150 mM (v/v) foram preparadas mediante lavagem das células com NaCl 150 mM

Os ensaios de hemaglutinação foram realizados seguindo o método da dupla diluição seriada em placas de microtitulação de fundo em V, de acordo com metodologia previamente estabelecida (SAMPAIO *et al.*, 1998). A amostra permaneceu incubada por 1 hora em temperatura ambiente e a atividade hemaglutinante foi observada macroscopicamente e expressa em títulos de hemagutinação (U.H.), unidade inversa da maior diluição de amostra capaz de aglutinar eritrócitos.

3.4 Estudo de inibição da atividade hemaglutinante

Na inibição da atividade hemaglutinante foram testados carboidratos e glicoproteínas frente ao extrato bruto e, posteriormente, frente a lectina purificada, com a finalidade de determinar a mínima concentração de carboidratos capaz de inibir a aglutinação de eritrócitos.

Os carboidratos utilizados foram: D-xilose, D-ribose, L-fucose, L-arabinose, L-ramnose, D-galactose (Gal), D-manose, D-glicose (Glc), D-glucosamina, D-galactosamina, *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), *N*-acetil-D-galactosamina (GalNAc), ácido D-galacturônico, D-frutose, D-sacarose, D-melibiose, α -D-lactose, β -D-lactose, D-lactulose, D-maltose, D-rafinose, metil- α -D-galactopiranosídeo, metil- β -D-galactopiranosídeo, metil- β -D-tiogalactose, fenil- β -D-galactopiranosídeo, 4-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo, 4-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo, 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo e as glicoproteínas mucina de estômago de porco tipo 2 (PSM-II), mucina de estômago de porco tipo 3 (PSM-III), mucina submaxilar bovina (BSM), fetuína bovina e tiroglobulina.

O teste de inibição da atividade hemaglutinante foi realizado em placas de microtitulação de fundo em V, no qual foram adicionados aos poços 50 μ L da solução da lectina em tampão Tris 20 mM, pH 7,6 contendo NaCl 150 mM e CaCl₂ 20 mM (TBS/Ca²⁺) e 50 μ L das soluções de açúcares. Os resultados observados foram expressos em unidade de concentração mínima de carboidratos e/ou glicoproteínas capaz de inibir a atividade hemaglutinante (SAMPAIO *et al.*, 1998).

3.5 Purificação da lectina

O extrato bruto foi descongelado e centrifugado a 8.000 xg, por 20 minutos, a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi submetido a cromatografia de afinidade em matriz de goma de xantana (Sigma Aldrich). A coluna (3,0 x 22,0 cm) foi previamente equilibrada TBS/Ca²⁺. Após adição do extrato bruto, a coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio e os eluatos foram monitorados por espectrofotometria a 280 nm. Quando a absorbância apresentou leitura abaixo de 0,02, as moléculas adsorvidas na matriz foram eluídas com tampão Tris 20 mM, pH 7,6 contendo NaCl 150 mM e EDTA 20 mM. O material retido foi coletado em frações de 3 mL. As frações que apresentaram atividade hemaglutinante (pAF) foram reunidas, dialisadas sucessivamente contra solução de CaCl₂ 20 mM e água destilada, liofilizadas e posteriormente submetida à cromatografia de gel filtração.

O pAF liofilizado foi solubilizado em tampão TBS/ Ca²⁺ contendo Triton 0,1% e submetido à cromatografia de filtração em gel, em coluna BioSuite SEC HR (0,78 x 30 cm), acoplada a sistema Acquity UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, Waters Corp.). A coluna foi previamente equilibrada com TBS/Ca²⁺ adicionado de Triton 0,1% e a cromatografia foi realizada no mesmo tampão, com um fluxo de 0,4 mL.min⁻¹ e sendo coletadas frações de 0,4 mL.

As frações que apresentaram atividade hemaglutinante foram reunidas, dialisadas, liofilizadas e armazenadas a -20 °C para ensaios posteriores.

3.6 Avaliação da pureza e estimativa de massa molecular da lectina purificada

O grau de pureza e homogeneidade da proteína alvo foi avaliado através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). O gel foi submetido a uma corrente de 25 mA e tensão de 150 V, durante 1 hora. A estimativa de massa foi realizada comparando-se a migração da lectina com a migração de proteínas de peso molecular conhecido presentes no kit SigmaMarker™ *low range* (Sigma Aldrich, MO): albumina sérica bovina - BSA, 66 kDa; álcool desidrogenase - ADH, 45 kDa; anidrase carbônica, 30 kDa; tripsinogênio, 24 kDa; inibidor de tripsina, 20 kDa; lisozima, 14 kDa; aprotinina, 6,5 kDa.

Para estimativa de massa em condições nativas, a lectina isolada foi submetida à cromatografia de gel filtração em coluna BioSuite 250 HR (0,78 x 0,30 cm, tamanho de partícula 5 µm) acoplada ao sistema Acquity UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, Waters Corp.). A coluna foi previamente equilibrada e a cromatografia foi conduzida em TBS/Ca²⁺, ao fluxo de 0,4 mL.min⁻¹.

3.7 Efeito do pH, temperatura e íons divalentes na atividade hemaglutinante

O efeito do pH na atividade hemaglutinante foi avaliado através de incubação da lectina (1 mg.mL⁻¹) por 1 hora com seguintes tampões: acetato de sódio 100 mM, pH 4 e pH 5, citrato de sódio 100 mM, pH 6, Tris 100 mM, pH 7 e pH 8, glicina 100 mM, pH 9 e pH 10, todos contendo NaCl 150 mM e CaCl₂, seguido de ensaios da atividade hemaglutinante.

Para avaliar o efeito da temperatura na atividade hemaglutinante, amostras da lectina, solubilizadas em NaCl 150 mM em concentrações de 1 mg.mL⁻¹, foram incubadas em

diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C) por 1 h e posteriormente submetidas a testes de atividade hemaglutinante.

Foi avaliado também o efeito do íon cálcio na atividade hemaglutinante, onde a lectina solubilizada foi submetida ao teste de hemaglutinação em tampão TBS/Ca²⁺ e em tampão Tris 20 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM e EDTA 20 mM.

3.8 Determinação de massa molecular através de espectrometria de massas

A massa molecular média da lectina foi determinada por espectrometria de massas, utilizando um espectrômetro de massa UltraFlex III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Germany). A solução lectínica (10 pmol μL^{-1}) foi misturada na proporção de 1:1 com uma solução de matriz (CHCA, α -ciano-4-hidroxicinâmico, 10 mg.mL⁻¹ diluído em acetonitrila, água e ácido trifluoroacético 50:47:3% v/v). Os espectros foram adquiridos em modo linear e positivo, os dados foram processados com o pacote de programas Flex Analysis 3.4 software (Bruker Daltonics, Germany).

3.9 Determinação da sequência de aminoácidos através de espectrometria de massas

Para o sequenciamento de aminoácidos, a proteína foi submetida à eletroforese (SDS-PAGE-12%) e as bandas proteicas foram excisadas do gel e transferidas juntas para microtubos de centrifugação.

Os fragmentos de gel foram descorados e as proteínas reduzidas e alquiladas, conforme descrito por Shevchenko *et al.* (2007). A lectina foi digerida com diferentes enzimas proteolíticas (tripsina, quimiotripsina e pepsina) e a estrutura primária obtida por sobreposição das sequências dos peptídeos gerados após digestão (SHEVCHENKO *et al.*, 2007; SEIDLER *et al.*, 2010).

As digestões com tripsina (Promega) e quimiotripsina (Roche) foram conduzidas em bicarbonato de amônio 50 mM na proporção de 1:50 p/p (enzima:substrato). A digestão com pepsina foi conduzida em HCl 10 mM na proporção de 1:50 p/p (enzima:substrato). Todas as digestões foram mantidas a 37 °C por 16 h.

As digestões foram paradas através da adição de 2 μL de ácido fórmico (5%). Os peptídeos foram extraídos e concentrados seguindo métodos pré-estabelecidos (SHEVCHENKO *et al.*, 2007).

Os peptídeos oriundos das digestões proteolíticas foram aplicados em matriz de

fase reversa C18 (75 μm x 100 mm) e eluídos por gradiente linear de ACN, contendo AF 0,1%. O espectrômetro de massas operou em modo positivo na faixa de m/z 50 a 3000, sob voltagem do capilar de 3,5 kV e temperatura da fonte de 363 K. As análises de LC-MS/MS foram conduzidas de acordo com a função DDA (*Data Dependent Analysis* – Análise Dependente de Dados), sendo selecionados para análise de MS/MS íons precursores com carga (z) entre 2⁺ e 4⁺.

Os íons selecionados foram fragmentados por Dissociação Induzida por Colisão (CID), utilizando argônio como gás de fragmentação. Os espectros foram coletados e processados pelos programas MassLynx v4.1 e ProteinLynx v2.4 (Waters Corp.). Os espectros de fragmentação CID foram processados manualmente pelo uso da ferramenta PepSeq (Waters).

3.10 Análises de sequência

As pontes dissulfeto intracadeia e intercadeia foram determinadas de acordo com o servidor web DiANNA 1.1 (FERRE; CLOTE, 2005). O ponto isoelétrico foi determinado pela ferramenta ProtParam disponível na plataforma ExPASy (*Expert Protein Analysis System*) (<https://www.expasy.org/resources/compute-pi-mw>).

Buscas de similaridade foram realizadas *on line*, com sequências de proteínas conhecidas, com o auxílio da ferramenta BLASTp, disponível em https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome. A identificação de domínios proteicos foi realizada através do servidor SMART, *Simple Modular Architecture Research Tool* (LATUNIC *et al.*, 2021).

Os alinhamentos foram realizados pela ferramenta Multalin (CORPET, 1998) e confirmados com o servidor ESPRIPT 3.0 (ROBERT; GOUET, 2014), a matriz Blossum62-12-2 foi usada como parâmetro de alinhamento.

Uma árvore filogenética não enraizada foi construída, baseada no alinhamento múltiplo, pelo algoritmo *neighbor-joining* (NJ), usando o pacote de programas MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018).

3.11 Predição estrutural

A predição estrutural de ELL foi realizada através do servidor I-TASSER (ZHANG, 2008). Inicialmente uma busca por modelos foi realizada pelo LOMETS usando

como base o PDB. LOMETS é uma abordagem de segmentação de meta-servidor contendo vários programas de segmentação, onde cada programa pode gerar dezenas de milhares de alinhamentos de modelos. O I-TASSER usa apenas os modelos de maior significância nos alinhamentos, a significância é medida pela Z-score, onde o maior valor de Z-score se reflete como um alinhamento mais significativo.

Após esta busca inicial, o I-TASSER através do programa SPICKER produziu cinco modelos. A confiança de cada modelo foi medida quantitativamente pelo C-score, que é calculado com base na importância dos alinhamentos do modelo e nos parâmetros de convergência das simulações de montagem da estrutura. A pontuação C está normalmente na faixa de [-5, 2], onde uma pontuação C de um valor mais alto significa um modelo com uma confiança mais alta e vice-versa.

Cada modelo foi submetido a uma avaliação estrutural usando o servidor SWISS Model, disponível em <https://swissmodel.expasy.org/assess>. Os valores de QMEAN e o percentual de aminoácidos alocados em zonas favoráveis no gráfico de Ramachandran foram usados para validar o melhor modelo.

As funções biológicas foram deduzidas através do servidor COFACTOR com base no melhor modelo gerado pelo I-TASSER.

3.12 Inibição da formação de biofilme bacteriano

3.12.1 Microrganismos e condições de cultura

Os ensaios para avaliar a atividade antimicrobiana foram realizados com as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Escherichia coli* ATCC 11303. As bactérias foram cultivadas em meio Agar Triptona de Soja (TSA; Himedia, Índia) e incubadas a 37 °C por 24 h. Após o crescimento no meio sólido, algumas colônias isoladas foram selecionadas, inoculadas em Caldo Triptona de Soja (TSB; Himedia, Índia) e incubadas durante 24 h a 37 °C, sob agitação constante. Antes do uso, a densidade celular de cada suspensão bacteriana foi ajustada para uma concentração final de 2×10^6 células.mL⁻¹.

3.12.2 Efeitos da lectina em células planctônicas

Os efeitos da lectina sobre as células planctônicas foram avaliados pelo método de

microdiluição. Resumidamente, a lectina foi diluída em NaCl 150 mM em concentrações variando de 6,5 a 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O ensaio foi realizado em placas de poliestireno de 96 poços por adição de 100 μL de células bacterianas, previamente ajustadas 2×10^6 células. mL^{-1} , a cada poço. As microplacas foram incubadas a 37 °C durante 24 h em agitação constante e a densidade óptica foi avaliada a 620 nm utilizando um leitor de microplacas (SpectraMax® I3, Molecular Devices LLC, CA, EUA).

3.12.3 Ensaio de formação de biofilme

Os efeitos sobre a formação de biofilme foram avaliados conforme proposto por Vasconcelos e colaboradores. Placas de poliestireno estéreis de 96 poços foram preparadas seguindo os mesmos passos anteriormente estabelecidos para o crescimento celular planctônico. Entretanto, duas placas foram utilizadas: uma para a quantificação de biomassa por cristal violeta e outra para enumeração de células viáveis de biofilme (VASCONCELOS *et al.*, 2014).

3.12.4 Quantificação de massa de biofilme

Para quantificar a biomassa total de biofilme formada foi utilizado um método colorimétrico. Após o desenvolvimento do biofilme, o conteúdo de cada poço foi removido e os poços lavados duas vezes com 200 μL de NaCl 150 mM para remover células fracamente aderidas. Para fixação dos biofilmes foram adicionados 200 μL de metanol (99%) a cada poço. Após 15 min, o metanol foi removido e as placas foram deixadas secar a 25 °C. Em seguida, 200 μL de cristal violeta foram adicionados a cada poço. Após 5 min, o excesso de cristal violeta foi removido e as placas foram lavadas duas vezes com água. Por último, 200 μL de ácido acético (33% v/v) foram adicionados aos poços para dissolver o cristal violeta ligado à massa do biofilme e a absorbância foi medida a 590 nm usando um leitor de microplacas (SpectraMax® I3).

3.12.5 Quantificação do número de células viáveis de biofilme

Com a finalidade de determinar o número de células viáveis, os poços foram lavados com NaCl 150 mM e, em seguida, 200 μL da mesma solução foram adicionados a cada poço contendo biofilmes. As placas foram mantidas em banho ultrassônico por 10

minutos para liberação das células envolvidas por biofilme. Diluições decimais em série das suspensões obtidas foram plaqueadas em meio TSA para permitir a determinação da viabilidade. As placas foram então incubadas durante 24 h a 37 °C, e o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC.mL⁻¹) foi determinado.

3.13 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo GraphPad Prism® versão 7.0 do Microsoft Windows®. Os dados de todos os ensaios foram comparados utilizando análise de variância unidirecional (ANOVA), com teste de Bonferroni *post hoc*. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,01$.

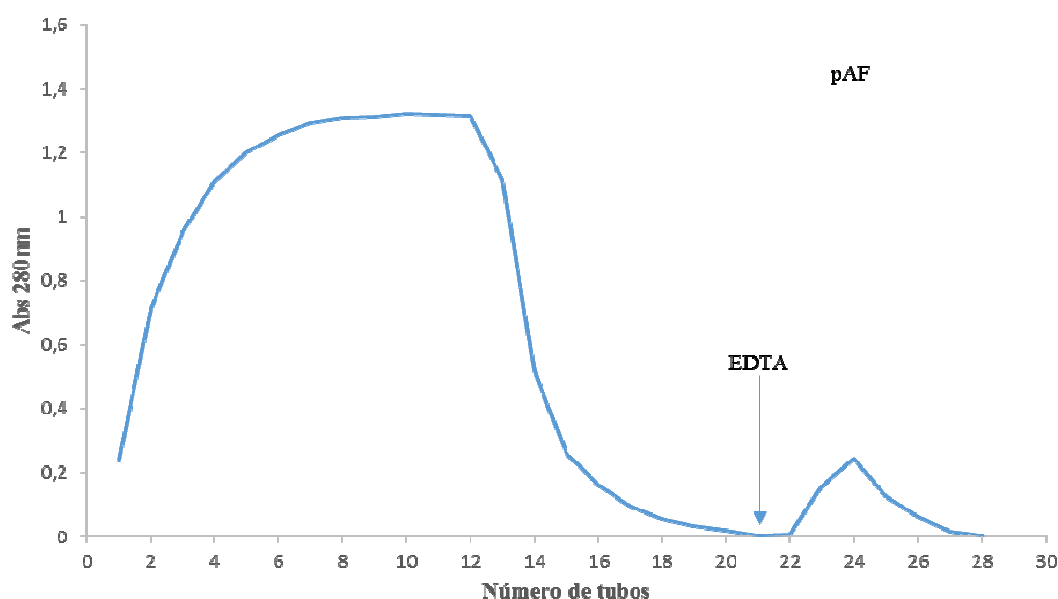
4 RESULTADOS

4.1 Purificação da lectina

A lectina presente no fluido de *Echinometra lucunter*, denominada ELL (*E. lucunter lectin*), foi isolada a partir da combinação de cromatografia de afinidade em matriz de goma de xantana e cromatografia de filtração em gel, em matriz BioSuite SEC HR 250 (0,78 x 30 cm), acoplada em um sistema Acquity UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, Waters Corp.).

Após a cromatografia de afinidade em matriz de goma de xantana (Gráfico 1), as frações não adsorvidas e adsorvidas apresentaram atividade hemaglutinante. As frações adsorvidas (pAF) foram coletadas reunidas, dialisadas, liofilizadas e armazenadas para os ensaios posteriores.

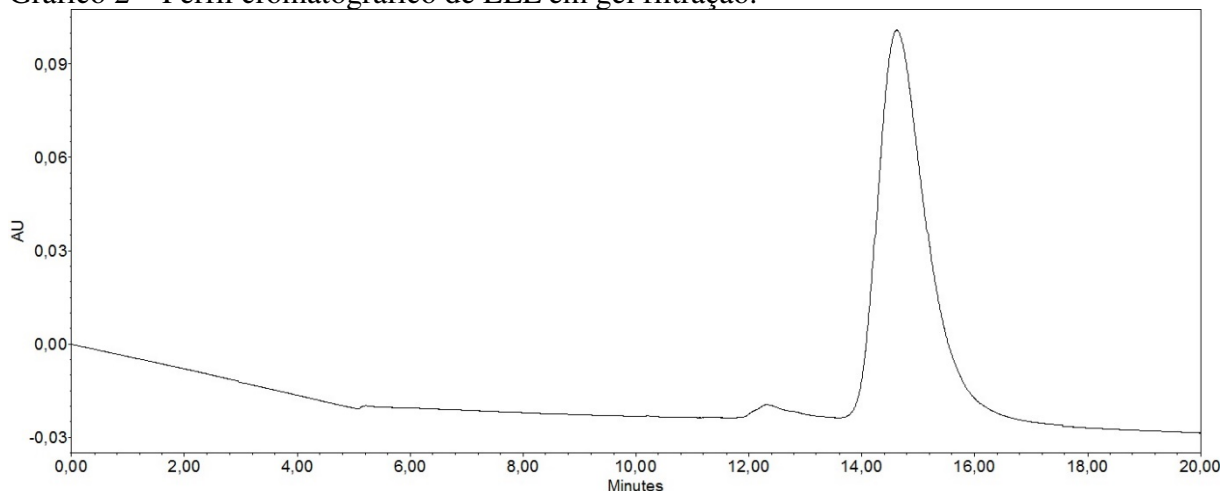
Gráfico 1- Cromatografia de afinidade em matriz de goma de xantana do extrato de *Echinometra lucunter*.



Fonte: o Autor (2021). Foram aplicados 60 mL de extrato em matriz de goma de xantana (3,0 cm x 22,0 cm), a mesma foi equilibrada e lavada com tampão Tris 20 mM, pH 7,6 contendo NaCl 150 mM e CaCl 20 mM. As frações adsorvidas foram eluídas com tampão Tris 20 mM, pH 7,6 contendo NaCl 150 mM e EDTA 20 mM. O fluxo foi mantido em 3 mL.min⁻¹ e frações de 2,5 mL foram coletadas. pAF (frações adsorvidas).

A segunda etapa cromatográfica foi realizada em coluna de gel filtração BioSuite SEC HR 250 (Gráfico 2). ELL mostrou um perfil de eluição com apenas um pico simétrico que apresentou atividade hemaglutinante.

Gráfico 2 – Perfil cromatográfico de ELL em gel filtração.



Fonte: o Autor (2021). Cromatograma da exclusão molecular em coluna BioSuite SEC HR 250, equilibrada com Tris 20 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM, CaCl 20mM e Triton 0,1%.

4.2 Atividade hemaglutinante

O fluido celomático do ouriço-do-mar *E. lucunter*, apresentou atividade hemaglutinante apenas contra eritrócitos humanos do tipo sanguíneo O, na forma nativa.

ELL mostrou padrão de aglutinação semelhante ao do extrato bruto, aglutinando os eritrócitos humanos do tipo sanguíneo O (Tabela 1).

Tabela 1– Atividade hemaglutinante de ELL contra eritrócitos humanos do tipo sanguíneo O.

Fração	Eritrócitos humanos	Título (UH.mL ⁻¹)
Extrato Bruto	O	8
PI (TBS + Ca ²⁺)	O	64
pAF (TBS + EDTA)	O	16
ELL	O	16

Fonte: o Autor (2021). PI e pAF, são frações não adsorvidas e adsorvidas, respectivamente, obtidas a partir de cromatografia de afinidade. ELL é a proteína obtida após a cromatografia de exclusão molecular.

4.3 Inibição da atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante de ELL não foi inibida por qualquer dos açúcares simples testados, apenas pelas glicoproteínas mucina de estômago de porco tipo 2 (PSM-II), mucina de estômago de porco tipo 3 (PSM-III), mucina submaxilar bovina (BSM) e

tiroglobulina bovina, com concentração inibitória mínima (CIM) de 0,125; 0,031; 0,25; e 1,0 mg.mL⁻¹, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2– Inibição da atividade hemaglutinante de ELL.

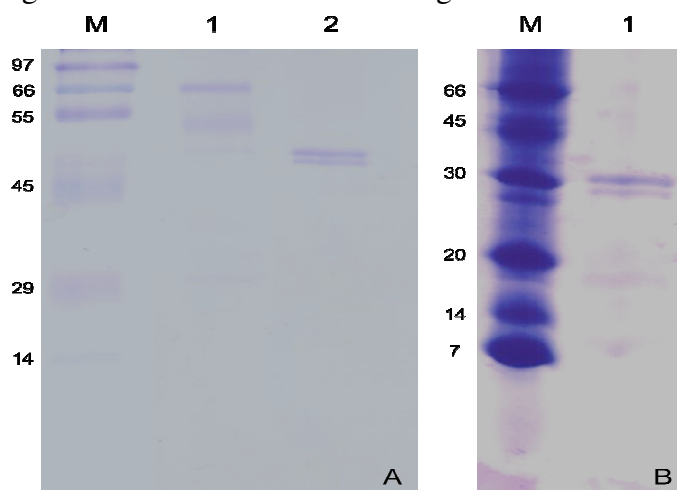
Glicoproteínas	CIM*
PSM-II	0,125 mg.mL ⁻¹
PSM-III	0,031 mg.mL ⁻¹
BSM	0,25 mg.mL ⁻¹
Tiroglobulina	1,0 mg.mL ⁻¹

Fonte: o Autor (2021). *Concentração inibitória mínima.

4.4 Avaliação da pureza e estimativa de massa molecular da lectina purificada

Em SDS-PAGE, sob condições não redutoras, ELL apresentou duas bandas com massas moleculares aproximadas de 50 kDa (Figura 3A). Na presença de β-mercaptoetanol foram observadas também duas bandas, mas com massas próximas a 30 kDa. Esses resultados indicam que ELL é uma mistura de duas isoformas, as quais são diméricas e suas cadeias são mantidas por pontes dissulfeto (Figura 3B).

Figura 3 – SDS-PAGE da cromatografia de afinidade.



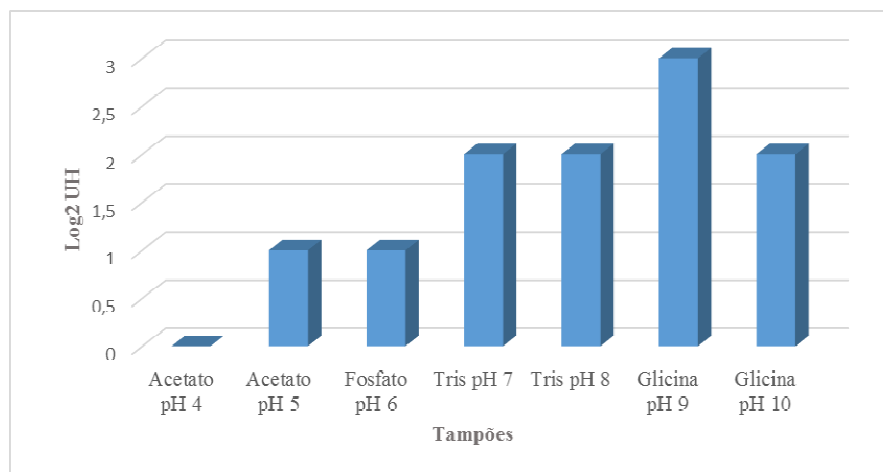
Fonte: o Autor (2021). **A:** SDS-PAGE 15% (M) Marcador S8445 – SigmaMarker (97, 66, 55, 45, 29 e 14 kDa), (1) fração não retida, (2) ELL 15µL (4 mg/mL). **B:** SDS-PAGE 15% (M) Marcador de peso molecular (66, 45, 30, 20, 14 e 7 kDa), (1) ELL 15µL (4 mg/mL) + β-mercaptoetanol 5%.

4.5 Efeito do pH, temperatura e íons divalentes na atividade hemaglutinante

O pH 9 foi aquele no qual ELL apresentou maior atividade hemaglutinante (8 U.H.). Abaixo deste valor, a atividade foi de 4 U.H. até pH 7, tendo sua atividade abolida em pH 4, enquanto que, em valores de pH acima do pH 9, a atividade se manteve em 4 U.H. (Gráfico 3).

A atividade hemaglutinante da lectina contra eritrócitos humanos do tipo O, foi abolida na presença de EDTA, mas restabelecida por meio da adição de íons Ca^{2+} (dados não apresentados).

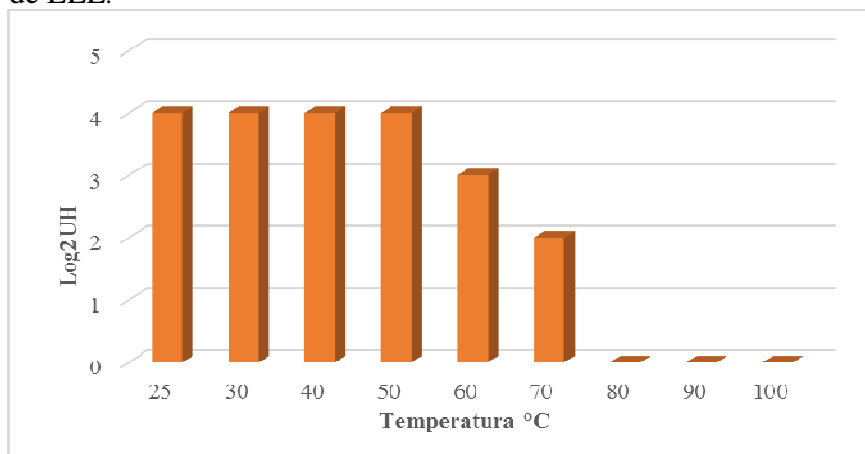
Gráfico 3 – Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante de ELL.



Fonte: o Autor (2021).

ELL apresentou estabilidade térmica, mantendo sua atividade de 16 U.H. até 50 °C, diminuindo gradativamente com a elevação da temperatura, sendo a atividade hemaglutinante totalmente abolida na temperatura de 80 °C (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante de ELL.



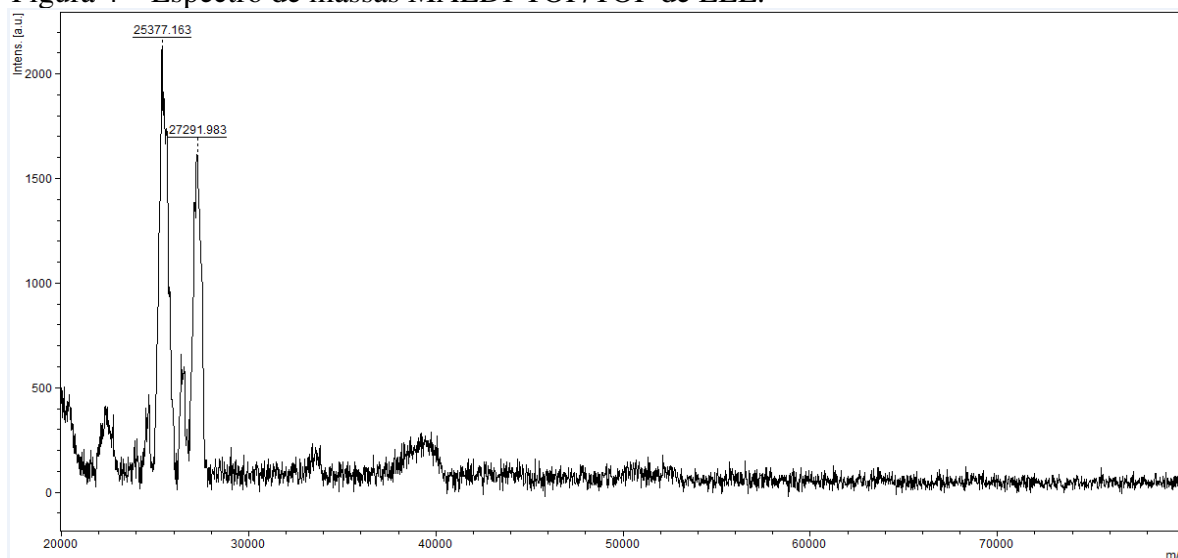
Fonte: o Autor (2021).

Ao avaliar o efeito da presença e ausência de íons divalentes na atividade hemaglutinante foi constatado que a lectina foi afetada pela presença e ausência do íon Ca^{2+} testado, não sendo capaz de aglutinar eritrócitos de sangue humano na presença de EDTA.

4.6 Determinação de massa molecular através de espectrometria de massas

A análise de ELL por MALDI-TOF revelou dois íons majoritários com m/z de 25.377 ± 5 Da e 27.292 ± 5 Da, sugerindo a existência de duas formas da lectina: ELL-a e ELL-b (Figura 4). Estes íons provavelmente representam as formas duplamente carregadas ($M+2H^+$) de ELL, visto que em SDS-PAGE, a massa da lectina sob condições não redutoras foi estimada em 50 kDa.

Figura 4 – Espectro de massas MALDI-TOF/TOF de ELL.



Fonte: o Autor (2021).

4.7 Estrutura primária de ELL

Os peptídeos oriundos de digestões com tripsina, quimiotripsina e pepsina foram sequenciados por MS/MS (Tabela 3). A estrutura primária de ELL foi obtida pela sobreposição dos peptídeos ao serem comparados com a sequência de aminoácidos de uma proteína (LOC115924551) não caracterizada do ouriço-do-mar, *Strongylocentrotus purpuratus*.

Tabela 3- Sequências de aminoácidos dos peptídeos de ELL. (Continua).

Peptídeo	Sequência	Massa		Δ (Da)
		Observada	Calculada	
T1	TDVVK	707.3168	707.3854	0.07
T2	GTGASAHNDQWNR	1412.4843	1412.6182	0.13
T3	VTCLPGGTSK	1018.3796	1018.5118	0.13
T4	VTCLPGSSSK	1034.3358	1034.5067	0.17
T5	VNCNMDLEGGGWAR	1577.5023	1577.6715	0.17
T6	YLESAGLYR	1070.3989	1070.5397	0.14
T7	YLESAGLYR	1070.4437	1070.5397	0.10
T8	VTGCIPGSSSK	1091.4293	1091.5281	0.10
T9	LEFPSGSVDR	1105.3142	1105.5404	0.23
T10	IEFPSGDVDR	1133.4038	1133.5353	0.13
T11	IEFPSGDVDR	1133.4327	1133.5353	0.10
T12	LEGFPSGSVDR	1162.4420	1162.5618	0.12
T13	FLVQTDVVK	1194.5664	1194.6648	0.10
T14	MKADDSVNPSR	1218.3248	1218.5663	0.24
T15	FKADDSVNPSR	1234.4089	1234.5942	0.19

Tabela 3- Sequências de aminoácidos dos peptídeos de ELL. (Continuação).

Peptídeo	Sequência	Massa		Δ (Da)
		Observada	Calculada	
T16	GASAHNDQWNR	1254.4092	1254.5490	0.14
T17	GLSKPFFFQSLFFSPR	1903.9248	1903.9984	0.07
T18	FFKSLFFSPR	1274.5206	1274.6812	0.16
T19	VNCNMDIEGGWARYGR	1952.7101	1953.8574	1.15
T20	GTGASAHNDQWNR	1412.4756	1412.6182	0.14
T21	SVCADTASDFYYLESAGLYHK	2395.8821	2396.0630	0.18
T22	VFCEMDIEGGWAR	1625.5837	1625.6967	0.11
T23	VFCEFDLEGGWAR	1641.5583	1641.7246	0.17
T24	SLPWLEDTPLFLPDYGNDHTR	2484.8921	2485.1914	0.30
T25	YTWGDSYYFVYAK	1661.6152	1661.7402	0.13
T26	SLPWLEESPLFGIPDYGNDHTR	2542.9265	2542.2129	-0.71
T27	NKYTWGDSYYFVYAK	1903.8782	1903.8781	0.00
T28	CGQGGGLPTANGLSKPFFFQSLFFSPR	2916.2083	2916.4380	0.23
T29	SNQGTWNVYVDEDAEELTLDIINASEVK	3095.2729	3095.4570	0.18
T30	SLPWLEESPLFIPDYGNDHTRIEFPGSVDR	3572.5132	3572.7212	0.21
T31	QLHPLYLSGCPTTANCGSLGTPTNPALSCEHLK	3593.4399	3593.7065	0.27
T32	SLPWLEESPLFIPDYGNDHTR	2485.0615	2485.1914	0.13
Q1	TTRSLPW	859.3410	859.4552	0.11
Q2	KFKADDSVNPSRL	1475.5726	1475.7732	0.20
Q3	SPRGTGASAHNDQW	1482.5321	1482.6600	0.13
Q4	GRSDQGTW	1006.3951	1006.4468	0.05
Q5	VDEATLETL	1104.3396	1104.5187	0.18
Q6	GTGASAHNDQW	1142.3292	1142.4741	0.14
Q7	KSVCADTASDF	1199.4255	1199.5128	0.09
Q8	SCEHLKSVCADTASDFY	1988.6526	1988.8245	0.17
Q9	NRFLVQTDVVF	1336.6232	1336.7139	0.09
Q10	FIPDYGNDHTRIEFPGSVDRVTCIPGSSSK	3437.4075	3437.6311	0.22
Q11	KMKADDSVNPSRL	1459.5786	1459.7452	0.17
Q12	TTRSLPWLEESPL	1527.6320	1527.7933	0.16
Q13	DIINASEVKEMTDL	1576.6820	1576.7654	0.08
Q14	FSPRGTGASAHNDQW	1629.5909	1629.7284	0.14
Q15	LEESPLFIPDYGNDHTRIEFPGSVDRVT	3289.4407	3289.5891	0.15
Q16	CGQGGGLPTADGLSKPF	1660.6611	1660.7880	0.13
Q17	DIINASEVKEMTDLKY	1867.8170	1867.9237	0.11
Q18	GTPTNPALSCEHL	1409.6268	1409.6238	0.00

Fonte: o Autor (2021). Peptídeos oriundos de digestão com tripsina (T) e peptídeos obtidos de digestão com quimiotripsina (Q).

O sequenciamento revelou uma cadeia polipeptídica de 229 resíduos de aminoácidos com uma massa molecular teórica de 25.392 Da e ponto isoelétrico de 5,19. No entanto, o valor de massa é inferior à massa molecular determinada por MALDI-TOF.

Em comparação a ELL-a (25.377), a massa determinada por sequenciamento é 15

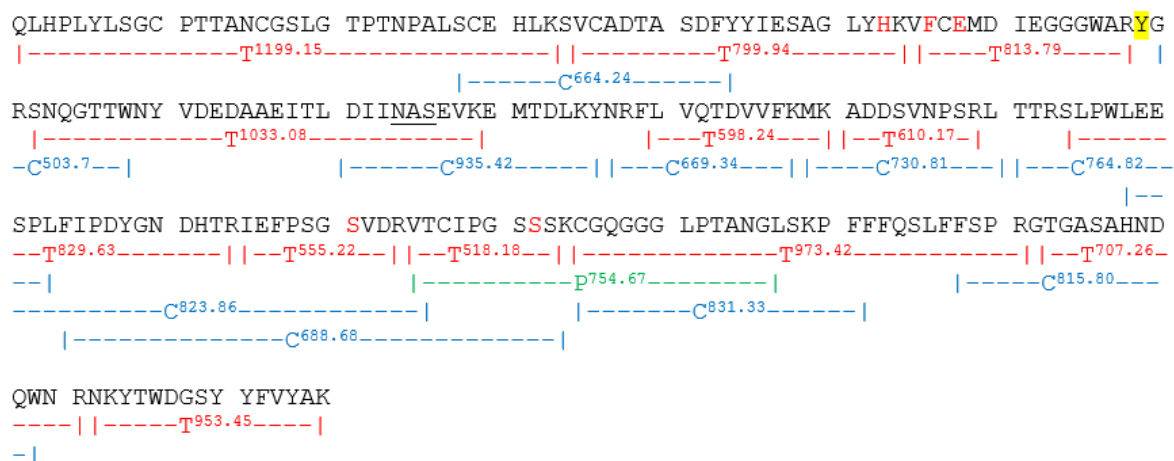
Da maior, esta diferença pode ser atribuída a oxidação de um resíduo de metionina, causando um possível erro de interpretação durante o sequenciamento sendo confundida com um resíduo de fenilalanina.

Em comparação a ELL-b (27.291), a massa determinada por sequenciamento é 1.914 Da menor, esta diferença pode ser atribuída a presença de glicosilação, uma vez que um sítio de *N*-glicosilação foi observado na sequência (⁹⁴NAS). No entanto, nenhum peptídeo contendo carboidratos ancorados foi encontrado.

A sequência de aminoácidos de ELL está representada na figura 5. Sete cisteínas foram encontradas, das quais seis delas parecem estar envolvidas em ligações dissulfeto intracadeia, enquanto uma cisteína parece formar uma ligação dissulfeto entre as duas subunidades. De acordo com o servidor web DiANNA 1.1 (FERRÈ; CLOTE, 2005), as cisteínas estão emparelhadas da seguinte forma: ¹⁰Cys-Cys¹⁶, ²⁹Cys-Cys³⁶ e ⁵⁷Cys-Cys¹⁷⁵, enquanto ¹⁶⁷Cys está envolvida na manutenção do dímero. Um local de glicosilação (NAS) foi identificado na sequência. Micro heterogeneidades foram observadas em cinco posições: 53 (H/R); 56 (F/N); 58 (E/N); 161 (S/D) e 172 (S/T).

Um único aminoácido não foi encontrado através do sequenciamento (⁶⁹Y), este aminoácido foi assinalado por conta da similaridade observada entre ELL e uma proteína não caracterizada encontrada no genoma de *Strongylocentrotus purpuratus* (LOC115924551).

Figura 5 - Sequência de aminoácidos de ELL.

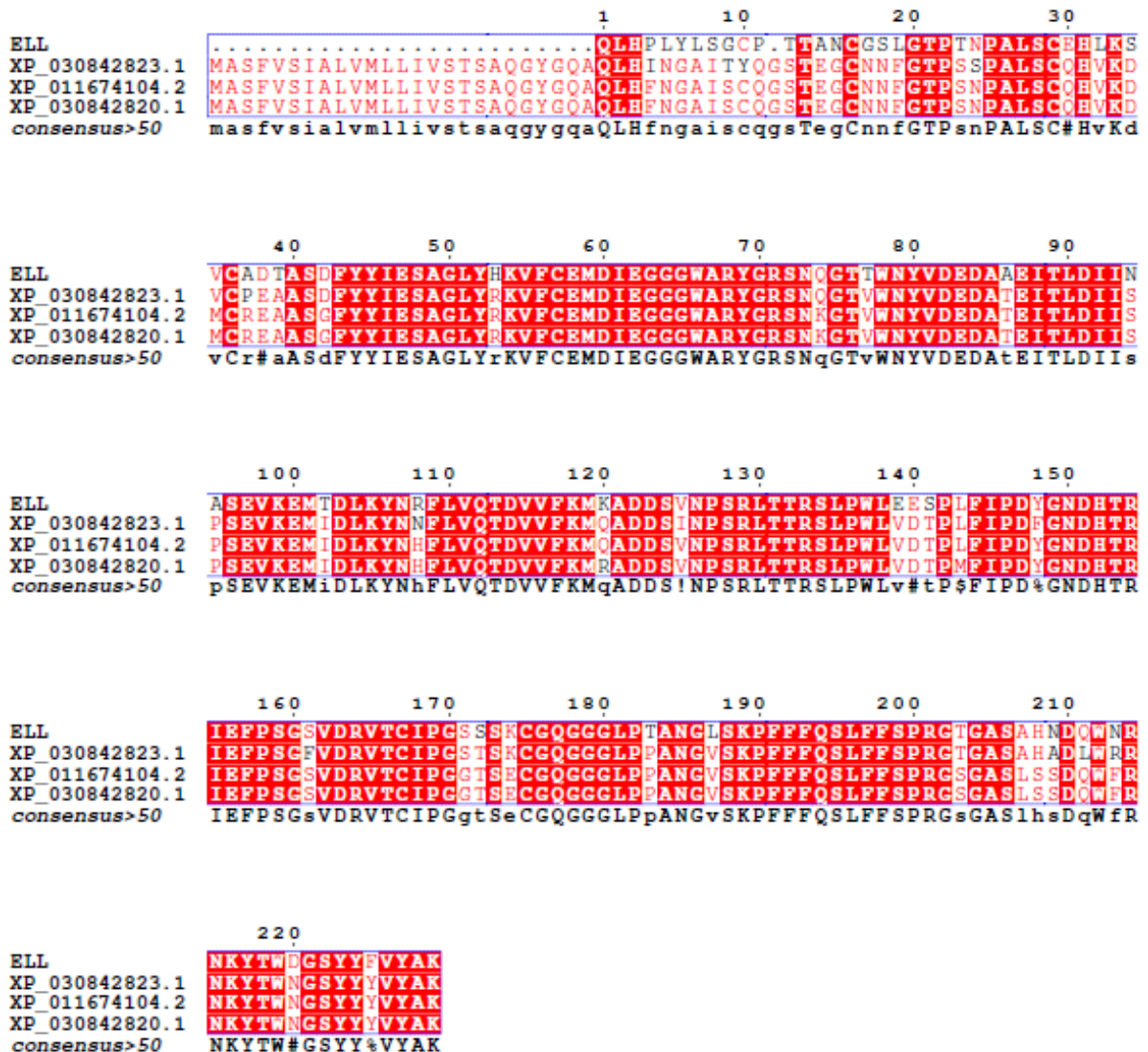


Fonte: o Autor (2021). Os peptídeos originados por diferentes digestões são representados por T (tripsina), C (quimiotripsina) e P (pepsina). Os aminoácidos sublinhados representam o local de glicosilação, aminoácidos em vermelho mostram as heterogeneidades e o aminoácido realçado em amarelo não foi coberto na sequência.

A análise no servidor *on line* SMART (LETUNIC *et al.*, 2021) indicou a existência de um domínio relacionado ao fibrinogênio (FReD) na estrutura primária de ELL. O domínio está localizado entre os aminoácidos ²⁷Leu e ¹⁷⁰Gly.

Em uma busca por similaridade utilizando a ferramenta *on line* BLASTp, a sequência de ELL foi significativamente semelhante a proteínas putativas do genoma do ouriço *Strongylocentrotus purpuratus*. ELL apresentou 82, 81 e 80% de identidade com as proteínas não caracterizadas LOC115924550 (XP_030842820.1), LOC105443016 (XP_030842820.1) e LOC115924551 (XP_030842823.1), respectivamente (Figura 5). A similaridade foi de 90, 90 e 89%, respectivamente (Figura 6).

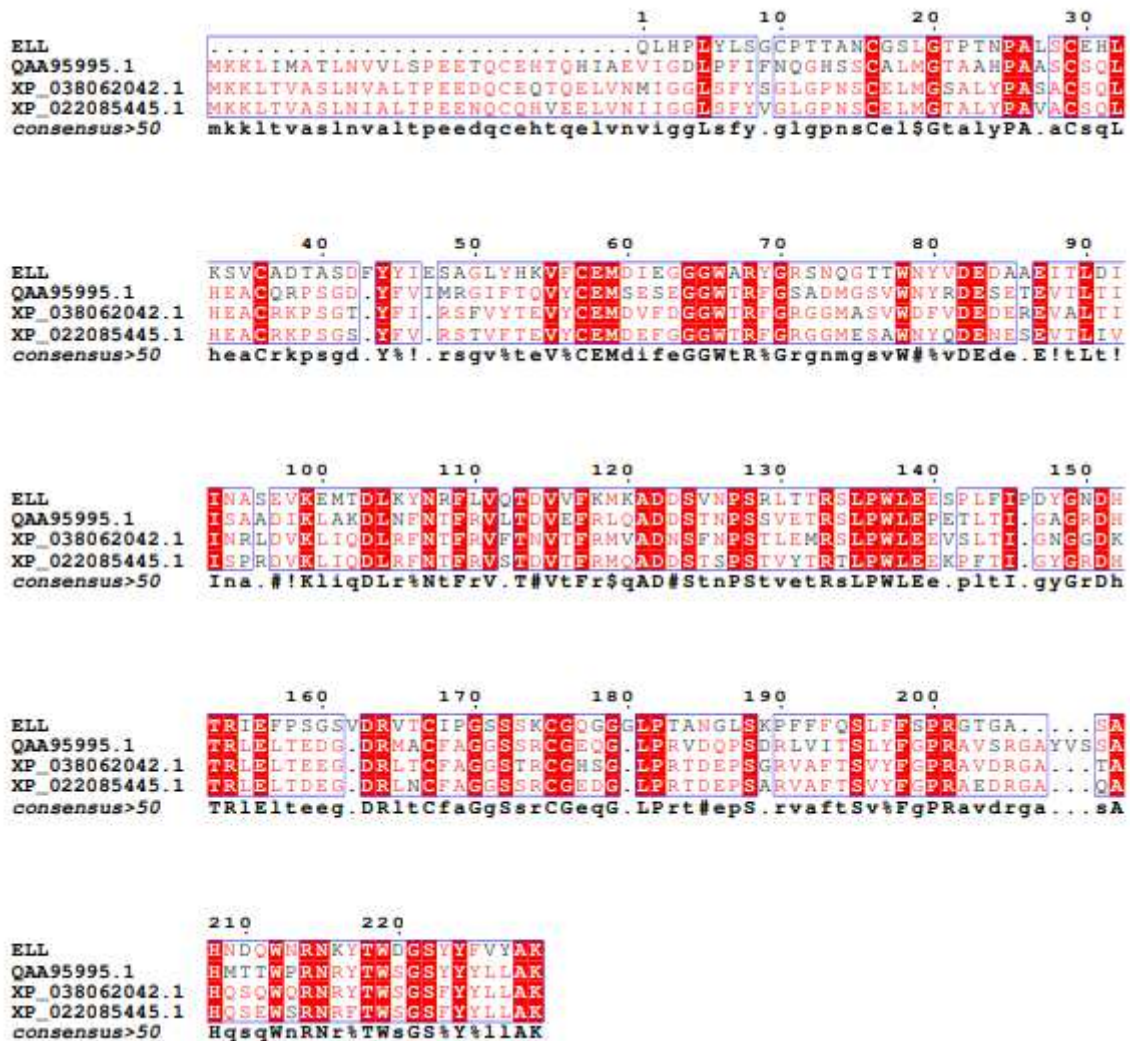
Figura 6 - Comparação da sequência de aminoácidos de ELL com FRePs de *S. purpuratus*.



Fonte: o Autor (2021). Alinhamento múltiplo entre a sequência de aminoácidos de ELL com as FRePs de *Strongylocentrotus purpuratus* (XP_030842820.1, XP_030842820.1 e XP_030842823.1). Aminoácidos em vermelho representam as regiões conservadas. O programa ESPRIPT 3.0 foi usado para construir o alinhamento.

Quando comparada a proteínas de outros equinodermos, ELL mostrou 45, 45 e 44% de identidade com proteínas não caracterizadas das estrelas do mar *Patiria miniata* (XP_038062042.1), *Acanthaster planci* (XP_022085445.1) e uma FReP da também estrela do mar *Asterias rubens* (QAA95995.1) (Figure 7). A similaridade observada foi de 61, 64 e 60%, respectivamente.

Figura 7- Comparação da sequência de aminoácidos de ELL com FRePs de equinodermos.

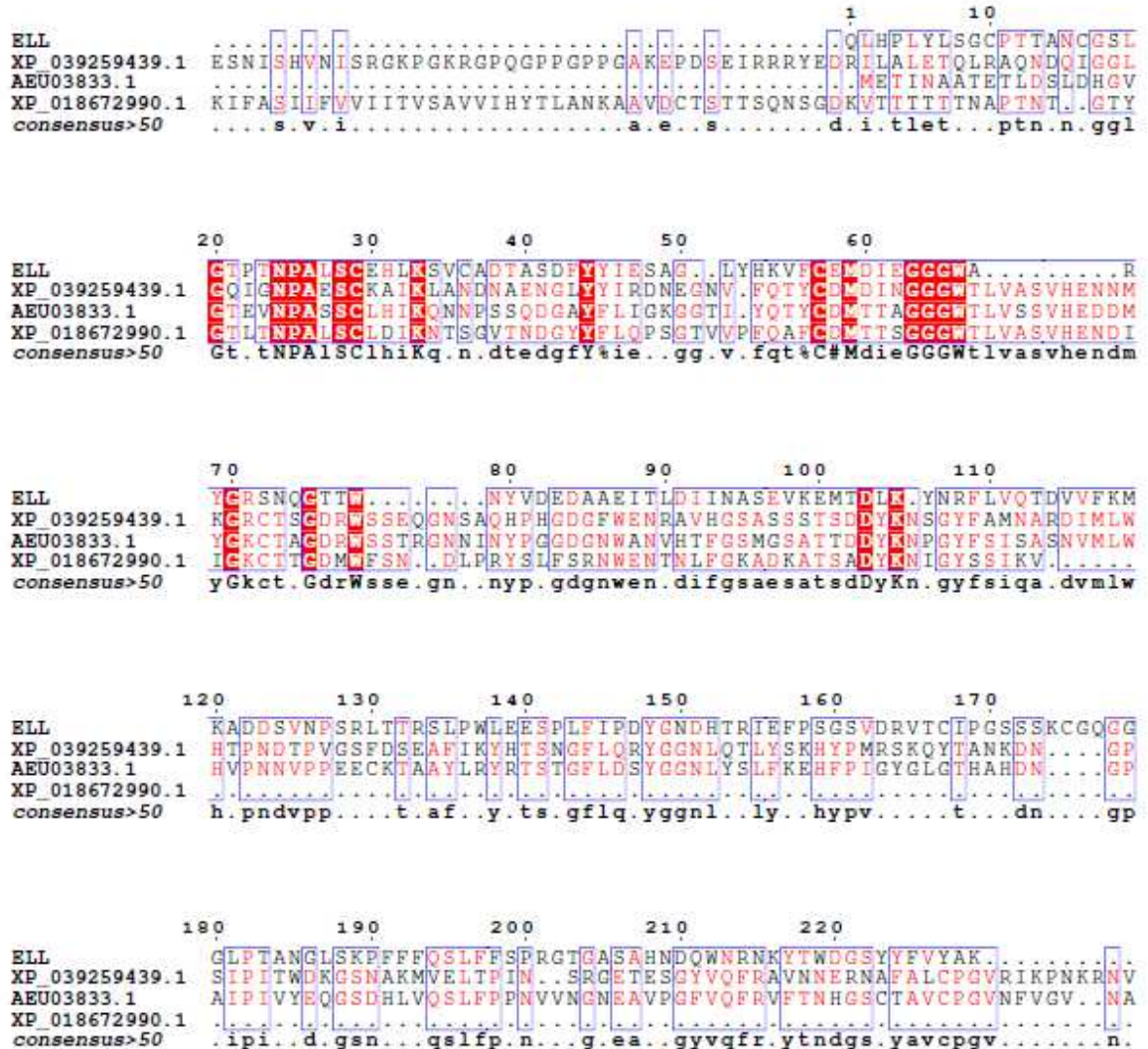


Fonte: o Autor (2021). Alinhamento múltiplo entre a sequência de aminoácidos de ELL com as FRePs de *Patiria miniata* (XP_038062042.1), *Acanthaster planci* (XP_022085445.1) e *Asterias rubens* (QAA95995.1). Aminoácidos em vermelho representam as regiões conservadas. O programa ESPRIPT 3.0 foi usado para construir o alinhamento.

ELL também apresentou identidade com FRePs de cordados, incluindo a intelectina-1 da ascídia *Styela clava* (XP_039259439.1), intelectina-1b da ascídia *Ciona intestinalis* (XP_018672990.1) e a intelectina-1 do anfioxo *Brachiostoma belcheri* (AEU03833.1). Os valores de identidade foram 41, 41 e 27%, respectivamente. A similaridade

observada foi de 58, 59 e 42% (Figura 8).

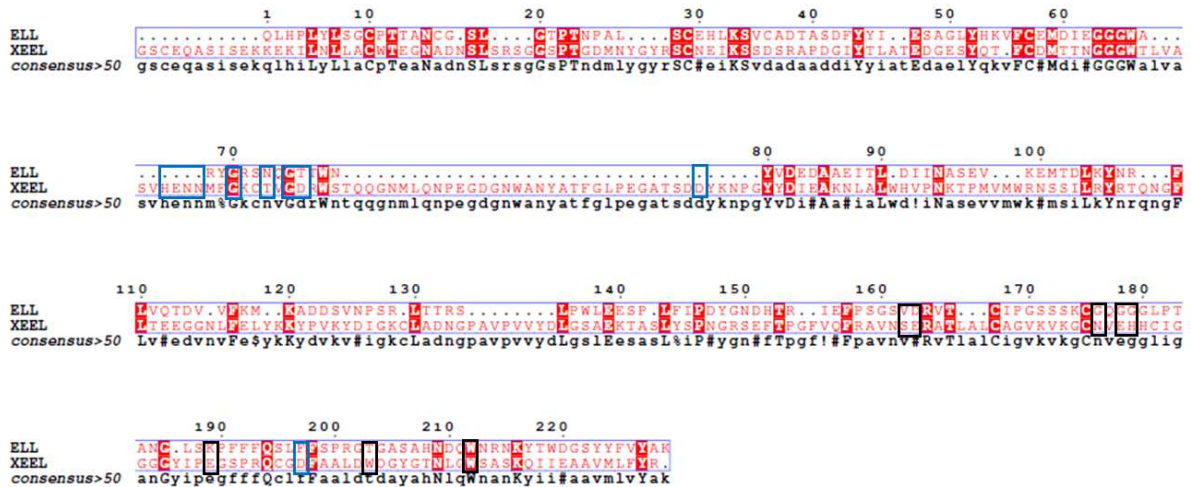
Figura 8 - Comparação da sequência de aminoácidos de ELL com FRePs de cordados.



Fonte: o Autor (2021). Alinhamento múltiplo entre a sequência de aminoácidos de ELL com as intelectinas de *Styela clava* (XP_039259439.1), *Ciona intestinalis* (XP_018672990.1), e *Brachiostoma belcheri* (AEU03833.1). Aminoácidos em vermelho representam as regiões conservadas. O programa ESPRIPT 3.0 foi usado para construir o alinhamento.

Com relação aos animais vertebrados, ELL mostrou similaridade de 35% e identidade de 22% com a intelectina do sapo *Xenopus laevis* (*Xenopus* embryonic epidermal lectin – XEEL). Dentre os resíduos envolvidos na ligação à carboidratos em XEEL somente o Trp³²⁶ está conservado em ELL. Os três sítios de ligação ao átomo de cálcio encontrados em XEEL também não estão conservados em ELL (Figura 9).

Figura 9 - Comparação de sequência entre ELL e XEEL.

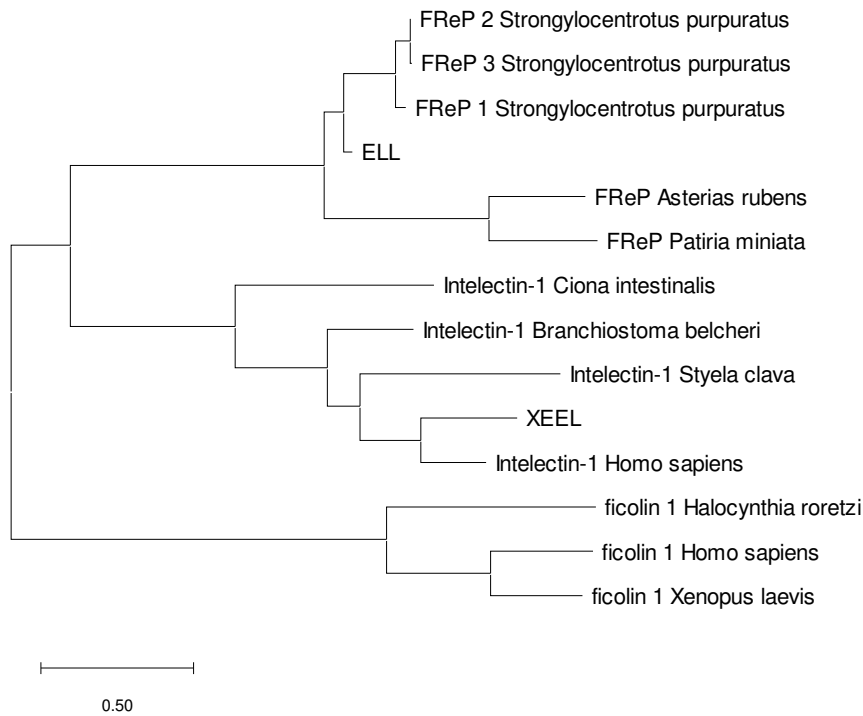


Fonte: o Autor (2021). Alinhamento entre a sequência de aminoácidos de ELL e a intelectina do anfíbio *Xenopus laevis* (Q5PPM0.1). Aminoácidos em vermelho representam as regiões conservadas. Os resíduos envolvidos na ligação ao carboidrato estão destacados em preto. Os resíduos envolvidos no sítio de cálcio estão marcados em azul. O programa ESPRIPT 3.0 foi usado para construir o alinhamento.

Quando comparada a outras lectinas contendo um domínio do tipo fibrinogênio, como ficolinas e tachylectinas, ELL não apresentou similaridade significativa. Baseado no alinhamento múltiplo de lectinas contendo fibrinogênio (intelectinas e ficolinas, além das FRePs não caracterizadas de *S. purpuratos* e das estrelas do mar *Asterias rubens* e *Patiria miniata*), uma árvore filogenética não enraizada foi construída usando o método *neighbor-joining* com o teste de 500 *bootstrap* (Figura 10).

De acordo com a árvore, as ficolinas de *Homo sapiens*, *Xenopus laevis* e *Halocynthia roretzi* formaram um *cluster* independente das intelectinas e das FRePs de equinodermos, incluindo ELL. ELL e as outras FRePs de equinodermos estão dispostas em um *cluster* diferente daquele onde estão alocadas as intelectinas. Sendo assim, embora as FRePs de equinodermos estejam mais relacionadas às intelectinas que às ficolinas, elas ainda estão agrupadas separadamente das intelectinas.

Figura 10 - Árvore filogenética de lectinas contendo domínio do tipo fibrinogênio.



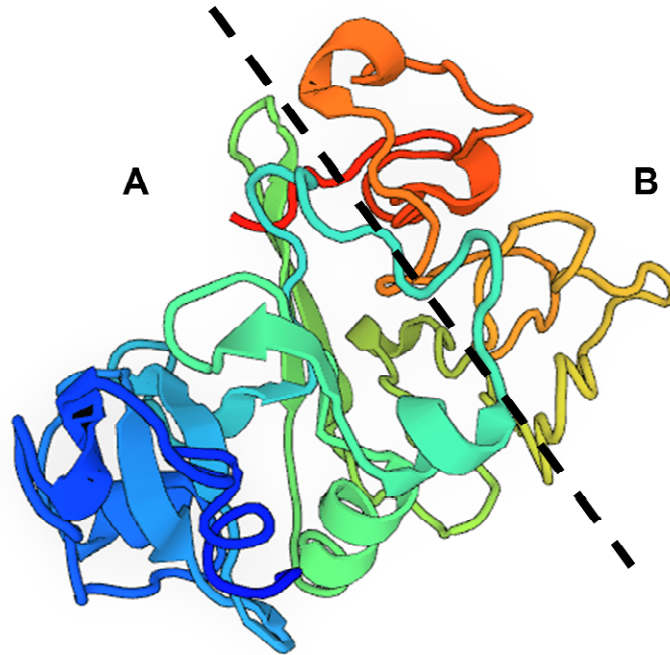
Fonte: o Autor (2021). A árvore foi construída pelo algoritmo *neighbor-joinin* usando o programa MEGA X baseado no múltiplo alinhamento por MUSCLE. A confiabilidade das ramificações foi testada pelo *bootstrap* (500 replicatas). A barra de escala corresponde a substituição estimada de 0.5 aminoácido por sítio.

4.8 Predição estrutural de ELL

O modelo final de ELL apresentou 81,7% dos aminoácidos em regiões permitidas (61,9% em regiões favoráveis) no gráfico de Ramachandran (dados não mostrados). O C-score estimado para o modelo foi de -1,87, o TM-score foi $0,49 \pm 0,15$ e RMSD de $9,8 \pm 4,6 \text{ \AA}$. Apesar dos parâmetros indicarem boa qualidade para o modelo gerado, o elevado número de aminoácidos em regiões desfavoráveis o compromete.

A estrutura predita de ELL consistiu em uma estrutura contendo dois domínios distintos. O domínio A compreende a região similar ao fibrinogênio, ele é composto por um misto de fitas beta e α -hélices. O domínio B compreende a região C-terminal de ELL, este domínio é pouco estruturado, sendo composto basicamente por alças de tamanhos variados (Figura 11).

Figura 11- Modelo de estrutura tridimensional de ELL.



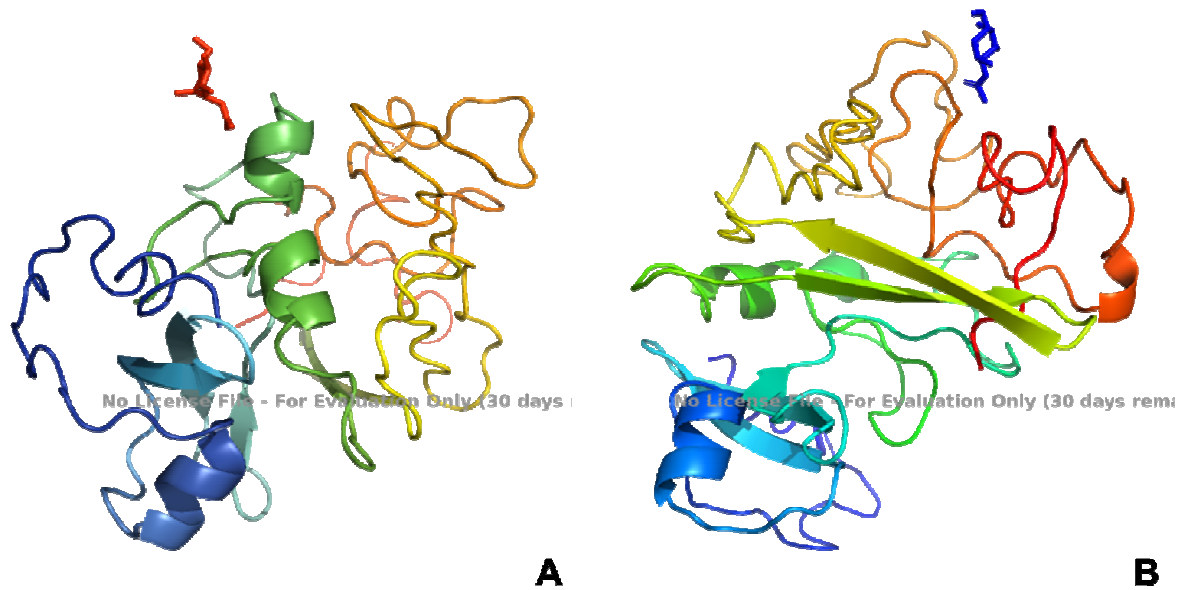
Fonte: o Autor (2021). Estrutura 3D do monômero de ELL previsto pelo servidor web I-TASSER. A linha pontilhada separa os dois domínios A (N-terminal, fibrinogênio) e B (C-terminal)

As estruturas que apresentaram maior similaridade com ELL foram os fibrinogênios de *Gallus gallus* (1m1jE), *Homo sapiens* (3ghgK) e *Petromyzon marinus* (1lwuE). Os TM-scores observados foram 0,811; 0,809 e 0,804, respectivamente. O TM-score varia entre 0 e 1, onde 1 significa perfeita simetria entre duas estruturas.

Na avaliação de funções fisiológicas, a ferramenta GO *terms* indicou que ELL ocupa a porção extracelular da célula com um CscoreGo de 0,49. CscoreGO é a pontuação de confiança dos termos GO previstos. Os valores de CscoreGO variam entre 0 e 1; onde um valor mais alto indica uma maior confiança na previsão da função usando o modelo.

As ferramentas COFACTOR e COACH apontaram dois domínios distintos de ligação a carboidratos (Figura 12). O DRC 1 está localizado no domínio A de ELL (N-terminal) e pode interagir com *N*-acetil-manosamina, os aminoácidos Tyr⁸⁰, Glu⁸³, Asp⁸⁴ e Glu⁸⁷ estão envolvidos na ligação. O DRC 2 está no domínio B (C-terminal) e pode interagir com *N*-acetil-galactosamina (GalNAc), os aminoácidos Leu¹⁸⁷, Ser¹⁸⁸, Lys¹⁸⁹ e Tyr²¹⁷ estão envolvidos na ligação.

Figura 12 - Modelo tridimensional de ELL com seus ligantes.



Fonte: o Autor (2021). Modelo 3D do monômero de ELL com seus ligantes. Em vermelho o ligante ManNAc, em azul o ligante GalNAc

4.9 Atividade antimicrobiana de ELL

4.9.1 Efeitos da lectina em células planctônicas

ELL inibiu o crescimento de bactérias gram-positivas, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Não foi observado efeito bactericida (Tabela 4).

Tabela 4 - Efeitos de ELL em células planctônicas de bactérias

Bactérias	ELL	
	CIM*	CBM**
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	200	ND
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	200	ND
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11303	ND	ND

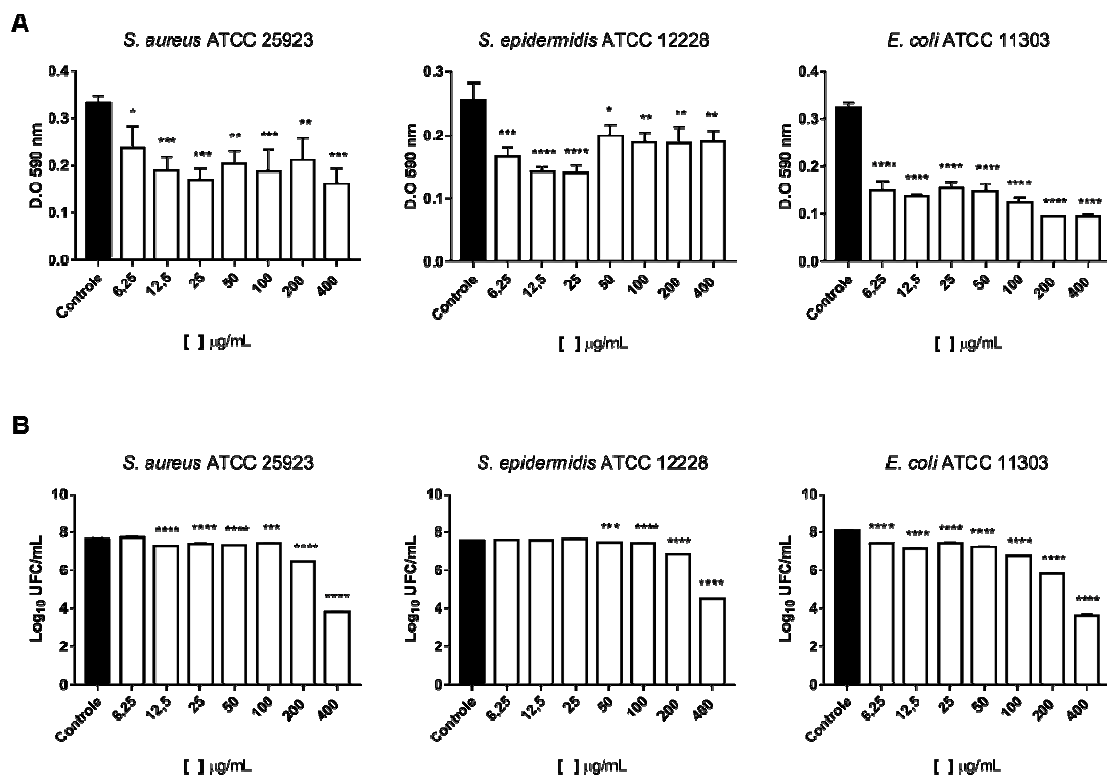
Fonte: o Autor (2021). Concentrações variaram de 400 a 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. (*) Concentração inibitória mínima; (**) Concentração bactericida mínima e (ND) não determinado nas concentrações testadas.

4.9.2 Quantificação de massa e do número de células viáveis de biofilme

Os tratamentos de biofilmes de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* com ELL apresentaram reduções significativas na biomassa bacteriana. Nas bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *S. epidermidis* houve diferenças estatísticas entre os tratamentos e todas as concentrações utilizadas reduziram significativamente a biomassa dos biofilmes. ELL foi capaz de reduzir em mais de 50% a biomassa de *E. coli*, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos. Não foi observado efeito dose-dependente (Figura 13a).

Em relação ao número de células viáveis, ELL reduziu a viabilidade celular de todas as bactérias testadas, principalmente na maior concentração utilizada (400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figura 13b).

Figura 13 - Formação de biofilme de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* na presença de ELL.



Fonte: o Autor (2021). **A** Biomassa de biofilme e **B** Número de células viáveis no biofilme. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ comparado ao controle.

5 DISCUSSÃO

Diversas proteínas relacionadas ao fibrinogênio (FRePs) têm sido isoladas e caracterizadas de vertebrados e invertebrados. Em vertebrados, as tenascinas (inicialmente conhecidas como citotactinas) (JONES *et al.*, 1989), ficolinas (ICHIJO *et al.*, 1993), fibroleucinas (KOYAMA *et al.*, 1987), nos invertebrados, as taquilectinas isoladas do caranguejo-ferradura *Tachypleus tridentatus*, do camarão *Peneus monodon* e da ostra *Sinonovacula constricta* são representantes da grande família das FRePs (INAMORI *et al.*, 1999; ANGTOHNG *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2021).

A maior parte das lectinas isoladas de equinodermos são oriundas do fluido celomático, com suas funções supostamente relacionadas ao processo de defesa, atuando no reconhecimento específico de substâncias ou agentes patogênicos (BULGAKOV *et al.*, 2013).

Neste trabalho, foi isolada uma lectina que possui domínio do tipo fibrinogênio, denominada ELL (*Echinometra lucunter lectin*), presente no fluido celomático do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*, através de cromatografia de afinidade em matriz de goma de xantana e cromatografia de filtração em gel.

A cromatografia de afinidade é um procedimento referência para o isolamento de lectinas de equinodermos, como observado com as lectinas isoladas dos ovos de *E. lucunter* (CARNEIRO *et al.*, 2015), ovos de *Anthocidaris crassispina* (SASAKI; AKETA, 1981), fluido celomático de *Strongylocentrotus nudus* (BULGAKOV *et al.*, 2013) e de *Cucumaria echinata* (HATAKEYAMA *et al.*, 1994).

Interessantemente, não há relatos na literatura sobre a utilização da goma de xantana como matriz, em cromatografias de afinidade. A goma de xantana é um exopolissacarídeo secretado pela bactéria *Xanthomonas campestris* composto por uma cadeia principal de unidades repetidas de β -(1 \rightarrow 4)-D-glucopiranosídeo, com ramificações de (1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranosídeo-(2 \rightarrow 1)- β -D-ácido glucurônico-(4 \rightarrow 1)- β -D-manopiranosídeo em resíduos alternados (SWORN, 2021). Desta forma, esse é o primeiro relato da utilização de goma de xantana como matriz de afinidade para o isolamento de lectinas.

ELL foi capaz de aglutinar eritrócitos do tipo sanguíneo O em sua forma nativa, fato também observado na lectina MBL-SN de *Strongylocentrotus nudus* (BULGAKOV *et al.*, 2013). Outras lectinas de equinodermos aglutinaram eritrócitos humanos, como PISL (*Paracentrotus lividus*), echinoidin (*Anthocidaris crassispina*), ELEL (*Echinometra lucunter*) e SUEL (*Anthocidaris crassispina.*), mas não exibiram aglutinação preferencial para hemácias

humanas do tipo O (CARNEIRO *et al.*, 2015; DRAGO *et al.*, 2009; GIGA; SUTOH; IKAI, 1985; SASAKI; AKETA, 1981).

ELL mostrou atividade hemaglutinante entre pH 5 e 10, com seu ótimo em pH 9. A faixa de pH neutro-alcálico parece ser ótima para as lectinas de equinodermos, visto que as lectinas ELA, HaL, MBL-SN e HSL apresentaram atividade ótima em pH 7, pH 7-10, pH 7 e pH 8, respectivamente (DUARTE, 2018; TORRES, 2017; BULGAKOV *et al.*, 2013; GOWDA *et al.*, 2008). Isto pode ser explicado que, devido aos organismos marinhos viverem em um habitat onde a faixa de pH está no neutro-alcálico, suas funções fisiológicas são reguladas pelo mesmo.

ELL apresentou atividade hemaglutinante estável ao ser aquecida até 50 °C, perdendo sua atividade aglutinante inicial com o aumento da temperatura, sendo totalmente abolida a partir da temperatura de 80 °C. O mesmo perfil de termoestabilidade foi observado em ELA, lectina isolada do fluido celomático do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* (DUARTE, 2018). Mesmo comportamento foi observado para as lectinas HaL e MBL-SN, que tiveram a atividade hemaglutinante diminuída, quando submetidas ao aquecimento, perdendo suas capacidades de aglutinação nas temperaturas de 70 e 50 °C, respectivamente (TORRES, 2017; BULGAKOV *et al.*, 2013). Diferentemente destas ELL perde sua capacidade de aglutinar eritrócitos somente quando aquecida à 100 °C (CARNEIRO *et al.*, 2015).

ELL mostrou ser dependente de íons divalentes, outras lectinas como ELA, MBL-SN e *Echinoidin* que também mostraram possuir esta dependência, não sendo capazes de aglutinar eritrócitos na presença de uma agente quelante (DUARTE, 2018; BULGAKOV *et al.*, 2013; GIGA; SUTOH; IKAI, 1985). Geralmente as lectinas isoladas de equinodermos tem se mostrado dependentes de cálcio para que possam expressar sua atividade biológica, onde na ausência deste íon, não há atividade hemaglutinante (DUARTE, 2018; HATAKEYAMA *et al.*, 1993; MATSUI *et al.*, 1994; BULGAKOV *et al.*, 2007). Distintamente, ELL e PISL não dependem de íons divalentes (CARNEIRO *et al.*, 2015; DRAGO *et al.*, 2009).

A atividade hemaglutinante de ELL foi inibida pelas glicoproteínas mucinas de estômago de porco tipo 2 e 3 (PSM-II e PSM-III), mucina submaxilar bovina (BSM) e tiroglobulina. A inibição de diversas lectinas por mucinas tem sido observada (MOURA *et al.*, 2013; MELO *et al.*, 2014; MATSUI *et al.*, 1994). Normalmente, esta interação está associada ao reconhecimento de galactose e *N*-acetyl-galactosamina, presentes em abundância nos glicanos *O*-ligados que compõem as mucinas (DEVINE; MCKENZIE, 1992).

As lectinas isoladas dos equinodermos *Echinometra lucunter* (ELA), *Holothuria arenicola* (Hal) e *Holothuria grisea* (HGA) mostraram possuir afinidade por PSM-II e PSM-III (DUARTE, 2018; TORRES, 2017; MOURA *et al.*, 2013). Por outro lado, as lectinas ELEL e SUEL foram inibidas por apenas galactose e seus derivados (CARNEIRO *et al.*, 2015; SASAKI; AKETA, 1981).

A tiroglobulina bovina é uma glicoproteína com pelo menos 20 sítios para *N*-glicosilação, nos quais estão distribuídos oligossacarídeos híbridos, complexos e ricos em manose. Nos oligossacarídeos complexos são encontrados resíduos de fucose e galactose, além de manose e glucosamina em menor quantidade. Nos híbridos são encontrados galactose, manose e glucosamina, mas não fucose (YANG *et al.*, 1996). Com tantos possíveis sítios de interação para lectinas, não está claro qual carboidrato de reconhecimento da ELL na inibição por tiroglobulina.

Além das glicoproteínas, a interação com a matriz de xantana sugere o reconhecimento de carboidratos complexos por ELL. Curiosamente, os carboidratos que compõem a xantana diferem daqueles presentes nas glicoproteínas que inibiram ELL. Desta forma não foi possível determinar experimentalmente a especificidade de ELL.

Visando trazer um pouco de luz a esta questão, um modelo tridimensional de ELL foi construído. A ocorrência de dois DRCs localizados nos domínios A e B de ELL sugerem o reconhecimento diferencial de carboidratos não relacionados, o que ajuda a entender o perfil de inibição e a interação com a matriz de xantana.

Conforme observado em SDS PAGE e MALDI/ToF, ELL é um dímero, onde as subunidades estão mantidas por pontes dissulfeto. A maioria das lectinas isoladas de equinodermos apresentam conformações diméricas, incluindo ELEL, MBL-SN, Echinonectin, SUEL e *Echinoidin* (BULGAKOV *et al.*, 2013; CARNEIRO *et al.*, 2015; GIGA; SUTOH; IKAI, 1985; SASAKI; AKETA, 1981; VENO; STRUMSKI; KINSEY, 1990).

Além disso, as análises de SDS PAGE e MALDI/ToF indicam a existência de ELL como uma mistura de duas isoformas. A presença de isoformas, originadas a partir de divergências de sequência, já fora observada na outra lectina de *E. lucunter*, ELEL, que também apresenta duas isoformas (CARNEIRO *et al.*, 2015). Entretanto, no caso de ELL as microheterogeneidades observadas não justificam tamanha diferença de massa entre as duas isoformas (1.914 Da).

A presença de glicosilação é uma hipótese para justificar a diferença entre ELL-a e ELL-b, mas nenhum carboidrato ligado a peptídeos foi encontrado durante o sequenciamento. Além disso, proteínas contendo o domínio do tipo fibrinogênio não

costumam ser glicosiladas, com exceção das intelectinas (TSUJI *et al.*, 2007; WANGKANONT *et al.*, 2016).

Outra hipótese para explicar a diferença entre ELL-a e ELL-b é a existência de um peptídeo sinal e a ocorrência de uma forma pré-proteica. Nesta condição, ELL-a seria a proteína madura, enquanto ELL-b seria a proteína não processada, mantendo o peptídeo sinal. De fato, peptídeos sinais são muito comuns em proteínas encontradas no fluido celomático de invertebrados (HAN *et al.*, 2007; NAKANO *et al.*, 1999; KAKIUCHE *et al.*, 2002). Uma vez que estas proteínas são sintetizadas em compartimentos celulares (normalmente em células do fluido, como os coelomócitos), elas precisam ser direcionadas para o meio extracelular, o que ocorre através da informação contida no peptídeo sinal. Este peptídeo é, posteriormente, removido por hidrólise (OWJI *et al.*, 2018).

É importante ressaltar que há evidências, em se tratando de lectinas de invertebrados, que as proteínas não processadas são ativas (HAN *et al.*, 2007; NAKANO *et al.*, 1999; KAKIUCHE *et al.*, 2002). Uma vez que ELL-b foi recuperada através de cromatografia de afinidade, é plausível considerar como uma proteína ativa. Além disso, o parâmetro GO *terms* indicou que ELL é possivelmente uma proteína extracelular.

As proteínas que apresentaram maior identidade com ELL, aquelas não caracterizadas de *Strongylocentrotus purpuratus*, possuem peptídeos sinais de aproximadamente 2.000 Da, um valor que corrobora com a diferença entre ELL-a e ELL-b (1.914 Da). Esta informação fortalece a hipótese de ELL-b ser uma pré-proteína.

No entanto, não foram encontrados peptídeos similares aos peptídeos sinais das proteínas de *S. purpuratus*. Esta informação é relevante, mas pode ser justificada pela composição do peptídeo sinal. Em geral, estes peptídeos têm caráter hidrofóbico, são ricos em aminoácidos alifáticos, *i.e.* Leu, Isso, Val; e pobres em aminoácidos carregados. Esta composição dificulta a ionização e a consequente identificação destes peptídeos por MS (SEIDLER *et al.*, 2010). Sendo assim, novos experimentos serão necessários para melhor compreender as diferenças entre ELL-a e ELL-b e confirmar uma das hipóteses supracitadas.

ELL é uma proteína relacionada ao fibrinogênio (FReP), devido que, em sua sequência, há aminoácidos conservados da assinatura do domínio FReP: -GGGW (ARYG) R - na região N-terminal, além das cisteínas altamente conservadas nas posições (29 e 57). ELL apresentou elevada similaridade de sequência com FRePs de equinodermos, especialmente com as FRePs de *S. purpuratus*. Infelizmente, estas proteínas são hipotéticas, assinadas em genomas depositados em bancos de dados, portanto, as informações a respeito de suas propriedades bioquímicas são limitadas.

Quando comparadas a FRePs bem caracterizadas, como ficolinas e intelectinas, ELL mostrou similaridade significativa com as intelectinas. Entretanto, os resíduos de ligação a carboidratos, bem como aqueles envolvidos na interação com os íons Ca^{2+} , não estão conservados em ELL.

As intelectinas são proteínas típicas de cordados, não sendo encontradas em invertebrados. Elas são caracterizadas pela presença de um domínio do tipo fibrinogênio em seu N-terminal e um domínio singular na porção C-terminal, o qual é responsável pela ligação ao carboidrato. Galactofuranose é o principal ligante das intelectinas. As intelectinas são glicoproteínas com massa molecular de aproximadamente 30 kDa, normalmente se associam na forma de dímeros de trímeros, onde os trímeros são mantidos por pontes dissulfeto. Elas estão envolvidas na interação com bactérias invasoras e também simbioses, por vezes agindo como mediadores na relação microrganismo-hospedeiro (TSUJI *et al.*, 2007; WANGKANONT *et al.*, 2016; WESENER *et al.*, 2015).

ELL não pode ser classificada como uma intelectina, pois não apresenta as características descritas acima. No entanto, o grau de identidade demonstrado para com as proteínas de cordados sugere ao menos um ponto convergente na evolução de proteínas contendo domínio do tipo fibrinogênio.

Por outro lado, a divergência entre ELL e ficolinas, indicada pela ausência de similaridade e observada na árvore filogenética, sugere a ausência de relação entre a proteína do ouriço e as lectinas contendo domínios do tipo colágeno.

O modelo tridimensional gerado para ELL não parece estar associado a quaisquer estruturas de lectinas determinadas com dados experimentais depositados, pois o modelo criado em nada se assemelha a lectinas conhecidas. Sendo assim, ELL só pode ser definida como uma FReP, mas não pode ser incluída em nenhuma família de lectinas conhecidas.

Em invertebrados, a primeira linha de defesa está relacionada ao reconhecimento dos patógenos por receptores/proteínas de reconhecimento padrão (PRPs). Dentre elas, destacam-se as proteínas relacionadas ao fibrinogênio ou (FRePs) identificadas nos invertebrados e que, em sua maioria, atuam como PRPs desempenhando papéis importantes na aglutinação microbiana, lise e *clearance* bacteriano e na defesa antiparasitária (GORDY *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2011).

ELL foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* e *S. epidermidis*, além de reduzir a biomassa e a viabilidade celular do biofilme de ambas as bactérias na maior concentração testada. Lectinas de invertebrados marinhos têm revelado grande potencial em ensaios de atividade antibacteriana, assim como ELL, outras lectinas de equinodermos

também foram capazes de apresentar essa atividade biológica: SJL-1 isolada de *Apostichopus japonicus* foi capaz de aglutinar as bactérias *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda*, *E. coli* e *Lactococcus garvieae* (ONO *et al.*, 2018), a lectina HSL (*Holothuria scabra lectin*), que aglutina em ensaios biológicos as bactérias *E. coli*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Serratia* sp., *Klebsiella* sp. e *Shigella* sp. (Gram-positivas e Gram-negativas) (GOWDA; GOSWAMI; KHAN, 2008), e ELEL, lectina dos ovos de *Echinometra lucunter* que é capaz de aglutinar células bacterianas de *S. aureus* (CARNEIRO *et al.*, 2015).

Outros estudos revelaram que as FRePs de invertebrados são reguladas positivamente quando submetidos a desafios com agentes patogênicos, como é o caso observado no mexilhão *Mytilus galloprovincialis*, onde a proteína MuFREP é expressa em maiores quantidades após o desafio com a bactéria Gram-negativa *Vibrio anguillarum* e com a bactéria Gram-positiva *Micrococcus lysodeikticus* (ROMERO *et al.*, 2011). O mesmo perfil foi verificado em camarões *Marsupenaeus japonicus* desafiados com *V. anguillarum*, onde a expressão de MjFREP2 atingiu maiores níveis (SUN, *et al.*, 2014). As FREPs dos invertebrados são importantes proteínas de reconhecimento microbiano, atuando na defesa antimicrobiana a partir da sua ligação com os lipopolissacarídeos da superfície de bactérias Gram-negativas, peptidoglicanos e ácido lipoteicoico da parede de bactérias Gram-positivas (CHAI *et al.*, 2012; SUN, *et al.*, 2014).

6 CONCLUSÃO

Uma nova lectina, presente no fluido celomático do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*, denominada de ELL (*Echinometra lucunter lectin*), foi purificada por combinação de cromatografia de afinidade em goma de xantana e cromatografia de exclusão molecular. Este é o primeiro relato da utilização de goma de xantana como matriz de afinidade para o isolamento de lectinas. ELL tem especificidade para glicoproteínas mucina e tiroglobulina. Sua sequência de aminoácidos é semelhante a proteínas relacionadas ao fibrinogênio (FRePs), podendo assim ser classificada como uma proteína pertencente a esta grande família. Em ensaios de atividade antimicrobiana, ELL foi capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas patogênicas, além de reduzir a biomassa e viabilidade celular do biofilme formado por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sugerindo sua capacidade de reconhecer patógenos. Estudos sobre sua estrutura terciária devem ser conduzidos para a elucidação dos mecanismos estruturais, bem como uma melhor avaliação do potencial biotecnológico e suas possíveis aplicações na área de antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- ADEMA, C. M.; HERTEL, L. A.; MILLER, R. D.; LOKER, E. S. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 16, p. 8691-8696, 1997.
- AGNELLO, M. Sea Urchin: From Environment to Aquaculture and Biomedicine. **BoD-Books on Demand**, 2017.
- ANGTHONG, P.; ROYTRAKUL, S.; JARAYABHAND, P.; JIRAVANICHPAISAL, P.A. Characterization and function of a tachylectin 5-like immune molecule in *Penaeus monodon*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 76, p. 120-131, 2017.
- AUB, J. C.; SANFORD, B. H.; COTE, M. N. Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. **Proceedings of the National Academy of Science**, USA, v. 54, p. 396-399, 1965.
- BARTON, W. A., TZVETKOVA, D., & NIKOLOV, D. B. Structure of the angiopoietin-2 receptor binding domain and identification of surfaces involved in Tie2 recognition. **Structure**, v. 13, n. 5, p. 825-832, 2005.
- BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular immunology**, v. 40, n. 12, p. 845-859, 2004.
- BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, USA, v. 119, p. 419, 1954.
- BROWN, J. H., VOLKMANN, N., JUN, G., HENSCHEN-EDMAN, A. H., & COHEN, C. The crystal structure of modified bovine fibrinogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 1, p. 85-90, 2000.
- BULGAKOV, A. A.; NAZARENKO, E. L.; PETROVA, I.Y.; ELISEIKINA, M.G.; VAKHRUSHEVA, N. M.; ZUBKOV, V.A. Isolation and properties of a mannan-binding lectin from the coelomic fluid of the holothurian *Cucumaria japonica*. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 65, n. 8, p. 933-939, 2000.
- BULGAKOV, A. A.; ELISEIKINA, M. G.; PETROVA, I. Y.; NAZARENKO, E. L.; KOVALCHUK, S. N.; KOZHEMYAKO, V. B.; RASSKAZOV, V. A. Molecular and biological characterization of a mannan-binding lectin from the holothurian *Apostichopus japonicus*. **Glycobiology**, v. 17, n. 12, p. 1284-1298, 2007.
- BULGAKOV, A. A.; ELISEIKINA, M. G.; KOVALCHUK, S. N.; PETROVA, I. Y.; LIKHATSKAYA, G. N.; SHAMSHURINA, E. V.; RASSKAZOV, V. A. Mannan-binding lectin of the sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. **Marine Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 73-86, 2013.
- CARNEIRO, R. F.; TEIXEIRA, C. S.; DE MELO, A. A.; DE ALMEIDA, A. S.; CAVADA, B. S.; DE SOUSA, O. V.; SAMPAIO, A. H. L-Rhamnose-binding lectin from eggs of the

Echinometra lucunter: Amino acid sequence and molecular modeling. **International journal of biological macromolecules**, v. 78, p. 180-188, 2015.

CARY, G. A.; HINMAN, V. F. Echinoderm development and evolution in the post-genomic era. **Developmental biology**, v. 427, n. 2, p. 203-211, 2017.

CHAI, Y. M., ZHU, Q., YU, S. S., ZHAO, X. F., & WANG, J. X. A novel protein with a fibrinogen-like domain involved in the innate immune response of *Marsupenaeus japonicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 32, n. 2, p.307-315, fev. 2012.

CHEN, L.; YAN, J.; SUN, W.; ZHANG, Y.; SUI, C.; QI, J.; FENG, L. A zebrafish intelectin ortholog agglutinates both Gram-negative and Gram-positive bacteria with binding capacity to bacterial polysaccharide. **Fish & shellfish immunology**, v. 55, p. 729-736, 2016.

CHEN, L.; YAN, J.; SHI, J.; SUN, W.; CHEN, Z.; YU, J.; FENG, L. Zebrafish intelectin 1 (zITLN1) plays a role in the innate immune response. **Fish & shellfish immunology**, v. 83, p. 96-103, 2018.

CHEN, L; LI, J; YANG, G. A comparative review of intelectins. **Scandinavian journal of immunology**, v. 92, n. 1, p. e12882, 2020.

CHRISTOPHIDES, G. K.; VLACHOU, D.; KAFATOS, F. C. Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Immunological reviews**, v. 198, n. 1, p. 127-148, 2004.

CLARK, E. G.; BHULLAR, B. A. S.; DARROCH, S. A.; BRIGGS, D. E. Water vascular system architecture in an Ordovician ophiuroid. **Biology letters**, v. 13, n. 12, p. 20170635, 2017.

CUMMINGS, R. D.; ETZLER, M. E. R-type Lectins. **Essentials of Glycobiology. 2nd edition**, 2009.

DAI, Y. J.; WANG, Y. Q.; ZHANG, Y. H.; LIU, Y.; LI, J. Q.; WEI, S.; LAN, J. F. The role of ficolin-like protein (PcFLP1) in the antibacterial immunity of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). **Molecular immunology**, v. 81, p. 26-34, 2017.

DE MELO, A. A.; CARNEIRO, R. F.; DE MELO S. W.; DA MATA M., R.; SILVA, G. C.; DE SOUSA, O. V.; SAMPAIO, A. H. 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.

DEVINE, P. L.; MCKENZIE, I. F. Mucins: structure, function, and associations with malignancy. **Bioessays**, v. 14, n. 9, p. 619-625, 1992.

DRAGO, F., MALAGOLI, D., PEZZINO, F. M., D'URSO, V., & SAMMARTANO, F. Presence of a low molecular weight lectin in the coelomic fluid of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. **Inv Surv Journal**, v. 6, p. 15-20, 2009.

DUARTE, P. L. Purificação e caracterização bioquímica de uma lectina extraída do fluido celomático do ouriço-do-mar, *Echinometra lucunter*, exposto a indução bacteriana. 2018.

- ELISEIKINA, M. G.; PETROVA, I. Y.; MAGARLAMOV, T. Y.; DOLMATOV, I. Y.; BULGAKOV, A. A. Mannan-binding lectins of echinoderms are components of humoral defense. In: **Echinoderms: Munchen: Proceedings of the 11th International Echinoderm Conference, 6-10 October 2003, Munich, Germany**. Taylor & Francis, p. 119. 2004.
- ENDO, Y.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 43, n. 5, p. 705-712, 2011.
- ENDO, Y.; SATO, Y.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. Cloning and characterization of the human lectin P35 gene and its related gene. **Genomics**, v. 36, n. 3, p. 515-521, 1996.
- FERRÈ, F.; & CLOTE, P. DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction. **Nucleic acids research**, v. 33, n. suppl_2, p. W230-W232, 2005.
- FUJIMORI, Y.; HARUMIYA, S.; FUKUMOTO, Y.; MIURA, Y.; YAGASAKI, K.; TACHIKAWA, H.; FUJIMOTO, D. Molecular cloning and characterization of mouse ficolin-A. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 244, n. 3, p. 796-800, 1998.
- FUHRMAN, M. H.; SUHAN, J. P.; ETTENSOHN, C. A. Developmental expression of echinonectin, an endogenous lectin of the sea urchin embryo. **Development, growth & differentiation**, v. 34, n. 2, p. 137-150, 1992.
- GARLATTI, V.; BELLOY, N.; MARTIN, L.; LACROIX, M.; MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; GABORIAUD, C. Structural insights into the innate immune recognition specificities of L- and H-ficolins. **The EMBO journal**, v. 26, n. 2, p. 623-633, 2007.
- GARLATTI, V.; MARTIN, L.; GOUT, E.; REISER, J. B.; FUJITA, T.; ARLAUD, G. J.; GABORIAUD, C. Structural basis for innate immune sensing by M-ficolin and its control by a pH-dependent conformational switch. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 49, p. 35814-35820, 2007.
- GASPARINI, F.; FRANCHI, N.; SPOLAORE, B.; BALLARIN, L. Novel rhamnose-binding lectins from the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 32, n. 10, p. 1177-1191, 2008.
- GIGA, Y.; SUTOH, K.; IKAI, A. A new multimeric hemagglutinin from the coelomic fluid of the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. **Biochemistry**, v. 24, n. 16, p. 4461-4467, 1985.
- GIGA, Y.; IKAI, A.; TAKAHASHI, K. The complete amino acid sequence of echinoidin, a lectin from the coelomic fluid of the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. Homologies with mammalian and insect lectins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 13, p. 6197-6203, 1987.
- GORDY, M. A.; PILA, E. A.; HANINGTON, P. C. The role of fibrinogen-related proteins in the gastropod immune response. **Fish & shellfish immunology**, v. 46, n. 1, p. 39-49, 2015.
- GOWDA, N. M.; GOSWAMI, U.; KHAN, M. I. T-antigen binding lectin with antibacterial activity from marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*): Possible involvement in

differential recognition of bacteria. **Journal of invertebrate pathology**, v. 99, n. 2, p. 141-145, 2008.

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

HAMMARSTROM, S.; KABAT, E. A. Purification and characterization of a blood-group A reactive hemagglutinin from the snail *Helix pomatia* and a study of its combining site. **Biochemistry**, United Kingdom, v. 8, p. 2696–2705, 1969.

HAN, J.; ZHOU, H.; HORAZDOVSKY, B.; ZHANG, K.; XU, R. M.; ZHANG, Z. Rtt109 acetylates histone H3 lysine 56 and functions in DNA replication. **Science**, v. 315, n. 5812, p. 653-655, 2007.

HAN, L. L.; YUAN, Z.; DAHMS, H. U.; LI, Q. Y.; ZHANG, Q. Z.; WU, R. J.; HOU, L. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a C-type lectin (AJCTL) from the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. **Immunology letters**, v. 143, n. 2, p. 137-145, 2012.

HASAN, I.; GERDOL, M.; FUJII, Y.; OZEKI, Y. Functional characterization of OXYL, a SghC1qDC LacNAc-specific lectin from the crinoid feather star *Anneissia japonica*. **Marine drugs**, v. 17, n. 2, p. 136, 2019.

HATAKEYAMA, T.; HIMESHIMA, T.; KOMATSU, A.; & YAMASAKI, N. Purification and characterization of two lectins from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 57, n. 10, p. 1736-1739, 1993.

HATAKEYAMA, T.; KOHZAKI, H.; NAGATOMO, H.; YAMASAKI, N. Purification and characterization of four Ca²⁺-dependent lectins from the marine invertebrate, *Cucumaria echinata*. **The Journal of Biochemistry**, v. 116, n. 1, p. 209-214, 1994.

HATAKEYAMA, T.; OHUCHI, K.; KUROKI, M.; YAMASAKI, N. Amino acid sequence of a C-type lectin CEL-IV from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 59, n. 7, p. 1314-1317, 1995.

HATAKEYAMA, T.; MATSUO, N.; SHIBA, K.; NISHINOHARA, S.; YAMASAKI, N.; SUGAWARA, H.; AOYAGI, H. Amino acid sequence and carbohydrate-binding analysis of the N-acetyl-D-galactosamine-specific C-type lectin, CEL-I, from the Holothuroidea, *Cucumaria echinata*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 66, n. 1, p. 157-163, 2002.

HATAKEYAMA, T.; ICHISE, A.; YONEKURA, T.; UNNO, H.; GODA, S.; NAKAGAWA, H. cDNA cloning and characterization of a rhamnose-binding lectin SUL-I from the toxopneustid sea urchin *Toxopneustes pileolus* venom. **Toxicon**, v. 94, p. 8-15, 2015.

HATAKEYAMA, T.; ICHISE, A.; UNNO, H.; GODA, S.; ODA, T.; TATENO, H.; NAKAGAWA, H. Carbohydrate recognition by the rhamnose-binding lectin SUL-I with a novel three-domain structure isolated from the venom of globiferous pedicellariae of the flower sea urchin *Toxopneustes pileolus*. **Protein Science**, v. 26, n. 8, p. 1574-1583, 2017.

HAYASHIBE, M.; NAKAYAMA, S.; OGASAWARA, M. Shared hemocyte-and intestine-dominant expression profiles of intelectin genes in ascidian *Ciona intestinalis*: insight into the evolution of the innate immune system in chordates. **Cell and tissue research**, v. 370, n. 1, p. 129-142, 2017.

HUANG, S.; YUAN, S.; GUO, L.; YU, Y.; LI, J.; WU, T.; XU, A. Genomic analysis of the immune gene repertoire of amphioxus reveals extraordinary innate complexity and diversity. **Genome research**, v. 18, n. 7, p. 1112-1126, 2008.

HUGHES, A. L. Evolution of the β GRP/GNBP/ β -1, 3-glucanase family of insects. **Immunogenetics**, v. 64, n. 7, p. 549-558, 2012.

ICHIJO, H.; HELLMAN, U.; WERNSTEDT, C.; GONEZ, L. J.; CLAEISSON-WELSH, L.; HELDIN, C. H.; MIYAZONO, K. Molecular cloning and characterization of ficolin, a multimeric protein with fibrinogen-and collagen-like domains. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 19, p. 14505-14513, 1993.

IMAMICHI, Y.; YOKOYAMA, Y. Purification and characterization of a lectin from the starfish *Asterias amurensis*. **Fisheries science**, v. 79, n. 6, p. 1007-1013, 2013.

IMBERTY, A.; BRETON, C.; ORIOL, R.; MOLLICONE, R.; PÉREZ, S. Biosynthesis, structure and conformation of blood group carbohydrate antigens. 2003.

INAMORI, K. I.; SAITO, T.; IWAKI, D.; NAGIRA, T.; IWANAGA, S.; ARISAKA, F.; KAWABATA, S. I. A newly identified horseshoe crab lectin with specificity for blood group A antigen recognizes specific O-antigens of bacterial lipopolysaccharides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 6, p. 3272-3278, 1999.

ITI. Reports. Disponível em:<

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=156857#
null. Acesso em: 10 de março de 2021.

JIANG, L.; SHAO, Y.; XING, R.; LI, C.; CUI, Y.; ZHANG, W.; ZHAO, X. Identification and characterization of a novel PRR of fibrinogen-related protein in *Apostichopus japonicus*. **Fish & shellfish immunology**, v. 82, p. 68-76, 2018.

JONES, F. S.; HOFFMAN, S.; CUNNINGHAM, B. A.; EDELMAN, G. M. A detailed structural model of cytotactin: protein homologies, alternative RNA splicing, and binding regions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 6, p. 1905-1909, 1989.

KAIRIES, N.; BEISEL, H. G.; FUENTES-PRIOR, P.; TSUDA, R.; MUTA, T.; IWANAGA, S.; KAWABATA, S. I. The 2.0-Å crystal structure of tachylectin 5A provides evidence for the common origin of the innate immunity and the blood coagulation systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 24, p. 13519-13524, 2001.

KAKINUMA, Y.; ENDO, Y.; TAKAHASHI, M.; NAKATA, M.; MATSUSHITA, M.; TAKENOSHITA, S.; FUJITA, T. Molecular cloning and characterization of novel ficolins from *Xenopus laevis*. **Immunogenetics**, v. 55, n. 1, p. 29-37, 2003.

KAKIUCHI, M.; OKINO, N.; SUEYOSHI, N.; ICHINOSE, S.; OMORI, A.; KAWABATA, S. I.; ITO, M. Purification, characterization, and cDNA cloning of α -N-acetylgalactosamine-specific lectin from starfish, *Asterina pectinifera*. **Glycobiology**, v. 12, n. 2, p. 85-94, 2002.

KALININ, V. I. Echinoderms Metabolites: **Structure, Functions, and Biomedical Perspectives**. 2021.

KAWABATA, S.; IWANAGA, S. Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 23, n. 4-5, p. 391-400, 1999.

KENJO, A.; TAKAHASHI, M.; MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; NAKATA, M.; MIZUOCHI, T.; FUJITA, T. Cloning and characterization of novel ficolins from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 23, p. 19959-19965, 2001.

KILPATRICK, D. C.; GREEN, C. Lectins as blood typing reagents. **Adv Lectin Res**, v. 5, p. 51-94, 1992.

KILPATRICK, D. C. **Handbook of animal lectins**, properties and biomedical applications. Eddinburg: British library, p. 468, 2000.

KILPATRICK, D.C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 187-197, 2002.

KILPATRICK, D. C.; CHALMERS, J. D. Human L-ficolin (ficolin-2) and its clinical significance. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

KING, N.; WESTBROOK, M. J.; YOUNG, S. L.; KUO, A.; ABEDIN, M.; CHAPMAN, J.; ROKHSAR, D. The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. **Nature**, v. 451, n. 7180, p. 783-788, 2008.

KOYAMA, T.; HALL, L. R.; HASER, W. G.; TONEGAWA, S.; SAITO, H. Structure of a cytotoxic T-lymphocyte-specific gene shows a strong homology to fibrinogen beta and gamma chains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 6, p. 1609-1613, 1987.

KUDTARKAR, P.; CAMERON, R. A. Echinobase: an expanding resource for echinoderm genomic information. **Database**, v. 2017, 2017.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018.

KURATA, S. Peptidoglycan recognition proteins in *Drosophila* immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 42, n. 1, p. 36-41, 2014.

LAVANYA, V.; MOHAMED ADIL, A. A.; AHMED, N.; JAMAL, S. Lectins and Onco therapy. **Oncobiology and Targets**, 2014.

LETUNIC, I.; KHEDKAR, S.; BORK, P. SMART: recent updates, new developments and

status in 2020. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D458-D460, 2021.

LIN, B.; CAO, Z.; SU, P.; ZHANG, H.; LI, M.; LIN, Y.; XU, A. Characterization and comparative analyses of zebrafish intelectins: highly conserved sequences, diversified structures and functions. **Fish & shellfish immunology**, v. 26, n. 3, p. 396-405, 2009.

LU, J.; TAY, P. N.; KON, O. L.; REID, K. Human ficolin: cDNA cloning, demonstration of peripheral blood leucocytes as the major site of synthesis and assignment of the gene to chromosome 9. **Biochemical Journal**, v. 313, n. 2, p. 473-478, 1996.

MARCHALONIS, J. J.; EDELMAN, G. M. Isolation and characterization of a hemagglutinin from *Limulus polyphemus*. **Journal of molecular biology**, v. 32, n. 2, p. 453-465, 1968.

MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; TAIRA, S.; SATO, Y.; FUJITA, T.; ICHIKAWA, N.; MIZUOCHI, T. A novel human serum lectin with collagen-and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 5, p. 2448-2454, 1996.

MATSUI, T.; OZEKI, Y.; SUZUKI, M.; HINO, A.; TITANI, K. Purification and characterization of two Ca²⁺-dependent lectins from coelomic plasma of sea cucumber, *Stichopus japonicus*. **The Journal of Biochemistry**, v. 116, n. 5, p. 1127-1133, 1994.

MOURA, R. D. M.; ARAGÃO, K. S.; DE MELO, A. A.; CARNEIRO, R. F.; OSÓRIO, C. B.; LUZ, P. B.; CAVADA, B. S. *Holothuria grisea* agglutinin (HGA): the first invertebrate lectin with anti-inflammatory effects. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 27, n. 6, p. 656-668, 2013.

MOROKUTTI, A.; REDLBERGER-FRITZ, M.; NAKOWITSCH, S.; KRENN, B. M.; WRESSNIGG, N.; JUNGBAUER, A.; FERKO, B. Validation of the modified hemagglutination inhibition assay (mHAI), a robust and sensitive serological test for analysis of influenza virus-specific immune response. **Journal of Clinical Virology**, v. 56, n. 4, p. 323-330, 2013.

NAGANUMA, T.; OGAWA, T.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.; KAMIYA, H.; MURAMOTO, K. Isolation, characterization and molecular evolution of a novel pearl shell lectin from a marine bivalve, *Pteria penguin*. **Molecular diversity**, v. 10, n. 4, p. 607-618, 2006.

NAKANO, M.; TABATA, S.; SUGIHARA, K.; KOUZUMA, Y.; KIMURA, M.; YAMASAKI, N. Primary structure of hemolytic lectin CEL-III from marine invertebrate *Cucumaria echinata* and its cDNA: structural similarity to the B-chain from plant lectin, ricin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1435, n. 1-2, p. 167-176, 1999.

NAKAGAWA, H.; YAMAGUCHI, C.; SAKAI, H.; KANEMARU, K.; HAYASHI, H.; ARAKI, Y.; KITAGAWA, H. Biochemical and physiological properties of pedicellariar lectins from the toxopneustid sea urchins. **Journal of natural toxins**, v. 8, n. 3, p. 297-308, 1999.

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

NITTA, K.; KAWANO, T.; SUGAWARA, S.; HOSONO, M. Regulation of globotriaosylceramide (Gb3)-mediated signal transduction by rhamnose-binding lectin. **Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 127, n. 4, p. 553-561, 2007.

NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in culture of animal and human leukocytes. **Cancer Res.**, USA, v. 20, 462–466, 1960.

O'HARA, T.; BYRNE, M. **Australian echinoderms: biology, ecology and evolution**. CSIRO publishing, 2017.

OHASHI, T.; ERICKSON, H. P. Oligomeric structure and tissue distribution of ficolins from mouse, pig and human. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 360, n. 2, p. 223-232, 1998.

OKINO, N.; KAWABATA, S. I.; SAITO, T.; HIRATA, M.; TAKAGI, T.; IWANAGA, S. Purification, characterization, and cDNA cloning of a 27-kDa lectin (L10) from horseshoe crab hemocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 52, p. 31008-31015, 1995.

OLIVE, C. Pattern recognition receptors: sentinels in innate immunity and targets of new vaccine adjuvants. **Expert review of vaccines**, v. 11, n. 2, p. 237-256, 2012.

OMORI-SATOH, T.; YAMAKAWA, Y.; MEBS, D. The antihemorrhagic factor, erinacin, from the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*), a metalloprotease inhibitor of large molecular size possessing ficolin/opsonin P35 lectin domains. **Toxicon**, v. 38, n. 11, p. 1561-1580, 2000.

ONO, K.; SUZUKI, T. A.; TOYOSHIMA, Y.; SUZUKI, T.; TSUTSUI, S.; ODAKA, T.; NAKAMURA, O. SJL-1, a C-type lectin, acts as a surface defense molecule in Japanese sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. **Molecular immunology**, v. 97, p. 63-70, 2018.

OWJI, H.; NEZAFAT, N.; NEGAHDARIPOUR, M.; HAJIEBRAHIMI, A.; GHASEMI, Y. A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications. **European journal of cell biology**, v. 97, n. 6, p. 422-441, 2018.

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

PEES, B.; YANG, W.; ZÁRATE-POTES, A.; SCHULENBURG, H.; DIERKING, K. High innate immune specificity through diversified C-type lectin-like domain proteins in invertebrates. **Journal of innate immunity**, v. 8, n. 2, p. 129-142, 2016.

PETROVA, I. Y.; BULGAKOV, A. A.; NAZARENKO, E. L.; SHAMSHURINA, E. V.; KOBELEV, S. S.; ELISEIKINA, M. G. Mannan-binding lectins in the coelomic fluid of various species of Far Easter echinoderms. **Russian Journal of Marine Biology**, v. 35, n. 2, p. 171–177, 2009.

PHUPET, B.; PITAKPORNPREECHA, T.; BAOWUBON, N.; RUNSAENG, P.; UTARABHAND, P. Lipopolysaccharide- and β -1, 3-glucan-binding protein from *Litopenaeus*

- vannamei*: Purification, cloning and contribution in shrimp defense immunity via phenoloxidase activation. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 81, p. 167-179, 2018.
- QIN, N.; WU, M.; TANG, T.; LIU, F. A fibrinogen-related protein (Mnfico3) acts as a novel pattern recognition receptor in *Macrobrachium nipponense*. **Fish & shellfish immunology**, v. 100, p. 272-282, 2020.
- ROMERO, A.; DIOS, S.; POISA-BEIRO, L.; COSTA, M. M.; POSADA, D.; FIGUERAS, A.; NOVOA, B. Individual sequence variability and functional activities of fibrinogen-related proteins (FREPs) in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) suggest ancient and complex immune recognition models in invertebrates. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 3, p.334-344, mar. 2011.
- ROSEMAN, S. Reflections on glycobiology. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 45, p. 41527-41542, 2001.
- ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature protocols**, v. 5, n. 4, p. 725-738, 2010.
- RUPPERT, E. E.; FOX, R.S.; BARNES R.D. **Zoologia dos invertebrados**: uma abordagem evolutiva. 7. Ed. São Paulo; Roca, 2005.
- SAITO, T.; KAWABATA, S. I.; HIRATA, M.; IWANAGA, S. A novel type of limulus lectin-L6. Purification, primary structure, and antibacterial activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 24, p. 14493-14499, 1995.
- SAITO, T.; HATADA, M.; IWANAGA, S.; KAWABATA, S. I. A newly identified horseshoe crab lectin with binding specificity to O-antigen of bacterial lipopolysaccharides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 49, p. 30703-30708, 1997.
- SAKAI, H.; EDO, K.; NAKAGAWA, H.; SHINOHARA, M.; NISHIITSUTSUJI, R.; OHURA, K. Isolation and partial characterization of a L-rhamnose-binding lectin from the globiferous pedicellariae of the toxopneustid sea urchin, *Toxopneustes pileolus*. **International Aquatic Research**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2013.
- SASAKI, H.; AKETA, K. Purification and distribution of a lectin in sea urchin (*Anthocidaris crassispina*) egg before and after fertilization. **Experimental cell research**, v. 135, n. 1, p. 15-19, 1981.
- SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J. A galactose specific lectin from the red marine algae *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, Netherlands, v. 48, p. 765-769, 1998.
- SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J.; SAKER-SAMPAIO, S.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; FARIAS, W. R. L. 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**, Netherlands, v. 14, p.489-495, 2002.
- SCHRÖDER, H. C.; USHIJIMA, H.; KRASKO, A.; GAMULIN, V.; THAKUR, N. L.; DIEHL-SEIFERT, B.; MÜLLER, W. E. Emergence and disappearance of an immune

molecule, an antimicrobial lectin, in basal metazoa: a tachylectin-related protein in the sponge *Suberites domuncula*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 35, p. 32810-32817, 2003.

SEIDLER, J.; ZINN, N.; BOEHM, M. E.; LEHMANN, W. D. De novo sequencing of peptides by MS/MS. **Proteomics**, v. 10, n. 4, p. 634-649, 2010.

SEIKE, Y.; SHIBATA, H.; SUYEMITSU, T. Purification of a sperm lectin extracted from spermatozoa of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. **Development, growth & differentiation**, v. 34, n. 3, p. 285-291, 1992.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science, USA**, v. 177, p. 949-959, 1972.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognize molecules. **Glycobiology**, United Kingdom, v.14, n.11, p.53-62, 2004.

SHARON, N. Lectins: past, present and future1. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, n. 6, p. 1457, 2008.

SIVAKAMAVALLI, J.; TRIPATHI, S. K.; SINGH, S. K.; VASEEHARAN, B. Homology modeling, molecular dynamics, and docking studies of pattern-recognition transmembrane protein-lipopolysaccharide and β -1, 3 glucan-binding protein from *Fenneropenaeus indicus*. **Journal of Biomolecular structure and Dynamics**, v. 33, n. 6, p. 1269-1280, 2015.

SONG, X.; ZHANG, H.; ZHAO, J.; WANG, L.; QIU, L.; MU, C.; SONG, L. An immune responsive multidomain galectin from bay scallop *Argopectens irradians*. **Fish & shellfish immunology**, v. 28, n. 2, p. 326-332, 2010.

STRUMSKI, M. A. Purification and characterization of an endogenous carbohydrate-binding protein from the sea urchin, *Lytechinus variegatus* (**Eggs, Carrageenan, Development, Agar, Lectin**). 1986.

SUN, J. J.; LAN, J. F.; SHI, X. Z.; YANG, M. C.; YANG, H. T.; ZHAO, X. F.; WANG, J. X. A fibrinogen-related protein (FREP) is involved in the antibacterial immunity of *Marsupenaeus japonicus*. **Fish & shellfish immunology**, v. 39, n. 2, p. 296-304, 2014.

SWORN, G. Xanthan gum. In: **Handbook of hydrocolloids**. Woodhead Publishing, p. 833-853, 2021.

TANIO, M.; KONDO, S.; SUGIO, S.; KOHNO, T. Trivalent recognition unit of innate immunity system: crystal structure of trimeric human M-ficolin fibrinogen-like domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 6, p. 3889-3895, 2007.

TEP, A. Target Enabling Package. Fibrinogen-like globe domain of human Tenascin-C (hFBG-C). **Group**, 2020.

TIAN, Y.; CHEN, T.; LUO, P.; HUANG, W.; HUO, D.; YUN, L.; CHENG, C. A fibrinogen-related protein, LvFREP2, from *Litopenaeus vannamei* facilitates the clearance of *Vibrio harveyi*. **Fish & shellfish immunology**, v. 78, p. 364-371, 2018.

TSUJI, S.; UEHORI, J.; MATSUMOTO, M.; SUZUKI, Y.; MATSUHISA, A.; TOYOSHIMA, K.; SEYA, T. Human intelectin is a novel soluble lectin that recognizes galactofuranose in carbohydrate chains of bacterial cell wall. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 26, p. 23456-23463, 2001.

TSUJI, S.; YAMASHITA, M.; NISHIYAMA, A.; SHINOHARA, T.; LI, Z.; MYRVIK, Q. N.; SHIBATA, Y. Differential structure and activity between human and mouse intelectin-1: human intelectin-1 is a disulfide-linked trimer, whereas mouse homologue is a monomer. **Glycobiology**, v. 17, n. 10, p. 1045-1051, 2007.

TUCKER, R. P.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Evidence for the evolution of tenascin and fibronectin early in the chordate lineage. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 41, n. 2, p. 424-434, 2009.

UCHIDA, T.; YAMASAKI, T.; ETO, S.; SUGAWARA, H.; KURISU, G.; NAKAGAWA, A.; HATAKEYAMA, T. Crystal structure of the hemolytic lectin CEL-III isolated from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*: implications of domain structure for its membrane pore-formation mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 35, p. 37133-37141, 2004.

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

VENO, P. A.; STRUMSKI, M. A.; KINSEY, W. H. Purification and Characterization of Echinonectin, a Carbohydrate-Binding Protein from Sea Urchin Eggs. **Development, growth & differentiation**, v. 32, n. 3, p. 315-319, 1990.

WANG, H.; XUE, Z.; LIU, Z.; WANG, W.; WANG, F.; WANG, Y.; SONG, L. A novel C-type lectin from the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (AjCTL-2) with preferential binding of D-galactose. **Fish & shellfish immunology**, v. 79, p. 218-227, 2018.

WANGKANONT, K.; WESENER, D. A.; VIDANI, J. A.; KIESSLING, L. L.; FOREST, K. T. Structures of *Xenopus* embryonic epidermal lectin reveal a conserved mechanism of microbial glycan recognition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 11, p. 5596-5610, 2016.

WATANABE, Y.; TATENO, H.; NAKAMURA-TSURUTA, S.; KOMINAMI, J.; HIRABAYASHI, J.; NAKAMURA, O.; MURAMOTO, K. The function of rhamnose-binding lectin in innate immunity by restricted binding to Gb3. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 33, n. 2, p. 187-197, 2009.

WEI, X.; LIU, X.; YANG, J.; FANG, J.; QIAO, H.; ZHANG, Y.; YANG, J. Two C-type lectins from shrimp *Litopenaeus vannamei* that might be involved in immune response against bacteria and virus. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 32, n. 1, p. 132-140, 2012.

WESENER, D. A.; WANGKANONT, K.; MCBRIDE, R.; SONG, X.; KRAFT, M. B.; HODGES, H. L.; KIESSLING, L. L. Recognition of microbial glycans by human intelectin-1. **Nature structural & molecular biology**, v. 22, n. 8, p. 603-610, 2015.

WU, C.; SÖDERHÄLL, K.; SÖDERHÄLL, I. Two novel ficolin-like proteins act as pattern

recognition receptors for invading pathogens in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Proteomics**, v. 11, n. 11, p.2249-2264, 2011.

WU, Y.; ZHENG, Y.; LI, Y.; LI, Y.; NIU, D. Two fibrinogen-related proteins (FREPs) in the razor clam (*Sinonovacula constricta*) with a broad recognition spectrum and bacteria agglutination activity. **Developmental & Comparative Immunology**, p. 104075, 2021.

YAN, J.; WANG, J.; ZHAO, Y.; ZHANG, J.; BAI, C.; ZHANG, C.; FENG, L. Identification of an amphioxus intelectin homolog that preferably agglutinates gram-positive over gram-negative bacteria likely due to different binding capacity to LPS and PGN. **Fish & shellfish immunology**, v. 33, n. 1, p. 11-20, 2012.

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

YOSHIDA, S.; SHIMADA, Y.; KONDOH, D.; KOUZUMA, Y.; GHOSH, A. K.; JACOBS-LORENA, M.; SINDEN, R. E. Hemolytic C-type lectin CEL-III from sea cucumber expressed in transgenic mosquitoes impairs malaria parasite development. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 12, p. e192, 2007.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2008.