



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

MANOEL FERREIRA DA COSTA FILHO

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIMICROBIANO EM ASSOCIAÇÃO COM ANTIBIÓTICOS DA LECTINA CiL-2
DE *Codium isthmocladum*, NOVO MEMBRO DAS LECTINAS DO TIPO-H**

FORTALEZA

2024

MANOEL FERREIRA DA COSTA FILHO

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIMICROBIANO EM ASSOCIAÇÃO COM ANTIBIÓTICOS DA LECTINA CIL-2 DE
Codium isthmocladum, NOVO MEMBRO DAS LECTINAS DO TIPO-H

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

Orientador: Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano
Coorientador: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro

FORTALEZA

2024

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

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

- C874c Costa Filho, Manoel Ferreira da.
Caracterização estrutural e avaliação do potencial antimicrobiano em associação com antibióticos da lectina CiL-2 de *Codium isthmocladum*, novo membro das lectinas do Tipo-H / Manoel Ferreira da Costa Filho. – 2024.
172 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano.
Coorientação: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.
1. Estrutura primária. 2. Lectinas do Tipo-H. 3. Efeito sinérgico. I. Título.

CDD 639.2

MANOEL FERREIRA DA COSTA FILHO

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIMICROBIANO EM ASSOCIAÇÃO COM ANTIBIÓTICOS DA LECTINA CIL-2 DE
Codium isthmocladum, NOVO MEMBRO DAS LECTINAS DO TIPO-H

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

Aprovada em: _____ / _____ / 2024 .

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por estar comigo em todos os momentos.

À minha família, principalmente minha mãe Maria Neuba, por todo apoio.

Ao meu orientador, professor Dr. Celso Shiniti Nagano, por todos os ensinamentos, apoio e atenção depositados ao longo dos anos. Obrigado!

Ao meu coorientador, professor Dr. Rômulo Farias Carneiro, pelos ensinamentos, oportunidades, paciência e por toda a confiança depositada em mim.

À Dra. Renata Pinheiro Chaves, por toda ajuda, paciência e ensinamentos durante todo esse tempo.

Ao professor Ph.D. Alexandre Holanda Sampaio, por toda ajuda e pela oportunidade de fazer parte desse grupo, além de aceitar fazer parte da banca avaliadora.

Ao professor Dr. Bruno Lopes de Sousa por aceitar fazer parte da banca avaliadora.

A todos os colegas que tive no laboratório, Pedro Abílio, Philippe, João Marcelo, Vinícius, Pedro Arthur, Levi, Andressa, Regi, Renato, Jéssica e muitos outros por toda a ajuda e companheirismo.

A todos que contribuíram de alguma forma com esse trabalho e minha formação, são poucas palavras, mas muita gratidão.

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

“O sábio não se exhibe, e por isso brilha. Ele não se faz notar, e por isso é notado. Ele não se elogia, e por isso tem mérito. E, porque não está competindo, ninguém no mundo pode competir com ele.”

Lao Tsé

RESUMO

Organismos marinhos, como as algas, são uma rica fonte de compostos bioativos, com as lectinas sendo um grupo notável. As lectinas são um grupo de proteínas ou glicoproteínas capazes de se ligar a carboidratos e que têm potencial em aplicações de saúde, como diagnóstico. Estudos estruturais de lectinas são vitais, pois suas atividades biológicas estão vinculadas às interações proteína-carboidrato, decodificando informações nos glicoconjugados e impulsionando funções em seres vivos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar estruturalmente a lectina CiL-2 presente na macroalga marinha *Codium isthmocladum* e avaliar o seu potencial antimicrobiano em associação com antibióticos. A estrutura primária de CiL-2 foi determinada por sobreposição de peptídeos sequenciados por espectrometria de massas. A sequência de aminoácidos da proteína consiste de 111 aminoácidos, rica em resíduos ácidos, com pI estimado de 3.97 e com massa molecular calculada de 12.039 Da. A lectina possui uma arquitetura de domínio de lectinas do Tipo-H, família ligante de GalNAc e/ou galactose e oligossacarídeos com resíduos de Gal/GalNAc. A sequência assinatura de domínio altamente conservado nessa família foi identificada em CiL-2 com poucas modificações que também foram observadas em outras lectinas de algas relacionadas ao grupo. A estrutura tridimensional e o local de ligação a carboidratos foram preditos e analisadas por meio de ferramentas de bioinformática estrutural, onde CiL-2 apresentou uma estrutura típica de lectinas do tipo-H que consiste em um β -sanduíche com duas β -folhas antiparalelas, além de um estado de oligomerização clássico, de um hexâmero, observado nos principais representantes do grupo. O sítio de ligação a monossacarídeos de CiL-2 apresentou todos os aminoácidos que fazem interações com os ligantes que são conservados nesta família de lectinas para um monômero. Um sítio estendido comum em lectinas de origem algal também foi observado, provavelmente utilizado para acomodar os polissacarídeos e glicoproteínas com resíduos de GalNAc. A função molecular, o processo biológico e a localização da proteína prevista, mostram que CiL-2 é uma típica lectina do tipo-H, destacando sua especificidade por GalNAc e sua capacidade de desempenhar várias funções diferentes na célula. CiL-2 é uma molécula com potencial antimicrobiano em associação com o antibiótico tetraciclina, apresentando sinergismo contra cepas de *Staphylococcus aureus*. Logo, esse estudo contribuirá para que CiL-2 conste como uma nova lectina de macroalga com estrutura primária determinada, e com isso, ajude na compreensão e classificação funcional e filogenética de lectinas desses organismos.

Palavras-chave: estrutura primária; lectinas do tipo-H; efeito sinérgico.

ABSTRACT

Marine organisms, such as algae, represent a rich source of bioactive compounds, with lectins standing out as a notable group. Lectins are a category of proteins or glycoproteins capable of binding to carbohydrates, showing potential applications in health, including diagnostics. Structural studies of lectins are crucial, as their biological activities are linked to protein-carbohydrate interactions, decoding information within glycoconjugates and driving functions in living organisms. The objective of this study was to structurally characterize the lectin CiL-2 present in the marine macroalga *Codium isthmocladum* and evaluate its antimicrobial potential in combination with antibiotics. CiL-2 primary structure was determined by overlapping peptides sequenced by mass spectrometry. The protein's amino acid sequence consists of 111 amino acids, rich in acidic residues, with an estimated pI of 3.97 and a calculated molecular mass of 12.039 Da. The lectin has a lectin Type-H domain architecture, belonging to the GalNAc and/or galactose binding family, and oligosaccharides with Gal/GalNAc residues. The highly conserved domain signature sequence in this family was identified in CiL-2 with a few modifications also observed in other algae lectins related to the group. The three-dimensional structure and carbohydrate-binding site were predicted and analyzed using structural bioinformatics tools, revealing that CiL-2 exhibits a typical Type-H lectin structure, consisting of a β -sandwich with two antiparallel β -sheets, and a classic hexamer oligomerization state observed in the main representatives of the group. CiL-2 monosaccharide-binding site contained all the amino acids interacting with ligands conserved in this lectin family for a monomer. An extended site common in lectins of algal origin was also observed, likely used to accommodate polysaccharides and glycoproteins with GalNAc residues. The predicted molecular function, biological process, and protein location indicate that CiL-2 is a typical Type-H lectin, emphasizing its specificity for GalNAc and its ability to perform various functions in the cell. CiL-2 is a molecule with antimicrobial potential in combination with the antibiotic tetracycline, showing synergy against *Staphylococcus aureus* strains. Therefore, this study contributes to establishing CiL-2 as a new macroalga lectin with a determined primary structure, aiding in the understanding and functional and phylogenetic classification of lectins from these organisms.

Keywords: primary structure; type-H lectins; synergistic effect.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– <i>Codium isthmocladum</i>	14
Figura 2	– Divisão de Lectinas Oriundas de Algas (LOA) por filos	20
Figura 3	– Afinidade a carboidrato das LOA	31
Figura 4	– Padrão de afinidade de lectinas de algas verdes	32
Figura 5	– Carboidratos simples inibitórios de LOA	33
Figura 6	– Estrutura dos principais carboidratos simples inibitórios de LOA	35
Figura 7	– Padrão de afinidade de lectinas de algas vermelhas	36
Figura 8	– Principais glicanos reconhecidos por LOA	38
Figura 9	– <i>N</i> -glicanos do tipo <i>high</i> manose mais específicos a LOA	40
Figura 10	– Alinhamento de LOA similares a OAA	55
Figura 11	– Alinhamento de LOA similares a BTL	56
Figura 12	– Alinhamento de HCA e HML	56
Figura 13	– Alinhamento de sequências de proteínas algais similares a GFL	57
Figura 14	– Alinhamento de sequências de proteínas algais similares a BPL-2	58
Figura 15	– Alinhamento de sequências de proteínas algais similares a <i>Rhodobindin</i>	59
Figura 16	– Alinhamento de sequências de proteínas algais similares a BPL-3	60
Figura 17	– Alinhamento de ULL e UPL1	60
Figura 18	– Alinhamento de sequências de proteínas algais similares a <i>Cyanovirin-N</i> ...	61
Figura 19	– Alinhamento de sequências de proteínas algais similares a MVL	61
Figura 20	– Alinhamento de sequências de proteínas algais similares a <i>Scytovirin</i>	62
Figura 21	– Alinhamento de sequências de proteínas algais similares a BHL	62
Figura 22	– Estrutura determinada de GRFT	63
Figura 23	– Estrutura determinada de OAA	64
Figura 24	– Estrutura determinada de Sfl	65

Figura 25 – Comparação da subunidade de SfL com a estrutura de OAA	65
Figura 26 – Estrutura determinada de <i>Cyanovirin-N</i>	66
Figura 27 – Estrutura determinada de MVN	66
Figura 28 – Estrutura determinada de MVL	67
Figura 29 – Estrutura determinada <i>Scytovirin</i>	68
Figura 30 – Estrutura predita de GFL	68
Figura 31 – Estrutura predita de BCA	69
Figura 32 – Estrutura predita de BPL-2	70
Figura 33 – Eletroforese SDS-PAGE de CiL-2	91
Figura 34 – Alinhamento do N-terminal de CiL-2 obtido por degradação de Edman e por sobreposição de peptídeos sobrepostos	92
Figura 35 – Estrutura primária de CiL-2	93
Figura 36 – Alinhamento de CiL-2 com proteínas similares	96
Figura 37 – Alinhamento de CiL-2 com proteínas similares de algas	97
Figura 38 – Alinhamento de CiL-2 com lectinas do Tipo-H	97
Figura 39 – Alinhamento do domínio de CiL-2 com outras lectinas do Tipo-H	98
Figura 40 – Regiões conservadas de CiL-2 e outras lectinas do Tipo-H	99
Figura 41 – Alinhamento do domínio Tipo-H em proteínas de algas	100
Figura 42 – Resíduos conservados em proteínas relacionadas ao Tipo-H de algas	101
Figura 43 – Alinhamento do domínio conservado de lectinas do Tipo-H de invertebrados e algas	102
Figura 44 – Alinhamento de lectinas do Tipo-H de invertebrados e algas	103
Figura 45 – Árvore filogenética de CiL-2 e proteínas relacionadas a lectinas do Tipo-H	104
Figura 46 – Gráfico de Ramachandran para o modelo estrutural de CiL-2	106
Figura 47 – Distribuição dos aminoácidos no gráfico de Ramachandran do modelo de CiL-2	106

Figura 48	– Gráficos de Ramachandran para o modelo estrutural de CiL-2 e para estrutura determinada de HPA	107
Figura 49	– Estrutura geral de CiL-2	108
Figura 50	– Sobreposição da estrutura de CiL-2 com as lectinas HPA e BPL-3	109
Figura 51	– Localização das pontes dissulfeto nas estruturas de CiL-2 e HPA	111
Figura 52	– Diagrama de topologia das estruturas de CiL-2, HPA e SLL-2	112
Figura 53	– Estruturas secundárias alinhadas com sequências de aminoácidos de CiL-2 HPA e SLL-2	114
Figura 54	– Predição do padrão oligomérico de CiL-2	115
Figura 55	– Diagrama químico de interações entre cadeias do padrão hexamérico de CiL-2	116
Figura 56	– Diagrama de interações entre cadeias do trímeros de CiL-2	117
Figura 57	– Diagrama de interações entre cadeias do hexâmero de CiL-2	118
Figura 58	– Comparação das estruturas gerais de CiL-2 e lectinas do Tipo-H	119
Figura 59	– Análise da interação dos trímeros em CiL-2, HPA e SLL-2	121
Figura 60	– Predição de sítios de ligação a carboidratos de CiL-2	122
Figura 61	– Sítio de ligação do monossacarídeo I de CiL-2	124
Figura 62	– Sítio de ligação do monossacarídeo II de CiL-2	125
Figura 63	– Diagrama de interações dos sítios de ligação a monossacarídeos de CiL-2 ..	126
Figura 64	– Participação da alça alongada no sítio de ligação a carboidratos de CiL-2 HPA e HAA	128
Figura 65	– Local de ligação do monossacarídeo nos oligômeros de CiL-2, HPA e SLL 2	130
Figura 66	– Função molecular prevista de CiL-2	131
Figura 67	– Predição do processo biológico de CiL-2	132
Figura 68	– Localização de CiL-2 no compartimento celular	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Carboidratos inibitórios das LOA	21
Tabela 2 – LOA com estrutura primária determinada	41
Tabela 3 – LOA com estrutura primária parcial	43
Tabela 4 – Lectinas putativas de algas	44
Tabela 5 – Características estruturais de LOA	71
Tabela 6 – Famílias de lectinas oriundas de algas	76
Tabela 7 – Atividades biológicas de LOA	79
Tabela 8 – Peptídeos sequenciados de CiL-2 resultantes das digestões	93
Tabela 9 – Composição de aminoácidos de CiL-2	94
Tabela 10 – Resumo das características dos sítios de ligação a carboidratos de CiL-2 preditos	122
Tabela 11 – Efeito da lectina CIL-2 combinada aos antibióticos Oxacilina e Tetraciclina sobre <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>E. coli</i>	136

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Algas	13
1.2	Lectinas	14
1.3	Lectinas de algas	19
1.3.1	<i>Especificidade a carboidratos</i>	20
1.3.1.1	<i>Especificidade a monossacarídeos</i>	30
1.3.1.2	<i>Especificidade a carboidratos complexos e glicoproteínas</i>	36
1.3.2	<i>Características estruturais</i>	41
1.3.2.1	<i>Estrutura primária</i>	41
1.3.2.1.1	Massa molecular	45
1.3.2.1.2	Domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC)	48
1.3.2.1.3	Peptídeo sinal	51
1.3.2.1.4	Presença de ponte dissulfeto	52
1.3.2.1.5	Similaridades de sequências	53
1.3.2.2	<i>Estruturas tridimensionais</i>	62
1.3.2.3	<i>Classificações estruturais</i>	70
1.3.3	<i>Atividades biológicas</i>	75
1.3.4	<i>Codium isthmocladum Lectin – 2 (CiL-2)</i>	81
2	OBJETIVOS	83
2.1	Objetivo geral	83
2.2	Objetivos específicos	83
3	MATERIAS E MÉTODOS	84
3.1	Material biológico	84
3.1.1	<i>Coleção de algas</i>	84
3.1.2	<i>Ensaio de hemaglutinação</i>	84
3.2	Isolamento da lectina	84
3.2.1	<i>Avaliação da pureza da lectina</i>	85
3.3	Determinação da estrutura primária	85
3.3.1	<i>Determinação da sequência de aminoácidos por espectrometria de massas (MS/MS)</i>	85
3.3.1.1	<i>Digestão da lectina com enzimas proteolíticas em gel</i>	85

3.3.1.2	<i>Digestão em solução com enzimas proteolíticas</i>	86
3.3.1.3	<i>Sequenciamento dos peptídeos obtidos por digestão</i>	86
3.3.1.4	<i>Análise dos dados</i>	86
3.3.1.5	<i>Análise de bioinformática</i>	87
3.4	Modelagem da estrutura tridimensional	87
3.4.1	<i>Predição estrutural</i>	87
3.4.2	<i>Predição de sítios de ligação</i>	88
3.4.3	<i>Predição de função</i>	88
3.5	Atividade sinérgica em combinação com antibióticos	89
3.5.1	<i>Micro-organismos</i>	89
3.5.2	<i>Atividade da lectina combinada a antibióticos</i>	89
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
4.1	Purificação da lectina CiL-2	91
4.2	Sequência de aminoácidos do N-terminal	92
4.3	Determinação da estrutura primária por MS/MS	92
4.4	Domínio conservado	95
4.5	Modelagem molecular	105
4.5.1	<i>Caracterização do sítio de ligação a carboidratos</i>	120
4.6	Predição de função	130
4.7	Atividade da lectina combinada a antibióticos	134
5	CONCLUSÃO	140
	REFERÊNCIAS	141

1 INTRODUÇÃO

1.1 Algas

As algas são um conjunto de organismos cada vez mais investigados principalmente devido a sua importância ecológica nos ecossistemas aquáticos e seu potencial como reservatório de substâncias bioativas com vasta aplicabilidade. Esses compostos vão desde pigmentos acessórios e moléculas de reserva responsáveis por inúmeras funções fundamentais, até substâncias com funções mais específicas, como para proteção e sobrevivência, que provavelmente são adquiridas em razão da concorrência inibitória em um ambiente dinâmico e hostil poder promover a aquisição de metabolitos quimicamente ativos nos organismos (HAKIM; PATEL, 2020; PATEL *et al.*, 2022).

Esses organismos são caracterizados como produtores primários eucarióticos ou procarióticos, divididos em micro e macroalgas. A partir da sua riquíssima diversidade esses organismos podem ser agrupados baseado em seus pigmentos, morfologias e características anatômicas: as microalgas podem estar relacionadas a inúmeros subconjuntos divididos entre procarióticas ou cianobactérias e eucarióticas, já as macroalgas dividem-se nos filos Chlorophyta (algas verdes), Rhodophyta (algas vermelhas), Phaeophyta (algas marrons) e Cyanophyta (algas azuis-esverdeadas) (SOUSA *et al.*, 2023; WAGHMODE, 2017).

O filo Chlorophyta, das algas verdes, inclui espécimes marinhas e de água doce, possuindo uma ampla diversidade ecológica, citológica e morfológica, por exemplo, variando de organismos planctônicos unicelulares a algas coloniais, multicelulares e sifônicas. Elas ocupam um importante papel no potencial das algas de promover metabolitos secundários, sendo a principal fonte de muitos desses que apresentam propriedades farmacológicas, como alcaloides e ésteres terpenoides bioativos (SHAH, 2020).

É dentro desse filo que se encontra o gênero *Codium*, compreendendo um grupo singular de macroalgas marinhas verdes, com mais de 160 espécies amplamente distribuídas, que mesmo com algumas se caracterizando como invasoras, ainda assim, apresentam aspectos importantes, principalmente de potencial para a produção de compostos bioativos (MEINITA; HARWANTO; CHOI, 2022). O litoral brasileiro abriga diversas espécies desse gênero, muito por causa do caráter adaptativo desses organismos em relação a distribuição geográfica e clima (MUHA *et al.*, 2019; SABRY *et al.*, 2019). Dessa forma, essas espécies se tornam propícias para o estudo e extração de substâncias importantes, como polissacarídeos e compostos fenólicos (BELLAN *et al.*, 2020; RABECCA *et al.*, 2022).

A alga cenocítica *Codium isthmocladum* da família Codiaceae (Figura 1) é uma das representantes desse gênero que vem apresentando potencial biotecnológico de fornecedor de moléculas bioativas (HARB *et al.*, 2023). Alguns desses metabolitos importantes são os polissacarídeos sulfatados, como a galactana com ação anticâncer isolada dessa espécie que atua na restrição da metástase do melanoma (BELLAN *et al.*, 2020) ou o arabinano de ação antiaglutinante (LI *et al.*, 2022).

Figura 1 – *Codium isthmocladum*.



Fonte: Autor.

Outros compostos cada vez mais em evidência que se relacionam com esses polissacarídeos e estão presentes em *C. isthmocladum* são as lectinas capazes de proporcionar atividades, como antibiofilme bacteriano, antinociceptiva e anti-inflamatória (CARNEIRO *et al.*, 2020; DA SILVA ALVES *et al.*, 2022).

1.2 Lectinas

As lectinas são moléculas que estão dentro desse vasto número de compostos isolados de algas que apresentam valor biotecnológico inestimado, essas moléculas de forma geral são definidas como proteínas de origem não imune que se ligam a carboidratos, monossacarídeos ou oligossacarídeos, de forma específica e reversível, compreendendo pelo menos um domínio não catalítico, podendo ou não apresentar outros tipos de sítios com

domínios catalíticos (LAM; NG, 2011; PEUMANS; VAN DAMME, 1995). A capacidade de poder promover uma ligação altamente específica que pode ser desfeita sem degradar ou modificar a estrutura dos carboidratos ou moléculas glicosiladas, é fundamental para a classificação, definição do potencial e entendimento do papel biológico dessa classe de compostos.

A capacidade aglutinante foi a base para a primeira definição proposta para essas macromoléculas cunhando o termo “lectina” (do latim *legere*, escolher, selecionar, optar) graças a interação dessas com diversas moléculas dos fluidos biológicos e distinção de diferentes tipos sanguíneos (BOYD; SHAPLEIGH, 1954). No entanto, a história descrita de moléculas protéicas com essas propriedades é bem mais antiga com seus primeiros relatos reportados a mais de um século, ainda sem um isolamento apropriado e sendo consideradas compostos altamente tóxicos (STILLMARK, 1888).

Com o passar do tempo, o conhecimento adquirido e acumulado, proporcionou uma nova visão e extensão da compreensão sobre as propriedades dessas proteínas, possibilitando o aperfeiçoamento da definição dessas moléculas (VAN DAMME, 2022). Em 1995, a definição mais utilizada para lectinas de origem vegetal aborda sua origem não imune e obrigatoriedade da presença de no mínimo um domínio não catalítico de ligação a carboidratos, além da possibilidade de outros tipos de sítios com domínios catalíticos na sua cadeia peptídica (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Dois anos depois, a combinação das informações e conhecimentos da época unifica as definições de lectina, ressignificando a sua função/capacidade de ligação e/ou precipitação de carboidratos e glicoconjugados, e dando enfoque nas características físico-químicas da sua atividade ligante que apresenta caráter reversível, não covalente e não modificador das estruturas covalentes das ligações glicosídicas (SAMPAIO, 1997)

No entanto, apesar das contribuições importantíssimas dos estudos iniciais, hoje é entendido que a compreensão sobre aspectos bioquímicos e principalmente estruturais é fundamental para a elucidação do papel das lectinas nos organismos de origem e aplicabilidades biotecnológicas dessas moléculas, e essa caracterização, particularmente a estrutural, é complementada e esclarecida com auxílio de novas ferramentas de análise, possibilitando o preenchimento de lacunas nas descrições limitadas em nível molecular formuladas anteriormente (ALFARO *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2020).

Os novos *insights* sobre lectinas envolvem avanços sobre a biologia molecular, estrutural e genômica, primeiramente baseando-se nas sequências de aminoácidos e nos Domínio de Reconhecimento a Carboidratos (DRC) característicos, que facilitam seus

agrupamentos em famílias, e mais recentemente utilizando ferramentas de bioinformática estrutural para alcançar maior poder de análise sobre as conformações tridimensionais que fornecem uma compreensão necessária para a formulação de definições e classificações interespecies mais precisas (BONNARDEL, 2021; TAYLOR *et al.*, 2022; VAN DAMME, 2014).

Essas informações são cruciais para descrever os mecanismos de atuação das lectinas sobre os açúcares, que por sua vez, são uma classe de compostos de importância significativa para os organismos em geral, apresentando diversas atividades. Os carboidratos são encontrados de forma abundante e com alta variedade estrutural na natureza, por exemplo, nos ambientes aquáticos, algas marinhas vermelhas, pardas e verdes apresentam altas concentrações de polissacarídeos sulfatados (THOMPSON; THOMPSON, 2020). Realmente, sua distribuição e riqueza nos organismos fotossintéticos é elevada, com diversas fontes, como alginato, ágar, carragenina e fucoidado, e podem estar envolvidos e se incorporar em várias vias e processos, como a formação de ácidos húmicos, desintoxicações, produção de biofilme e ligação de enzimas extracelulares (AHMED *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2021).

Os carboidratos são moléculas versáteis, que além de serem uma das principais classes de macronutrientes, base da dieta da maioria dos animais, proporcionando energia para os processos fisiológicos, também são constituintes estruturais importantes das células (NAITHANI *et al.*, 2021). Reconhecidamente, estão envolvidos na manutenção da integridade celular, mas além disso, medeiam interações tanto no interior, quanto na superfície dos mais diversos tipos de células. Essa capacidade está atrelada as suas características bioquímicas como hidrofiliabilidade e baixa toxicidade, mas principalmente a sua diversidade estrutural, que é responsável por possibilitar inúmeros e finos arranjos de contato, que podem ser conhecidos também como glicocódigo (DEDOLA *et al.*, 2020; MISHRA; TIWARI; SCHMIDT., 2020; WISNOVSKY; BERTOZZI, 2022).

Consequentemente, para que esse mecanismo de etiquetagem altamente específico funcione é necessário que exista a capacidade de identificação e diferenciação desses glicocódigos estruturais nos organismos vivos (NAITHANI *et al.*, 2021). Essa função é exercida por proteínas de ligação a carboidratos, da qual as lectinas fazem parte, no entanto, as três características principais dessas moléculas, **ligação específica, reversível e não catalítica**, nos ajudam a diferenciá-las de outros conjuntos de proteínas, compreender a importância dessas moléculas e o porquê de serem amplamente distribuídas nos organismos (CUMMINGS *et al.*, 2022; LÓSSIO, 2021).

Primeiramente, a elevada especificidade que as lectinas podem possuir está

relacionada ao DRC, local do contato proteína-carboidrato, sendo fruto do arranjo tridimensional de seus aminoácidos. Esse arcabouço, confere grande diversidade estrutural para a proteína, característica intensificada pela possibilidade dos resíduos adjacentes ao DRC também poderem interagir com ligantes, cooptando assim outras forças, para aumentar ainda mais a especificidade (KIESSLING, 2018; KIESSLING; DIEHL, 2021).

O caráter reversível de suas ligações a açúcares também está intimamente atrelado a muitas dessas interações, principalmente as não covalentes, como ligação de hidrogênio, CH- π e interações hidrofóbicas, e não comprometem sua seletividade (FERNANDES; DEY, 2022). Ao contrário, possibilitam que lectinas migrem entre sítios de ancoragem de diferentes carboidratos a favor da maior compatibilidade, ou seja, dos que apresentam os ligantes orientados de maneira mais específica (RAPOSO; CANELAS; BARROS, 2021). Essa capacidade, proporciona a utilização de várias metodologias bioquímicas fundamentais para o estudo dessas moléculas, como a atividade hemaglutinante e inibição, que utilizam esse princípio para seu funcionamento (HABERMANN *et al.*, 2021; SOL *et al.*, 2020).

As lectinas não são as únicas proteínas de ligação a carboidratos, por exemplo, enzimas ativas de carboidratos (CAZY, *Carbohydrate-Active enZymes*) são um conjunto importante capaz de sintetizar, modificar e degradar muitos desses carboidratos *in vivo* (NAITHANI *et al.*, 2021). No entanto, como mencionado, enzimas podem levar à hidrólise do açúcar, por outro lado, lectinas apresentam domínios não catalíticos fundamentais para certos processos biológicos (CHETTRI *et al.*, 2021).

Essas características, esclarecem e consolidam as lectinas como fortes representantes dentro das proteínas com potenciais atividades biológicas. Graças as suas aplicabilidades, nas últimas décadas diversos trabalhos avançaram em prol de fornecerem evidências sobre a produção, otimização, identificação, composição e sequência de aminoácidos desses peptídeos marinhos bioativos (AHMED *et al.*, 2022; CUNHA; PINTADO, 2022; WU *et al.*, 2021). Apesar de apresentarem fatores inconvenientes relacionados a sua produção em larga escala, como baixo rendimento e pureza, sua importância ainda é muito relevante, contribuindo para o mercado de peptídeos terapêuticos atingir US\$ 25 bilhões em 2018 e venha aumentando esse valor ano a pós ano devido às suas aplicações como ingredientes nas indústrias química e farmacêutica (DALIRI; LEE; OH, 2018; ZIZZARI *et al.*, 2021).

Assim, é correto afirmar que lectinas são moléculas com alto potencial biotecnológico, uma vez que são capazes de interagir com moléculas de superfície celular, substituir ligantes naturais e ativar células. Essa característica de agente biológico promissor está evidente desde os primeiros estudos de definição desse conjunto de proteínas, como no

caso da estimulação mitogênica de linfócitos proposta na década de 60 (NOWELL, 1960; SINGH; WALIA, 2018).

Desde então, outras inúmeras atividades vêm sendo vinculadas as lectinas: indução de células supressoras, citotoxicidade de linfócitos e macrófagos, mediação de fagocitose de células alvo, atividade insulino-mimética, transporte de drogas, papel na adesão celular, entre outras. As lectinas também estão no grupo de substâncias que tiveram seu estudo ampliado devido ao seu grande potencial biotecnológico no âmbito da saúde, uma vez que experimentalmente se observa muito sua função atrelada a defesa dos organismos, mesmo não sendo essa uma característica obrigatória (CHETTRI *et al.*, 2021).

De fato, inicialmente presumia-se que as ações das hemaglutininas vegetais eram análogas às reações de anticorpos por causa de suas especificidades nos eritrócitos, todavia, sua participação não é restrita a sistemas de defesas, além de ter a capacidade de atuar em inúmeros outros processos fisiológicos (ARAÚJO *et al.*, 2020; DE CONINCK; VAN DAMME, 2021; LANDSTEINER, 1962). Hoje, porém, são inúmeros os estudos descrevendo aplicações biomédicas e terapêuticas vinculadas as lectinas e atreladas as suas características próprias e particulares (LASTOVICKOVA; STROUHALOVA; BOBALOVA, 2020; NASCIMENTO DA SILVA *et al.*, 2021).

Como forma de evidenciar a participação das lectinas nesses inúmeros processos básicos e essenciais, é importante também destacá-las como moléculas onipresentes nos organismos em geral, já sendo isoladas e descritas em plantas (DA SILVA *et al.*, 2023), fungos (MUKHAMMADIEV *et al.*, 2021), bactérias (ALYOUSEF; ALQASIM; ALOAHD, 2018), algas (MESQUITA *et al.*, 2021), moluscos (HE *et al.*, 2020), esponjas (ANDRADE *et al.*, 2023), cnidários (TAKEUCHI *et al.*, 2021), platelmintos (PANG *et al.*, 2012), nematódeos (HARCUS *et al.*, 2009), anelídeos (MOLCHANOVA *et al.*, 2007), artrópodes (SAHOO *et al.*, 2023), equinodermos (DUARTE *et al.*, 2022) e cordados (DARA *et al.*, 2021).

Essas proteínas já foram sugeridas como substâncias de defesa inata ao sistema imunológico de vertebrados e invertebrados, atuando muitas vezes como linha primária de defesa do hospedeiro contra certos agentes infecciosos (TAKAHASHI; EZEKOWITZ, 2005). Nos últimos anos, também apresentaram potencial interessantíssimo contra o vírus SARS-CoV-2, responsável pela pandemia global de COVID-19 (ROSALES-MENDOZA *et al.*, 2020; SHEEHAN *et al.*, 2020; SOHRAB *et al.*, 2020).

1.3 Lectinas de algas

A pesquisa sobre lectinas ao longo do tempo concentrou-se em vegetais terrestres, principalmente sementes de leguminosas, tornando-o o grupo mais bem estudado pois mostraram possuir altos rendimentos (VAN DAMME, 2022). No entanto, apesar da possibilidade de uma classificação e definição comum, lectinas de organismos diferentes concentram características distintas que podem ser agrupadas em conjuntos específicos quando analisados aspectos bioquímicos, estruturais e funcionais (BEKTAS; KAPTAN, 2023; BONNARDEL, 2021).

Dessa forma, a história independente das lectinas de algas, principalmente marinhas, onde se concentram a maioria dos estudos realizados, começa em 1966 com o primeiro relato de atividade hemaglutinante em extratos aquosos desses organismos (BOYD; ALMODÓVAR; BOYD, 1966). Contudo, o avanço das pesquisas desse grupo de proteínas é notoriamente lento, podendo ser observado com a primeira lectina, PPL de *Ptilota plumosa*, sendo isolada mais de uma década depois, e sua caracterização sendo ainda parcial, necessitando de mais 25 anos para que fosse melhor investigada (ROGERS; BLUNDEN; EVANS, 1977; SAMPAIO *et al.*, 2002).

Apesar de não existir uma definição clara e própria para as Lectinas Oriundas de Algas (LOA), os estudos realizados na década de 90 proporcionaram a possibilidade de compilar algumas características comuns as lectinas desses organismos e distintas a outros tipos, principalmente quando comparadas as de plantas terrestres e animais. Sendo essas em geral moléculas de baixa massa molecular, com boa termoestabilidade, se apresentando geralmente na forma de monômeros, normalmente não apresentando afinidade por monossacarídeos e comumente suas atividades de hemaglutinação não necessitam de cátions divalentes para sua manutenção, mas são frequentemente inibidas por glicoproteínas contendo *N*-glicanos, além de aglutinarem preferencialmente eritrócitos de coelhos tratados enzimaticamente (HORI; MIYAZAWA; ITO, 1990; ROGERS; HORI, 1993; SAMPAIO *et al.*, 1993).

Essas propriedades foram propostas analisando cerca de 30 lectinas, que a época era um número significativo, considerando-se o estudo recente e pouco explorado. De fato, essas características provaram-se frequentes em LOA, no entanto, com relação a aspectos estruturais, tanto das proteínas quanto dos carboidratos de ligação, cabem ser melhor detalhados visto o tempo percorrido e o advento de novas tecnologias de análise nesses campos (BROOKS, 2023; SINGH; WALIA, 2018).

Outro aspecto importante, diz respeito ao filo de origem das lectinas dentro da diversidade das algas, devido à dificuldade de acesso a relatórios mais antigos ou trabalhos pouco divulgados, pode-se estimar que cerca de 60% das lectinas isoladas de algas são de Rhodophytas (Figura 2). Essa particularidade, de maior número de LOA pertencerem as algas

vermelhas, deve-se em boa parte ao fato de um maior número de espécimes apresentando atividade hemaglutinante, usualmente utilizada para acompanhar as etapas de purificação e a presença de lectinas nos extratos algais, nos primeiros trabalhos de *screening* estarem nesse filo. Esse fato, incentivou os estudos a se aprofundarem nesse grupo, e além disso, algas pardas que viriam a apresentar positivo nesses ensaios são ricas em polifenóis que causam uma “pseudohemaglutinação” que dificultaria sua utilização como fonte de lectinas nas etapas de isolamento (SAMPAIO *et al.*, 1993; SILVA *et al.*, 2020).

Figura 2 – Divisão de Lectinas Oriundas de Algas (LOA) por filós.



Fonte: Autor.

1.3.1 Especificidade a carboidratos

Hoje conhece-se cerca de 110 LOA, com diferentes níveis de caracterização e considerando-se as principais isoformas para aquelas que possuem essa característica. Apesar de existir conhecimento detalhado sobre a especificidade de algumas dessas lectinas, essa não é uma informação comum a todas que apresentam purificação, no entanto, a inibição por carboidratos é considerada um dado básico e fundamental, sendo obtida nos estudos mais superficiais, a exceção de lectinas putativas que não apresentam isolamento (Tabela 1).

Tabela 1 – Carboidratos inibitórios das LOA (Continua).

Espécie	Lectina	Carboidrato		Referência
		Simplex	Complexo e glicoproteína	
		Algas verdes		
	BCA	S/I	<i>N</i> -glicanos ricos em manose	SATO <i>et al.</i> , 2011a
	Boonin-A	S/I	Manana / Ovalbumina	
<i>Boodlea coacta</i>	Boonin-B	S/I	Asialofetuína / Manana / Ovalbumina	HORI; MIYAZAWA; ITO, 1990
	Boonin-C	S/I	Manana / Ovalbumina	
	Boonin-D	S/I	Asialofetuína / Manana	
<i>Bryopsis hypnoides</i>	BHL	GalNAc/ GlcNAc	MSB/ Asialo-MSB	NIU <i>et al.</i> , 2009
	Bryohealin	GalNAc/ GlcNAc	S/I	YOON <i>et al.</i> , 2008; JUNG <i>et al.</i> , 2010
<i>Bryopsis plumosa</i>	BPL-2	α -Metil-D-manose / D-Manose / L-Fucose / D-Glicose	Fetuína	HAN <i>et al.</i> , 2010; HWANG <i>et al.</i> , 2018a
	BPL-3	GalNAc/ GlcNAc	Fetuína	HAN <i>et al.</i> , 2011; HWANG <i>et al.</i> , 2018b
	BPL-4	GalNAc/ GlcNAc	N/D	HAN <i>et al.</i> , 2012b
<i>Bryopsis ramulosa</i>	BRL-1	GalNAc	N/D	
	BRL-2	Manose / Fucose / Glicose	N/D	HIDALGO ROA, 2017
<i>Caulerpa cupressoides</i>	CcL	D-galactosamina / N-metil-D-galactosamina / <i>p</i> -Nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo / <i>p</i> -Nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo / α -Lactose / β -Lactose / D-melibiose / D-rafinose	MES	BENEVIDES <i>et al.</i> , 2001
<i>Caulerpa serrulata</i>	–	GalNAc / NeuNAc	S/I	DJABAYAN-DJIBAYAN <i>et al.</i> , 2018
<i>Chlorella vulgaris</i>	CvL	D-galactose / D-frutose / L-ramnose / D-Xilose / D-lactose / D-Maltose / GlcNAc	Albumina / Azocaseína	CAVALCANTI <i>et al.</i> , 2021
	CPL	Arabinose / Fucose / Galactose / Manose / Xilose	Ovalbumina	YI; PING; YANRU, 2003
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	CPH	S/I	Globulina / Asialofetuína / Fetuína / Mucina / Manana	CHU; HUANG; LING, 2006
<i>Codium adherens</i>	–	GalNAc	MES / Fetuína	ROGERS <i>et al.</i> , 1994
<i>Codium barbatum</i>	CBA	S/I	TGS / Asialo-TGS / MSB / Asialo-MSB	PRASEPTIANGGA; HIRAYAMA; HORI, 2012
<i>Codium bursa</i>	–	GalNAc	N/D	ROGERS; FLANGU, 1991
<i>Codium capitatum</i>	–	GalNAc	MES / Fetuína	ROGERS <i>et al.</i> , 1994

Tabela 1 – Carboidratos inibitórios das LOA (Continuação).

Espécie	Lectina	Carboidrato		Referência
		Simplex	Complexo e glicoproteína	
Algas verdes				
<i>Codium effusum</i>	–	GalNAc	MES / Fetuína	ROGERS <i>et al.</i> , 1994
<i>Codium fragile</i> ssp <i>atlaticum</i>	–	GalNAc	N/D	LOVELESS; ROGERS, 1985
<i>Codium fragile</i> ssp <i>tomentosoides</i>	CFT	GalNAc	GSO	LOVELESS; ROGERS, 1985; WU <i>et al.</i> , 1997
<i>Codium giraffa</i>	Giraffine	GalNAc/ GlcNAc/ D-rafinose	N/D	ALVAREZ-HERNANDEZ <i>et al.</i> , 1999
<i>Codium isthmocladum</i>	CiL-1	D-galactose / α -metil-D-galactopiranosídeo / metil- β - D-tiogalactose / D-galactosamina/ α -lactose	Fetuína	CARNEIRO <i>et al.</i> , 2020
	CiL-2	GalNAc	MES	CARNEIRO <i>et al.</i> , 2020
<i>Codium platylobium</i>	–	GalNAc	MES / Fetuína	ROGERS <i>et al.</i> , 1994
<i>Codium tomentosum</i>	Tomentine	GlcNAc	N/D	FABREGAS <i>et al.</i> , 1988
<i>Codium vermilara</i>	–	GalNAc	N/D	ROGERS; FLANGU, 1991
<i>Enteromorpha prolifera</i>	EPL-1 EPL-2	L-fucose / D-manose	Manano / fucoidano	AMBROSIO <i>et al.</i> , 2003
<i>Halimeda renschii</i>	HRL40	S/I	Tireoglobulina / Asialotireoglobulina / Manana	MU <i>et al.</i> , 2017
<i>Spirogyra</i> spp.	–	D-galactose / GlcNAc / N-Acetil- β -D-manose	N/D	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2017
<i>Tetradismus obliquus</i>	–	S/I	Azoalbumina / azocaseína / albumina	SILVA <i>et al.</i> , 2020
<i>Ulva lactuca</i>	–	L-fucose	MES / MSB / Fucoidano	SAMPAIO; ROGERS; BARWELL, 1998a
<i>Ulva laetevirens</i>	–	S/I	MES / MSB / Asialo-MSB / Fucoidano	SAMPAIO <i>et al.</i> , 1996
<i>Ulva liminetica</i>	ULL	-	-	ICHIHARA; ARAI; SHIMADA, 2009
<i>Ulva pertusa</i>	UPL1	GlcNAc	Tireoglobulina	WANG <i>et al.</i> , 2004
Algas vermelhas				
<i>Agardhiella tenera</i>	ATA	S/I	N/D	SHIOMI; KAMIYA; SHIMIZU, 1979

Tabela 1 – Carboidratos inibitórios das LOA (Continuação).

Espécie	Lectina	Carboidrato		Referência
		Simplex	Complexo e glicoproteína	
Algas vermelhas				
<i>Aglaothamnion callophyllidicola</i>	Rhodobindin	S/I	Fetuína / Asialofetuína	SHIM <i>et al.</i> , 2012
<i>Aglaothamnion oosumienses</i>	AOL-1	GalNAc	N/D	HAN <i>et al.</i> , 2012a
<i>Amansia multifida</i>	AML	S/I	Avidina / Fetuína / Manana / Clara de ovo	COSTA <i>et al.</i> , 1999
	BSHV			AINOUZ <i>et al.</i> , 1995
<i>Bryothamnion seaforthii</i>	BPL2	S/I	Fetuína / Avidina / Mucina	NASCIMENTO-NETO <i>et al.</i> , 2012
	BPL3			AINOUZ <i>et al.</i> , 1995;
	BPL4			CALVETE <i>et al.</i> , 2000;
<i>Bryothamnion triquetrum</i>	BTL	S/I	Fetuína / Avidina / Mucina N-glicanos α 1-6 Fucosilados	DO NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2015
<i>Carpopeltis fiabellata</i>	Carnin	S/I	Manana / Transferrina / Fetuína / Asialofetuína / α ₁ -Glicoproteína ácida	HORI <i>et al.</i> , 1987; HORI; MIYAZAWA; ITO, 1990
<i>Cystoclonium pwpureum</i>	–	S/I	N/D	KAMIYA; SHIOMI; SHIMIZU, 1980
<i>Enatiocladia duperreyii</i>	–	GalNAc / D-Galactosamina / <i>o</i> -Nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo / Lactulose / α -Lactose / β -Lactose / D-Melibiose / <i>p</i> -Nitrophenil- α -D-galactopiranosídeo / <i>p</i> -Nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo / D-Fucose / Metil- α -D-galactopiranosídeo / D-Galactose / D-Rafinose / Metil- β -D-galactopiranosídeo	MES	BENEVIDES <i>et al.</i> , 1998
<i>Eucheuma denticulatum</i>	EDA-2	S/I	Fetuína / Tiroglobulina / Asialo Tiroglobulina / Manana / Mucina/ Asialo Mucina	HUNG <i>et al.</i> , 2015

Tabela 1 – Carboidratos inibitórios das LOA (Continuação).

Espécie	Lectina	Carboidrato		Referência
		Simples	Complexo e glicoproteína	
Algas vermelhas				
<i>Eucheuma amakusaensis</i>	EAA-1			KAWAKUBO <i>et al.</i> , 1999
	EAA-2	S/I	α_1 -Glicoproteína ácida / ASB / Mucina / Globulina / Fetuína / Asialofetuína/ Ovalbumina / IgM/ Tiroglobulina / Manana	
	EAA-3			
<i>Eucheuma serra</i>	ESA-1	S/I	ASB / Mucina/ Globulina / Fetuína / Asialofetuína / Ovalbumina / IgM / Tiroglobulina / manana	KAWAKUBO <i>et al.</i> , 1997
	ESA-2			
<i>Gelidium amansii</i>	GAL	N/D	N/D	MASSI; AHMAD, 2012
	–	S/I	Lactoferrina	YAMADA <i>et al.</i> , 1999
<i>Georgiella confluens</i>	GCH	S/I	MES / Fetuína	SOUZA <i>et al.</i> , 2010
<i>Gracilaria fisheri</i>	GFL	N/D	N/D	SUTTISRISUNG <i>et al.</i> , 2011
<i>Gracilaria bursa-pastoris</i>	Granin-BP	S/I	Fetuína / Asialotransferrina / Asialofetuína / Manana / Ovalbumina	OKAMOTO <i>et al.</i> , 1990
<i>Gracilaria caudata</i>	–	S/I	Fetuína / Asialofetuína / Mucina	NEVES, 1999
<i>Gracilaria cornea</i>	GCL	S/I	Fetuína / Mucina	LIMA <i>et al.</i> , 2005
<i>Gracilaria. ornata</i>	GOL	S/I	MES / Asialofetuína / Lactotransferrina / Tiroglobulina	LEITE <i>et al.</i> , 2005
<i>Gracilaria tikvahiae</i>	GTL	NeuNAc	α_1 -Glicoproteína ácida / Fetuína / Asialofetuína / Lactoferrina / Ovomucóide / MSB / Transferrina	CHILES; BIRD, 1990
	GVA-1	S/I	N/D	SHIOMI; YAMANAKA; KIKUCHI, 1981
<i>Gracilaria. verrucosa</i>	–	S/I	Fetuína	KANO; KITAMURA; KOBAYASHI, 1992

Tabela 1 – Carboidratos inibitórios das LOA (Continuação).

Espécie	Lectina	Carboidrato		Referência
		Simplex	Complexo e glicoproteína	
Algas vermelhas				
<i>Gracilaria verrucosa</i>	GVL	N/D	N/D	RATHEESH; APPU; RAUF, 2022
<i>Grateloupia chiangii</i>	GCL	D-manose / Frutose	Fetuína	HWANG <i>et al.</i> , 2020
<i>Gracilariopsis sjoestedii</i>	Sjoestedina	S/I	Mucina	DE PAULA, 2011
<i>Griffithsia flosculosa</i>	–	D-manose	Fetuína / Mucina	ROGERS <i>et al.</i> , 1989
<i>Griffithsin</i> sp.	GRFT	Manose / Glicose / GlcNAc	N-glicanos ricos em manose	MORI <i>et al.</i> , 2005
<i>Hypnea cervicornis</i>	HCA	GalNAc	Sorotransferrina / Sorotransferrina dessililada / Lactotransferrina / Lactotransferrina dessililada / Tireoglobulina / Tireoglobulina dessililada / Lactotransferrina / Lactotransferrina dessililada / Fetuina / Asialofetuina/ Mucina / Asialomucina	NAGANO <i>et al.</i> , 2005a
	HJA	S/I	Transferrina / Asialo Transferrina / Fetuína/ Asialofetuina / α_1 -Glicoproteína ácida / Asialo- α_1 -Glicoproteína ácida	HORI <i>et al.</i> , 1986
<i>Hypnea japonica</i>	HJA-1 HJA-2 HJA-3	S/I	Transferrina / Asialo Transferrina / Fetuína/ Asialofetuina / α_1 -Glicoproteína ácida / Asialo- α_1 -Glicoproteína ácida / Mucina / Asialo mucina	HORI; MATSUBARA; MIYAZAWA, 2000

Tabela 1 – Carboidratos inibitórios das LOA (Continuação).

Espécie	Lectina	Carboidrato		Referência
		Simple	Complexo e glicoproteína	
Algas vermelhas				
<i>Hypnea japonica</i>	HJB HJC HJD	S/I	Transferrina / Asialo Transferrina / Fetuína/ Asialofetuína / α_1 -Glicoproteína ácida / Asialo- α_1 -Glicoproteína ácida / Asialo- α_1 -Glicoproteína ácida / Lactotransferrina / Lactotransferrina dessililada / Tireoglobulina / Tireoglobulina dessililada / Lactotransferrina / Lactotransferrina dessililada / Fetuína / Asialofetuína/ Mucina / Asialomucina	HORI; MIYAZAWA; ITO, 1990
<i>Hypnea musciformis</i>	HML	S/I	α_1 -Glicoproteína ácida / ASB / Mucina/ Globulina / Fetuína / Asialofetuína/ Ovalbumina / IgM/ Tireoglobulina / Manana	NAGANO <i>et al.</i> , 2005a
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	KAA-1 KAA-2	S/I	Fetuína / Manana/ Tireoglobulina / Asialo Tireoglobulina / Mucina / Asialomucina	KAWAKUBO <i>et al.</i> , 1999
<i>Kappaphycus striatum</i>	KSA-1 KSA-2 KSA-3	S/I	Manana	SATO; HORI, 2011
<i>Kappaphycus striatus</i>	KSL	S/I	Manana	HUNG; TRINH, 2021
<i>Meristiella echinocarpa</i>	MEL	S/I	Manana	CHAVES <i>et al.</i> , 2018a
<i>Osmundaria obtusiloba</i>	OOL	GalNAc / D-galactosamina / D-galactose / α -lactose	MES	COSTA FILHO, 2022; MELO <i>et al.</i> , 2004
<i>Palmaria palmata</i>	—	GalNAc / GlcNAc / NeuNAc	Glicoproteínas	KAMIYA; OGATA; HORI, 1982; ROGERS; FISH, 1991
<i>Plumaria elegans</i>	—	S/I	MES / MSB / fetuina / ovalbumina	ROGERS; FISH; BARWELL, 1990

Tabela 1 – Carboidratos inibitórios das LOA (Continuação).

Espécie	Lectina	Carboidrato		Referência
		Simplex	Complexo e glicoproteína	
Algas vermelhas				
<i>Pterocladia capillacea</i>	PcL	S/I	MES / Avidina	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2002
	–	p-Nitrofenil- α -D-galactosídeo	N/D	ROGERS; BLUNDEN; EVANS, 1977
<i>Ptilota plumosa</i>	PPL	p-Nitrofenil - α -D-galactosídeo / p-Nitrofenil - α -D-glucosídeo / p-Nitrofenil- β -D-fucosídeo / D-Glicose / D-Fucose / Metil- α -D-galactosídeo / p-Nitrofenil - β -D-galactosídeo / p-Nitrofenil - β -D-glucosídeo/ D-Galactose / L-Fucose / o-Nitrofenil - α -D-galactosídeo/ o-Nitrofenil- β -D-fucosídeo / Metil- β -D-galactosídeo / Rafinose / 2-Deoxi-D-glucose / D-Arabinose / Melibiose / α -Lactose / o-Nitrofenil - β -D-galactosídeo/ Lactulose / Glucosamina-HCl/ Raminose / GlcNAc	S/I	SAMPAIO <i>et al.</i> , 2002
<i>Ptilota serrata</i>	PSL	Nitrofenil-N-acetil- α -D-galactosídeo / p-Nitrofenil-N-acetil- β -D-galactosídeo / o-Nitrofenil-N-acetil- α -D-galactosídeo / o-Nitrofenil-N-acetil- β -D-galactosídeo / o-Nitrofenil-N-acetil- β -D-fucosídeo / p-Nitrofenil- α -D-galactosídeo / p-Nitrofenil - β -D-galactosídeo/ o-Nitrofenil - α -D-galactosídeo/ o-Nitrofenil- β -D-galactosídeo/ Lactose / GalNAc / Melibiose / D-Galactose / Metil- α -D-galactosídeo / Galactosamina-HCl / Metil- β -D-galactosídeo / Rafinose / 2-Deoxi-D-galactose / D-Fucose / Lactulose	Fucoidano / MES / AsialoMSB / Asialofetúina	SAMPAIO <i>et al.</i> , 1998

Tabela 1 – Carboidratos inibitórios das LOA (Continuação).

Espécie	Lectina	Carboidrato		Referência	
		Simplex	Complexo e glicoproteína		
Algas vermelhas					
<i>Ptilota filicina</i>	PFL	<i>p</i> -Nitrofenil- <i>N</i> -acetil- α -D-galactosídeo / <i>p</i> -Nitrofenil- <i>N</i> -acetil- β -D-galactosídeo / <i>o</i> -Nitrofenil- <i>N</i> -acetil- α -D-galactosídeo/ <i>o</i> -Nitrofenil- <i>N</i> -acetil- β -D-fucosídeo/ <i>p</i> -Nitrofenil- α -D-galactosídeo/ <i>p</i> -Nitrofenil - β -D-fucosídeo/ <i>p</i> -Nitrofenil - β -D-galactosídeo/ <i>o</i> -Nitrofenil - α -D-galactosídeo/ <i>o</i> -Nitrofenil- β -D-galactosídeo/ Lactose / GalNAc / Melibiose / D-Galactose / Metil- α -D-galactosídeo / Galactosamina-HCl / Metil- β -D-galactosídeo / Rafinose / 2-Deoxi-D-galactose / D-Fucose / Lactulose		Fucoidano / MES / AsialoMSB / MSB	SAMPAIO; ROGERS; BARWELL, 1998b
<i>Solieria filiformis</i>	SfL-1 SfL-2	S/I		Manana / Avidina/ Ovalbumina / Clara de ovo	BENEVIDES; LEITE; FREITAS, 1996
<i>Solieria robusta</i>	Solnin A Solnin B Solnin C	S/I		Fetuína / Asialotransferrina / Asialofetuína / Manana / Ovalbumina	HORI; MIYAZAWA; ITO, 1990
<i>Tichocarpus crinitus</i>	TCL	S/I		MES / Fetuína	MOLCHANOVA <i>et al.</i> , 2010
Algas azuis					
<i>Microcystis aeruginosa</i>	MAL	GalNAc/ Lactato/ D-galactose		MES / Asialo-MES / Asialo-MSB / Asialofetuína	YAMAGUCHI <i>et al.</i> , 1998
<i>Microcystis viridis</i>	MVL	S/I		Manana / Asialofetuína / Ovalbumina	YAMAGUCHI <i>et al.</i> , 1999
<i>Lyngabya confervoides</i>	Lyngabyal	Galactose / Frutose / Glicose / Manose / Raminose / GalNAc / Lactose / Sacarose / Melibiose / Celobiose / Maltose /		Pectina / Manana de levedura / Amilose	EL-FAKHARANY <i>et al.</i> , 2020
<i>Nostoc ellipsoforum</i>	Cyanovirin-N (CV-N)	N/D		N/D	BOYD <i>et al.</i> , 1997

Tabela 1 – Carboidratos inibitórios das LOA (Conclusão).

Espécie	Lectina	Carboidrato		Referência
		Simples	Complexo e glicoproteína	
Algas azuis				
<i>Nostoc muscorum</i>	NML-1	S/I	Fetuína / Asialofetuína / Transferrina / Asialotransferrina	SAAD <i>et al.</i> , 2022b
	NML-2	Galactose/ Frutose /Glicose / Manose / Ramnose / N-acetilgalactosamina / Lactose / Sacarose / Melibiose / Celobiose / Maltose	S/I	
<i>Oscillatoria acuminata</i>	-	Sacarose / maltose / melibiose / manose / glicose / N- acetilglucosamina / ramnose	Pectina / amilose / manana de levedura	SAAD <i>et al.</i> , 2022a
<i>Oscillatoria agardhii</i>	OAA	S/I	Fetuína / Asialofetuína / Transferrina / Asialotransferrina / Manana	SATO <i>et al.</i> , 2000
<i>Scytonema varium</i>	Scytovirin (SVN)	S/I	Oligomanose	BOKESCH <i>et al.</i> , 2003
Algas pardas				
<i>Fucus Vesiculosus</i>	–	S/I	MSB / Fetuína / Tiroglobulina	FERREIROS; CRIADO, 1983
<i>Hizikia fusiformis</i>	HFL	S/I	Tireoglobulina	WU <i>et al.</i> , 2016

Fonte: Autor. GalNAc: N-Aceilgalactosamina; GlcNAc: N-Acetilglucosamina; MSB: Mucina submaxilar bovina; MES: Mucina do estômago suíno; TGS: Tiroglobulina suína; GSO: Glicoproteína submandibular ovina; ASB: Albumina do soro bovino; IgM: Imunoglobulina M; NeuNAc: Ácido N-Acetilneuramínico. S/I: Sem inibição; N/D: Não determinado.

Em 1952, descobriu-se que a adição de açúcares específicos pode neutralizar a capacidade de aglutinação das lectinas por eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos promovendo uma espécie de competição regida pelo grau de especificidade (WATKINS; MORGAN, 1952). Esse achado foi essencial para a lectinologia e proporcionou uma nova compreensão sobre a hemaglutinação de proteínas, como existência de carboidratos na superfície celular e a participação deles no reconhecimento por parte das lectinas, e a possibilidade de esses poderem ser utilizados como alvo para marcadores celulares (TSANEVA; VAN DAMME, 2020). Esses conhecimentos, viriam a ser fundamentais para a utilização de lectinas contra outros tipos de células, como micro-organismos e células malignas que também apresentassem glicídios em sua superfície exterior, além de o açúcar ou glicoconjugado mais inibitório fornecer informações para o direcionamento da atuação de uma lectina (SURYA; DEEPTI; ELYAS, 2020).

Todavia, essa caracterização não é determinante absoluto da melhor especificidade, uma vez que nos estudos de base muitas vezes não são utilizados um número abundante de tipos de eritrócitos e geralmente sem tratamento enzimático, prática que pode promover um incremento na atividade hemaglutinante (LIS; SHARON, 1986; TEIXEIRA *et al.*, 2012).

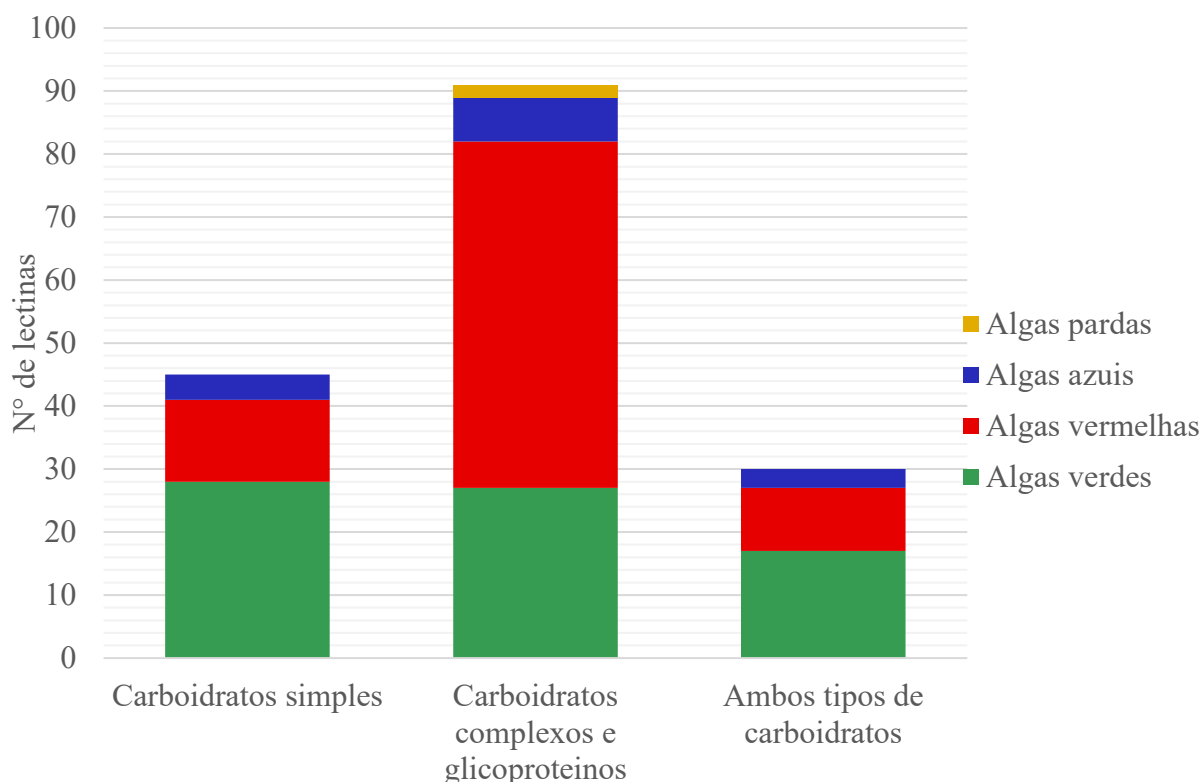
De toda forma, os açúcares inibitórios, mesmo o de trabalhos iniciais, podem apresentar um quadro geral que fornece diversas informações importantes. Mesmo extratos algais com perfil lectínico são uma base interessante de conhecimento sobre essas proteínas (ANAM *et al.*, 2019; FAJARNINGSIH *et al.*, 2019).

Para as LOA, a inibição por carboidratos complexos ou glicoproteínas é a mais observada, isso não significa que não haja monossacarídeos com capacidade neutralizante da atividade hemaglutinante dessas lectinas, ou mesmo, algumas que apresentam afinidade para ambos os tipos de carboidratos (Figura 3), haja visto, o caráter promiscuo que esse tipo de proteína pode apresentar (VAJRAVIJAYAN *et al.*, 2020).

1.3.1.1 Especificidade a monossacarídeos

A especificidade a monossacarídeos é a mais observada em lectinas, principalmente advindas de leguminosas, esse tipo de afinidade facilita suas classificações por se tratar de estrutura glicídica mais simples (RADHAKRISHNAN *et al.*, 2022). Geralmente, em LOA é importante notar que a terminologia de carboidratos simples comumente está indicando estruturas geralmente de um a três monômeros de sacarídeos.

Figura 3 – Afinidade a carboidrato das LOA.



Fonte: Autor.

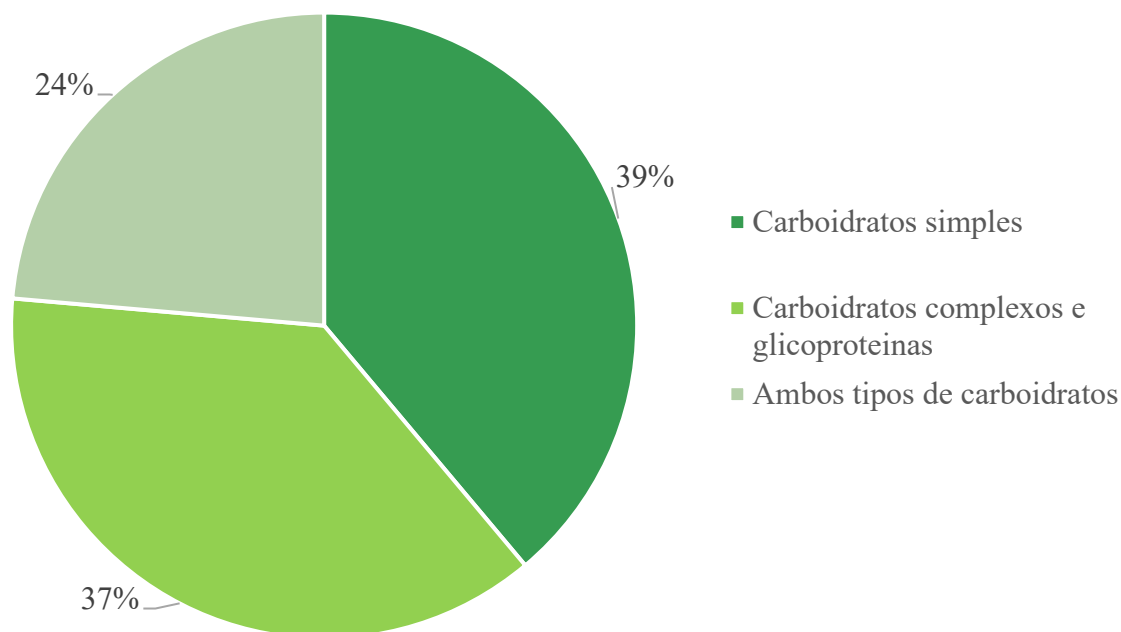
Esses carboidratos mais simples sofrem processos que modificam sua conformação, geralmente buscando maior estabilidade química em solução, um dos mais comuns resulta na existência mais abundante desses monossacarídeos na sua forma cíclica, principalmente de açúcares com 5 ou 6 carbonos, ou seja, pentoses e hexoses, fenômeno conhecido como ciclização que resulta na formação de anéis furano e pirano, respectivamente (VARKI *et al.*, 2022). Outro desses processos refere-se a isomeria presente nos glicídios que pode ser de função, com moléculas apresentando grupos funcionais diferentes, ou ótica sendo divididos em enantiômeros e diastereoisômeros (KUMARI RAYALA, KANDULA, P, 2022; LIU *et al.*, 2021a).

O entendimento desses processos é importante pois a associação de lectinas com esses monossacarídeos ocorre na natureza em solução, buscando a forma mais estável, ou seja, faz sentido que essas modificações influenciem na especificidade (VALVERDE *et al.*, 2020). Além disso, são essas diferenças nas estruturas dos carboidratos que são responsáveis por formar a complexibilidade do glicocódigo, o que enaltece o papel das lectinas nessa decodificação.

Com relação a LOA, a maior representatividade de afinidade por carboidratos

simples está relacionada a algas verdes (Figura 3) e representa mais de 50% dos tipos de carboidratos reconhecidos por esse grupo (Figura 4).

Figura 4 – Padrão de afinidade de lectinas de algas verdes.



Fonte: Autor.

Apesar de simples, quando comparados a glicanos complexos e glicoconjugados, a discussão sobre esses monossacarídeos ainda inclui aspectos tridimensionais. A primeira delas diz respeito ao enantiômero de configuração do tipo D, que é o mais observada em mono-açúcares inibitórios de LOA (Tabela 1) e sendo também em geral a forma mais comum desses carboidratos em vertebrados, além de muitas vezes ser a única forma reconhecida pelas enzimas que os metabolizam (LOPES; GASPAR, 2008). Esta conformação está relacionada a orientação dos grupos -H e -OH em relação ao carbono assimétrico mais afastado da carbonila da estrutura.

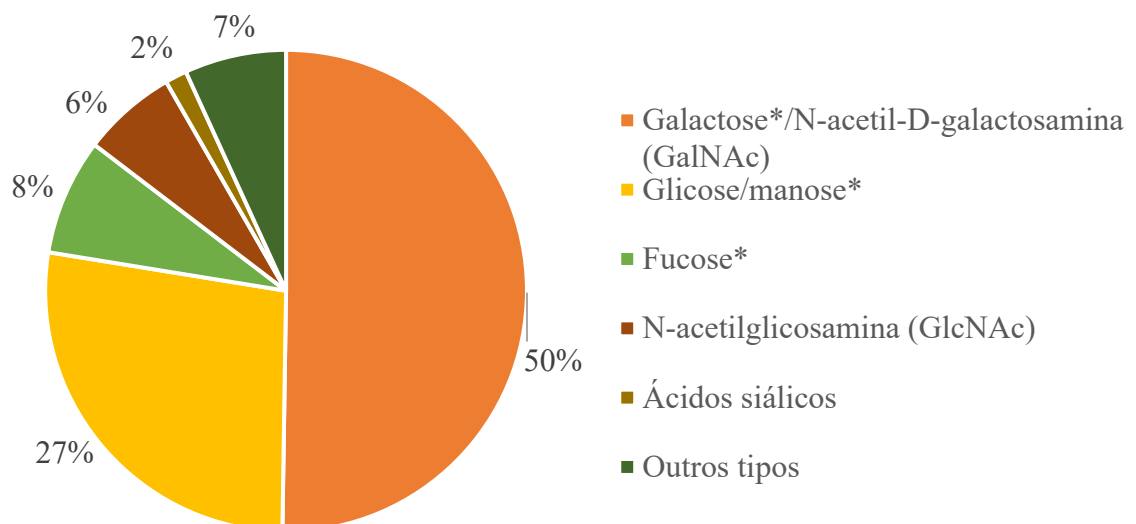
Quando o açúcar passa para a forma cíclica ele ganha mais um carbono assimétrico, e com isso outros dois isômeros de relevância, os anômeros alfa (α) e beta (β) (LUDWIG *et al.*, 2019). Esses isômeros apresentam uma frequência mais homogênea de ligação a LOA (Tabela 1). Mesmo assim, as lectinas algais podem apresentar estereoisomerismo em relação à ligação a açúcares, por exemplo, na preferência pela α -conformação em detrimento a β -conformação demonstrado pela lectina GCL de *Grateloupia chiangii* (HWANG *et al.*, 2020).

Ambas as características, estão relacionadas a orientação que grupos funcionais ou

hidroxilas apresentam na estrutura e são de forma simplificada modificações pequenas de topologia e conformação de uma molécula para seu isômero, no entanto, influenciam muito quando tratamos de encaixes tridimensionais (HARTWEG *et al.*, 2021).

Lectinas que interagem com monossacarídeos, de uma forma geral, podem ser classificadas em cinco classes principais a depender do açúcar de maior afinidade: glicose/manose, *N*-acetilglicosamina (GlcNAc), galactose/*N*-acetil-D-galactosamina (GalNAc), ácidos siálicos e lectinas ligantes de fucose (BARRE *et al.*, 2019). Essa classificação parece aplicar-se às lectinas de algas, ao se analisar os monossacarídeos que provocam inibição das LOA (Figura 5).

Figura 5. Carboidratos simples inibitórios de LOA.



Fonte: Autor. * e derivados.

O monossacarídeo que apresenta maior nível de especificidade por lectinas de algas é o *N*-Acetil-D-galactosamina que é o enantiômero D da *N*-Acetil galactosamina (GalNAc). O GalNAc é o monossacarídeo terminal presente no grupo sanguíneo humano do tipo A (GalNAc α 1–3[Fuc α 1–2]Gal) sendo acrescentado pela enzima GalNAc transferase ativa ao aglutinogênio H, é também um metabolito comum de animais e fonte de carboidrato essenciais para bactérias intestinais podendo atuar como regulador do crescimento (YANG *et al.*, 2022).

Outra função importante desse carboidrato é sua participação nos processos de *N*- e *O*-glicosilação servindo como unidade inicial de ligação de oligossacarídeos à sítios específicos em proteínas e lipídios, modificações comuns que decoram inúmeras células e apresentam muitas funções biológicas (HIRAT; KIZUKA, 2021; WANG *et al.*, 2021). Ele está

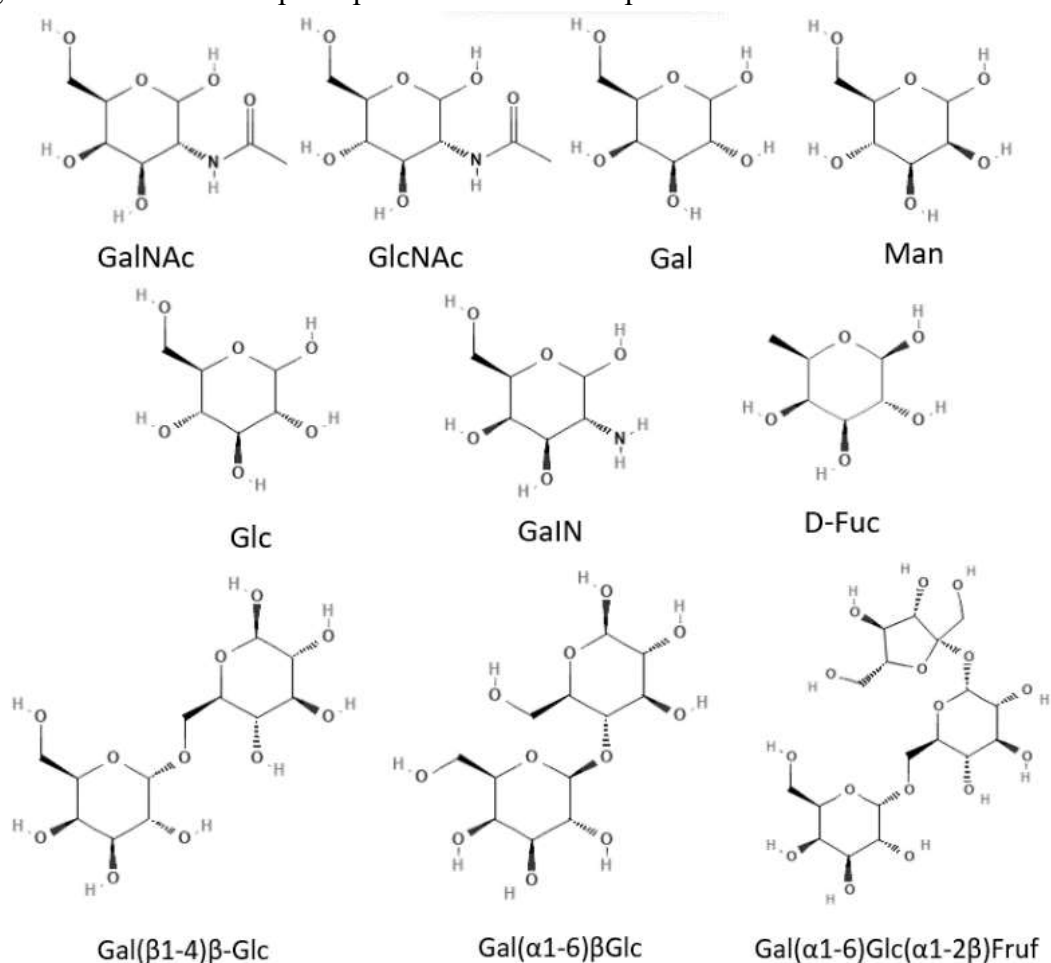
presente também em antígenos, como o Tn (GalNAc α 1-Ser/Thr) muito expresso em carcinomas, o que pode explicar a capacidade de algumas lectinas de algas de envolvimento na marcação ou morte de células cancerígenas ou outros tipos de aplicabilidades (BARRE *et al.*, 2019; BARRE *et al.*, 2020).

Estruturalmente é um monossacarídeo de seis carbonos possuindo um grande grupo substituinte no C-2 (Figura 6). Essa estrutura parece ser importante para lectinas de algas que apresentam essa especificidade, por exemplo, a lectina BHL de *Bryopsis hypnoides*, apresenta ligação a GalNAc e GlcNAc, mas não a monossacarídeos sem a extensão no C-2, como galactose e manose (NIU *et al.*, 2009). Para ter uma melhor compreensão sobre a influência dessas diferenças na interação lectina-carboidrato é interessante analisar a estrutura desses mono- e oligossacarídeos (Figura 6).

O estudo das LOA também sugere o envolvimento de GalNAc como açúcar de reconhecimento de lectinas envolvidas na ligação de gametas na reprodução de certas algas marinhas (HAN *et al.*, 2012a). Ele é inclusive associado a agrupamentos de lectinas como o ligante específico, por exemplo, em conjunto com D-galactose que é a galactopiranosose de configuração D e também um dos principais monossacarídeos de ligação a LOA (Figura 5), formam os carboidratos específicos do grupo de lectinas do tipo-H, sugerido em algumas lectinas do gênero *Bryopsis* (HAN *et al.*, 2011; HAN *et al.*, 2012b).

O *N*-Acetilglucosamina (GlcNAc) é outro açúcar relevante para as LOA, é um derivado monossacarídeo da glicose, uma aldohexose constituinte do peptidioglicano componente estrutural da parede celular de bactérias e também compõe o ácido hialurônico presente na estrutura corporal de animais. Assim como GalNAc, é um participante estrutural importante de modificações ramificadas comuns em moléculas biológicas como as glicosilações (HIRATA; KIZUKA, 2021; MOHANTY; P CHAUDHARY; ZOETEWY, 2020).

Figura 6 – Estrutura dos principais carboidratos simples inibitórios de LOA.



Fonte: Autor.

Seu caráter como monossacarídeo estrutural fica evidente na sua presença em muitas unidades glicídicas fundamentais, como o do antígeno sanguíneo humano, a substância H, estando ligado a galactoses, ou em outros antígenos naturais. Estruturalmente difere de GalNAc na orientação da hidroxila do C-4 (Figura 6). É um carboidrato de extrema importância para o conjunto das LOA pois a lectina algal GRFT de *Grifthisin* sp. (um potente anti-HIV) reconhece eficientemente a estrutura de GlcNAc isolada ou em complexo com outros glicanos (LUSVARGHI; BEWLEY, 2016; ZIÓŁKOWSKA *et al.*, 2007).

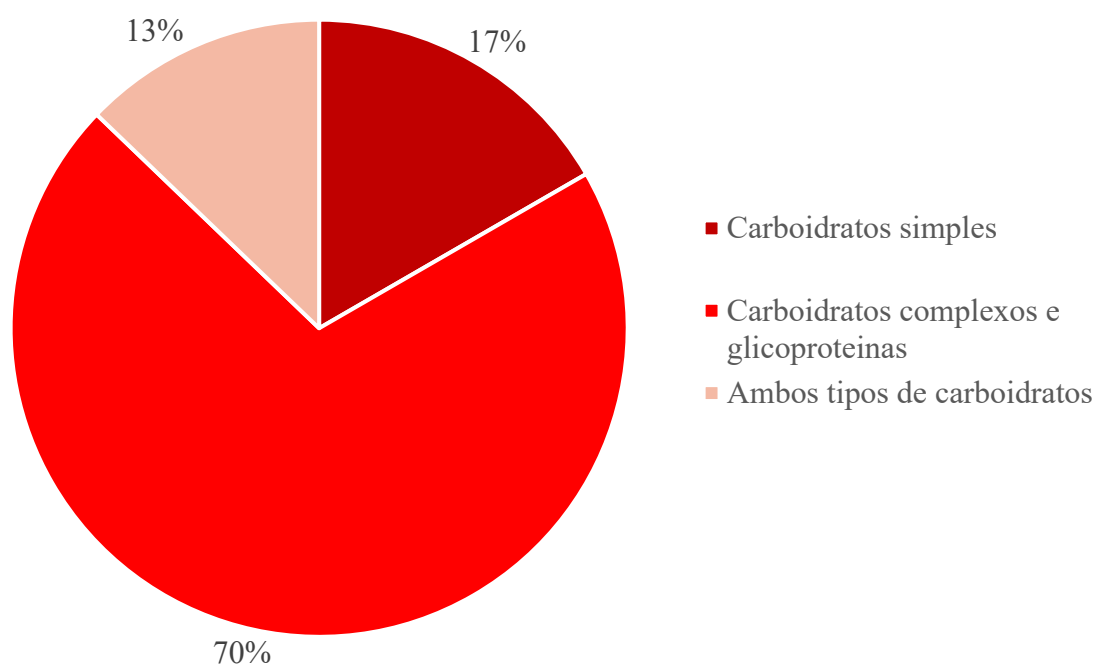
A análise desses monossacarídeos ajuda a entender as pequenas modificações que são relevantes para interação lectina-carboidrato, principalmente em relação a aspectos estruturais. Outra interessante observação é a origem natural desses açúcares e a capacidade intrínseca dessas moléculas de serem utilizadas em interações biológicas, como no caso da D-manose, outra hexose derivada da glicose e significativo ligante das LOA, é o epímero C-2 da D-glicose (Figura 6), ou seja, difere apenas na configuração em torno de um único átomo de

carbono quiral, o segundo carbono, interessante ela é conhecida por sua adesão a lectinas da superfície de bactérias como *E. coli*, impedindo a contaminação do trato urinaria atuando no lugar de antibióticos (LUPO; INGERSOLL; PINEDA, 2021).

1.3.1.2 Especificidade a carboidratos complexos e glicoproteínas

Muitos anos de pesquisa com lectinas têm mostrado que glicoconjugados, incluindo glicoproteínas e glicolipídios, são mais propensos a serem os ligantes naturais para a maioria dessas moléculas (VAN DAMME, 2014). Essa condição é particularmente bem observada nas LOA, principalmente nas de algas vermelhas (Figura 7).

Figura 7 – Padrão de afinidade de lectinas de algas vermelhas.



Fonte: Autor.

Por outro lado, a ligação a estruturas complexas dificulta a classificação dessas moléculas utilizando suas especificidades, uma vez que essas estruturas glicídicas apresentam arranjos naturalmente muito diversificados. Outro atenuante, que dificulta traçar um padrão, é a característica inerente das lectinas de poderem apresentar níveis diferentes de especificidade a um carboidrato baseadas em ligações e interações muito particulares que em estruturas muito diversas podem representar atuações mais significativas do que outras, tornando-as mais

complicadas de serem usadas em pesquisas ou aplicações médicas do que aquelas específicas para monossacarídeos devido à dificuldade em prever sua reatividade (HWANG *et al.*, 2020).

A maioria desses carboidratos complexos e glicoproteínas que são reconhecidos por lectinas de algas fazem parte ativa da superfície ou parede celular de organismos e/ou tecidos biológicos mais complexos, como as mananas encontradas na membrana de leveduras ou mucinas, proteínas fortemente glicosiladas frequentemente observadas em tecidos epiteliais (LIU *et al.*, 2021b; MELHEM; REGAN-KOMITO; NIESS, 2021).

Particularmente, lectinas de algas vermelhas costumam apresentar especificidade por *N*-glicanos, especialmente os do tipo *high* manose, ou seja, glicanos ligados ao nitrogênio do grupo amida da asparagina de uma cadeia peptídica, na configuração Asn-X-Ser/Thr (com X diferente de Pro, devido ao seu grande tamanho molecular), que apresentam ramificações ricas em manose (SAN CLEMENTE; JAMET, 2022). Esse tipo de *N*-glicosilação é comum, por exemplo, na superfície de vírus envelopados, o que indicaria o potencial de lectinas de algas vermelhas a serem usadas contra doenças virais, o que hoje é indiscutivelmente verdade (NAIK; KUMAR, 2022).

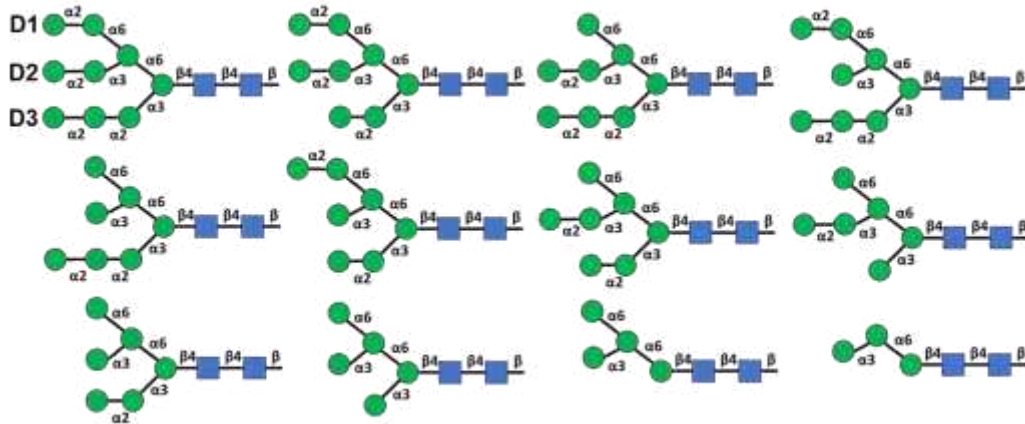
Uma possibilidade, mais adequada e detalhada de se analisar essas interações é por metodologias que examinam os glicanos de uma forma específica, como as técnicas de Ultracentrifugação e *Glican array*, que têm por princípio a imobilização da molécula analisada e teste da afinidade pelos glicanos (GAO *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2023). Apesar de não existir um vasto conhecimento atrelado ao uso dessas técnicas com relação a LOA, já existe algumas configurações de glicanos que apresentam maior grau de especificidade por esse grupo de lectinas (Figura 8).

Essas análises revelam alguns perfis interessantes de especificidade a glicanos nas LOA, onde é possível agrupá-las em três conjuntos principais: lectinas específicas de *N*-glicanos do tipo *high* manose; *N*-glicanos fucosilados e glicanos com Gal/Glc terminal (Figura 8).

Historicamente, entendia-se que lectinas de algas estavam divididas em três categorias principais de lectinas: específicas de *N*-glicano de tipo complexo, lectinas específicas de *N*-glicano com alto teor de manose e em lectinas com ambas as especificidades, tanto de *N*-glicano de tipo complexo, quanto com alto teor de manose (HORI; MIYASAWA, ITO, 1990; ROGERS; HORI, 1993).

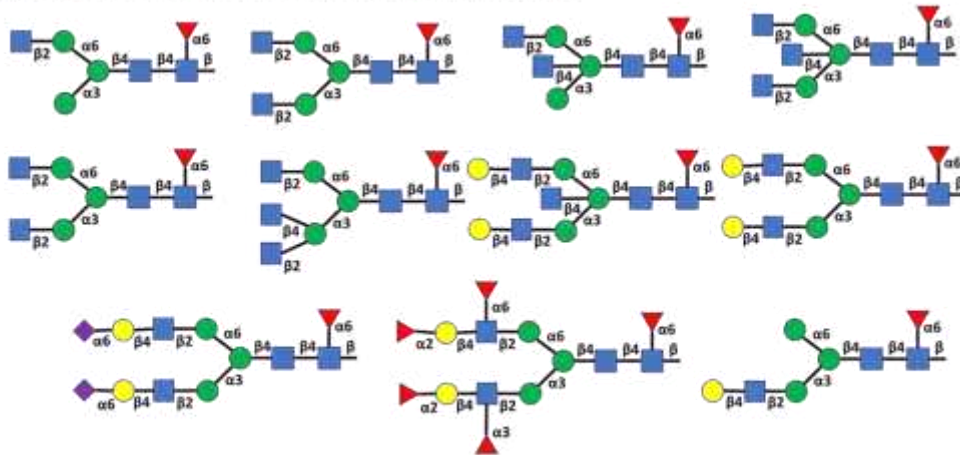
Figura 8 – Principais glicanos reconhecidos por LOA.

N-glicanos tipo *High manose*

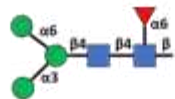


N-glicanos fucosilados

N-glicanos tipo complexo de núcleo (α 1-6) fucosilado



N-glicano sem ramificações após o núcleo (α 1-6) fucosilado



Glicanos com Gal/Glc terminal

Oligossacarídeo Gal terminal



Oligossacarídeo Gal terminal sialilado



Malto-oligossacarídeos



● Man ■ GlcNAc ● Glc ▲ Fuc ● Gal ◆ NeuAc

Fonte: Autor.

Ao utilizar essas técnicas mais precisas, essa classificação pode ser complementada, por exemplo, com a percepção da fucosilação apresentando maior relevância na interação de algumas lectinas de algas a *N*-glicanos do tipo complexo, como nas HJA-1, HJA-2 e HJA-3 da alga *Hypnea japonica* que apresentaram padrão de ligação estrita a *N*-glicanos fucosilados do núcleo (α 1-6), e não a outros oligossacarídeos, incluindo glicanos fucosilados (α 1-2), (α 1-3) e (α 1-4) (OKUYAMA *et al.*, 2009). A lectina BTL da alga vermelha *Bryothamnion triquetrum* segue o mesmo padrão mostrando uma especificidade estrita para o núcleo da α 1,6-fucosilação, não reconhecendo a presença única da α 1,3-fucosilação, além de parecer não ser afetada pela composição da extremidade não redutora dos *N*-glicanos (NASCIMENTO *et al.*, 2015).

A lectina da alga *Hypnea musciformis* HML também teve sua especificidade investigada, essa pela composição dos carboidratos e glicoproteínas específicas ou invés dos glicanos isolados, apresentando certa preferência pelo epítipo Fuc (α 1-6-GlcNAc) (NAGANO *et al.*, 2005a). Outra lectina que parece seguir esse perfil é a CBA de *Codium barbatum*, discriminando entre *N*-glicanos fucosilados centrais (α 1-6) que são predominantes em tiroglobulina de porco, mas são poucos ou ausentes em transferrina e fetuína, os quais a lectina não se ligou (PRASEPTIANGGA *et al.*, 2012).

Outras lectinas parecem ter preferência por glicanos menos ramificados, não bi- ou triantenados, e com terminais Gal/Glc, com especificidade para a conformação alfa (α -), por exemplo, Gal- β -1,3-GalNAc α - (antígeno T) em BPL-3 de *Bryopsis plumosa*, ou beta (β -), como ligação com Maltohexaose- β - e Maltoheptaose- β - observada em GCL (HWANG *et al.*, 2018b; HWANG *et al.*, 2020).

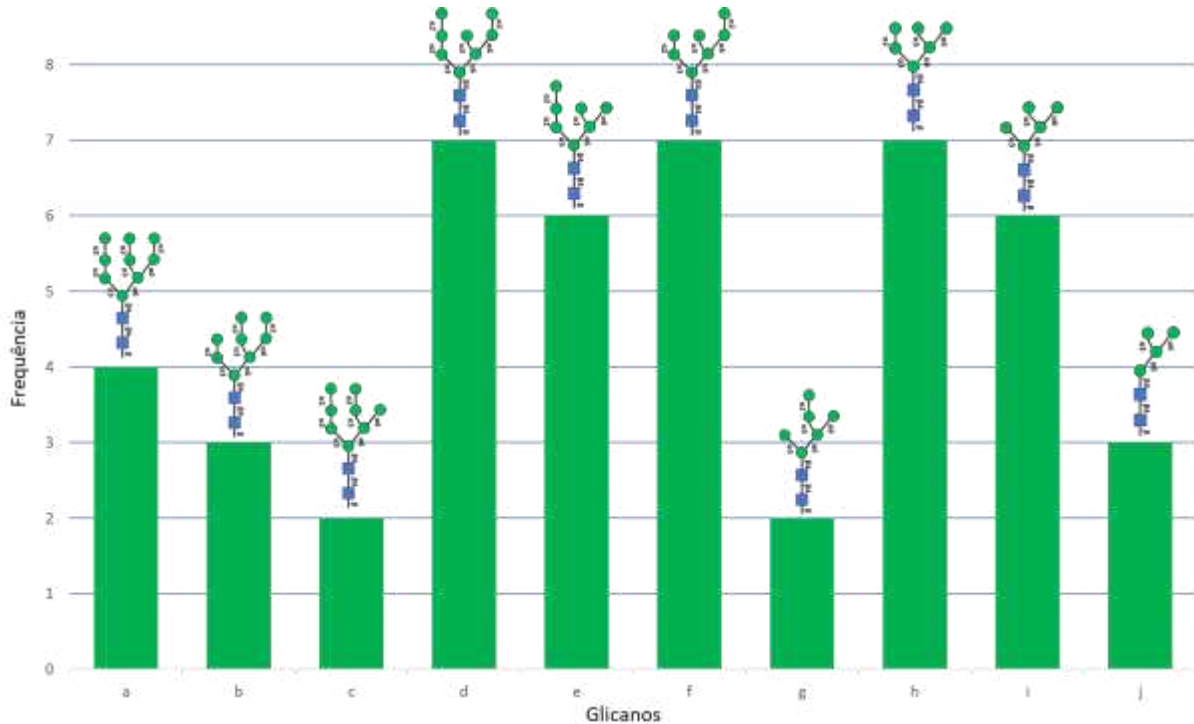
No entanto, a preferência mais observada e mais bem compreendida em LOA é à *N*-glicanos do tipo *high* manose (Figura 9), geralmente sendo as lectinas restritas a esse tipo de glicosilação. Diversas lectinas, como EDA-2, ESA-2, KSA-2, KAA-1, -2, OAA, HR40 e BCA apresentam esse padrão de ligação (BARRE *et al.*, 2021).

Além do tipo de glicosilação, algumas características parecem ser comuns a especificidade dessas algas por esse grupo de glicanos. Existe uma preferência por estruturas que apresentam resíduos de Man exposto (α 1-3) no terminal redutor do braço D2, com diminuição significativa na afinidade quando mascarado pela adição de um resíduo de Man no terminal não redutor (α 1-2) (HORI *et al.*, 2007). Outra modificação que parece aumentar a atividade de ligação é a adição de um (α 1-2) resíduo de Man à unidade Man(α 1-3)Man β 1 no braço D1 (HUNG *et al.*, 2015).

Um Man (α 1-2) no término do braço D3 também parece não afetar a interação dessas lectinas por esses oligomanosídeos, o que sugere que um resíduo de C2-OH do Man

(α 1–3) pode ser primariamente essencial para a interação dessas lectinas algais (HIRAYAMA; LY; HORI, 2015). Assim, a estrutura preferível dessas LOA parece ser (Man(α 1-2)Man(α 1-3)[Man(α 1-3)[Man(α 1-2)Man(α 1-6)]Man(α 1-6)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4) β -GlcNAc) (Figura 9-Glicano f).

Figura 9 – *N*-glicanos do tipo *high* manose mais específicos a LOA.



- a - Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-3)[Man(α 1-2)Man(α 1-3)]Man(α 1-6)]Man(α 1-6)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)b-GlcNAc
b - Man(α 1-2)Man(α 1-3)[Man(α 1-2)Man(α 1-3)]Man(α 1-6)]Man(α 1-6)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)b-GlcNAc
c - Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-3)[Man(α 1-2)Man(α 1-3)]Man(α 1-6)]Man(α 1-6)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)b-GlcNAc
d - Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-3)[Man(α 1-3)]Man(α 1-2)Man(α 1-6)]Man(α 1-6)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)b-GlcNAc
e - Man(α 1-2)Man(α 1-2)Man(α 1-3)[Man(α 1-3)]Man(α 1-6)]Man(α 1-6)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)b-GlcNAc
f - Man(α 1-2)Man(α 1-3)[Man(α 1-3)]Man(α 1-2)Man(α 1-6)]Man(α 1-6)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)b-GlcNAc
g - Man(α 1-3)]Man(α 1-2)Man(α 1-3)]Man(α 1-6)]Man(α 1-6)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)b-GlcNAc
h - Man(α 1-2)Man(α 1-3)[Man(α 1-3)]Man(α 1-6)]Man(α 1-6)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)b-GlcNAc
i - Man(α 1-3)]Man(α 1-3)]Man(α 1-6)]Man(α 1-6)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)b-GlcNAc
j - [Man(α 1-3)]Man(α 1-6)]Man(α 1-6)]Man(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)b-GlcNAc

Fonte: Autor.

Essa condição parece não ser necessária para a lectina BCA que mostrou preferência pelos oligossacarídeos portadores de manose terminal ligadas α 1–2, e a atividade foi aumentada proporcionalmente ao aumento do número de substituições α 1–2 na extremidade não redutora. Além disso BCA não interage com *N*-glicanos do tipo *high* manose que são desprovidos de α 1–2-manose terminal, o que faz parecer que existem pelo menos dois grupos diferentes de lectinas de algas com interação por esses glicoconjugados (SATO *et al.*, 2011a). Demonstrando assim, que a ligação a *N*-glicanos ricos em manose é uma especificidade conservada em certos tipos

de LOA, mas existem variações nas antenas das estruturas que determinam níveis diferentes de especificidade.

1.3.2 Características estruturais

1.3.2.1 Estrutura primária

Desde a Concavalina-A (ConA) de *Canavalia ensiformis*, primeira lectina com a estrutura primária elucidada, entende-se que essa caracterização é capaz de fornecer importantes informações sobre as lectinas, como o entendimento das interações dos aminoácidos com os ligantes específicos dos DRC ou com sua própria estrutura no enovelamento da proteína (EDELMAN *et al.*, 1972; DE CONINCK; VAN DAMME, 2021).

No entanto, assim como no estudo geral das LOA, a pesquisa estrutural dessas moléculas ainda é escassa. A primeira delas a ter sua sequência de aminoácidos elucidada foi a lectina BTL (CALVETE *et al.*, 2000). Hoje são conhecidas 41 estruturas primárias de lectinas algais isoladas, sendo 9 de algas verdes, 26 de algas vermelhas e 6 de algas azuis (Tabela 2).

Tabela 2 – LOA com estrutura primária determinada (Continua).

Espécie	Lectina	Metodologia	Especificidade	Referência
Algas verdes				
<i>Boodlea coacta</i>	BCA	Clonagem de cDNA	N-glicanos ricos em manose	SATO <i>et al.</i> , 2011a
<i>Bryopsis hypnoides</i>	BHL	Clonagem de cDNA	Mucina, GalNAc e GlcNAc	NIU <i>et al.</i> , 2009
<i>Bryopsis plumosa</i>	<i>Bryohealin</i> BPL2 BPL3 BPL4	Clonagem de cDNA	Manose, GalNAc e GlcNAc	YOON <i>et al.</i> , 2008; HAN <i>et al.</i> , 2010, 2011, 2012b
<i>Codium barbatum</i>	CBA	Clonagem de cDNA	N-glicanos ricos em manose	PRASEPTIANGGA; HIRAYAMA; HORI, 2012
<i>Codium isthmocladum</i>	CiL-1	MS/MS	Galactosídeos e fetuína	CARNEIRO <i>et al.</i> , 2020
<i>Ulva pertusa</i>	UPL1	Clonagem de cDNA	GlcNAc e tiroglobulina	WANG <i>et al.</i> , 2004
Algas vermelhas				

Tabela 2 – LOA com estrutura primária determinada (Continuação).

Espécie	Lectina	Metodologia	Especificidade	Referência
Algas vermelhas				
<i>Aglaothamnion callophyllidicola</i>	Rhodobindin	Clonagem de cDNA	Fetuina e Asialofetuina	SHIM <i>et al.</i> , 2012
<i>Aglaothamnion oosumienses</i>	AOL-1	Clonagem de cDNA	<i>N</i> -acetil galactosamina (GalNAc)	HAN <i>et al.</i> , 2012a
<i>Amansia multifida</i>	AML	Clonagem de cDNA	Manana de levedura	SILVA, 2016
<i>Bryothamnion seaforthii</i>	BSHV	Degradação de Edman e MS	Fetuina, Avidina e Mucina	MEDINA-RAMIREZ <i>et al.</i> , 2007
<i>Bryothamnion seaforthii</i>	BSL-2	MS/MS	Fetuina, Avidina e Mucina	NASCIMENTO-NETO <i>et al.</i> , 2012
	BSL-3			
	BSL-4			
<i>Bryothamnion triquetrum</i>	BTL	Degradação de Edman e MS	Fetuina e Mucina	CALVETE <i>et al.</i> , 2000
<i>Eucheuma denticulatum</i>	EDA-2	Clonagem de cDNA	<i>N</i> -glicanos ricos em manose	HUNG <i>et al.</i> , 2015
<i>Eucheuma serra</i>	ESA-2	Degradação de Edman	<i>N</i> -glicanos ricos em manose	HORI <i>et al.</i> , 2007
<i>Gelidium amansii</i>	GAL	Degradação de Edman / Clonagem de cDNA	N.D.	MASSI; AHMAD, 2012
<i>Grateloupia chiangii</i>	GCL	Degradação de Edman e LC-MS / MS	D-manose	HWANG <i>et al.</i> , 2020
<i>Grifthisin</i> sp.	GRFT	Degradação de Edman e MS	Manose e <i>N</i> -acetil D-glicosamina (GlcNAc)	MORI <i>et al.</i> , 2005
<i>Hypnea cervicornis</i>	HCA	Degradação de Edman e MS/MS	Mucina	NAGANO <i>et al.</i> , 2005a
	HJA-1	Degradação de Edman	Transferrina, Fetuina e α 1-glicoproteína ácida e suas formas desializadas	HORI; MATSUBARA; MIYASAWA, 2000; OKUYAMA <i>et al.</i> , 2009
	HJA-2			
<i>Hypnea japonica</i>	HJA-3			
<i>Hypnea musciformis</i>	HML	Degradação de Edman e MS/MS	Mucina	NAGANO <i>et al.</i> , 2005a
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	KAA-1	Clonagem de cDNA	<i>N</i> -glicanos ricos em manose	HIRAYAMA <i>et al.</i> , 2016
	KAA-2			
<i>Kappaphycus striatum</i>	KSA-1	Clonagem de cDNA	<i>N</i> -glicanos ricos em manose	HIRAYAMA; LY; HORI, 2015; TRUNG; HUNG, 2016
	KSA-2			

Tabela 2 – LOA com estrutura primária determinada (Conclusão).

Espécie	Lectina	Metodologia	Especificidade	Referência
Algas vermelhas				
<i>Kappaphycus striatus</i>	KSL	Clonagem de cDNA	Manana de levedura	HUNG; TRINH, 2021
<i>Meristiella echinocarpa</i>	MEL	Clonagem de cDNA e MS/MS	Manana de levedura	CHAVES <i>et al.</i> , 2018a
<i>Solieria filiformis</i>	SfL-1 SfL-2	Degradação de Edman; Clonagem de cDNA e MS/MS	N-glicanos ricos em manose	CHAVES <i>et al.</i> , 2018b
Algas azuis				
<i>Mycrocystis aeruginosa</i>	Microvirin (MVN)	Clonagem de DNA genômico	Manana	KEHR <i>et al.</i> , 2006
<i>Mycrocystis aeruginosa</i>	MAL	Clonagem de DNA genômico	Galactosídeos, mucina e fetuina	JIMBO <i>et al.</i> , 2000
<i>Mycrocystis viridis</i>	MVL	Clonagem de DNA genômico	Manose	YAMAGUCHI <i>et al.</i> , 1999
<i>Nostoc ellipsosporum</i>	Cyanovirin-N (CV-N)	Degradação de Edman	N-glicanos ricos em manose	BOYD <i>et al.</i> , 1997
<i>Oscillatoria agardhii</i>	OAA	Clonagem de DNA genômico	N-glicanos ricos em manose	SATO <i>et al.</i> , 2007
<i>Scytonema varium</i>	Scytovirin (SVN)	Degradação de Edman	N-glicanos ricos em manose	BOKESCH <i>et al.</i> , 2003

Fonte: Autor. MS: espectrometria de massas. MS/MS: espectrometria de massa em tandem. LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. N.D.: não determinado.

Além dessas, existem algumas lectinas de algas com suas sequências de aminoácidos parcialmente determinadas (Tabela 3), como é o caso das lectinas EPL-1 e EPL-2 de *Enteromorpha prolifera*, que apresentam aproximadamente 70% de suas estruturas primárias determinadas, não apresentando similaridade entre si ou com outras lectinas de algas (AMBROSIO *et al.*, 2003). Já a lectina *Sjoestedina* de *Gracilariopsis sjoestedii* que teve sua estrutura parcial obtida a partir de peptídeos trípticos apresentou similaridade as lectinas ESA-2 de *Eucheuma serra*, AML de *Amansia multifida* e OAA de *Oscillatoria aghardii* (DE PAULA, 2011).

Tabela 3 – LOA com estrutura primária parcial (Continua).

Espécie	Lectina	Metodologia	Especificidade	Referência
<i>Bryothamnion triquetrum</i>	BTHV	Degradação de Edman e MS	Fetuina e Mucina	MEDINA-RAMIREZ <i>et al.</i> , 2007

Tabela 3 – LOA com estrutura primária parcial (Conclusão).

Espécie	Lectina	Metodologia	Especificidade	Referência
<i>Caulerpa cupressoides</i>	CcL	Degradação de Edman	N/D	QUEIROZ, 2013
<i>Codium isthmocladum</i>	CiL-2	Degradação de Edman e MS/MS	GalNAc e MES	CARNEIRO <i>et al.</i> , 2020
<i>Enteromorpha prolifera</i>	EPL-1 EPL-2	MALDI-TOF MS	Manano / fucoidano	AMBROSIO <i>et al.</i> , 2003
<i>Gracilariopsis sjoestedii</i>	Sjoestedina	MS/MS	Mucina	DE PAULA, 2011
<i>Hizikia fusiformis</i>	HFL	MALDI-TOF MS	Tireoglobulina	WU <i>et al.</i> , 2016
<i>Osmundaria obtusiloba</i>	OOL	MS/MS	N-glicanos ricos em manose	COSTA FILHO, 2022

Fonte: Autor. MS: espectrometria de massas. MS/MS: espectrometria de massa em tandem. N.D.: não determinado.

Além das técnicas mais convencionais de determinação da estrutura primária, como espectrometria de massas e clonagem molecular, uma abordagem que vem ganhando evidência é a construção de bibliotecas de cDNA (*complementary DeoxyriboNucleic Acid*) que promove o acesso direto a sequência de genes, muitas estruturas já foram descritas seguindo essa metodologia, no entanto, para se atestar que uma sequência de aminoácidos pertence a uma lectina o isolamento é muito importante, principalmente a determinação do sítio de ligação a carboidratos, característica obrigatória para essa classe de proteínas (PARK; KIM; CHO, 2022; ZARLENGA, 2021). Assim, proteínas putativas só podem ser sugeridas como lectinas se apresentarem semelhança de sequência com lectinas isoladas ou pelo menos com o DRC conhecidos, ou se tiverem a união lectina-carboidrato determinada experimentalmente.

Tabela 4 – Lectinas putativas de algas (Continua).

Espécie	Lectina	Sequence ID	Referência
<i>Agardhiella subulata</i>	ASL-1	BAX08598.1	CHAVES <i>et al.</i> , 2018b
	ASL-2	BAX08599.1	
<i>Bryopsis máxima</i>	BML-17	BAI94585.1	HORI, 2007
<i>Gracilaria fisheri</i>	GFL	ACY56710.1	SUTTISRISUNG <i>et al.</i> , 2011
<i>Meristotheca papulosa</i>	MPA-1	BAX08601.1	CHAVES <i>et al.</i> , 2018b
	MPA-2	BAX08602.1	

Tabela 4 – Lectinas putativas de algas (Conclusão).

Espécie	Lectina	Sequence ID	Referência
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	NgL	N/R	CARPINELLI <i>et al.</i> , 2014; BARRE, 2019
<i>Porphyra umbilicalis</i>	BU14	OSX69288.1	BARRE, 2019
<i>Ostreococcus tauri</i>	Otl	N/R	DERELLE <i>et al.</i> , 2006
<i>Ulva liminetica</i>	ULL	BAH15075.1	ISHIHARA; ARAI; SHIMADA, 2009

Fonte: Autor. N/R: não referenciado.

1.3.2.1.1 Massa molecular

A determinação da sequência de aminoácidos de uma proteína é um dos passos iniciais da caracterização estrutural, dela são tiradas várias informações básicas, como a localização de sítios de ligação, possíveis interações, determinação calculada da massa molecular e validação de estruturas tridimensionais (ERBA; SIGNOR; PETOSA, 2020; MADANI *et al.*, 2020).

Lectinas ou proteínas em geral, costumam apresentar algumas características que podem ser melhor investigadas com a análise de suas assinaturas de sequências, por exemplo, as massas moleculares baixas estimadas em estudos bioquímicos se traduzem em cadeias de aminoácidos relativamente curtas (LUDWIG *et al.*, 2019). Essas características podem ser utilizadas para agrupá-las, por exemplo, em relação a massas moleculares, algumas LOA possuem aproximadamente 9 kDa e uma sequência de cerca de 90 aminoácidos.

A *Scytovirin* (SVN), uma lectina de cianobactéria *Scytonema varium* com massa de aproximadamente 9,7 kDa determinada por ESI-MS (*ElectroSpray Ionization – Mass Spectrometry*) teve a sua sequência de aminoácidos determinada por degradação de Edman (Degradação sequencial automatizada de Edman) e analisada também por ESI-MS utilizando as enzimas Arg-C e Glu-C, resultando em 95 aminoácidos em sua sequência (BOKESCH *et al.*, 2003; ARMARIO-NAJERA *et al.*, 2022). A lectina BTL do gênero *Bryothamnion* é outra LOA que está nessa faixa de massa e que possui estrutura primária determinada, com massa de aproximadamente 9 kDa determinada por MALDI-TOF-MS (*MALDI – Time Of Flight – MS*) (CALVETE *et al.*, 2000).

BSHV, de *Bryothamnion seaforthii*, é outra lectina algal que possui baixa massa, de aproximadamente 9 kDa, e apresenta-se como um monômero, no entanto, é sugerido possuir a

capacidade de facilmente associar-se à formação de dímeros, trímeros e tetrâmeros, além de possuir isoformas com algumas modificações em algumas posições, deduzidas da análise da sequência N-terminal de seus peptídeos sobrepostos, obtidos pela degradação da lectina com tripsina e quimotripsina (MEDINA-RAMIREZ *et al.*, 2007).

Assim como BSHV outras lectinas do gênero *Bryothamnion* possuem ocorrência de micro heterogeneidades nas suas unidades monoméricas. A lectina BSL da mesma espécie, possui 5 isoformas examinadas por espectrometria de massas em tandem (MS/MS), com 3 delas possuindo sequência determinada por sobreposição das sequências dos peptídeos gerados pela digestão de BSL com as enzimas proteolíticas tripsina e quimotripsina e massas isotópicas calculadas em torno de 9 kDa por MALDI/MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – MS*) (DO NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012).

As lectinas HCA (9193±3 Da) e HML (9357±1 Da) do gênero *Hypnea*, possuem estruturas primárias determinadas por degradação de Edman e MS/MS, apresentando um N-terminal com 47 resíduos, correspondendo ao domínio N-terminal das lectinas, que em sua totalidade possuem 90 aminoácidos e a oligomerização da HML foi avaliada por ultracentrifugação analítica sendo observada como forma monômerica até o pH 8,0 (NAGANO *et al.*, 2005a; NAGANO *et al.*, 2005b). Outras lectinas do gênero *Hypnea* são HJA-1 e HJA-2 que também eram hemaglutininas compostas por 90 resíduos de aminoácidos com massas moleculares calculadas de 9146,7 e 9109,7 Da (HORI; MATSUBARA; MIYASAWA, 2000). Alguns anos depois, a HJA-3 também teve sua estrutura primária elucidada e conservava as mesmas características de massa, número de aminoácidos e N-terminal das primeiras lectinas da espécie *Hypnea japonica* (OKUYAMA *et al.*, 2009).

Outras LOA podem ser classificadas em um grupo de massa um pouco superior, variando 9,7 a 14 kDa e possuindo entre 100 e 140 aminoácidos. Entre elas estão a lectina CBA que teve a biblioteca de cDNA codificando um polipeptídeo de 105 aminoácidos incluindo um peptídeo sinal de 17 resíduos. A massa molecular calculada a partir da sequência deduzida foi de 9,7 kDa (PRASEPTIANGGA; HIRAYAMA; HORI, 2012). Outra lectina do gênero *Codium* que pode ser incluída nesse grupo é a CiL-1, que foi sequenciada por auxílio de MALDI-ToF-MS, possuindo massa de 12 kDa e uma sequência de 112 aminoácidos (CARNEIRO *et al.*, 2020).

A lectina MVN de *Mycrocystis aeruginosa* possui 108 aminoácidos com 14 kDa, sendo caracterizada como uma proteína monomérica que possui a capacidade de sofrer dimerização. Existem outras lectinas de algas azuis nessa faixa de massa, como os casos da MVL de *Mycrocystis viridis* que possui a determinação de sua sequência realizada por clonagem

de cDNA e MALDI-TOF, correspondendo a 13 kDa e 113 aminoácidos e a lectina CV-N de *Nostoc elliposporum* apresenta 11 kDa com 101 resíduos de aminoácidos em sua estrutura primária (BOYD *et al.*, 1997; KEHR *et al.*, 2006; YAMAGUCHI *et al.*, 1999).

Outros membros das LOA que estão nessa faixa são a lectina GRFT, amplamente estudada, possuindo aproximadamente 13 kDa e uma sequência de 121 aminoácidos; a lectina BPL-3 de 11,5 kDa determinados por MALDI-ToF-MS e uma sequência de 134 aminoácidos; a BPL-4, também obtida da alga *Bryopsis plumosa* assim como BPL-3, que possui aproximadamente 13 kDa sem a massa de seu peptídeo sinal, e conta com 137 aminoácidos; e a lectina OAA que possui uma massa de 13,9 kDa calculada de seus 132 aminoácidos (HAN *et al.*, 2011, 2012; MORI *et al.*, 2005; SATO *et al.*, 2007).

Algumas outras LOA que possuem estrutura determinada compartilham uma quantidade maior de aminoácidos entre 180 e 231 apresentando cerca de 14 a 25 kDa. São os casos das lectinas BCA de *Boodlea coacta* com massa molecular de 13,8 kDa determinada por ESI-MS e 17,5 kDa com a contabilização de seu peptídeo sinal, sua estrutura primária foi determinada por uma combinação de degradação de Edman, fragmentação peptídica produzida pelas digestões proteolíticas (Lys-C e Asp-N) e clonagem de cDNA, onde o cDNA foi composto por 1.023 pb que codificou 180 aminoácidos, incluindo um N-terminal de 30 resíduos ²⁰GAF(Q/K) AISGESGKYLSHAFKIWLQNGYQGL⁵⁰ com presença de dupla identificação no quarto aminoácido o que sugeria a presença de isoformas (SATO *et al.*, 2011a).

Já a lectina BPL-2, outra lectina de *Bryopsis plumosa*, teve sua massa determinada por MALDI-TOF-MS em 17,4 kDa e a sequência completa de cDNA foi obtida usando biblioteca de cDNA que representou 206 aminoácidos com N-terminal de ⁴¹VIYQDPVTSD⁵⁰ (HAN *et al.*, 2010).

A lectina UPL-1 da alga verde *Ulva pertusa* possui 23 kDa estimado em SDS-PAGE e teve a determinação de sua sequência por clonagem de cDNA que tinha 1084 pb de comprimento, e codificou uma proteína prematura de 203 aminoácidos com um N-terminal de 20 resíduos (⁵⁴GGITNTDNWETFAGLPLTGA⁷³) (WANG *et al.*, 2004). A lectina GAL do gênero *Gelidium* teve sua sequência determinada por sequenciamento do N-terminal (¹⁹PLQGRSQKTE²⁸) por sequenciador de proteínas e posteriormente clonagem de cDNA, apresentando uma massa de aproximadamente 21 kDa (MASSI; AHMAD, 2012). A lectina GCL, também seguiu metodologia de degradação de Edman e LC-MS/MS (*Liquid Chromatography – MS/MS*), e as sequências de cDNA e peptídeo foram deduzidas, mostrando-se constituída de 231 aminoácidos (24,9 kDa) com N-terminal ²VVSNRLVSGESLHR¹⁵ (HWANG *et al.*, 2020).

Um grupo bem vasto de LOA possui de 250 a 300 aminoácidos em suas estruturas primárias determinadas, com massas variando de 19 a 29 kDa:

As lectinas do gênero *Bryopsis*, BHL que possui 27 kDa e um sequência de 296 aminoácidos e *Bryohealin* com 27 kDa 257 aminoácidos (NIU *et al.*, 2009). AOL-1, a lectina da alga *Aglaothamnion oosumienses* teve a clonagem de seu cDNA obtendo 1.095 pb de comprimento e codificando uma proteína de 259 aminoácidos com massa molecular deduzida de 21,4 kDa por MALDI-TOF-MS (HAN *et al.*, 2012a).

Com íntima relação entre si, as lectinas AML, EDA-2, ESA-2, KAA-1, -2, KSA-1, -2, KSL, MEL, Sfl-1, -2 particularmente tem essas características de massa e número de resíduos bem similares, apresentando cerca de 28 kDa e variando entre 267 e 270 aminoácidos (SINGH; WALIA, 2018).

Pouquíssimas LOA estão fora dessas faixas de massas reduzidas, essas lectinas isoladas que não se encaixam nesses grupos possuem entre 450 e 520 aminoácidos: uma lectina da alga azul *Mycrocystis aeruginosa* MAL (517 aminoácidos / 55,2 kDa) e duas de algas vermelhas, a *Rhodobindim* de *Aglaothamnion callophyllidicola* (450 aminoácidos / 50,7 kDa) e GFL da alga *Gracilaria fisheri* (513 aminoácidos / 56,5 kDa) (JIMBO *et al.*, 2000; SHIM *et al.*, 2012; SUTTISRISUNG *et al.*, 2011).

Essa pequena massa molecular é uma característica interessante, principalmente para moléculas com a capacidade das lectinas de participar de processos fisiológicos. A massa reduzida ajuda na entrega de drogas e absorção acelerada ou não detecção por sistemas antagonistas, o que potencializa a capacidade de aplicação dessas moléculas e dá pistas sobre suas funções naturais (WU *et al.*, 2020).

Além das baixas massas moleculares, poucas LOA como *Bryohealin* ou GRFT, não foram sugeridas como moléculas monoméricas. De fato, essa é uma característica comum das lectinas obtidas de algas e juntamente com a observação de sua capacidade hemaglutinante evidencia outro aspecto estrutural importante desse conjunto de moléculas que é de em geral se comportarem como hololectinas, ou seja, apresentam no mínimo dois domínios de ligação a carboidratos necessários para a precipitação de glicoconjugados e aglutinação de células (LOO *et al.*; 2021; PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

1.3.2.1.2 Domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC)

O domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC) é a característica mais fundamental das lectinas e deve ser expressa pelo menos uma vez na cadeia peptídica, suas

propriedades como quantidade na cadeia, composição, orientação e extensão definem a capacidade de ligação das lectinas. O DRC pode apresentar assinatura conservada em conjuntos de proteínas, o que ajuda na sua classificação (CHETTRI *et al.*, 2021; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2022). Em lectinas multiméricas, costumam-se encontrar um DRC por subunidade e a atuação dos sítios de ligação por monômeros confere maior especificidade e estabilidade para a ligação.

No entanto, essa não é a característica mais observada em LOA, pois geralmente essas se apresentam como monômeros. Provavelmente para suprir essas necessidades de estabilidade e/ou de estender seus locais de contato com as superfícies glicídicas essas moléculas de cadeia única começaram a ser expressas apresentando mais de um domínio em sua sequência de aminoácidos, essas regiões podem ser repetições ou diferirem, atuando em conjunto ou proporcionando locais de contato para mais de um carboidrato (NABI-AFJADI *et al.*, 2022; NOTOVA *et al.*, 2020).

A identificação precisa dos DRC só pode ser realizada com uma investigação detalhada dos contatos realizados pelos aminoácidos com seus açúcares específicos ou pela identificação de homologia com DRC conhecidos (GABBA *et al.*, 2021). Contudo, repetições são mais fáceis de serem observadas e parecem ser uma característica bem conservada nas LOA.

A duplicação de domínios é uma característica bem observada nas LOA sendo encontrada em 12 lectinas. As lectinas de cianobactérias CV-N, SVN, MVL, MAL, MVN e OAA possuem essa característica, a *Cytovirin-N*, por exemplo, mostra clara duplicação de sequência interna, quando os aminoácidos 1–48 e 49–95 estão alinhados, 75% de similaridade pode ser observada e três locais representam alterações conservadoras. Além disso, ligações dissulfeto podem ser observadas com íntima correspondência entre um domínio e outro, e essas regiões estariam ligadas também por uma ponte entre cisteínas (BOYD *et al.*, 1997).

A lectina MVN é outra que apresenta tal característica, além disso, ela apresenta dois domínios que são semelhantes aos resíduos de aminoácidos que fazem parte do sítio primário de ligação de carboidratos da CV-N, que por sua vez, já é um domínio bem conhecido. Entre elas, existem aminoácidos presentes ou trocados conservadoramente e outros estão ausentes, da mesma forma, os resíduos envolvidos no sítio de ligação dos carboidratos secundários são parcialmente conservados (KEHR *et al.*, 2006).

A lectina MVL é composta por dois domínios homólogos repetidos de 54 resíduos de aminoácidos com 50% de aminoácidos ácidos sendo idênticos entre o domínio N-terminal e o domínio C-terminal (YAMAGUCHI *et al.*, 1999). Já a OAA possui dois domínios homólogos com uma quantidade um pouco maior de resíduos do que os da MVL, cada um é constituído

pelas metades N- (67 resíduos) e C-terminal (65 resíduos) com 75% de identidade sequencial entre si e com grande similaridade com domínios de outras algas vermelhas que possuem mais repetições (SATO *et al.*, 2007).

As lectinas HCA e HML são outras duas proteínas que apresentam duplicação interna na sequência e compartilham similaridade entre essas regiões, o alinhamento da sequência de aminoácidos mostrou que os resíduos 1–47 e 48–90 correspondem aos domínios N- e C-terminal (NAGANO *et al.*, 2005a).

Um grupo de lectinas do mesmo gênero são as HJAs que apresentam regiões conservadas e aminoácidos invariantes nos domínios entre suas isoformas, contudo, elas não apresentaram domínios repetidos em sua sequência (HORI; MATSUBARA; MIYASAWA, 2000; OKUYAMA *et al.*, 2009).

A sequência de aminoácidos de CiL-1 também consistiu em dois domínios repetidos de aproximadamente 40 resíduos cada, um domínio do 9–52 resíduos de aminoácido e outro do 57–101, mostrando 58% de similaridade (CARNEIRO *et al.*, 2020). Outras macroalgas com lectinas com duplicações são a *Rhodobindin* e a bem estudada GRFT, que apresenta dois domínios que ainda podem ser separados em 3 sítios de ligação por domínio (LEE *et al.*, 2019; MORI *et al.*, 2005). Além dessas, BPL-4 foi descrita possuindo 2 domínios, que no caso, seriam heterogêneos (HAN *et al.*, 2012b; SHIM *et al.*, 2012).

A presença de quatro domínios na sequência de aminoácidos também é uma característica bem comum em LOA, compreendendo 11 lectinas de macroalgas vermelhas, no entanto, essas lectinas apresentam bastante similaridade entre os domínios entre as diferentes lectinas, sugerindo um grupo em comum (HUNG; TRINH, 2021).

De forma isolada, a lectina BCA apresenta 3 domínios internos repetidos em tandem dos quais consiste em 40 a 43 resíduos, apresentando identidade de sequência de 47,6 a 62,8% entre si, dos três subdomínios com sequências consensuais de aminoácidos, cada um dos quais corresponde a sítios característicos de ligação a manose e contém o DRC da sequência semelhante ao sítio de ligação de carboidratos das lectinas relacionadas à aglutinina de *Galanthus nivalis* (SATO *et al.*, 2011a). Da mesma forma, a lectina GCL possui número de domínios próprio no grupo das LOA, com seis domínios com aproximadamente 30 aminoácidos apresentando similaridade ao domínio das lectinas do tipo B (manose-específico) (HWANG *et al.*, 2020).

As demais lectinas pertencentes as LOA não possuem domínios repetidos por cadeia de aminoácidos, ou mais de um domínio determinado. Muitos desses, com poucas exceções, como GAL que apresenta DRC similar as lectinas do tipo C ou *Bryohealin* com certa

homologia a domínios de fucolectinas, não mostram similaridade a outros domínios conhecidos (MASSI; AHMAD, 2012; YOON *et al.*, 2008).

1.3.2.1.3 Peptídeo sinal

A presença de peptídeo sinal (P.S.) é uma característica interessante que pode revelar informações sobre as funções das lectinas nos organismos de origem, pois traduz informação de direcionamento da lectina, pois são sequências curtas de aminoácidos que controlam a secreção e translocação de proteínas em todos os organismos vivos (TEUFEL *et al.*, 2022). Do mesmo modo, a ausência do P.S. também fornece informações importantes, por exemplo, os membros da família OAAH não apresentam peptídeo sinalizador, indicando que são lectinas citosólicas, ou seja, são encontradas no citoplasma das células e ao contrário de muitas outras lectinas que são predominantemente associadas à membrana celular ou secretadas, essas estão envolvidas em processos biológicos endógenos (VAN DAMME *et al.*, 2004).

Entre às LOA, 12 lectinas apresentaram peptídeo sinal pelos métodos de sequenciamento utilizados, dentre esses, a maioria pertence ao padrão Sec/SPI, peptídeo de comprimento curto no término N das proteínas sintetizadas mais recentemente, carregando códigos postais relacionados à via de secreção de proteínas, bem como à localização do alvo da proteína (ALMAGRO ARMENTEROS *et al.*, 2019).

A maioria dessas lectinas que apresenta peptídeo sinal, pertence ao grupo das algas verdes, interessante é desse grupo também que estão alguns estudos sobre a elucidação da função natural dessas moléculas nesses organismos, que estariam ligados à sua atuação externa em processos de cicatrização ou reprodução (HAN *et al.*, 2011; NIU *et al.*, 2009; YOON *et al.*, 2008). A biblioteca de cDNA de BCA codificou um peptídeo sinal de 19 resíduos (1–19 aminoácidos) ¹MKTVDCIALLCTLLCGVVRG¹⁹, pela mesma metodologia, BPL-2 codificou um peptídeo sinal um pouco mais extenso, de 40 resíduos (1–40 aminoácidos) ¹MTPYMRAAIACAALVALAALGDARPVVNEMANVTMMVEN⁴⁰, assim como as outras lectinas oriundas da alga *Bryopsis plumosa*, BPL-3 com um peptídeo sinal de 28 resíduos ¹ARGPFKTITMAVTKIAVLLLLAAVGAYA²⁸ e BPL-4, com 16 aminoácidos ¹MLASKFAIFLLVALTTTGAYA¹⁶, BPL-4 pode ser uma proteína secretora direcionada ao vacúolo (HAN *et al.*, 2012b).

A lectina UPL-1, foi descrita possuindo um peptídeo sinal de 53 resíduos ¹MINILHVIAGLALASVGVDARQVGVGADVLHAVENTIDSITGVEASHSALEVG⁵³ estando distribuída na membrana celular, retículo endoplasmático e mitocôndria, e assim como ela, ULL

a outra lectina do gênero *Ulva* com estrutura primária determinada, também possui peptídeo sinal (ICHIHARA; ARAI; SHIMADA, 2009; LI *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2004).

A lectina do gênero *Codium* CBA, possui 17 resíduos ¹MYRCAIVLVALLIGAEA¹⁷ descritos como seu peptídeo sinal, já outras lectinas de algas verdes que apresentam essa característica são do gênero *Bryopsis*, BHL possui um peptídeo sinal de 39 resíduos ¹MMIRRWKKTLRLGALDTMAIKALHVVI AVLAAFASHVGA³⁹ e *Bryohealin* um consistindo de 22 aminoácidos apresentados antes do seu códon inicial, indicando que esta lectina era uma proteína vacuolar (armazenamento) prevista como uma proteína secretora direcionada para a parede celular ou vacúolo em vez de mitocôndrias ou cloroplasto (NIU *et al.*, 2009; PRASEPTIANGGA; HIRAYAMA; HORI, 2012; YOON *et al.*, 2009).

As únicas duas LOA que demonstraram possuir peptídeo sinal e que não pertencem as algas verdes são a lectina GAL com 18 aminoácidos ¹MLIHLSNTTQVCISLVI¹⁸ e a GFL com 19 resíduos correspondendo ao seu peptídeo de sinalização ¹MSVLFVLLLLALHAPPIPA¹⁹ (MASSI; AHMAD, 2012; SUTTISRISUNG *et al.*, 2011).

1.3.2.1.4 Presença de ponte dissulfeto

A presença de resíduos de cisteínas na sequência de aminoácidos das lectinas é importante pois elas podem comumente formar ligações dissulfeto que desempenham um papel significativo na estabilidade mecânica das proteínas, como na estabilização termodinâmica (FAMIL SAMAVATI *et al.*, 2020; MOSSUTO, 2013). A estrutura primária valida a possibilidade da existência dessas ligações, além de poder fornecer mais evidências sobre os padrões de contagem, que são importantes para a análise do enovelamento tridimensional dessas proteínas.

A lectina BTL possui a presença de quatro resíduos de cisteína envolvidos em duas ligações dissulfeto intracadeia, incluindo quatro meias-cistinas no padrão Cys⁵-Cys¹² e Cys⁶²-Cys⁹⁰ (CALVETE *et al.*, 2000). BTLV e BSHV também possuem 4 resíduos de cisteína envolvidas em duas pontes de dissulfeto intramoleculares (MEDINA-RAMIREZ *et al.*, 2007). Curiosamente, as isolectinas de HJA e BSL, que possuem similaridade de sequência com BTL, possuem quatro meias-cistinas envolvidas em duas ligações dissulfeto intracadeia, mas o padrão de ponte dissulfeto é diferente ocorrendo em Cys⁵-Cys⁶² e Cys¹²-Cys⁸⁹ (HORI; MATSUBARA; MIYASAWA, 2000; OKUYAMA *et al.*, 2009, NASCIMENTO-NETO, 2012)

A lectina CiL-1 também apresenta quatro meias-cistinas formando duas ligações

dissulfeto intracadeia no padrão $^{17}\text{Cys-Cys}^{20}$ e $^{65}\text{Cys-Cys}^{68}$ (CARNEIRO *et al.*, 2020). As lectinas MVN e CV-N apresentam similaridade de sequência, contendo a presença de quatro resíduos conservados de cisteína envolvidos em duas ligações dissulfeto intracadeia, sendo que MVN apresenta dois resíduos adicionais de cisteína em seu domínio C-terminal (BOYD *et al.*, 1997; KEHR *et al.*, 2006).

As LOA BPL-2 e BPL-3, descritas como monoméricas, possuem uma ligação dissulfeto intramolecular cada, fazendo com que estas lectinas formem uma estrutura mais compacta, o que resulta em maior mobilidade observada em gel SDS-PAGE em condições não redutoras (HAN *et al.*, 2011; 2012). Com um número mais elevado de cisteínas em sua sequência de aminoácidos estão a lectina CBA contendo sete resíduos de cisteína, todos envolvidos em ligações dissulfeto, tanto intracadeia como intercadeia na formação de um dímero (PRASEPTIANGGA; HIRAYAMA; HORI, 2012). A lectina SVN possui 10 cisteínas formando cinco ligações dissulfeto intracadeia, com padrão de ligação dissulfeto $\text{Cys}^{20}\text{-Cys}^{26}$, $\text{Cys}^{32}\text{-Cys}^{38}$, $\text{Cys}^{68}\text{-Cys}^{74}$, $\text{Cys}^{80}\text{-Cys}^{86}$ e $\text{Cys}^7\text{-Cys}^{55}$ (BOKESCH *et al.*, 2003).

As lectinas HCA e HML são responsáveis pelo maior número de resíduos de cisteínas em cadeias de aminoácidos das LOA, apresentando seis cisteínas conservadas em cada domínio podem formar três ligações intracadeia, e os resíduos únicos de cisteína dos domínios N-terminal (Cys^{46}) e C-terminal (Cys^{71}) podem formar uma ligação dissulfeto intersubunidade entre esses domínios. Ou seja, essas lectinas apresentam 14 cisteínas em seus monômeros (NAGANO *et al.*, 2005a).

1.3.2.1.5 Similaridades de sequências

Devido ao avanço lento da caracterização estrutural, um entrave significativo observado ao longo dos anos é a falta de sequências homólogas ou similares para as LOA em bancos de dados, no entanto, esse cenário parece estar mudando (XU *et al.*, 2023). Contando com pesquisas de bibliotecas de cDNA, atualmente a maioria das lectinas de algas apresentam alguma similaridade com outra lectina ou lectina-like desses organismos.

Muitas lectinas de algas vermelhas apresentam similaridade com a lectina de cianobactéria OAA, apresentando geralmente 4 domínios repetidos nas lectinas de macroalgas marinhas Sfl-1, Sfl-2, EDA-2, ESA-2, MEL, AML, KSL, KSA-1, KSA-2, KAA-1, KAA-2 (Figura 10), mas esse número pode variar em outros organismos.

Outro grupo que agrega um grande número de lectinas isoladas com homologia nas suas sequências por contar com a característica de possuir isoformas, é o composto por BTL,

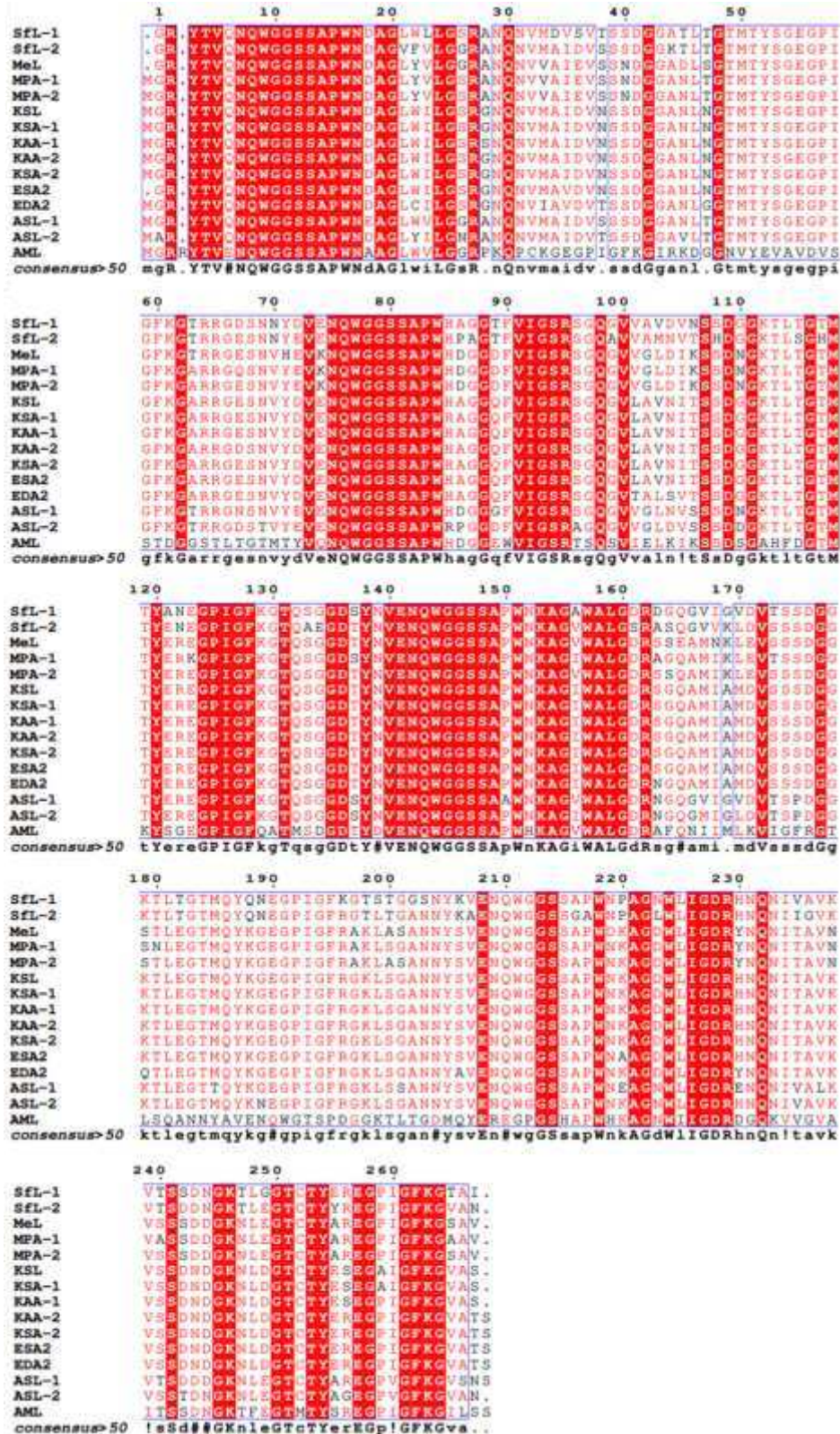
BSHV, BSL-2, BSL-3, BSL-4, HJA-1, HJA-2, HJA-3 (Figura 11).

As lectinas HCA e HML não apresentam similaridade significativa com outras lectinas do gênero *Hypnea*, no entanto, possuem alta homologia entre si (Figura 12).

A lectina GFL possui similaridade as proteínas putativas VIP36-Like de *Gracilariopsis chorda* (GenBank ID:PXF44184.1) e XP_005718310.1 de *Chondrus crispus* (NCBI ID:XP_005718310.1) (Figura 13).

A lectina BPL-2 não apresenta similaridade com nenhuma LOA isolada, contudo é possível observar homologias de sua sequência com as proteínas hipotéticas BCL-17 de *Bryopsis corticulans* (GenBank ID:BAX08603.1), BML-17 de *Bryopsis maxima* (GenBank ID:BAI94585.1) e outras do gênero *Bryopsis* sp. como BSKO_13835 (GenBank ID:GMH45872.1) (Figura 14).

Figura 10 – Alinhamento de LOA similares a OAA.



Fonte: Autor. SfL-1 (*Solieria filiformis lectin-1*); SfL-2 (*Solieria filiformis lectin-2*); MEL (*Meristiella echinocarpa lectin*); MPA-1 (*Meristotheca papulosa agglutinin -1*); MPA-2 (*Meristotheca papulosa agglutinin -2*); KSL (*Kappaphycus striatus lectin*); KSA-1 (*Kappaphycus striatum agglutinin-1*); KAA-1 (*Kappaphycus alvarezii agglutinin -1*); KAA-2 (*Kappaphycus alvarezii agglutinin -2*); KSA-2 (*Kappaphycus striatum agglutinin -2*); ESA-2 (*Eucheuma serra agglutinin-2*); EDA-2 (*Eucheuma denticulatum agglutinin-2*); ASL-1 (*Agardhiella subulata lectin-1*); ASL-2 (*Agardhiella subulata lectin-2*); AML (*Amansia multifida lectin*). Ponto na sequência é indicativo de intervalo de alinhamento. Os pontos acima da sequência marcam a cada dez aminoácidos.

Figura 11 – Alinhamento de LOA similares a BTL.

```

1      10      20      30      40      50      60
BSHV  ADPVCGSPGYSC TPAILLTPKSPGNFVPSGYSKIIVTGVGGSYPVYIHRPDGFVWAKASEG
BSL-2 ADPVCGSSGYSC TPAILLTPKSTGNFVSGYSKLIIVTGVGGSYPVYISRPDGFVWVKASEG
BSL-3 ADPVCGSSGYSC TPAILLTPKSPGNFVPSGYDKLIIVTGVGGSYPVYISRPDGFVWVKVSEG
BSL-4 ADPVCGSPGYSC TPAILLTPKSTGNFVSGYSKLIIVTGVGGSYPVYIHRPDGFVWVKVSEG
BTL   ADPVCGSSGYSC TPAILLTPKSPGSFVPSGYSKVIVTGVGGSYSVYIHRPDGFVWYKASEG
Hypnin-A1 FGP GCGPSTFSCTSPQKILP GSSVSVFPSGYRSIYLT TESGSASVYLD RPDGFVWVGADSK
Hypnin-A2 FGP GCGPSTFSCTSPQKILP GSSVSVFPSGYRSIYLT TESGSASVYLD RPDGFVWVGADSK
Hypnin-A3 FGP GCGPSTFSCTSPQKILP GSSVSVFPSGYRSIYLT TESGSASVYLD RPDGFVWVGADSK
consensus>50 adPvCGssg%SCTtPailltPkS.gnFpSGYskiiVTgvGGSypVYi.RpDG%wVgkaseg

```

```

70      80      90
BSHV  GCANF SVYSGGKSEVGVY GSSGTIVAVACK
BSL-2 GCANF GAYSGGKSEVGVY GSSGTIVAVACK
BSL-3 GCANF GAYSGGKSEVGVY GSSGTIVAVACK
BSL-4 GCANF GAYSGGKSEVGVY GSSGTIVAVACK
BTL   GCASF GSYSGGNSEVVKY GSGGTIVAVACK
Hypnin-A1 GCSNF GGFSGNGDSKVG NWGDV.PVAAWACN
Hypnin-A2 GCSNF GGFSGNGDSKVG NWGDV.PVAAWACN
Hypnin-A3 GCSNF GGFSGNGDSKVG NWGDV.PVAAWACN
consensus>50 GCAnFg.%sGgGdSeVGvyGssgt!vAvACK

```

Fonte: Autor. BSHV (Isoforma da lectina de *Bryothamnion seaforthii*); BSL-2 (*Bryothamnion seaforthii lectin-2*); BSL-3 (*Bryothamnion seaforthii lectin-3*); BSL-4 (*Bryothamnion seaforthii lectin-4*); BTL (*Bryothamnion triquetrum lectin*); Hypnin-A1 (*Hypnea japônica agglutinin-1*); Hypnin-A2 (*Hypnea japônica agglutinin-2*); Hypnin-A2 (*Hypnea japônica agglutinin-2*). Os pontos acima da sequência marcam a cada dez aminoácidos.

Figura 12 – Alinhamento de HCA e HML.

```

1      10      20      30      40      50      60
HCA   QKACTMDYFPVCCQIVIGGGAYTAGNPNCSQGFVASKGTCDNPPYPCPCTTEAQFPVCCITT
HML   QKFCTLDIAPVCCQIVIGGGMYTAGNACMC#EGFVSGVGRCE#NPKECPCTREAOIPSCSS
consensus>50 QKfCT$DifPVCCQIViGGGmYTAGNaCmC#GFVagvGrC#NPyeCPCTrEAQiPvCCss

```

```

70      80      90
HCA   QWGLVSA TGNACACGCMGGVPVSDGPCPEVY
HML   RWGLVSV TGKACACDCLGGTVAFPEPCPSPY
consensus>50 qWGLVSVtGnCACdC$GGvvvfdePCPevY

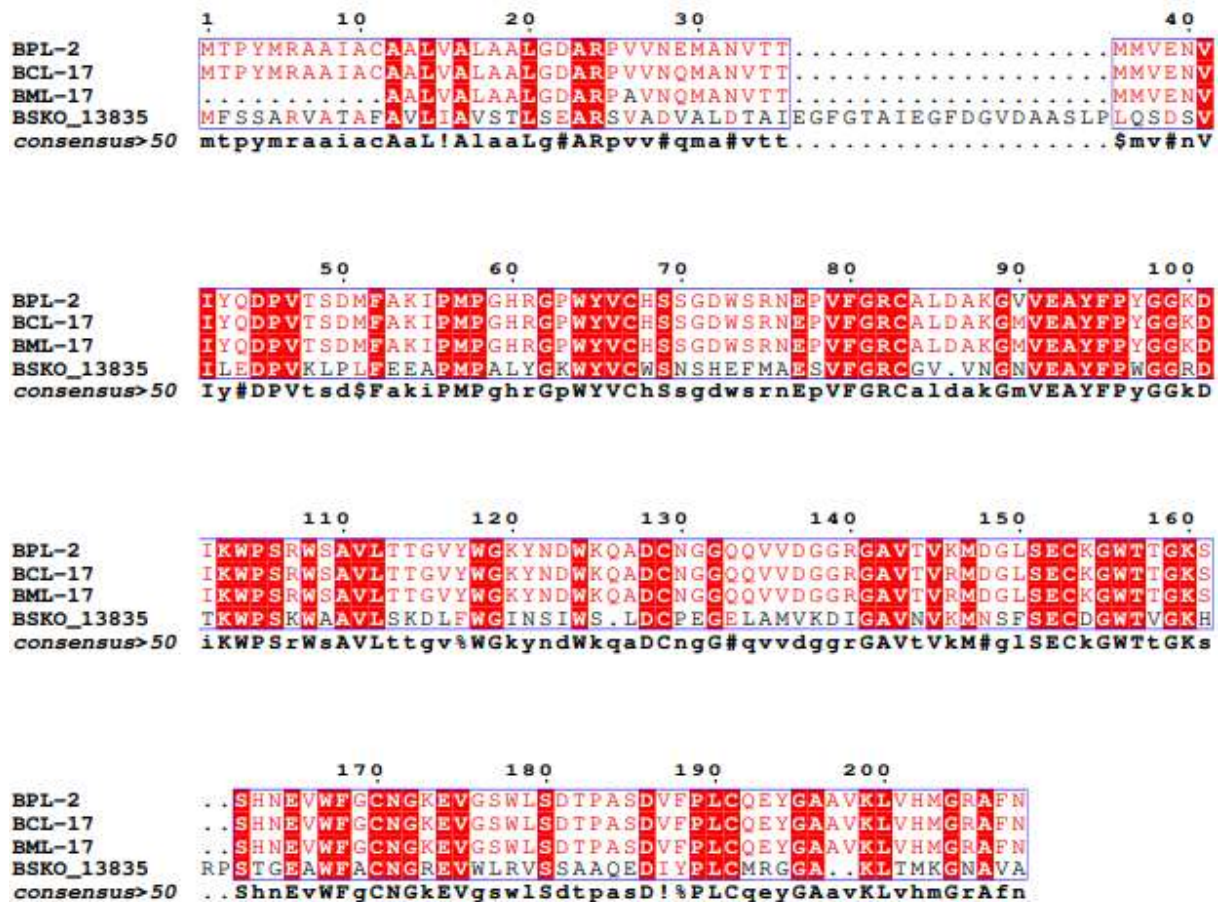
```

Fonte: Autor. HCA (*Hypnea cervicornis agglutinin*); HML (*Hypnea musciformis lectin*). Os pontos acima da sequência marcam a cada dez aminoácidos.

A lectina *Rhodobindin* tem as proteínas BWQ96_05261 de *Gracilariopsis chorda* (GenBank ID: PXF44961.1) e WP_027846017.1 da cianobactéria *Mastigocoleus testarum* (NCBI ID:WP_027846017.1) com similaridade de sequência (Figura 15).

As lectinas BPL-3 e BPL-4 possuem homologia entre si e também similaridade com as proteínas BSKO_05701 (GenBank ID:GMH37828.1) e BSKO_05691 (GenBank ID:GMH37818.1) de *Bryopsis* sp. assim como outras proteínas dessa biblioteca de genes (OCHIAI *et al.*, 2023) (Figura – 16).

Figura 14 – Alinhamento de sequências de proteínas algais similares a BPL-2.

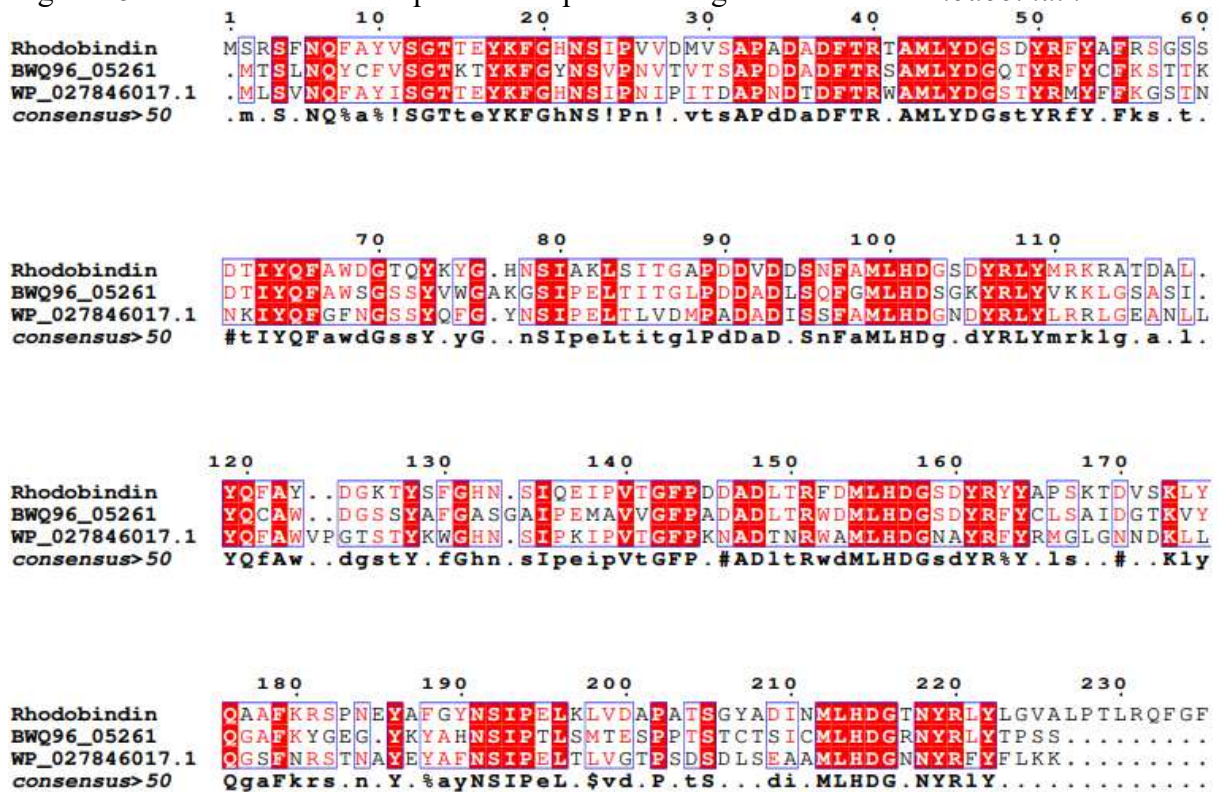


Fonte: Autor. BPL-2 (*Bryopsis plumosa lectin-2*); BCL-17 (Lectina-like *Bryopsis corticulans lectin*); BML-17 (Lectina-like *Bryopsis maxima lectin*); BSKO_13835 (Proteína hipotética de *Bryopsis* sp.). Ponto na sequência é indicativo de intervalo de alinhamento. Os pontos acima da sequência marcam a cada dez aminoácidos.

As LOA do gênero *Ulva* ULL e UPL1 também apresentam similaridade entre si (Figura 17). Assim como as proteínas CV-N, MVN, CV-A de *Amazonocrinis nigriterrae* (NCBI ID:WP_198125656.1) e outras proteínas relacionadas aos gêneros *Nostoc* e *Microcystis* (Figura 18).

Outras lectinas de algas azuis que pode ser agrupadas por homologia em suas estruturas primárias são a MVL com a Mf-aL de *Microcystis flos-aquae* (NCBI ID:WP_242034682.1) (Figura 19).

A lectina SVN apresenta similaridade com HK-02L de *Nostoc commune* (GenBank ID:BBD69056.1) (Figura 20). E por fim as últimas lectinas purificadas que apresenta similaridade de sequência com outras LOA são BHL e *Bryohealin*, além de homologia a lectina BML-54 de *Bryopsis maxima* (GenBank ID:BAI94586.1) e a proteína hipotética BSKO_06903 (GenBank ID:GMH39005.1) (Figura 21).

Figura 15 – Alinhamento de sequências de proteínas algais similares a *Rhodobindin*.

Fonte: Autor. Rhodobindin (Lectina de *Aglaothamnion callophyllidicola*; BWQ96_05261 (Proteína hipotética de *Gracilariopsis chorda*); WP_027846017.1 (Proteína hipotética de *Mastigocoleus testarum*). Ponto na sequência é indicativo de intervalo de alinhamento. Os pontos acima da sequência marcam a cada dez aminoácidos.

Das 41 lectinas algais com isolamento apenas 8 não apresentam similaridade significativa com outras lectinas ou proteínas de algas, no entanto, alguns mostram homologia a outros grupos de lectinas encontradas em outros organismos. A lectina BCA não mostrou similaridade significativa de sequência com outras lectinas ligantes de glicano do tipo *high* manose, como CV-N, OAA e ESA-2, mas surpreendentemente, possuía parcialmente o domínio de ligação a carboidratos de lectinas relacionadas a GNA de *Galanthus nivalis* (SATO *et al.*, 2011a).

A lectina GAL apresentou alguma similaridade a lectinas do tipo C geralmente relacionado a animais e GCL apresentou semelhanças com proteínas relacionadas com bactérias de domínio do tipo B (MASSI; AHMAD, 2012; WHANG *et al.*, 2020).

Figura 18 – Alinhamento de LOA similares a *Cyanovirin-N*.

```

                                  1   10   20   30
Microvirin      .....MPNFSSHTCSSINYPDPDSTIISAECAARDGEWL
Cyanovirin-N    .....MLGKFSQTCY..NSAIQGSVLTSTCERTNGG.YN
Cyanovirin-A    MKSVLKLGLAVLFTIVVSEFGLTNSALALGKFSQTCR..NSIQGSVLTSTCERAVGGVYN
consensus>50    .....$gkFSqTC...Ns.i#gs!LtstC#ra.gG.yn

                                  40   50   60   70   80   90
Microvirin      PTELRLSDDHIGNIDGELQFGDQNFQETCQDCRLEFGDGEQSVWLVCTCQTMGDGEWKSTQI
Cyanovirin-N    TSSIDLNSVIEENVDSLKWQPSNFIETCRNTQLA.GSSE...LAAECKTRAQQFVSTKI
Cyanovirin-A    TSSIDLNPVIEENVDSGLKWQPSNFIETCRNTKLA.GSSE...LAAECKTRAQQFVSTSI
consensus>50    tssidLn.vIeN!DG.LkwqpsNFiETCr#t.La.GsSE...LaaEckTraq#fvST.I

                                  100
Microvirin      LLSQIDNNSQLEIG
Cyanovirin-N    NLDDHIANIDGTLKYE
Cyanovirin-A    NLDDHIANIDGTLKYE
consensus>50    nLddhIaNiDgtLkYe

```

Fonte: Autor. Microvirin (Lectina de *Mycrocystis aeruginosa*); Cyanovirin-N (Lectina de *Nostoc ellipsosporum*); Cyanovirin-A (Proteína hipotética de *Amazonocrinis nigriterrae*). Ponto na sequência é indicativo de intervalo de alinhamento. Os pontos acima da sequência marcam a cada dez aminoácidos.

Figura 19 – Alinhamento de LOA similares a MVL.

```

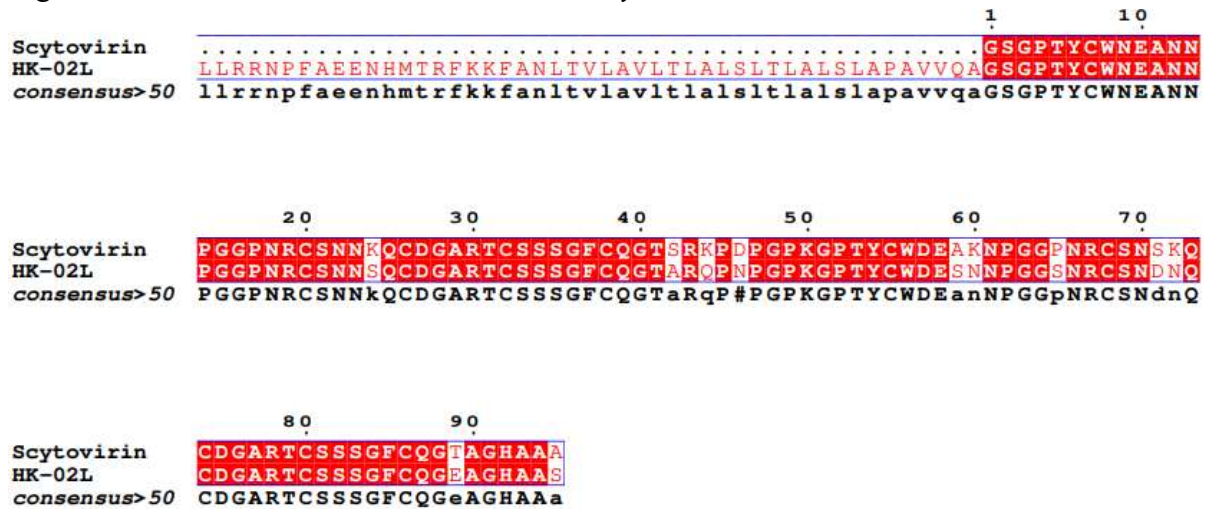
                                  1   10   20
MVL              .....MASYKVNIPAGPLWSNAEAQQVGPkI
Mf-aL            MLKALWLTQKIQKRIFDIVLRIQNQQKSQRTLSIMASYKVNIPAGPLWSNAEAQQVGPRI
consensus>50    mlkalwltqkiqkrifdivlriqnqqksqrtlsiMASYKVNIPAGPLWSNAEAQQVGPkI

                                  30   40   50   60   70   80
MVL              AAHQGNFTGQWTTVVESAMSVVEVELQVENTGIHEFKTDVLAGPLWSNDEAQLGPQIA
Mf-aL            AAHQGNFTGQWTTVVESAMSVVEVELQVENTGIHEFKTNVLAGPLWSNDEAQLGPQIA
consensus>50    AAHQGNFTGQWTTVVESAMSVVEVELQVENTGiHEFKT#VLAGPLWSNDEAQLGPQIA

                                  90   100  110
MVL              ASYGAEFTGQWR TIVEGVMSVIQIKYTF
Mf-aL            ASYGAEFTGQWQTIVEGVMSVIEIKYTF
consensus>50    ASYGAEFTGQWqTIVEGVMSVI#IKYTF

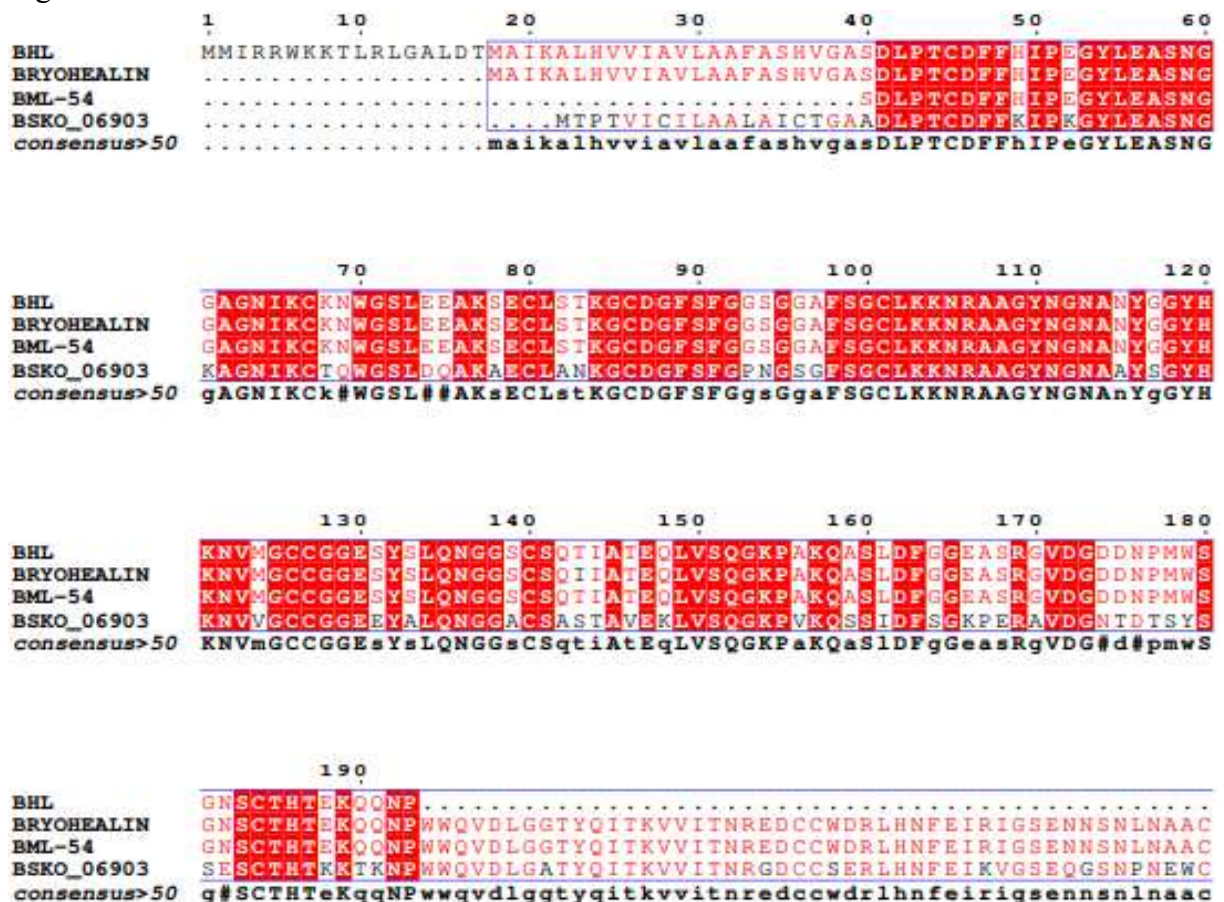
```

Fonte: Autor. MVL (Lectina de *Mycrocystis viridis*); Mf-aL (Lectina de *Microcystis flos-aquae*). Ponto na sequência é indicativo de intervalo de alinhamento. Os pontos acima da sequência marcam a cada dez aminoácidos.

Figura 20 – Alinhamento de LOA similares a *Scytovirin*.

Fonte: Autor. Scytovirin (Lectina de *Scytonema varium*); HK-02L (Lectina de *Nostoc commune*). Ponto na sequência é indicativo de intervalo de alinhamento. Os pontos acima da sequência marcam a cada dez aminoácidos.

Figura 21 – Alinhamento de LOA similares a BHL.



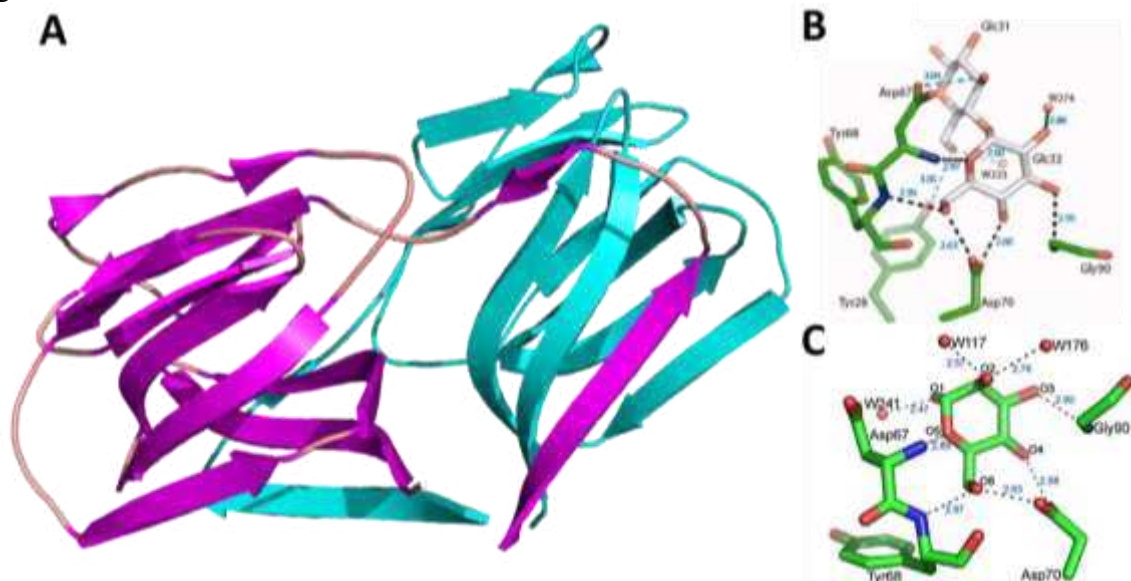
Fonte: Autor. BHL (*Bryopsis hypnoides lectin*); Bryohealin (*Bryopsis plumosa lectin*); BML-54 (Lectina-like de *Bryopsis máxima*); BSKO_06903 (Proteína hipotética de *Bryopsis* sp.). Ponto na sequência é indicativo de intervalo de alinhamento. Os pontos acima da sequência marcam a cada dez aminoácidos.

1.3.2.2 Estruturas tridimensionais

A caracterização tridimensional é essencial para se determinar com precisão as interações que ocorrem entre aminoácidos e seus ligantes. O primeiro estudo de cristalografia de raios X de LOA foi realizado com a HML (NAGANO *et al.* 2005b). Nas LOA, apenas duas lectinas de macroalgas e cinco de cianobactérias possuem estrutura tridimensional determinada.

A GRFT ou *Griffithsin* é a lectina da alga vermelha *Griffithsia* sp., foi uma das primeiras lectinas com especificidade por manose a ser isolada e caracterizada de algas marinhas e sem dúvidas é a mais importante e conhecida das lectinas de macroalgas quando se diz respeito a aplicabilidade biotecnológica, muito por causa de aspectos como alta especificidade e expressão (LEE, 2019; MORI *et al.*, 2005). A lectina teve sua estrutura determinada em complexo com seus ligantes mais específicos, como a manose, por difração de raios X com uma resolução de 0,94 Å (PDB ID:2GUD) (Figura 22).

Figura 22 – Estrutura determinada de GRFT.



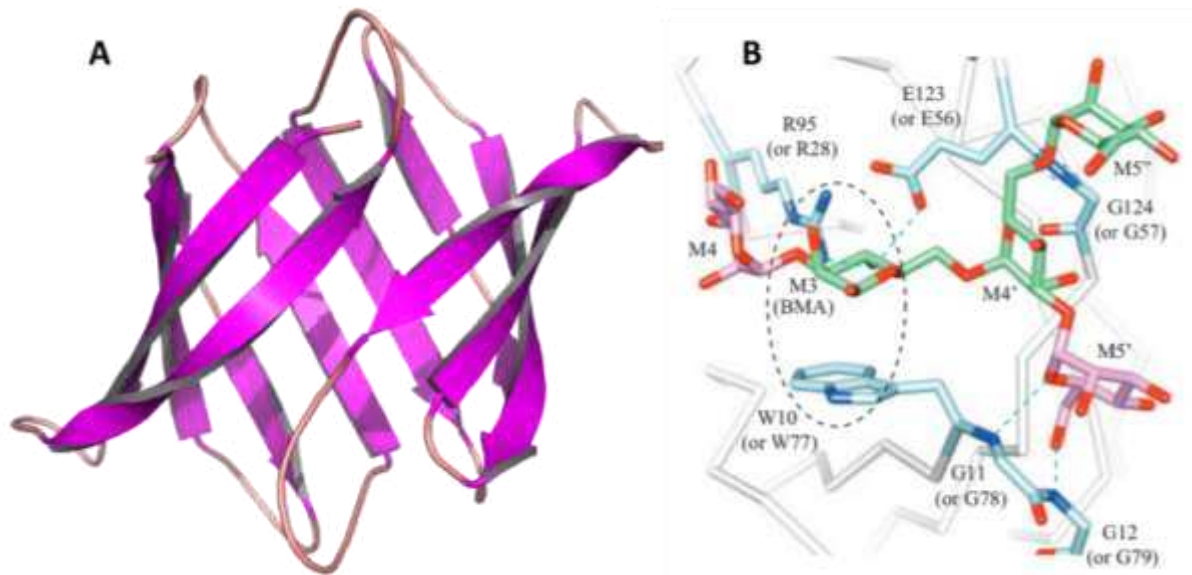
Fonte: Adaptado de ZIÓŁKOWSKA *et al.*, 2006. A – GRFT (primeira cadeia em magenta; segunda cadeia em ciano). B – Interação entre GRFT e maltose. C – Interações entre GRFT e Man3.

Sua cristalização revelou uma organização de β -prisma I semelhante àquela encontrada na lectina *jacalin* de *Artocarpus heterophyllus*, caracterizado como um dímero trocado de domínio porque duas fitas β de uma dos monômeros que formam o dímero exibem propriedades de troca de domínio com as duas fitas β correspondentes de sua contraparte, essa configuração é resultado do arranjo simétrico não covalente de dois domínios idênticos (ZIÓŁKOWSKA *et al.*, 2006). Contando com três sítios de ligação de carboidratos dispostos como um triângulo nas bordas de cada domínio β -prisma, ela se torna uma estrutura hexavalente

específica do Man com 6 locais disponíveis para contato (ZIÓŁKOWSKA *et al.*, 2007).

A lectina OAA possui um arcabouço que consiste em uma única cadeia polipeptídica formada por duas repetições de cinco fitas β , organizados em uma estrutura compacta de 10 fios em um β barril (Figura 23). Dois barris de β se associam perpendicularmente para construir a molécula completa. Este arcabouço estrutural foi obtido por sua cristalografia de raios X, (PDB ID:3OBL) (KOHARUDIN; GRONENBORN, 2011).

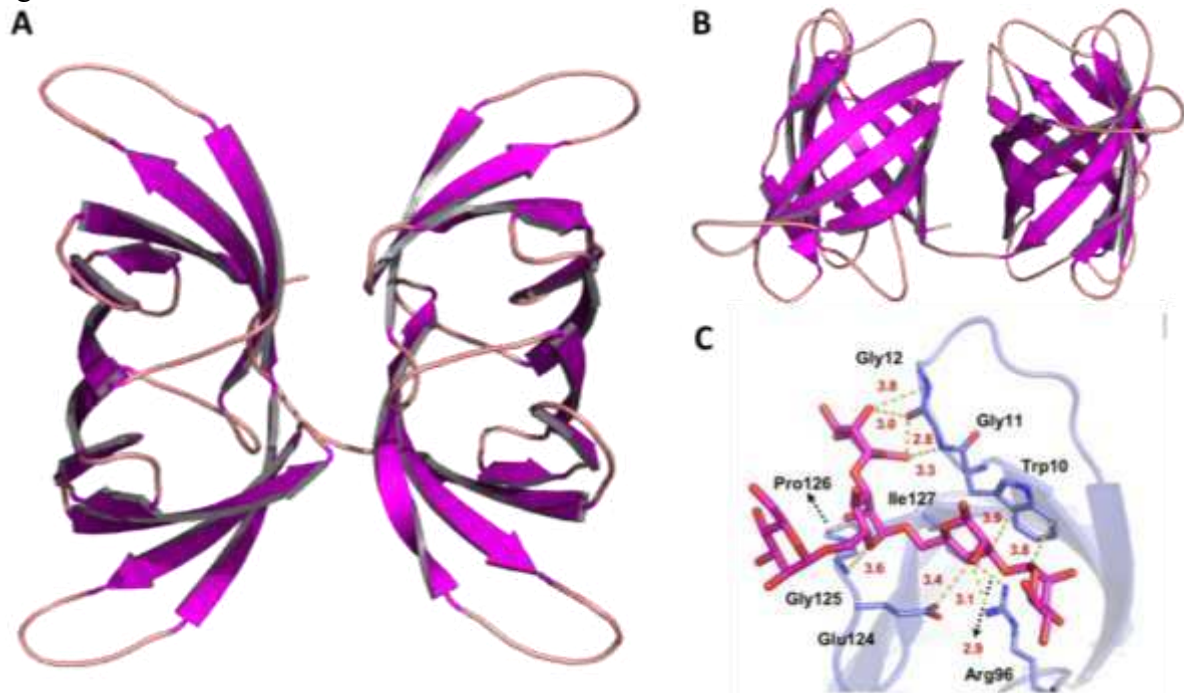
Figura 23 – Estrutura determinada de OAA.



Fonte: Adaptado de KOHARUDIN; GRONENBORN, 2011. A – OAA. B – Interação entre OAA e α 3,6-manopentose.

A lectina SfL recentemente teve sua estrutura tridimensional determinada pela cristalografia de raios X de sua forma recombinante (rSfL) com uma resolução de 1,88 Å (PDB ID:7UMJ). Essa é apenas a segunda lectina de macroalga com cristal resolvido, rSfL se agrupa em um domínio duplo tipo β barril conectado por uma estrutura peptídica com sete aminoácidos formando uma estrutura descrita como pseudodimérica (Figura 24). No interior da estrutura de β barril foram observadas interações de cadeias laterais, tanto alifáticas quanto aromáticas, que contribuem para estabilizar a estrutura ao formar um núcleo hidrofóbico, também foi possível observar troca de β -fios nos dois domínios de cada β barril ajudando na estabilidade da estrutura (CHAVES *et al.*, 2023).

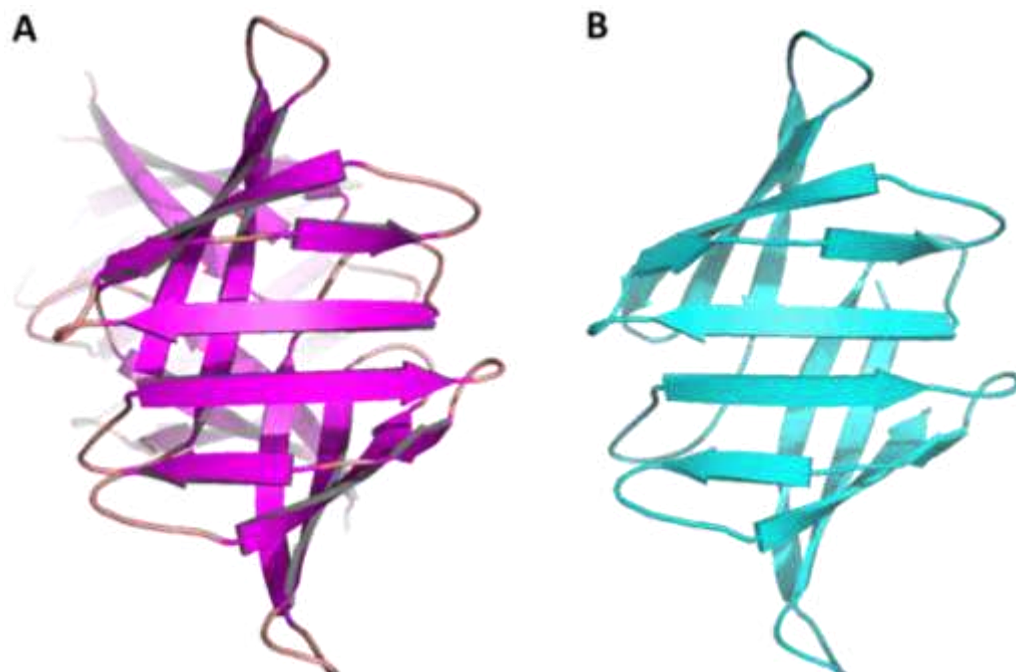
Figura 24 – Estrutura determinada de SfL.



Fonte: Adaptado de CHAVES *et al.*, 2023. A – SfL. B – Visualização dos β -barris da estrutura. C – Interação entre SfL e $\alpha 3, \alpha 6$ -manopentose.

A elucidação tridimensional também pode ser usada para averiguar a implicação das estruturas primárias na conformação espacial das proteínas, pode-se observar isso ao comparar uma das subunidades de SfL com a sua lectina homóloga OAA (Figura 25).

Figura 25 – Comparação da subunidade de SfL com a estrutura de OAA.



Fonte: Autor. A – Subunidade de SfL. B – Estrutura de OAA.

A lectina CV-N ou *Cyanovirin-N* apresenta vários trabalhos de elucidação de sua estrutura, tanto da estrutura isolada como em associação com seus principais ligantes, utilizando técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) e cristalografia, mostrando que a proteína existe como um monômero quase simétrico de dois domínios ou um dímero trocado por domínio, semelhante ao observado na lectina SfL (Figura 26) (BOTOS; WLODAWER, 2003).

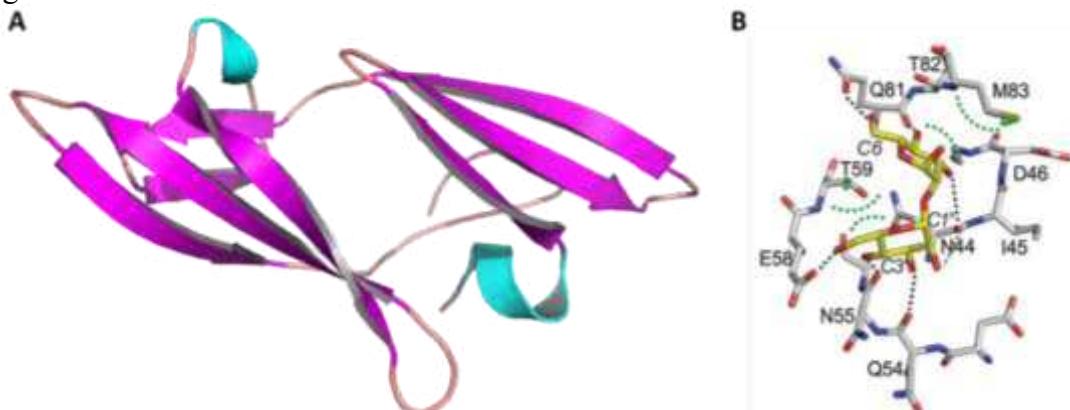
Figura 26 – Estrutura determinada de *Cyanovirin-N*.



Fonte: Autor. A – *Cyanovirin-N*. B – Interação entre *Cyanovirin-N* e Man2.

A lectina MVN teve sua estrutura resolvida por técnicas de RMN (PDB ID:2Y1S). A estrutura apresenta semelhança a CV-N, incluindo dois domínios homólogos cada um consistindo de uma folha β antiparalela de fita tripla e um β -grampo oposto (Figura 27). MVN é uma proteína globular e alongada, ~ 52 Å de comprimento e ~ 27 Å em seu ponto mais largo. Sua estrutura difere um pouco da CV-N, com o primeiro domínio sendo formado pelos resíduos 38–93 e sendo estabilizado por duas ligações dissulfeto entre Cys-63 e Cys-78 e Cys-60 e Cys-80, e o segundo domínio consiste nos resíduos 1–37 e 94–108, com uma ligação dissulfeto entre Cys-8 e Cys-24 (HUSKENS *et al.*, 2010).

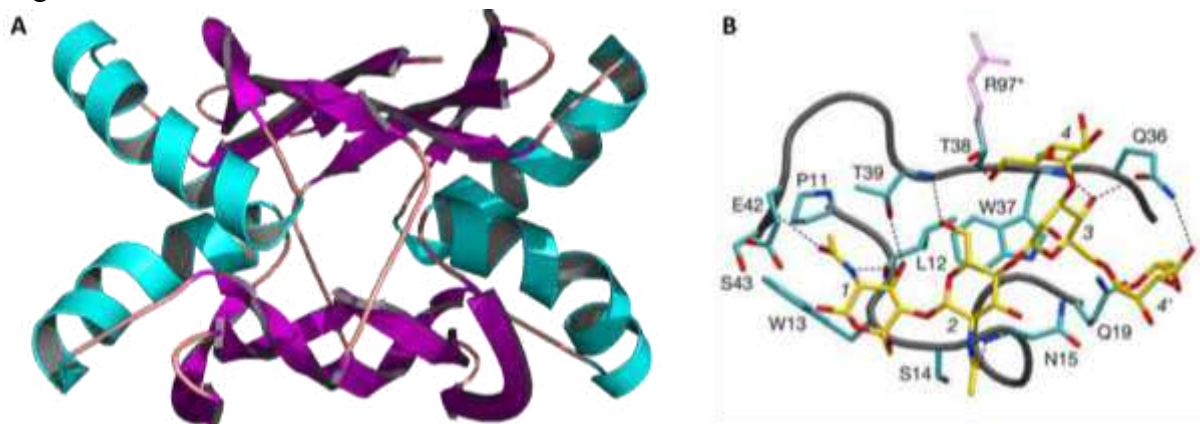
Figura 27 – Estrutura determinada de MVN.



Fonte: Adaptado de SHAHZAD-UL-HUSSAN *et al.*, 2011. A – MVN. B – Interação entre MVN e α -manobiose.

A proteína da MVL teve estrutura resolvida por cristalografia de raios X as suas estruturas cristalinas livre e ligada ao pentassacarídeo $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ com resolução de 1,9 Å (PDB ID:1ZHQ) e 1,8 Å (PDB ID:1ZHS), respectivamente. MVL é um homodímero estabilizado por uma extensa interface intermolecular entre monômeros (Figura 28). Essa lectina é um polipeptídeo de 13 kDa de 113 aminoácidos que contém dois domínios de 54 resíduos altamente homólogos com 50% de identidade de sequência entre eles, cada domínio contém uma folha β antiparalela de três fitas, com a única α -hélice (por domínio) localizada entre as fitas β . Há três protuberâncias nas β -fitas, entre os resíduos 34-35 (93-94), 40-41 (99-100) e 44-45 (103-104), distorcendo a torção normal da folha de β de tal forma que ela envolve a α -hélice e forma uma fenda na extremidade distal de cada domínio que constitui a bolsa de ligação de carboidratos (WILLIAMS *et al.*, 2005).

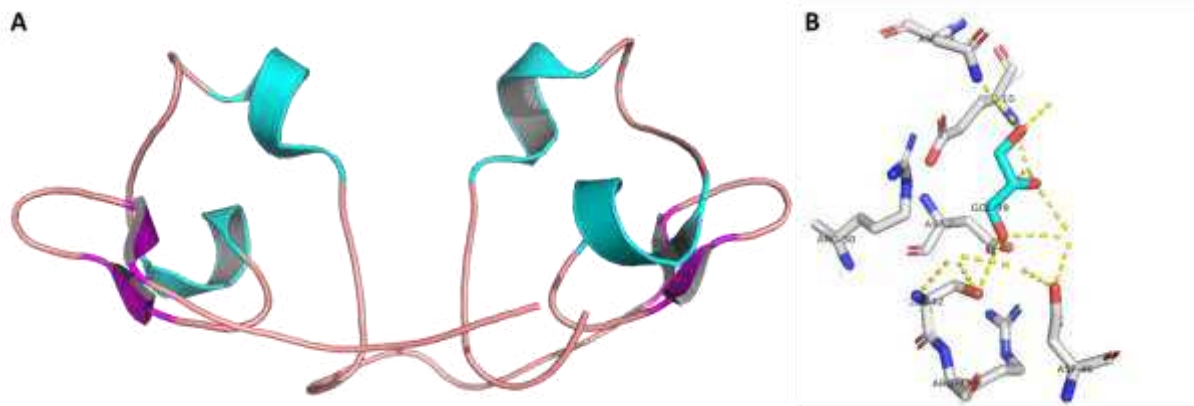
Figura 28 – Estrutura determinada de MVL.



Fonte: Adaptado de WILLIAMS *et al.*, 2005. A – MVL. B – Interação entre MVL e $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$.

As estruturas cristalinas da lectina antiviral silvestre e recombinante *Scytovirin* (SVN) foram resolvidas por difração anômala de comprimento de onda único e refinadas com dados estendendo-se para resolução de 1,3 Å (PDB ID:2QT4) e 1,0 Å (PDB ID:2QSK), respectivamente. A SVN ao contrário de outras lectinas com atividade antiviral, como *cyanovirin* ou GRFT, é estritamente monomérico, sem indicação de oligomerização sob quaisquer condições (Figura 29). No entanto, semelhante ao monômero da CV-N, a molécula de SVN é altamente simétrica com dois domínios (MOULAEI *et al.*, 2007).

Figura 29 – Estrutura determinada *Scytovirin*.

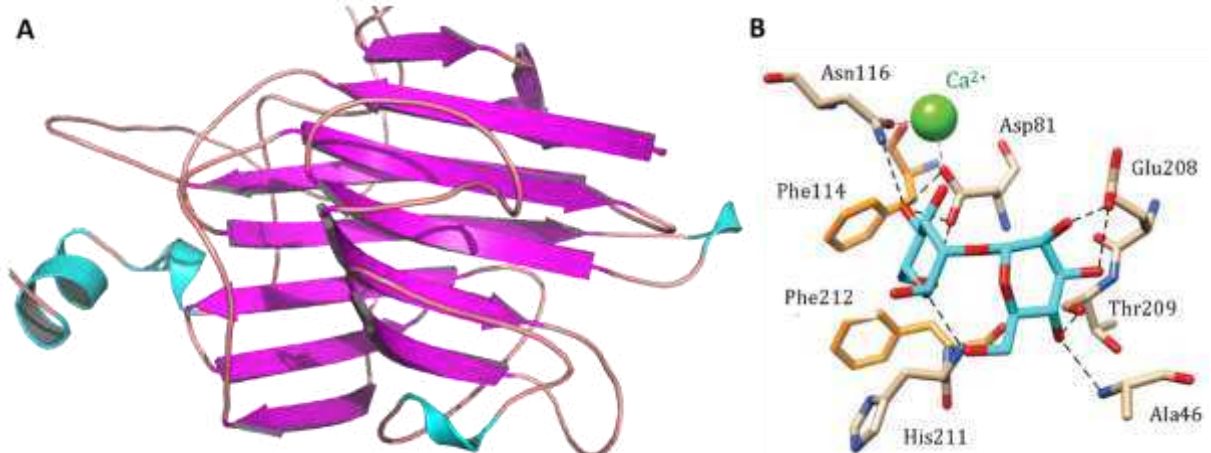


Fonte: Autor. A – *Scytovirin*. B – Interação entre *Scytovirin* e glicerol.

Além das estruturas determinadas, metodologias podem ser empregadas para a predição da estrutura tridimensional de proteínas, esses modelamentos podem apresentar alta qualidade e trazer diversas informações.

A estrutura predita da lectina GFL continha 36% de α -hélice, 17% de folha β , 7% de β -loop e 40% de *coil* randômica. A GFL foi composta por 21 folhas β distribuídas no DRC, as α -hélices foram distribuídas nos terminais N e C (Figura 30). A predição da estrutura mostrou um dobramento espacial da semelhante ao (PDB ID:2DUR). O DRC de GFL apresentou uma forma global globular composta por um β -sanduíche de duas folhas β antiparalelas. Os sítios de ligação de carboidratos estavam no topo da estrutura e um sítio de ligação de metal estava na superfície superior de uma fita de β , em estreita proximidade com os sítios de ligação de carboidratos (BARRE *et al.*, 2019; SUTTISRISUNG *et al.*, 2011).

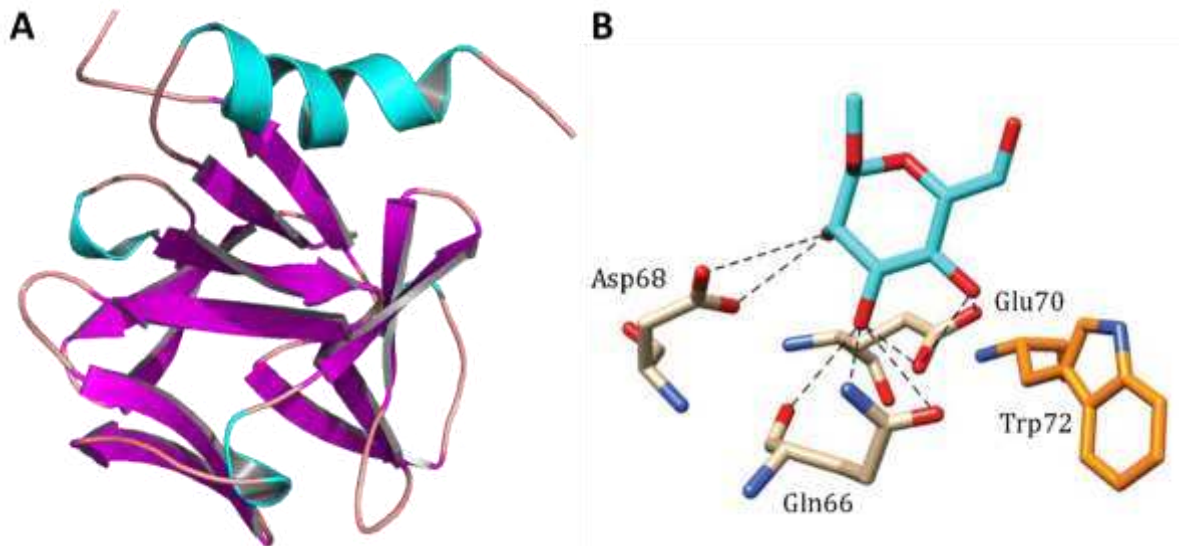
Figura 30 – Estrutura predita de GFL.



Fonte: Adaptado de BARRE *et al.*, 2019. A – Estrutura predita de GFL. B – Interação entre GFL e um dimanosídeo.

A lectina BCA possui o arcabouço β -prisma-II, também conhecido como arcabouço semelhante ao GNA, o que condiz com a homologia observada na estrutura primária, ele consiste de três feixes de quatro fios β dispostos em uma estrutura de β -prisma achatada em torno de um pseudoeixo central (Figura 31) (BARRE *et al.*, 2019). Um sítio de ligação de carboidratos ocorre em um sulco localizado no centro do feixe de fios β que forma cada folha β . As experiências de acoplamento realizadas *in silico* sugerem que ambas os sítios de ligação de BCA são totalmente ativos e acomodam prontamente um resíduo de manose (SATO *et al.*, 2011a).

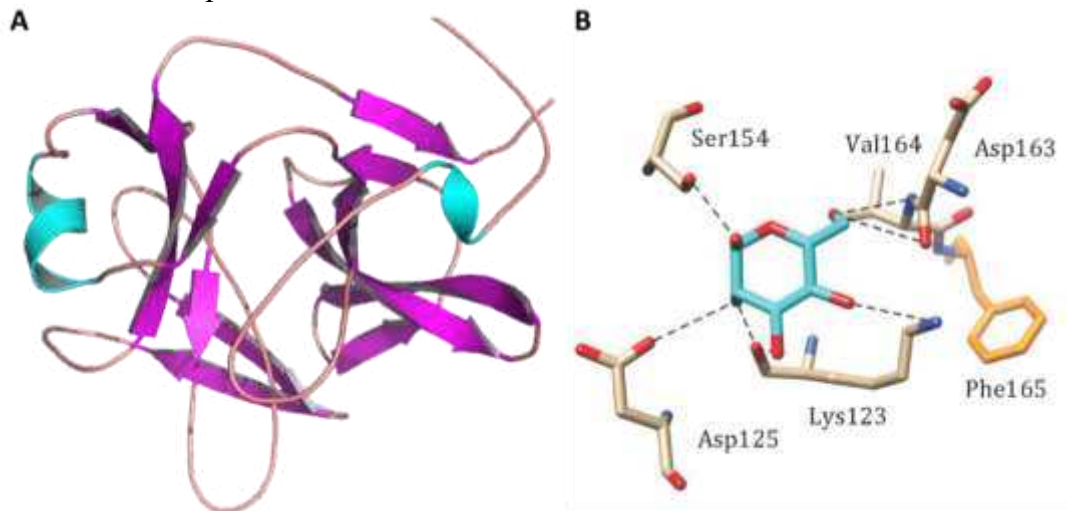
Figura 31 – Estrutura predita de BCA.



Fonte: Adaptado de BARRE *et al.*, 2019. A – Estrutura predita de BCA. B – Interação entre BCA e manose.

A lectina BPL-2 de *Bryopsis plumosa*, tem sido caracterizada como uma lectina manose-específica estruturalmente relacionada à MFP2 (GRANT *et al.*, 2005). A lectina é composta por três β -grampos que adotam uma disposição triangular para formar uma espécie de estrutura de β -trevo, em BPL-2 algo parecido com essa configuração pode ser observada (Figura 32). Todavia, é interessante salientar que essa lectina também apresenta homologias com outras lectinas algais (BARRE *et al.*, 2019). Em experimentos *in silico*, é sugerido a ocorrência de um único sítio de ligação a carboidratos ativo na lectina (HAN *et al.*, 2010).

Figura 32 – Estrutura predita de BPL-2.



Fonte: Adaptado de BARRE *et al.*, 2019. A – Estrutura predita de BPL-2. B – Interação entre BPL-2 e manose.

1.3.2.3 Classificações estruturais

Reunindo as informações sobre aspectos estruturais das LOA (Tabela 5) é possível complementar as principais características comuns a lectinas de algas que foram observadas na década de 90 (HORI; MIYAZAWA; ITO, 1990; ROGERS; HORI, 1993; SAMPAIO *et al.*, 1993).

Assim, pode-se dizer que lectinas de algas apresentam um conjunto de características diversas que as diferem de outros grupos de lectinas observadas em reinos diferentes, essas variações, tanto de caráter bioquímico, como estrutural, não permitem uma definição única para esse grupo, mas podendo ser descritas até o momento como:

Proteínas ou glicoproteínas com baixo teor de carboidrato, que apresentam baixa massa molecular, em geral não ultrapassando a massa de 30 kDa por unidade monomérica e possuindo em média de 150 a 250 aminoácidos em suas estruturas primárias, se apresentando geralmente na forma de monômeros compactos comumente com mais de um DRC com alta similaridade entre si e presença de ligações internas fortes, como pontes dissulfeto, características que conferem alta estabilidade frente a variações, por exemplo de temperatura e pH. Essas moléculas, em sua maioria não possuem peptídeo sinal e não necessitam de cátions divalentes para a manutenção de suas ligações a carboidratos, que por sua vez, podem ser tanto monossacarídeos como carboidratos ramificados, mas preferivelmente açúcares complexos, incluindo glicoconjugados, em especial *N*-glicanos do tipo *high* manose ou *N*-glicanos (α 1-6) fucosilados, podendo ser observado em sua preferência por eritrócitos de coelhos que são diversificadamente decorados com essas estruturas glicídicas.

Tabela 5 – Características estruturais de LOA (Continua).

Lectina	Massa (Da)	Nº de Aminoácidos	DRC	Peptídeo sinal	Teor de carboidrato	Estado oligomérico	Dependência de Íons	Arquitetura tridimensional	Referência
BCA	17.500	180	3	SIM	–	Monômero	–	β -prisma-II	SATO <i>et al.</i> , 2011a
BHL	27.000	296	1	SIM	N/A	Monômero	N/A	–	NIU <i>et al.</i> , 2009
Bryohelin	27.000	257	1	SIM	N/A	Homodímero	–	–	YOON <i>et al.</i> , 2008
BPL-2	17.300	208	1	SIM	–	Monômero	N/A	β -trevo	HAN <i>et al.</i> , 2010
BPL-3	11.500	134	1	SIM	N/A	Monômero	N/A	β -sanduíche	HAN <i>et al.</i> , 2011
BPL-4	12.900	137	2	SIM	N/A	Monômero	–	β -sanduíche	HAN <i>et al.</i> , 2012b
CBA	2X9.700	105	1	SIM	N/A	Homodímero	N/A	–	PRASEPTIANGGA; HIRAYAMA; HORI, 2012
CiL-1	12.000	112	2	NÃO	N/A	Monômero	N/A	–	CARNEIRO <i>et al.</i> , 2020
ULL	19.000	279	1	SIM	–	–	–	–	ISHIHARA; ARAI; SHIMADA, 2009
UPL-1	23.000	203	1	SIM	1,2%	Monômero	SIM	–	WANG <i>et al.</i> , 2004
MVN	14.000	108	2	NÃO	N/D	Monômero	–	β -barril	KEHR <i>et al.</i> , 2006
MAL	55.000	517	2	NÃO	7,8%	Monômero	–	–	JIMBO <i>et al.</i> , 2000
MVL	13.000	113	2	NÃO	–	Monômero	N/D	–	YAMAGUCHI <i>et al.</i> , 1999
CV-N	11.000	101	2	NÃO	–	Monômero	–	β -barril	BOTOS; WLODAWER, 2003

Tabela 5 – Características estruturais de LOA (Continuação).

Lectina	Massa (Da)	Nº de Aminoácidos	DRC	Peptídeo sinal	Teor de carboidrato	Estado oligomérico	Dependência de Íons	Arquitetura tridimensional	Referência
OAA	13.900	132	2	NÃO	N/A	Monômero	N/D	β -barril	SATO <i>et al.</i> , 2007
SVN	9.700	95	2	NÃO	S/N	Monômero	–	–	BOKESCH <i>et al.</i> , 2003
Rhodobindin	50.700	450	2	NÃO	N/A	Monômero	–	–	SHIM <i>et al.</i> , 2012
AOL-1	21.400	259	1	SIM	–	Monômero	–	–	HAN <i>et al.</i> , 2012a
AML	29.000	270	4	NÃO	2,9%	Monômero	–	β -barril	NEVES <i>et al.</i> , 2007
BSHV	9.000	91	1	NÃO	–	Monômero	–	–	MEDINA-RAMIREZ <i>et al.</i> , 2007
BSL-2	9.000	91	1	NÃO	–	Monômero	–	–	DO
BSL-3	9.000	91	1	NÃO	–	Monômero	–	–	NASCIMENTO-NETO <i>et al.</i> , 2012
BSL-4	9.000	91	1	NÃO	–	Monômero	–	–	
BTL	9.000	91	1	NÃO	N/A	Monômero	–	–	CALVETE <i>et al.</i> , 2000
EDA-2	28.000	269	4	NÃO	–	–	–	β -barril	HUNG <i>et al.</i> , 2015
ESA-2	28.000	268	4	NÃO	N/A	–	–	β -barril	HORI <i>et al.</i> , 2007
GAL	21.000	183	1	SIM	N/A	Monômero	–	–	MASSI; AHMAD, 2012
GFL	56.500	513	1	SIM	–	–	–	–	SUTTISRISUNG <i>et al.</i> , 2011

Tabela 5 – Características estruturais de LOA (Continuação).

Lectina	Massa (Da)	Nº de Aminoácidos	DRC	Peptídeo sinal	Teor de carboidrato	Estado oligomérico	Dependência de Íons	Arquitetura tridimensional	Referência
GCL	24.900	231	6	NÃO	N/A	Monômero	N/A		HWANG <i>et al.</i> , 2020
GRFT	2X13.000	121	2	NÃO	–	Dímero	–	β -prisma I	MORI <i>et al.</i> , 2005
HCA	9.200	90	2	NÃO	N/A	Monômero	N/A	–	NAGANO <i>et al.</i> , 2005a
HJA-1	9.100	90	1	NÃO	N/A	Monômero	N/A	–	HORI; MATSUBARA;
HJA-2	9.100	90	1	NÃO	N/A	Monômero	N/A	–	MIYASAWA, 2000
HJA-3	9.100	90	1	NÃO	N/A	Monômero	N/A	–	OKUYAMA <i>et al.</i> , 2009
HML	9.300	90	2	NÃO	N/A	Monômero	N/A	–	NAGANO <i>et al.</i> , 2005a
KAA-1	28.000	268	4	NÃO	–	Monômero	N/A	β -barril	HIRAYAMA <i>et al.</i> , 2016
KAA-2	28.100	269	4	NÃO	–	Monômero	N/A	β -barril	
KSA-1	27.800	268	4	NÃO	–	Monômero	N/A	β -barril	HIRAYAMA; LY; HORI, 2015; ;
KSA-2	28.000	269	4	NÃO	–	Monômero	N/A	β -barril	TRUNG; HUNG, 2016
KSL	27.800	267	4	NÃO	–	Monômero	N/A	β -barril	HUNG; TRINH, 2021
MEL	28.000	267	4	NÃO	2%	Monômero	N/A	β -barril	CHAVES <i>et al.</i> , 2018a

Tabela 5 – Características estruturais de LOA (Conclusão).

Lectina	Massa (Da)	Nº de Aminoácidos	DRC	Peptídeo sinal	Teor de carboidrato	Estado oligomérico	Dependência de Íons	Arquitetura tridimensional	Referência
SfL-1	27.500	267	4	NÃO	–	Monômero	N/A	β -barril	CHAVES <i>et al.</i> , 2018b
SfL-2	28.000	267	4	NÃO	–	Monômero	N/A	β -barril	

Fonte: Autor. N/A: Não apresenta.

Seus enovelamentos tridimensionais não segue um padrão comum, podendo ser divididas em diferentes famílias, mas geralmente apresentam riqueza em estruturas de folhas β .

E ao se agrupar essas lectinas por suas características estruturais é possível classificá-las pelas suas similaridades (Tabela 6):

O primeiro grupo é a família OAAH (*Oscillatoria agardhii agglutinin homologue*), uma família já bem estudada e definida com importantes propriedades antivirais, contra principalmente o vírus HIV (KOHARUDIN *et al.*, 2012; SATO *et al.*, 2020).

O segundo grupo é composto por lectinas que apresentam o segundo maior número de membros considerando as isoformas, denominado aqui como BTLH (*Bryothamnion triquetrum lectin homologue*). O terceiro grupo concentra lectinas similares com o grupo anterior, mas com singularidades, nomeado de Hycistinas (Hyp- em analogia ao gênero: *Hypnea*; cist – pela riqueza de cisteínas por domínio na lectina).

Um quarto grupo é formado pela lectina isolada BPL-2 e outras proteínas putativas de algas, chamada aqui de Bryoptinas em alusão ao gênero até aqui único de concentração das lectinas e proteínas similares. Bryohealinas seria o conjunto de lectinas homologas a *Bryohealin*. Assim como o grupo das Rhodobindinas é formado pelas proteínas homologas a *Rhobindin*.

O último grupo exclusivo de lectinas de algas foi chamado de Ulvinas, pois todos os membros pertencem ao gênero de algas verdes *Ulva*.

As LOA ainda possuem membros ligados as famílias das lectinas do Tipo-L, Tipo-H, e as conhecidos domínios ligados a lectinas de algas azuis CVNH, MVLH e SVNH.

1.3.3 Atividades biológicas

Toda caracterização estrutural é fundamental para o entendimento dos mecanismos de atuação das lectinas algais, principalmente devida ao número elevado de aplicabilidades que essas moléculas vêm demonstrando (Tabela 7). De fato, uma vez que o potencial para uma determinada atividade biológica é determinado em uma lectina o caminho para a elucidação dos processos envolvidos é o estudo de suas estruturas, pois essas informações são essenciais para potencializar suas capacidades de agente terapêutico, profilático ou outra qualquer, fazendo o correto direcionamento da atuação da proteína nas interações entre moléculas biológicas e células, baseadas nas suas estruturas glicídicas específicas.

Tabela 6 – Famílias de lectinas oriundas de algas (Continua).






Família	Membros	Características comuns	Arquitetura tridimensional
OAAH	OAA / SfL-1 / SfL-2 EDA-2 / ESA-2 / MeL AML / MPA-1 / MPA-2 KSL / KSA-1 / KSA-2 KAA-1 / KAA-2 / ASL-1 ASL-2	$\cong 270$ aminoácidos / $\cong 28$ kDa / monômero / 4 domínios repetidos Ligação a <i>N</i> -glicanos <i>high</i> manose / ausência de pep. Sinal / não dependente de íons divalentes / presença de isoformas / Ausência de cisteínas /	 PDB ID:7UMJ
BTLH	BTL / BSHV / BSL-2 BSL-3 / BSL-4 / HJA-1 HJA-2 / HJA-3	$\cong 90$ aminoácidos / $\cong 9$ kDa / monômero / domínio único / Ligação a <i>N</i> -glicanos (α 1-6) fucosilados / ausência de pep. Sinal / presença de isoformas / não dependente de íons divalentes / 2 pontes dissulfeto intracadeia / tendência a oligomerização /	 UniProt ID: P85888
Hypcistinas	HCA / HML	$\cong 90$ aminoácidos / $\cong 9$ kDa / monômero / 2 domínios repetidos / 14 cisteínas envolvidas em 3 pontes dissulfeto por domínio /	 UniProt ID:P84870
Bryoptinas	BPL-2 / BCL-17 BML-17 / BSKO_13835	$\cong 200$ aminoácidos / $\cong 17$ kDa / monômero / presença de pep. Sinal domínio único / ligação a monossacarídeos e fetuína / 6 cisteínas /	 UniProt ID:C9K135
Bryohealinas	BHL / <i>Bryohealin</i> BML-54 / BSKO_06903	$\cong 280$ aminoácidos / $\cong 27$ kDa / dímero / presença de pep. Sinal domínio único / ligação a GalNAc/ GlcNAc /	 UniProt ID:B2L2K0

Tabela 6 – Famílias de lectinas oriundas de algas (Continuação).







Família	Membros	Características comuns	Arquitetura tridimensional
Tipo-L	GFL VIP36 AAM93989.1	\cong 500 aminoácidos / \cong 56 kDa / presença de pep. Sinal / domínio único /	 UniProt ID:E3SER7
Rhodobindinas	<i>Rhodobindin</i> PXF41178.1 WP_027846017.1	\cong 225 aminoácidos por domínio / \cong 25 kDa por domínio / especificidade a Fetuina e Asialofetuina /	N/A
Tipo-H	BPL-3 / BSKO_05701 BPL-4 / BSKO_05691	\cong 120 aminoácidos / \cong 12 kDa / monômero / presença de pep. Sinal domínio único / ligação a GalNAc/ galactosídeo / uma ponte dissulfeto intracadeia /	 UniProt ID: A0A1J0CRG2
Ulvinas	ULL / UPL1	\cong 240 aminoácidos / \cong 20 kDa / monômero / presença de pep. Sinal domínio único / dependência de íons divalentes / ligação a GlcNAc/Fuc e glicoproteínas / podem ser glicoproteínas /	 UniProt ID: B9A6I7
CVNH	CV-N MVN CV-A	\cong 100 aminoácidos / \cong 12 kDa / monômero / ausência de pep. Sinal / 2 domínios repetidos /	 PDB ID:1IIY

Tabela 6 – Famílias de lectinas oriundas de algas (Conclusão).

Família	Membros	Características comuns	Arquitetura tridimensional
MVLH	MVL / Mf-aL	≈ 110 aminoácidos / ≈ 13 kDa / monômero / ausência de pep. Sinal / 2 domínios repetidos /	 <p data-bbox="1823 523 1989 552">PDB ID:1ZHQ</p>
SVNH	SVN / HK-02L	≈ 95 aminoácidos / ≈ 10 kDa / monômero / ausência de pep. Sinal / 2 domínios repetidos /	 <p data-bbox="1823 703 1989 730">PDB ID:2QT4</p>

Fonte: Autor. N/A: Não apresenta.

Tabela 7 – Atividades biológicas de LOA (Continua).

Atividade	Lectina	Referência
Antiviral	MVL	BEWLEY <i>et al.</i> , 2004
	CV-N	BARRIENTOS <i>et al.</i> , 2003; BOYD <i>et al.</i> , 1997; O'KEEFE <i>et al.</i> , 2003; NAIDOO <i>et al.</i> , 2003
	OAA	SATO; OKUYAMA; HORI, 2007
	SVN	ALEXANDRE <i>et al.</i> , 2010; ARMARIO-NAJERA <i>et al.</i> , 2022
	GRFT	ALEXANDRE <i>et al.</i> , 2010
	BCA	SATO <i>et al.</i> , 2011a
	KSA	SATO; HORI, 2011
	KAA-1	HIRAYAMA <i>et al.</i> , 2016
	KAA-2	SATO <i>et al.</i> , 2011b
	ESA-2	SATO <i>et al.</i> , 2015
Aglutinação de organelas celulares	<i>Lyngabyal</i>	EL-FAKHARANY <i>et al.</i> , 2020
	BHL	NIU <i>et al.</i> , 2009
Pró-cicatrizante	<i>Bryohealin</i>	JUNG <i>et al.</i> , 2010
	BSL	NASCIMENTO-NETO <i>et al.</i> , 2012
	SfL	CHAVES <i>et al.</i> , 2023
Antibacteriana	ESA	LIAO <i>et al.</i> , 2003;
	PcL	SILVA <i>et al.</i> , 2010;
	SfL	HOLANDA <i>et al.</i> , 2005
	EDA	HUNG <i>et al.</i> , 2015
	HML	VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2014
	BSL	
Antinociceptiva	KSA-2	HIRAYAMA <i>et al.</i> , 2015
	SfL	ABREU <i>et al.</i> , 2016
	PcL	SILVA <i>et al.</i> , 2010;
	AML	NEVES <i>et al.</i> , 2007;
	CcL	VANDERLEI <i>et al.</i> , 2010
	HCA	BITENCOURT <i>et al.</i> , 2008; FIGUEIREDO <i>et al.</i> , 2010
	BSL	VIANA <i>et al.</i> , 2002
Anti-inflamatória	BTL	VANDERLEI <i>et al.</i> , 2010; MONTEIRO
	CcL	
	HCA	BITENCOURT <i>et al.</i> , 2008
	SfL	ABREU <i>et al.</i> , 2016
	PcL	ABREU <i>et al.</i> , 2012
	BTL	FONTENELLE <i>et al.</i> , 2018
Inseticida	AML	MESQUITA <i>et al.</i> , 2021
	GOL	LEITE <i>et al.</i> , 2005
Mitogênica para linfócitos	GCL	LIMA <i>et al.</i> , 2005
	ESA	KAWAKUBO <i>et al.</i> , 1997
	<i>Carnin</i> <i>Granin-BP</i>	HORI <i>et al.</i> , 1987 OKAMOTO <i>et al.</i> , 1990

Tabela 7 – Atividades biológicas de LOA (Conclusão).

Atividade	Lectina	Referência
Anticâncer / Marcador de células cancerígenas	ESA	SUGAHARA <i>et al.</i> , 2001; HAYASHI <i>et al.</i> , 2012; OMOKAWA <i>et al.</i> , 2010
	SfL	CHAVES <i>et al.</i> , 2018b
	ATA	SHIOMI; KAMIYA; SHIMIZU, 1979
	BSL	CONRADO <i>et al.</i> , 2012
	<i>Lyngabyal</i>	EL-FAKHARANY <i>et al.</i> , 2020
Indução da migração de neutrófilos	BPL-2	LEE <i>et al.</i> , 2022
	AML	NEVES <i>et al.</i> , 2001
	BSL	
	BTL	
GC		
Anti-biofilme	HML	VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2014
	BSL	TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2007
	BTL	CARNEIRO <i>et al.</i> , 2020
	CiL-1	
	CiL-2	
SfL	CHAVES <i>et al.</i> , 2023	
Diferenciação de células de câncer	BSL	PINTO <i>et al.</i> , 2009
	BTL	
Relaxante vascular	BTL	LIMA <i>et al.</i> , 2004
Antioxidante	HfL	WU <i>et al.</i> , 2016
	BSL	DE ALENCAR ALVES <i>et al.</i> , 2020
Regeneração de protoplastos	BHL	NIU <i>et al.</i> , 2009
Inibição de agregação plaquetária	HJA	MATSUBARA; SUMI; HORI, 1996
Síntese de citocinas	TCL	MOLCHANOVA <i>et al.</i> , 2010
Anti-hiperglicêmica	BSL	DE ALENCAR ALVES <i>et al.</i> , 2020
Antidepressiva	SfL	ABREU <i>et al.</i> , 2018; ABREU <i>et al.</i> , 2022
Antifúngica	GRFT	NABETA <i>et al.</i> , 2021

Fonte: Autor.

Como já evidenciado, glicanos diversos, desde estruturas simples e principalmente glicoconjugados, são riquíssimamente encontrados em células, micro-organismos e tecidos epiteliais funcionando como receptores para transmitir informações intercelulares. A grande importância dessa função está porque, de forma geral, esse é o mecanismo básico tanto de processos essenciais nos organismos-vivos, como da entrada ou replicação de células infecciosas, seja de agentes invasores ou o próprio crescimento descontrolado como ocorre na neoplasia maligna (GUO *et al.*, 2021; HATAKEYAMA; UNNO, 2023; KONOZY; OSMAN, 2022).

As LOA se destacam por apresentar diversas atividades (Tabela 7), uma das mais evidenciadas é o potencial antiviral, por exemplo, nas lectinas da família OAAH graças a suas características estruturais de β -barril e topologia de sítios de ligação a específica a glicanos

decorados com manose $\alpha(1-6)$, que são diversamente distribuídos em membranas de vírus (ALVAREZ; FÉLIX; LEMOS, 2023; BARRE *et al.*, 2019). Outra lectina que possui enorme potencial biotecnológico contra vírus é a GRFT que possui atividade inibitória contra uma ampla variedade desses micro-organismos, como HIV (*Human immunodeficiency virus*) e SARS-CoV-2, já estando em ensaios clínicos como agente profilático contra ambos os vírus (BAINS *et al.*, 2023; BRAND, 2023; GUAN *et al.*, 2023; NABETA *et al.*, 2023).

Outra atividade muito importante observadas nessas lectinas é ação sobre células cancerígenas, muitas lectinas de algas vermelhas e azuis, apresentam capacidade de serem estratégias terapêuticas menos evasivas e tóxicas, e também mais barata para o tratamento desse conjunto de doenças (DE ARRUDA *et al.*, 2023). Além de poderem identificar e se ligar a polímeros de glicanos de superfície de vírus ou glicosilações de processos de metástase essas proteínas reconhecem muitas estruturas da parede celular de bactérias, além de outras glicídios internos a célula (CHO; PARK; KIM, 2022).

A capacidade de funcionar como agente antibacteriano já foi observado em várias LOA (HIRAYAMA *et al.*, 2015; HUNG *et al.*, 2015; VASCONCELOS *et al.*, 2014). Contudo, a produção de novos fármacos, como um microbicida, pode demorar muito tempo em testes até ser aprovado, além dos custos e da capacidade de bactérias tem de sofrer mutações que lhes conferem resistência (GUPTA *et al.*, 2021; SILVA; ARAÚJO, 2021).

Essas questões fazem nascer a necessidade de novas estratégias para utilizar a capacidade das lectinas contra esses micro-organismos. Uma dessas novos pensamentos é de potencializar a ação de medicamentos que combatem as infecções causadas por essas bactérias, com a associação dessas moléculas (DE ASSIS DUARTE *et al.*, 2023). A lectina GAL de *Gelidium amansii* foi até então a única lectina de alga testada que apresentou possuir tal potencial em associação com streptomina contra *Mycobacterium tuberculosis* (MASSI; AHMAD, 2012). Dessa forma, a utilização de novas LOA para esse fim é fundamental, a fim de descobrir novas moléculas com essa capacidade.

1.3.4 *Codium isthmocladum* Lectin – 2 (CiL-2)

A lectina CiL-2 de *Codium isthmocladum* é uma proteína inibida por GalNAc e mucina de estômago suíno, apresentando massa molecular de $12,264 \pm 5$ Da e demonstrando possuir pontes dissulfeto intracadeia, e ainda, foi classificada como uma lectina cálcio-dependente e aparenta possuir oligomerização de três ou seis subunidades (CARNEIRO *et al.*, 2020). Além da purificação, já foi determinado que a lectina conta com potencial biotecnológico

contra bactérias.

Em 2020, CiL-2 se mostrou capaz inibir o desenvolvimento de biofilme estafilocócico, principalmente de *Staphylococcus aureus*, apesar de não apresentar atividade antibacteriana sobre bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas (CARNEIRO *et al.*, 2020). Anterior a isso, a lectina (referida como CiL-1) já tinha mostrado possuir capacidade aglutinante sobre *S. aureus*, mas não foi tóxica contra o microcrustáceo *Artemia* sp. provavelmente pelo não reconhecimento de glicoproteínas presentes no seu trato digestório (SILVA, 2013). E em 2016, a lectina já demonstrava potencial antibiofilme bacteriano (SABOYA, 2016).

Em relação a características estruturais além da massa, CiL-2 teve estudos de elucidação de seu N-terminal e proporção das estruturas de sua forma secundária, mas sua sequência de aminoácidos completa ou pistas da sua conformação tridimensional não foram obtidas (CARNEIRO *et al.*, 2020). Dessa forma, existe uma lacuna de informações estruturais que podem ser melhor investigados em prol de se entender os mecanismos envolvidos nas possíveis atividades dessa lectina, como por exemplo, sua atuação contra bactérias como *S. aureus*, que anteriormente demonstrou possuir.

Inúmeras ferramentas de bioinformática estrutural estão hoje disponíveis e podem ser utilizadas para melhorar a caracterização dessas lectinas e ajudar a traçar relações entre as características estruturais já observadas nas LOA e suas notáveis aplicações biotecnológicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar estruturalmente a lectina CiL-2 presente na alga marinha *Codium isthmocladum* e avaliar seus efeitos sinérgicos em combinação com antibióticos.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a estrutura primária da lectina através de espectrometria de massas (MS/MS).
- Construir um modelo da estrutura tridimensional da proteína por meio de modelagem estrutural com base na estrutura primária determinada.
- Analisar a estrutura da proteína por meio de ferramentas de bioinformática.
- Observar o domínio de reconhecimento a carboidratos da lectina e a interação proteína-ligante.
- Avaliar os efeitos sinérgicos da lectina em combinação com antibióticos para diferentes cepas bacterianas patogênicas.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Material biológico

3.1.1 Coleção de algas

Espécimes da alga marinha *Codium isthmocladum* foram coletados durante as marés baixas de sizígia na praia de Paracuru, Ceará, Brasil. As algas foram transportadas em recipientes plásticos para o laboratório onde foram limpos de epífitas e congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até posterior uso.

Todas as coletas e acesso ao patrimônio genético de organismos marinhos foram autorizados e regulados pelos órgãos ambientais competentes através de registros no SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade, ID: 33913-11) e SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado, ID: AC14AF9).

3.1.2 Ensaio de hemaglutinação

Os ensaios de atividade hemaglutinante foram realizados utilizando eritrócitos de coelho, mantidos no Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, com coleta autorizada pelo certificado CEUAP 2211202101. Os testes foram realizados seguindo o método da dupla diluição seriada, em placas de microtitulação de fundo em V, segundo a metodologia padrão (SAMPAIO *et al.*, 2002).

3.2 Isolamento da lectina

A lectina presente na alga marinha *Codium isthmocladum* (CiL-2) foi obtida seguindo o protocolo previamente estabelecido (CARNEIRO *et al.*, 2020).

Os exemplares foram cortados e homogeneizados com três volumes de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5, contendo NaCl 1 M (TB de extração) sob agitação por 16 h. O extrato foi filtrado em tecido de nylon, em seguida foi centrifugado a $8000\times g$ por 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o sobrenadante, contendo atividade hemaglutinante, foi denominado extrato bruto.

O extrato bruto foi submetido inicialmente a uma precipitação com sulfato de amônio a 40% de saturação e após 4 h à temperatura ambiente, as proteínas precipitadas

peletizadas por centrifugação foram descartadas. O sobrenadante foi saturado com 100% de sulfato de amônio, deixado em repouso por 4 h e depois centrifugado. Proteínas precipitadas (F40-100) foram solubilizadas em pequeno volume de tampão fosfato 20 mM, pH 7 (PB).

A amostra foi dialisada contra PB, centrifugada, e seguiu para cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sephacel previamente equilibrada com PB. A coluna foi lavada com o mesmo tampão e as frações retidas foram eluídas com PB contendo 400 mM de NaCl, onde as frações foram monitoradas por medição de absorbância a 280 nm e através da determinação da atividade hemaglutinante.

A fração eluída 0,4-DEAE foi dialisada, liofilizada e solubilizada em pequeno volume de Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, contendo NaCl 150 mM e CaCl₂ 5 mM (TBS). Esta amostra foi centrifugada e carregada em coluna BioSuite 250 HR SEC (0,78 × 30 cm, tamanho de partícula de 5 µm, Waters Corp, EUA) acoplada a um sistema Acquity UPLC (Waters Corp), previamente equilibrado com TBS. As frações contendo atividade hemaglutinante representando a lectina isolada (CiL-2) foram agrupadas, dialisadas, liofilizadas e armazenadas a - 20 °C para uso posterior.

3.2.1 Avaliação da pureza da lectina

O grau de pureza da proteína alvo foi avaliado nas diferentes etapas de isolamento através de eletroforese em gel de poliacrilamida de 15% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), corado com *Coomassie Brilliant Blue*, com e sem redução da amostra com β-mercaptoetanol a 100 °C durante 5 minutos (LAEMMLI, 1970).

3.3 Determinação da estrutura primária

3.3.1 Determinação da sequência de aminoácidos por espectrometria de massas (MS/MS)

3.3.1.1 Digestão da lectina com enzimas proteolíticas em gel

Para a determinação da sequência de aminoácidos por espectrometria de massas (MS/MS), a lectina purificada foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de 12% corado com *Coomassie Brilliant Blue* (LAEMMLI, 1970). As bandas foram excisadas e descoradas segundo o protocolo previamente estabelecido (SHEVCHENKO *et al.*, 2007).

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

3.3.1.2 Digestão em solução com enzimas proteolíticas

A lectina também foi digerida em solução com a enzima proteolítica Asp-N. A digestão foi realizada em bicarbonato de amônio 50 mM na presença do surfactante RapiGest (0,1%) segundo o protocolo estabelecido (WATERS CORPORATION, 2015), onde Asp-N foi usada na proporção 1:200 p/p (enzima/substrato). A digestão foi mantida a 37 °C por 16 horas, sendo interrompida com adição de 10 µL de ácido trifluoroacético a 5%.

3.3.1.3 Sequenciamento dos peptídeos obtidos por digestão

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

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

3.3.1.4 Análise dos dados

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

3.3.1.5 Análise de bioinformática

Para as análises de bioinformática a similaridade de sequência de aminoácidos de CiL-2 com proteínas conhecidas foi avaliada *online* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) usando o BLASTp com o banco de dados disponível no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (MADDEN, 2002).

O banco de dados de proteínas SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) foi usado para determinar a arquitetura de domínio da lectina e presença de peptídeo sinal e/ou repetições internas. Os alinhamentos das sequências foram feitos usando os programas MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) e ESPript (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>).

A ferramenta *online* ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) foi usada para estimativa da composição de aminoácidos, índice de hidropatia e pI da proteína (GASTEIGER *et al.*, 2005) e o programa NetNGlyc foi usado para identificar sítios de glicosilação (NXT) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>) (GUPTA; JUNG; BRUNAK, 2004).

3.4 Modelagem da estrutura tridimensional

3.4.1 Predição estrutural

A predição estrutural da proteína foi realizada pela avaliação da qualidade de estruturas geradas automaticamente produzidas por diferentes servidores *online* de modelagem.

Primeiramente, uma busca por estruturas proteicas determinadas experimentalmente com sequências de aminoácidos semelhantes à CiL-2 foi realizada por meio do BLASTp com o algoritmo PSI-BLAST (YAO *et al.*, 2019) contra o Protein Data Bank (PDB - <https://www.rcsb.org/search>). Essa pesquisa permitiu a identificação da similaridade da lectina para lectinas relacionadas e proteínas contendo o domínio das lectinas do Tipo-H.

Os principais *templates* utilizados foram as lectinas de *Helix pomatia* sem ligantes (ID:2CE6) e complexada com zinco e N-acetil- α -D-galactoseamina (GalNAc) (ID:2CCV) e com o antígeno de *Forsmann* (2CGY) que apresentaram uma identidade de sequência média e cobertura de 22% e 74%, respectivamente. O ligante GalNAc também corresponde a especificidade de CiL-2 e se apresentou como uma lectina dependente de íons divalentes (CARNEIRO *et al.*, 2020).

Vinte e uma estruturas diferentes foram obtidas pelos seguintes servidores e

programas: Modeller - 5 modelos (WEBB; SALI, 2021), GalaxyWeb - 5 modelos (SHIN *et al.*, 2014), SWISS-MODEL - 1 modelo (WATERHOUSE *et al.*, 2018), I-TASSER - 5 modelos (ZHOU *et al.*, 2022) e AlphaFold2 - 5 modelos (JUMPER *et al.*, 2021). Posteriormente, os melhores modelos gerados pelas ferramentas, determinados em um primeiro momento pelos parâmetros próprios de cada *software*, foram refinados pelo servidor *online* GalaxyRefine (LEE *et al.*, 2019) e as estruturas refinadas foram então analisadas estereoquimicamente (gráficos de *Ramachandran*, sobreposições estéricas, parâmetros de desvio C β , rotâmeros e qualidade do ângulo de ligação) pelos servidores de validação MolProbity (WILLIAMS *et al.*, 2018) e PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 2012).

Finalmente, o melhor modelo (com base nos parâmetros mencionados acima) foi selecionado e visualizado usando programa Pymol, e o padrão oligomérico foi predito com o auxílio da ferramenta Homomer do servidor GalaxyWeb (<http://galaxy.seoklab.org/>) (SHIN *et al.*, 2014). Ambas as estruturas foram então submetidas as ferramentas PDBsum Generate (<https://www.ebi.ac.uk>) que gera um conjunto completo de análises estruturais (LASKOWSKI, 2022), 3D-BLAST (<http://3d-blast.life.nctu.edu.tw/>) (YANG; TUNG, 2006) e RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>) de alinhamento estrutural (WANG *et al.*, 2013).

3.4.2 Predição de sítios de ligação

Os sítios de ligação de carboidratos mais confiáveis na estrutura do CiL-2 foram identificados pela ferramenta DogSiteScorer (<https://proteins.plus>) e DogSite3 utilizando o monossacarídeo α -GalNAc (ID:A2G) como viés para a predição da bolsa de ligação (GRAEF; EHRT; RAREY, 2023; VOLKAMER *et al.*, 2012).

O sítio de ligação para os carboidratos anômeros α -GalNAc (ID:A2G) e β -GalNAc (ID:NGA) também foi predito com a ferramenta GalaxySite do servidor GalaxyWeb (<http://galaxy.seoklab.org/>) (SHIN *et al.*, 2014).

3.4.3 Predição da função

A função molecular, o processo biológico e a localização no componente celular de CiL-2 foram previstas utilizando a ferramenta C-I-TASSER do servidor I-TASSER que é capaz de prever a função de proteínas com alta precisão partir de uma sequência de consulta (ZHENG *et al.*, 2021).

3.5 Atividade sinérgica em combinação com antibióticos

3.5.1 *Micro-organismos*

Para o estudo da atividade sinérgica da lectina com antibióticos foram utilizadas as seguintes cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 700698, *Escherichia coli* ATCC 11303 que pertencem à coleção de culturas microbianas do Laboratório de Microbiologia aplicada do Laboratório Integrado de Biomoléculas.

O meio Ágar Müeller-Hinton foi utilizado para o cultivo das bactérias (MHA; KASVI, Brasil) que serão incubadas a 37°C por 24 h. Após o crescimento no meio sólido, algumas colônias isoladas foram removidas e inoculadas em Caldo Müeller-Hinton (MHB; KASVI, Brasil), posteriormente incubadas durante 24h a 37°C. As células foram colhidas por centrifugação durante 10 minutos, 6000 xg, a 25°C.

As células serão suspensas em MHB e a densidade celular de cada suspensão bacteriana foi ajustada para a concentração final de 1×10^6 (UFC.mL⁻¹), por densidade óptica de 620nm (as curvas de calibração foram previamente determinadas para cada bactéria) e guardadas para posterior uso.

3.5.2 *Atividade da lectina combinada a antibióticos*

A avaliação do efeito da lectina CIL-2 combinada aos antibióticos foi realizada através do método *checkerboard*, descrito nos trabalhos realizados por Lechartier, Hartkoom e Cole (2012) com adaptações. O termo *checkerboard* refere-se a múltiplas diluições com dois agentes antimicrobianos em concentrações equivalentes, abaixo ou acima das CIMs para os microrganismos testados. Este método consiste em colunas contendo concentrações diferentes da droga “A” diluídas ao longo do eixo x, e linhas contendo as concentrações da droga “B” ao longo do eixo y (LORIAN, 2005).

Para este estudo, foram avaliadas as combinações de CIL-2 com os antibióticos oxacilina e tetraciclina, contra todas as bactérias descritas anteriormente. Para cada combinação testada foram usados 25 poços da microplaca de 96 poços de fundo em "U", das linhas A a E, sendo o antibiótico diluído no sentido vertical da placa, das linhas A a E nas concentrações da CIM, 1/2 x CIM, 1/4 x CIM, 1/8 x CIM e 1/16 x CIM, e a lectina na concentração constante de 125 µg/mL nas colunas 1 a 5. Tanto os antibióticos quanto a lectina foram diluídos separadamente em placas de microtitulação, e logo em seguida foram misturados em nova placa,

que foi preenchido com 50 μL do antibiótico, 50 μL da lectina e 100 μL do inóculo bacteriano previamente ajustado (5×10^5 UFC/mL). A linha F foi usada como controle da CIM do antibiótico, e a linha G como controle do crescimento bacteriano.

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

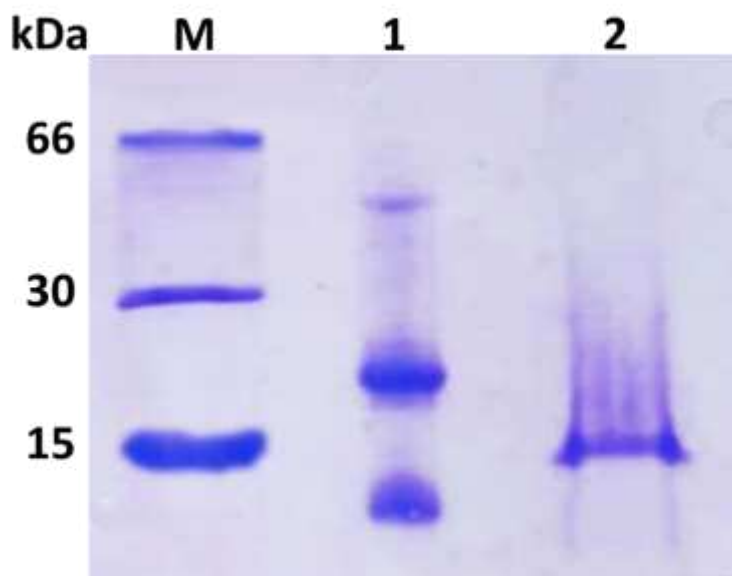
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação da lectina CiL-2

A lectina CiL-2 da alga marinha verde *Codium isthmocladum* foi purificada seguindo o protocolo já estabelecido por Carneiro e colaboradores, 2020. A lectina foi isolada por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel e a atividade hemaglutinante foi observada nos dois picos retidos, P1 (eluído com fosfato 20 mM) e P2 (eluído com 400 mM de NaCl), o P2 que correspondia a lectina foi recuperado e posteriormente submetido a cromatografia de exclusão molecular para concluir sua purificação, confirmada na fração contendo atividade hemaglutinante.

A lectina purificada foi submetida à SDS-PAGE na presença e ausência de β -mercaptoetanol para avaliar sua pureza e estimar a massa molecular (Figura 33).

Figura 33 – Eletroforese SDS-PAGE de CiL-2.



Fonte: Autor. SDS-PAGE 15%. M: marcador molecular (HSA – 66 kDa; rSfL – 30 kDa; CCL – 15 kDa). 1: CiL-2 na ausência de β -mercaptoetanol. 2: CiL-2 na presença de β -mercaptoetanol.

A lectina seguiu o mesmo padrão de três bandas na ausência de β -mercaptoetanol correspondentes a um trímero e uma banda única ($\cong 15$ kDa) em condições redutoras com uma migração em gel reduzida em comparação com a banda correspondente ao monômero ($\cong 13$ kDa) em condições não redutoras, o que indica a presença de pontes dissulfeto intercadeia, essas características foram observadas por Carneiro e colaboradores em 2020 e anos antes por Silva em 2013 e ainda Rodrigues, 2011 (denominada anteriormente como CiL-1). Todos os autores

relatarem um padrão de migração em gel muito similar ao observado nesse trabalho, o que indica que a lectina possui um protocolo de purificação facilmente replicável e um padrão oligomérico constante.

4.2 Sequência de aminoácidos do N-terminal

A sequência N-terminal da lectina CiL-2 foi obtida pela primeira vez através de degradação de Edman em 2020 e consistia nos primeiros 17 aminoácidos identificados: $^1\text{FQIGQGSMGNKTITGVS}^{17}$ (CARNEIRO *et al.*, 2020). Neste trabalho, confirmamos os 17 primeiros aminoácidos como $^1\text{FEIGTESVEDLGDKDSC}^{17}$ por espectrometria de massas (MS/MS) através da sobreposição dos peptídeos digeridos com as enzimas tripsina, quimiotripsina e Asp-N (ver a frente), que apresentou similaridade em todos os aminoácidos e identidade de quatro resíduos nos primeiros sete aminoácidos da estrutura primária da lectina com o N-terminal previsto anteriormente (Figura 34), o que é condizente com a metodologia de Edman de maior eficiência nos primeiros ciclos, apesar de hoje ser muitas vezes substituída por ferramentas de maior sensibilidade e resolução, como as técnicas de espectrometria de massas, ainda é conveniente para confirmação e identificação de incógnitas na sequência, como no caso da definição (I/L)³ sugerida por peptídeos trípticos e quimiotrípticos em CiL-2 (VECCHI; XIAO; WEN, 2019).

Figura 34 – Alinhamento do N-terminal de CiL-2 obtido por degradação de Edman e por sobreposição de peptídeos sobrepostos.



Fonte: Autor. CiL-2Edman (N-terminal de CiL-2 obtido por degradação de Edman); CiL-2Sequenciamento (N-terminal de CiL-2 obtido por MS/MS).

4.3 Determinação da estrutura primária por MS/MS

As digestões de CiL-2 com as enzimas tripsina, quimiotripsina e Asp-N produziram peptídeos de variados tamanhos, destes 14 fragmentos no total foram utilizados para confirmar a sequência da lectina (Tabela 8).

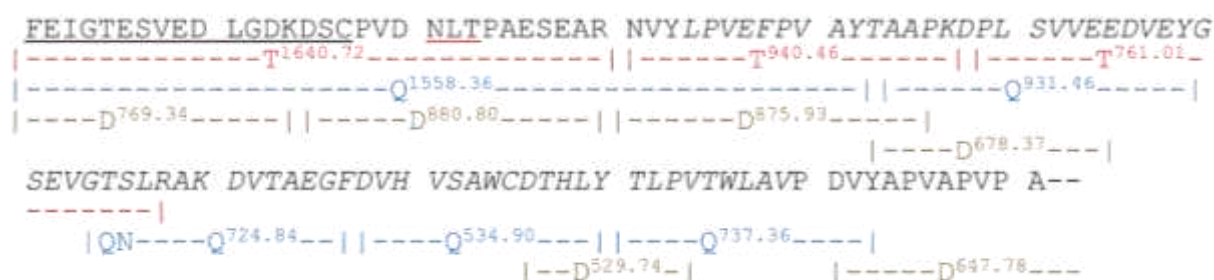
Tabela 8 – Peptídeos sequenciados de CiL-2 resultantes das digestões.

Peptídeo	<i>m/z</i>	Sequência	Massa		Δ (Da)
			Calculada	Observada	
D1	769,34	FQIGTESVEDLGDK	1536,73	1536,66	0,07
D2	880,80	DSCPVDNLTPAESEAR	1759,76	1759,72	0,04
D3	875,93	NVYLPVEFPVAYTAAP	1749,89	1749,80	0,09
D4	678,37	TAAPKDPLSVVEE	1354,69	1354,74	-0,05
D5	529,74	DTHLYTLPV	1057,54	1057,48	0,06
D6	647,78	DVYAAPVAPVA	1293,54	1071,56	-221,98
Q1	1558,36	FELGTESVEDLGDKDSCPVDNLTPAESEAR NVYLPVEFPVAY	4671,18	4671,24	-0,06
Q2	931,46	TAAPKDPLSVVEEDVEY	1860,89	1861,00	-0,11
Q3	724,84	QNLRAKDVTAEGF	1450,74	1450,78	-0,04
Q4	534,90	DVHVSACDTHLY	1601,65	1601,69	0,04
Q5	737,36	TLPVTWLAVPDVY	1272,69	1272,78	0,10
T1	1640,72	FELGTESVEDLGDKDSCPVDNLTPAESEAR	3279,36	3279,47	0,11
T2	940,46	NVYLPVEFPVAYTAAPK	1877,99	1877,92	0,07
T3	761,01	DPLSVVEEDVEYGVGTSR	2279,08	2279,22	-0,15

Fonte: Autor. D: peptídeos de Asp-N; Q: peptídeos de quimotripsina; T: peptídeos de tripsina; *m/z*: massa/carga; Δ : Massa calculada – Massa observada.

A estrutura primária de CiL-2 foi determinada pela sobreposição dos peptídeos sequenciados por MS/MS oriundos das digestões em conjunto com a utilização da sequência similar da lectina BPL-3 (GenBank ID:APB89196.1), utilizada como modelo para a construção do mapa da estrutura de CiL-2 (Figura 35). A sequência de aminoácidos da proteína consiste em 111 aminoácidos com massa molecular calculada de 12.039 Da, que é 225 Da abaixo da massa molecular determinada por MALDI-ToF (12.264 Da) por Carneiro *et al.* (2020). Essa diferença pode ser atribuída à presença de dois ou três aminoácidos não identificados no C-terminal.

Figura 35 – Estrutura primária de CiL-2.



Fonte: Autor. Letras abaixo da sequência em colorido indicam a enzima. T: tripsina. Q: Quimotripsina. D: Asp-N. Aminoácidos sublinhados em preto indicam o N-terminal. Aminoácidos sublinhados em vermelho indicam possível sítio de N-glicosilação. Aminoácidos em itálico indicam domínio lectínico do Tipo-H.

O sequenciamento do C-terminal pode ser complicado por se tratar de uma região que pode ser submetida a modificações pós-traducionais, como processos de degradação, mutações e clivagens espontâneas, por exemplo, incidindo em aminoácidos ácidos do terminal C da proteína (WANG *et al.*, 2019). As LOA costumadamente são ricas em resíduos ácidos e apresentam ponto isoelétrico (pI) baixos, CiL-2 apresenta quase 20% de aminoácidos desse tipo (ácido aspártico e ácido glutâmico) e baixa composição de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina) (Tabela 9) o que resultou em um pI estimado de 3.97 e um índice de hidropatia de -0.049, que quanto mais baixo significa mais afinidade por resíduos polares, classificando CiL-2 como uma lectina ácida e hidrofílica (MELO *et al.*, 2004; SINGH; WALIA, 2018).

Tabela 9 – Composição de aminoácidos de CiL-2.

Aminoácido	%	Classificação	Aminoácido	%	Classificação
Gly	4.50	Apolar / alifático (hidrofóbico)	Tyr	4.50	Aromático (hidrofóbico)
Ala	10.81	Apolar / alifático (hidrofóbico)	Asn	1.80	Polar, não-carregado
Leu	7.21	Apolar / alifático (hidrofóbico)	Gln	0.00	Polar, não-carregado
Val	15.32	Apolar / alifático (hidrofóbico)	Asp	9.01	Carregado negativamente
Ile	0.90	Apolar / alifático (hidrofóbico)	Glu	9.91	Carregado negativamente
Pro	9.91	Apolar / alifático (hidrofóbico)	Arg	1.80	Carregado positivamente
Phe	2.70	Aromático (hidrofóbico)	Lys	2.70	Carregado positivamente
Ser	6.31	Polar, não-carregado	His	1.80	Carregado positivamente
Thr	7.21	Polar, não-carregado	Trp	1.80	Aromático (hidrofóbico)
Cys	1.80	Polar, não-carregado	Met	0.00	Apolar / alifático (hidrofóbico)

Fonte: Autor.

O C-terminal truncado já foi relatado outras vezes em LOA, principalmente de algas verdes, é sugerido que a lectina BCA possui um precursor que é modificado pós-traducionalmente para seu truncamento C-terminal, assim como ocorre com ULL e CBA, essa última possui quatro aminoácidos truncados que correspondem a 462 Da massa proporcional ao número de resíduos sugeridos para os aminoácidos não observados em CiL-2 (225 Da) (ICHIHARA; ARAI; SHIMADA, 2009; PRASEPTIANGGA; HIRAYAMA; HORI, 2012; SATO *et al.*, 2011a).

A função desses resíduos terminais em lectinas pode ser variada, atuando desde o tráfego celular funcionando como sinalizadores de localização, quanto como inibidores

temporários da capacidade de ligação a carboidratos, por exemplo, quando a lectina se encontra ainda em um local inapropriado para sua atuação, processo que parece estar presente na lectina BCA (SATO *et al.*, 2011a). Essa região pode ainda está envolvida na interação de entre monômeros para formar um estado oligomérico em CiL-2 (ver a frente).

Assim como uma região de truncamento, um possível sítio de N-glicosilação (NXT) pode ser observado em CiL-2 na posição N²¹, lectinas sem peptídeo sinal geralmente não apresentam esse tipo de sítio, pois proteínas sem peptídeos sinalizadores geralmente não são expostas a maquinaria de glicosilação e, portanto, não pode ser glicosilada *in vivo*, embora contenham locais potenciais (SUPEKAR *et al.*, 2021). De fato, CiL-2 não apresentou conteúdo de carboidrato (SILVA, 2013). No entanto, o processamento da proteína madura ao qual CiL-2 foi submetida para a análise de sua sequência não permite a conservação de P.S. e naturalmente não foi observado. Assim, essas características condizem com o geralmente observado em LOA, de não glicoproteínas sem presença de peptídeo sinal, contudo CiL-2 apresenta grandes possibilidades de possuir um sítio de glicosilação funcional que pode ser confirmado por clonagem e obtenção de informações sobre seu mRNA.

4.4 Domínio conservado

A estrutura primária, através da ferramenta *online* SMART, não apresentou domínios internos repetidos, no entanto, uma arquitetura de domínio Tipo-H lectina, foi localizada entre as posições L³⁴ e V⁹⁹, com *E-value* de 1,00e⁻¹¹. O valor de *E-value* é um parâmetro estatístico de confiança do alinhamento que quanto mais próximo de zero mais confiável será o alinhamento (LETUNIC; KHEDKAR; BORK, 2021). Em 2006, a superfamília de lectinas com afinidade por GalNAc e oligossacarídeos com resíduos de galactose, denominada de Tipo-H, foi proposta ao se estudar aspectos estruturais da lectina HPA de *Helix pomatia* e sua homologia com outras lectinas, como as *Discoidins* (SANCHEZ *et al.*, 2006).

CiL-2 apresentou 39% de identidade e 63% de similaridade com a lectina BPL-3 da alga marina *B. plumosa* (GenBank ID:APB89196.1); 38,2% de identidade e 53% de similaridade com uma proteína contendo o domínio lectina Tipo-H da bactéria marinha *Planktomarina temperata* (GenBank ID:MDA8892013.1) e 38% de identidade e 59% de similaridade com a proteína hipotética L211DRAFT do fungo *Terfezia boudieri* (GenBank ID:RPB27317.1) (Figura 36).

A lectina também apresentou similaridade a outras proteínas de algas, como as proteínas hipotéticas de *Bryopsis* sp. BSKO_05702 (GenBank ID:GMH37829.1) com 36% de

identidade e 57% de similaridade e a BSKO_05692 (GenBank ID:GMH37819.1) com 35% de identidade e 57% de similaridade, além da lectina BPL-4 com 30% de identidade (Figura 37).

Como sugerido pela presença do domínio, CiL-2 também apresenta similaridade com as principais lectinas da superfamília do Tipo-H (que apresentam estrutura tridimensional determinada): HPA de *Helix pomatia* (PDB ID:2CE6_A) com 20% de identidade; HAA de *Cornu (Helix) aspersum* (PDB ID:4Q56_A) com 20% de identidade; SLL-2 de *Simularia lochmodes* (PDB ID:3WMP_A) com 19% de identidade; *Discoidin* I (Disc I) e II (Disc II) de *Dictyostelium discoideum* (PDB ID:2W94_A) com 20% de identidade e (GenBank ID:XP_629549.1) com 17% de identidade, respectivamente (Figura 38).

Figura 36 – Alinhamento de CiL-2 com proteínas similares.

```

                                     1   10   20   30
CiL-2      .....F EIGTE SVEDLGD K DSCPVDNLT PAESEARNV
BPL-3      ARGPFKTI TMAVTKIAVLL L LAAVGAYAT DVGSVQVRGLGDRSSCPVKPWTTAQTSAREK
DomTipoH_P.tempera .....MKRISSHTI GMDQGTLELFSDFQDGG.EMWTG..SGPRKV
L211DRAFT  .....MS TGEQL SLSLKIDS GSWNTAEVRDYRDPVVHT
consensus>50 .....l.v.....eidq.svellgD.dscpvdnwt.aes.arnv

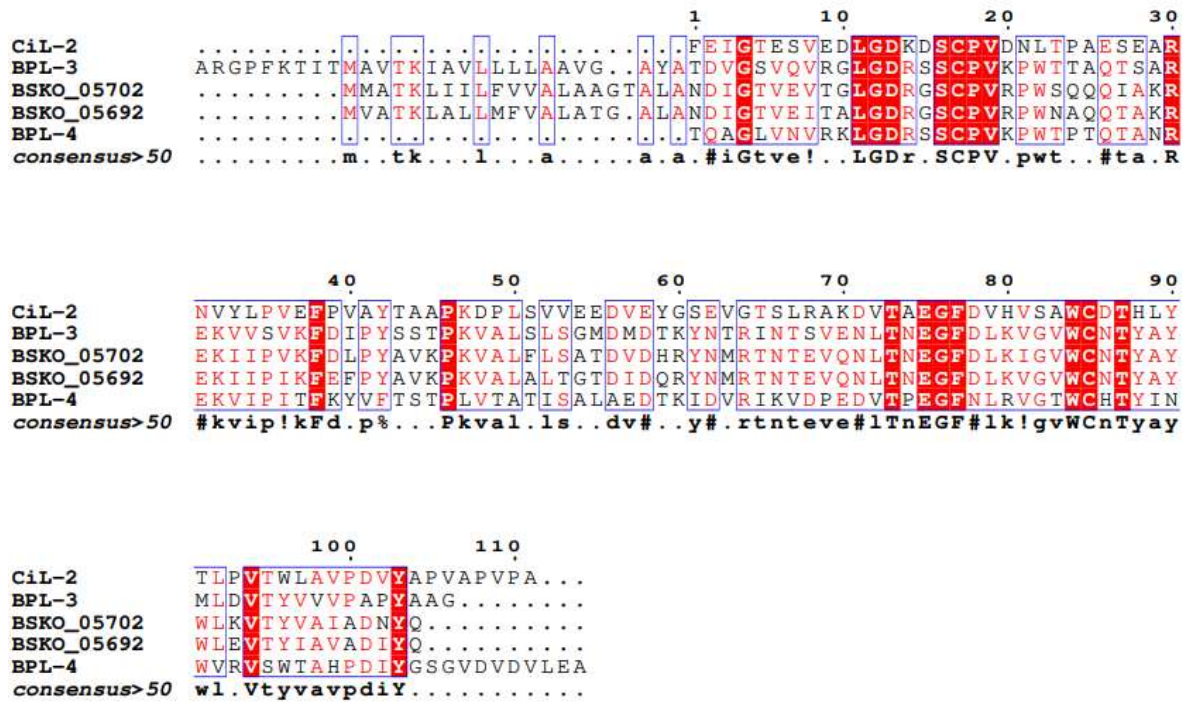
                                     40   50   60   70   80   90
CiL-2      YLPVEFPVAYTAAPKDP LSVVEEDVEY GSEVGTSLRAKDVTAE GFDVHVSAWCDTHLYTL
BPL-3      VVSVKFDIPYSSTPKV ALSLSGMDMDTKYNT RINTSVENLTNEGFDLKVGVWCNTIYAYML
DomTipoH_P.tempera SRAVEFSEAFTAQPMQVSLTMWDMGSDSNARADIRAENV TETGFDLVFRTWSDTRVARV
L211DRAFT  EGRVVFSENKFTSLPTVIVSLLSADVSN EYNFRVNVYATDVNLEGF TVHVNSWADTKIYSC
consensus>50 ...VeFsva%ta.Pkv.vsl...Dve.dy#.rinirae#vtneGFdvhv..Wc#T.vy.l

                                     100   110
CiL-2      PVTWLAVPD VYAPVAPVPA
BPL-3      DVTYVVVPAPYAAG.....
DomTipoH_P.tempera SASWLAIGDVADPEQWDLY
L211DRAFT  GVSWLAIGH.....
consensus>50 .vswla!gdvyap.....

```

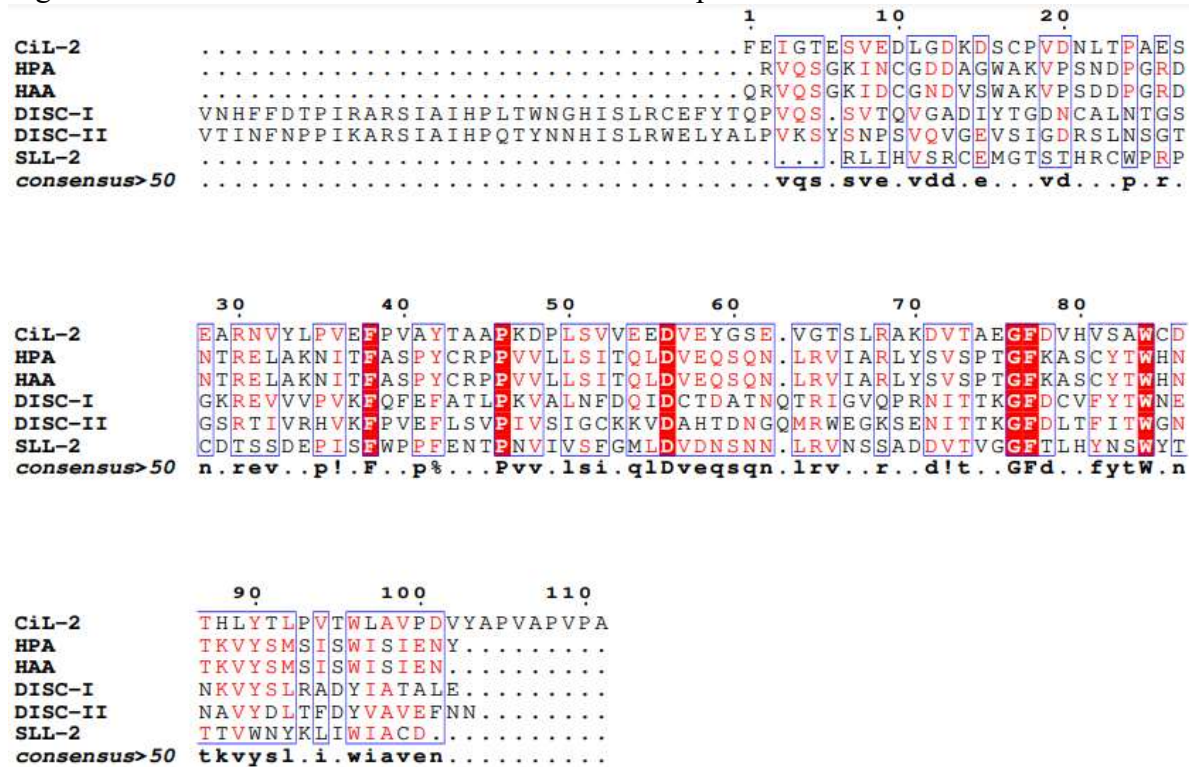
Fonte: Autor. CiL-2 (*Codium isthmocladum lectin*); BPL-3 (*Bryopsis plumosa lectin*); DomTipoH_P.tempera (Proteína contendo domínio tipo lectina H de *Planktomarina temperata*); L211DRAFT (Proteína hipotética de *Terfezia boudieri*). Ponto na sequência é indicativo de intervalo de alinhamento. Os pontos acima da sequência marcam a cada dez aminoácidos.

Figura 37 – Alinhamento de CiL-2 com proteínas similares de algas.



Fonte: Autor. CiL-2 (*Codium isthmocladum lectin*); BPL-3 (*Bryopsis plumosa lectin-3*); BSKO_05702 (Proteína hipotética de *Bryopsis* sp.); BSKO_05692 (05702 (Proteína hipotética de *Bryopsis* sp.); BPL-4 (*Bryopsis plumosa lectin-4*). Ponto na sequência é indicativo de intervalo de alinhamento. Os pontos acima da sequência marcam a cada dez aminoácidos.

Figura 38 – Alinhamento de CiL-2 com lectinas do Tipo-H.



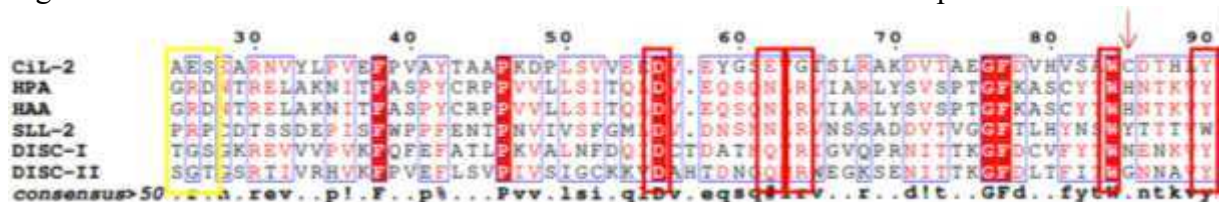
Fonte: Autor. CiL-2 (*Codium isthmocladum lectin*); HPA (*helix pomatia agglutinin*); HAA (*Cornu (Helix) aspersum agglutinin*); DISC-I (*Discoidin I*); DISC-II (*Discoidin II*); SLL-2 (*Sinularia lochmodes lectin*). Ponto na sequência é indicativo de intervalo de alinhamento. Os pontos acima da sequência marcam a cada dez aminoácidos.

É interessante notar que as proteínas que apresentam maior identidade com CiL-2 individualmente, quando alinhadas em conjunto (Figura 36), apresentam menor identidade do que o alinhamento com as proteínas de algas (Figura 37), o que sugere que esse possível grupo de lectinas pode apresentar características próprias quando oriundas de algas.

No entanto, CiL-2 não apresentou similaridade com CiL-1, outra lectina obtida de *C. isthmocladum*, essa característica já foi observada em LOA, como no próprio caso da lectina BPL-3 similar a CiL-2, que não compartilha similaridade com *Bryohealin*, outra proteína da alga *B. plumosa* (CARNEIRO *et al.*, 2020; HAN *et al.*, 2010; YOON *et al.*, 2008). CiL-1 apresenta especificidade distinta de CiL-2 o que pode significar que essas lectinas possuem funções diferentes na alga, o que justificaria a ausência de similaridade em suas sequências de aminoácidos.

A assinatura de domínio altamente conservada nas lectinas do tipo-H: D⁵⁵, N/Q⁶¹, R⁶³, W⁸³ e Y⁸⁹ foi observada em CiL-2 com pequenas modificações (PIETRZYK-BRZEZINSKA; BUJACZ, 2020). Os aminoácidos D⁵⁵, W⁸³ e Y⁸⁹ são conservados em CiL-2 como D⁵⁶, W⁸⁴ e Y⁹⁰, já os resíduos N/Q⁶¹ e R⁶³ são substituídos por E⁶² e G⁶⁴ (Figura 39). Todos esses aminoácidos fazem parte do sítio de ligação a carboidratos das principais lectinas do tipo-H (HPA, HAA, SLL-2, Disc I e II), com acréscimo de mais um resíduo variável (H⁸⁴ em HPA, H⁸⁵ em HAA, Y⁷⁹ em SLL-2, N²³⁶ em Disc I) que corresponde a um resíduo de cisteína na posição 85, envolvido na formação de uma ponte dissulfeto intracadeia (ver a frente), na sequência de CiL-2.

Figura 39 – Alinhamento do domínio de CiL-2 com outras lectinas do Tipo-H.



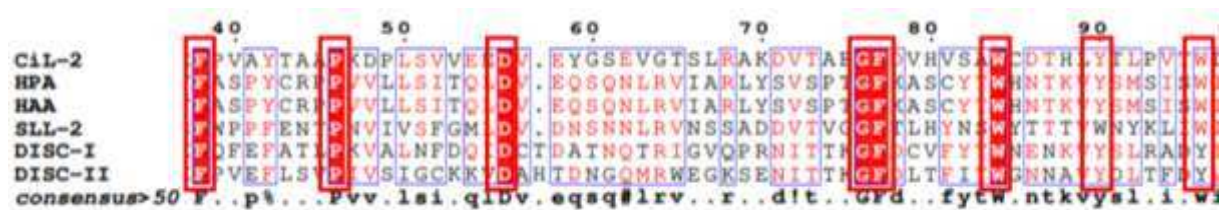
Fonte: Autor. CiL-2 (*Codium isthmocladum lectin*); HPA (*helix pomatia agglutinin*); HAA (*Cornu (Helix) aspersum agglutinin*); DISC-I (*Discoïdin I*); DISC-II (*Discoïdin II*); SLL-2 (*Sinularia lochmodes lectin*). Ponto na sequência é indicativo de intervalo de alinhamento. Os pontos acima da sequência marcam a cada dez aminoácidos. Caixas em vermelho indicam a sequência assinatura de domínio conservada nas lectinas do Tipo-H. Caixa em amarelo indica aminoácidos de uma alça alongada que fazem parte da assinatura de domínio das lectinas de caramujos. Seta indica resíduo variável que faz parte do sítio de ligação conservado.

Ainda em relação DRC dessas lectinas, a estrutura tridimensional elucidada de HPA e HAA mostrou a existência de uma alça alongada que conecta estruturas de β fita, esta alça apresenta três aminoácidos G²⁴, R²⁵, D²⁶ que também estão envolvidos no contato com

carboidratos (GalNAc) (SANCHEZ *et al.*, 2006). No entanto, acreditava-se que essa conexão estendida era quase que exclusiva das proteínas do Tipo-H isoladas de caramujos, como HPA, HAA, proteína CHAII de *Cepaea hortensis* (ChaII) e a proteína não caracterizada de *Arion vulgaris* (Avup) (PIETRZYK-BRZEZINSKA; BUJACZ, 2020). Contudo, essa alça também foi observada em CiL-2 (ver a frente) e os resíduos correspondentes eram A²⁵, E²⁶, e S²⁷ (Figura 39). Vale ressaltar que esses aminoácidos estão fora do domínio Tipo-H previsto para a lectina (L³⁴ e V⁹⁹).

Outros aminoácidos altamente conservados nessas lectinas são F³⁷, P⁴⁵, V⁴⁷, G⁷⁵, F⁷⁶ e W⁹⁵ (em HPA) que correspondem em CiL-2 com alta identidade a F³⁸, P⁴⁶, D⁴⁸, G⁷⁶, F⁷⁷ e W⁹⁶. Assim, CiL-2 conserva 8 resíduos em sua sequência dos 11 aminoácidos mais conservados encontrados nas estruturas primárias das lectinas do Tipo H, sendo três deles pertencentes ao principal sítio de ligação a carboidrato dessas lectinas (Figura 40).

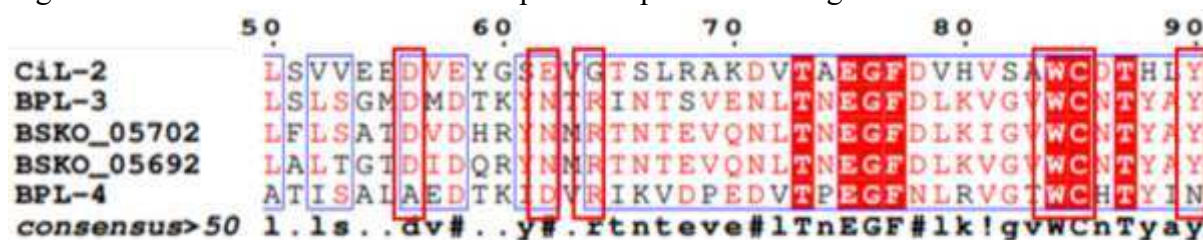
Figura 40 – Regiões conservadas de CiL-2 e outras lectinas do Tipo-H.



Fonte: Autor. CiL-2 (*Codium isthmocladum lectin*); HPA (*helix pomatia agglutinin*); HAA (*Cornu (Helix) aspersum agglutinin*); DISC-I (*Discoïdin I*); DISC-II (*Discoïdin II*); SLL-2 (*Simularia lochmodes lectin*). Ponto na sequência é indicativo de intervalo de alinhamento. Os pontos acima da sequência marcam a cada dez aminoácidos. Caixas em vermelho indicam resíduos conservados entre CiL-2 e outras lectinas do Tipo-H.

Com relação a conservação dos aminoácidos observados na principal assinatura de domínio (D⁵⁵, N/Q⁶¹, R⁶³, W⁸³ e Y⁸⁹) entre CiL-2 e outras proteínas de algas, foi observado que as demais LOA apresentam conservação completa da assinatura de domínio, no mesmo posicionamento de CiL-2 (um resíduo a frente em relação a HPA), com exceção da lectina BPL-4 que apenas substituiu D⁵⁵, N/Q⁶¹ e Y⁸⁹ por A⁵⁶, D⁶² e N⁹⁰ (Figura 41) (HAN *et al.*, 2012b). No entanto, o aminoácido variável que participa do sítio de contato a carboidrato (H⁸⁴ em HPA) é fortemente conservado nas lectinas de algas como C⁸⁵ (Figura 41).

Figura 41 – Alinhamento do domínio Tipo-H em proteínas de algas.



Fonte: Autor. CiL-2 (*Codium isthmocladum lectin*); BPL-3 (*Bryopsis plumosa lectin-3*); BSKO_05702 (Proteína hipotética de *Bryopsis* sp.); BSKO_05692 (05702 (Proteína hipotética de *Bryopsis* sp.); BPL-4 (*Bryopsis plumosa lectin-4*). Ponto na sequência é indicativo de intervalo de alinhamento. Os pontos acima da sequência marcam a cada dez aminoácidos. Caixas em vermelho indicam a sequência assinatura de domínio conservado nas lectinas do Tipo-H.

Apenas CiL-2 substitui R⁶³, pelo aminoácido G⁶⁴, enquanto o local N/Q⁶¹ é modificado também por BPL-4, em E⁶² e D⁶², respectivamente (Figura 41). HAN e colaboradores (2011) previram essa mesma assinatura como sítio de reconhecimento de carboidratos da BPL-3 com a presença de A²⁴ e T²⁵ vinculados a alça alongada observada nas lectinas de caramujos e em CiL-2 (ver a frente). Para BPL-4, o mesmo sítio é reportado, no entanto, os aminoácidos nas posições 24 a 26 não foram previstos no envolvimento com açúcares (HAN *et al.*, 2012b).

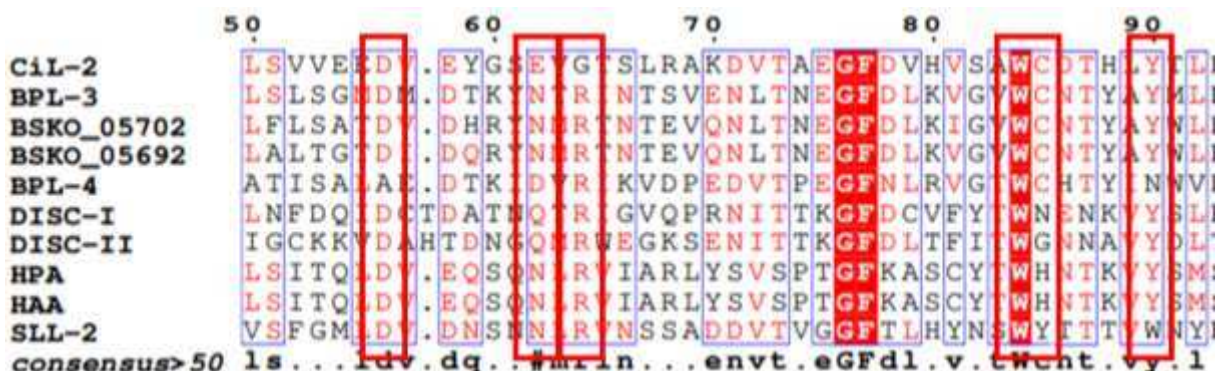
Dessa forma, pode-se dizer que a assinatura mais conservada das lectinas do Tipo-H relacionada ao contato com o ligante também é fortemente preservada nas lectinas desse grupo que possuem origem algal, com o acréscimo do C⁸⁵, sendo para as LOA: D⁵⁶, N⁶², R/G⁶⁴, W⁸⁴, C⁸⁵ e Y/N⁹⁰ (Figura 41).

Há outros aminoácidos que parecem ser conservados em lectinas do Tipo-H de algas, incluindo regiões extensas como ¹¹LGD¹³, ¹⁶SCPV¹⁹ e ⁷⁵EGFD⁷⁸, onde apenas o resíduo D⁷⁸ é trocado por N⁷⁸ em BPL-4 (Figura 42). Outros resíduos isolados como G⁴, R³⁰, F³⁸, P⁴⁶, T⁷³, T⁸⁷, V⁹⁴ e Y¹⁰³ também são conservados entre essas lectinas, além do dipeptídeo ⁸⁴WC⁸⁵ que faz parte da assinatura de domínio altamente conservada nesse grupo, sendo esses os únicos aminoácidos observados em todas as sequências de lectinas de algas analisadas.

Existem ainda alguns aminoácidos com alta conservação entre as lectinas de algas que sofrem pequenas modificações em algumas sequências dessas proteínas, por exemplo, V⁸ que é alterada para I⁸ em BSKO_05692, P³⁵ que aparece como S³⁵ na sequência de BPL-3 ou L⁵⁰ e D⁵⁶ que são substituídos por uma alanina nas duas posições em BPL-4. Essas modificações também aparecem relacionadas a CiL-2 com modificações observadas apenas em sua estrutura, como V⁶, N²¹, V³² ou H⁸⁸ (Figura 42).

O padrão ¹⁷Cys-Cys⁸⁵ que provavelmente corresponde a formação de uma ponte dissulfeto intracadeia em CiL-2 é conservado em outras proteínas algais (Figura 42).

Figura 43 – Alinhamento do domínio conservado de lectinas do Tipo-H de invertebrados e algas.



Fonte: Autor. CiL-2 (*Codium isthmocladum lectin*); BPL-3 (*Bryopsis plumosa lectin-3*); BSKO_05702 (Proteína hipotética de *Bryopsis* sp.); BSKO_05692 (05702 (Proteína hipotética de *Bryopsis* sp.); BPL-4 (*Bryopsis plumosa lectin-4*); DISC-I (*Discoidin I*); DISC-II (*Discoidin II*); HPA (*helix pomatia agglutinin*); HAA (*Cornu (Helix) aspersum agglutinin*); SLL-2 (*Sinularia lochmodes lectin*). Ponto na sequência é indicativo de intervalo de alinhamento. Os pontos acima da sequência marcam a cada dez aminoácidos. Caixas em vermelho indicam a sequência assinatura de domínio conservado nas lectinas do Tipo-H.

O resíduo na posição 85 parece apresentar a característica de variabilidade apenas nas lectinas de invertebrados, permanecendo conservado a cisteína nessa posição como relatado anteriormente nas lectinas de algas. Os resíduos de cisteínas podem formar pontes dissulfeto, ligações fortes que podem conferir maior estabilidade para a estrutura, a conservação desse aminoácido na região correspondente ao sítio de contato com açúcares pode significar uma necessidade de uma maior sustentação nessa região ou termoestabilidade em lectinas algais (ZHANG *et al.*, 2023).

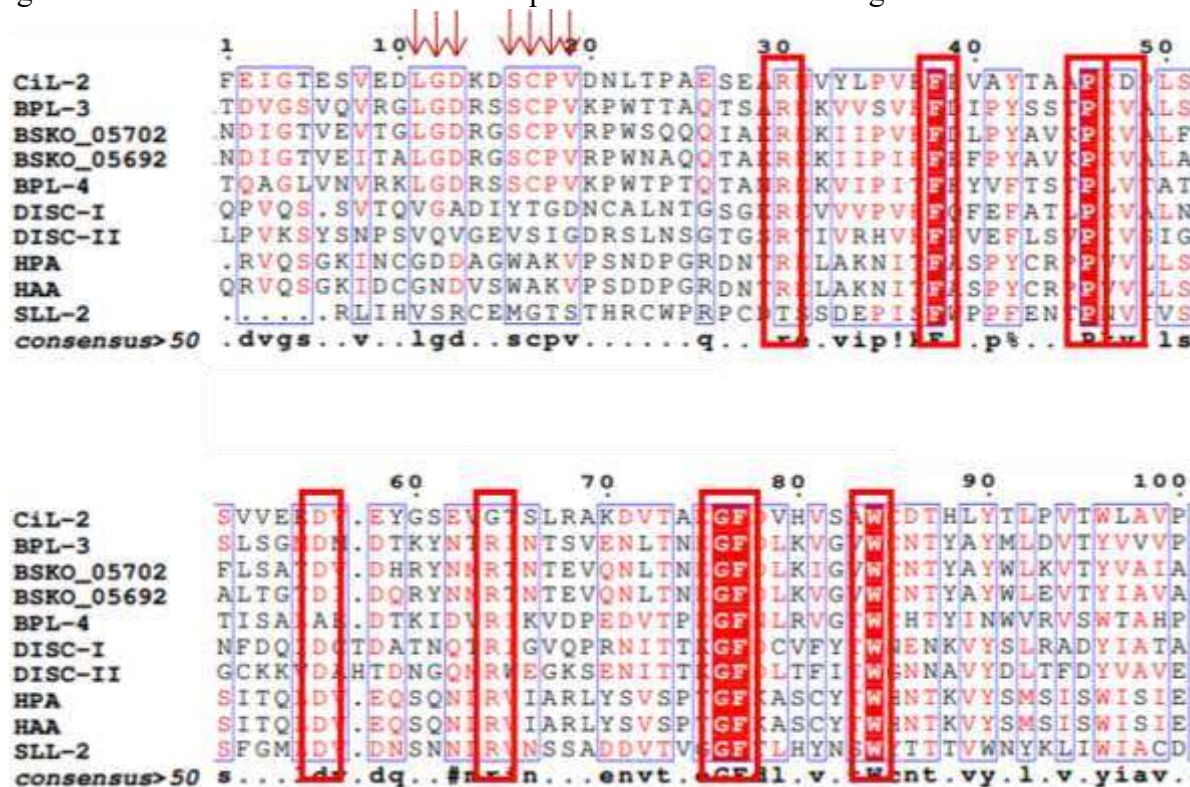
De fato, esse resíduo parece estar envolvido na sustentação da alça alongada presente na estrutura tridimensional dessas lectinas de algas (ver a frente). Ou seja, sua presença pode estar relacionada com a sustentação de uma área mais extensa de contato com o ligante, ao invés, de ser um resíduo de contato do domínio. Vale lembrar que as lectinas do Tipo-H, além da forma livre, reconhecem especificamente glicanos que possuem GalNAc ou galactose e tanto CiL-2 como BPL-3 são inibidas por *O*-glicoproteínas mucina e fetuína, respectivamente (CARNEIRO *et al.*, 2020; HAN *et al.*, 2011; PIETRZYK-BRZEZINSKA; BUJACZ, 2020).

Além dos resíduos conservados que fazem parte do principal sítio de ligação das lectinas do Tipo-H, existem outros aminoácidos que apresentam alta preservação entre sequências de algas e invertebrados, são os casos de R³⁰, F³⁸, P⁴⁶, V⁴⁸ e ⁷⁶GF⁷⁷ (Figura 44). Destes, apenas a valina da posição 48 é conservada em todas as outras lectinas e substituída por um ácido aspártico em CiL-2, já o resíduo R³⁰ é modificado em T³⁰ em SLL-2 (JIMBO *et al.*, 2005).

As regiões ¹¹LGD¹³ e ¹⁶SCPV¹⁹ que são bem conservadas nas lectinas de algas do grupo parecem não ser preservada na estrutura de outros organismos. Essas regiões podem estar

relacionadas a sítios de contatos (ver a frente) próprios das LOA vinculadas ao grupo H para funções biológicas necessárias nas algas.

Figura 44 – Alinhamento de lectinas do Tipo-H de invertebrados e algas.



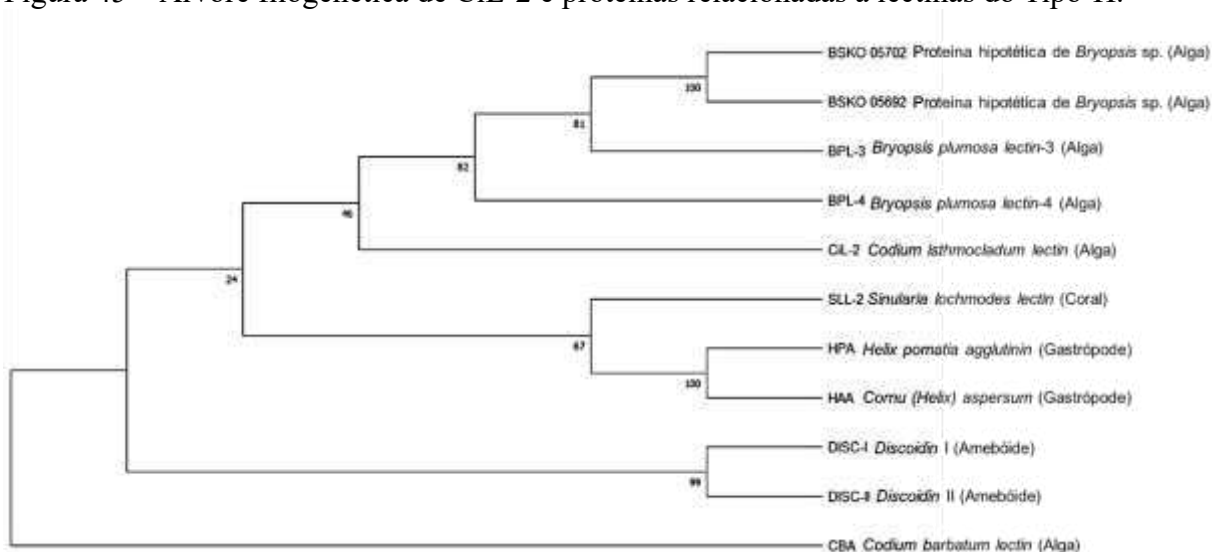
Fonte: Autor. CiL-2 (*Codium isthmocladum lectin*); BPL-3 (*Bryopsis plumosa lectin-3*); BSKO_05702 (Proteína hipotética de *Bryopsis* sp.); BSKO_05692 (05702 (Proteína hipotética de *Bryopsis* sp.); BPL-4 (*Bryopsis plumosa lectin-4*); DISC-I (*Discoidin I*); DISC-II (*Discoidin II*); HPA (*helix pomatia agglutinin*); HAA (*Cornu (Helix) aspersum agglutinin*); SLL-2 (*Sinularia lochmodes lectin*). Ponto na sequência é indicativo de intervalo de alinhamento. Os pontos acima da sequência marcam a cada dez aminoácidos. Caixas em vermelho indicam resíduos conservados entre as sequências. Setas indicam regiões fortemente conservadas em sequências de algas.

O padrão $^{17}\text{Cys-Cys}^{85}$ também não é observado em outras lectinas do grupo H além das de algas, apesar de HPA e HAA apresentarem a ligação na conformação $^9\text{Cys-Cys}^{80}$ e SLL-2 apresentar duas pontes em $^{17}\text{Cys-Cys}^{22}$ e $^8\text{Cys-Cys}^{93}$, já as Disc I e II não possuem cisteínas. Do mesmo modo, o local de glicosilação não é conservado nas sequências aparecendo em N³⁴ e N³⁵ nas lectinas de caramujos e na posição 60 em SLL-2 (Figura 44) (JIMBO *et al.*, 2005; PIETRZYK *et al.*, 2015; SANCHEZ *et al.*, 2006). Essas três lectinas são consideradas glicoproteínas, o que novamente intensifica a possibilidade do possível sítio de glicosilação em CiL-2 ser funcional e essa ser uma característica comum entre essas proteína. A Disc. II não apresenta esse tipo de modificação pós-traducional, mas possui uma fosforização no resíduo His⁸⁴, contudo essa região não corresponde ao domínio tipo lectina e sim ao domínio *discoidin* (ARAGÃO *et al.*, 2008).

Como esperado, pela previsão do domínio, CiL-2 conserva características relacionadas ao grupo das lectinas Tipo-H em sua estrutura primária, como 60% dos resíduos do principal sítio de ligação a carboidrato dessa família. Esse valor sobe para 67% se considerarmos os membros oriundos de algas, pois esse conjunto parece apresentar conservação de uma cisteína no local de contato com açúcares, resíduo esse que varia nas demais lectinas do Tipo-H.

A determinação da estrutura primária também pode ser utilizada para traçar um paralelo evolutivo entre organismos, apesar da presença de lectinas semelhantes não ser necessariamente uma característica evolutiva elas podem trazer informações a esse respeito (SIUKSTAITE; IMBERTY; RÖMER, 2021). Uma árvore filogenética foi gerada pelo programa MEGA.11 (<https://www.megasoftware.net/>) de análise de evolução genética da relação entre CiL-2 e as proteínas de algas similares e lectinas do tipo-H (Figura 45). Essa investigação mostrou que as lectinas e proteínas de algas relacionadas a HPA parecem apresentar uma boa aproximação evolutiva.

Figura 45 – Árvore filogenética de CiL-2 e proteínas relacionadas a lectinas do Tipo-H.



Fonte: Autor. Gerado por MEGA 11. CBA – *Outgroup* (Grupo externo).

CiL-2 permaneceu sozinha em uma das ramificações da árvore filogenética o que pode estar atrelado a ela ser a única dessas proteínas de algas relacionadas ao tipo-H que pertence ao gênero *Codium*. Além disso, todas essas moléculas de origem algal dessa família ficaram em um braço distinto das lectinas de invertebrados, onde as mais distantes foram as lectinas de caramujos, que são os organismos terrestres mais complexos e mais distante ainda os amebóides (DANILOVA; FOTINA; DANILOVA, 2022). De fato, essas LOA do gênero

Codium e *Bryopsis* parecem pertencer a família das lectinas do Tipo-H, e sua associação com os outros membros pode ter a ver com uma evolução convergente entre esses indivíduos não relacionados, como a necessidade de processos biológicos semelhantes que envolvem o mesmo padrão de reconhecimento de glicocódigos (SIUKSTAITE; IMBERTY; RÖMER, 2021).

4.5 Modelagem molecular

A determinação da estrutura primária da lectina CiL-2 alinhada as informações de estruturas tridimensionais de outros membros da família de lectinas do Tipo-H, ao qual a lectina demonstra ter íntima relação, e ainda mais os avanços de ferramentas de bioinformática estrutural de moléculas permitiram a predição de um modelo tridimensional confiável para a lectina de *C. isthmocladum* (AGNIHOTRY *et al.*, 2022).

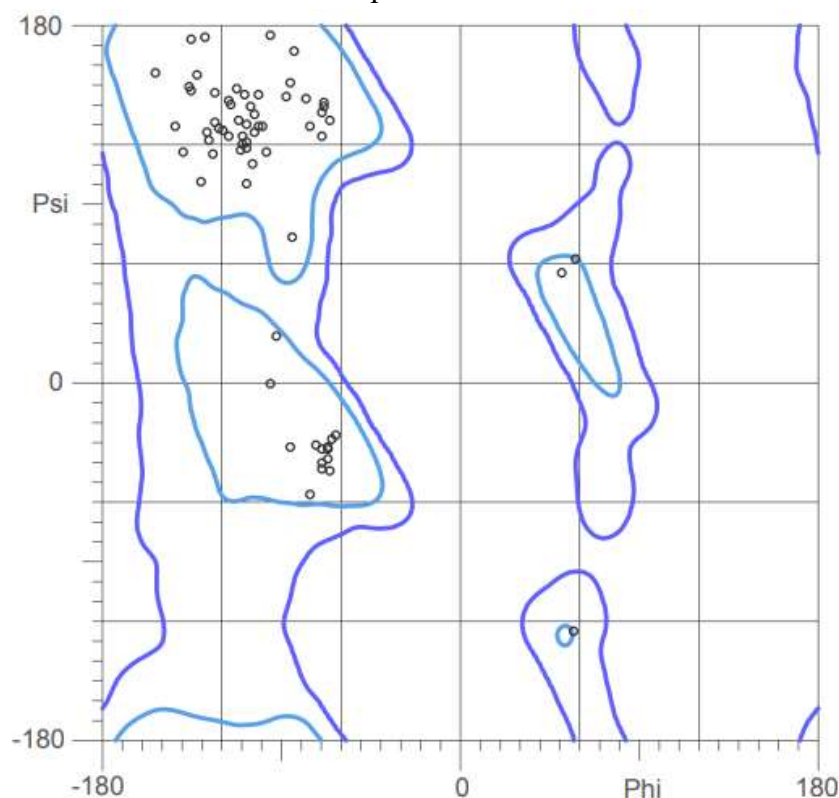
Primeiramente, a sequência de aminoácidos foi utilizada como entrada para busca de modelos adequados utilizando ferramentas como PSI-BLAST (YAO *et al.*, 2019). Os resultados demonstraram similaridade com as lectinas do grupo H, essa informação foi importante para o direcionamento da utilização de estruturas determinadas dessa família por programas e servidores *online* de modelamento e para comparação.

Vinte e uma estruturas diferentes foram obtidas: Modeller (5 modelos), GalaxyWeb (5 modelos), SWISS-MODEL (1 modelo), I-TASSER (5 modelos), AlphaFold2 (5 modelos), o melhor modelo de cada ferramenta, determinado pelos parâmetros próprios de cada *software*, foram refinadas pelo servidor *online* GalaxyRefine e posteriormente foram analisadas estereoquimicamente por servidores de validação MolProbity e PROCHECK. A estrutura mais adequada foi produzida por AlphaFold2, que utiliza aprendizado de máquina e busca informações em todo banco de dados e não somente do *template* tridimensional mais similar para gerar a modelagem, o modelo apresentou 100% de resíduos de aminoácidos dispostos em regiões permitidas (96,33% nas regiões favorecidas) do gráfico *Ramachandran* (Figura 46) (MARX, 2022).

A maioria dos aminoácidos está na região mais favorecida do gráfico, alguns pouco estão na região apenas permitida e apenas um resíduo está em uma região generosamente permitida sendo este a cisteína da posição 85 (Figura 47). Curiosamente, o resíduo correspondente (H⁸⁴) na estrutura do modelo determinado de HPA também está na mesma região em seu gráfico de avaliação (Figura 48). O que significa concordância com uma das estruturas base utilizadas para o modelamento, como visto anteriormente, esse resíduo apesar de ser variável nas lectinas pertencentes a família, faz parte do sítio mais conservado do grupo

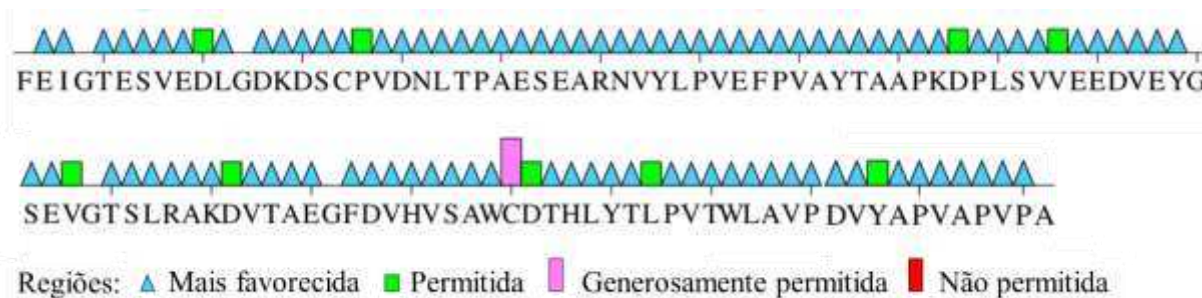
e é invariavelmente preservado nas lectinas algais relacionadas a CiL-2 (PIETRZYK-BRZEZINSKA; BUJACZ, 2020).

Figura 46 – Gráfico de *Ramachandran* para o modelo estrutural de CiL-2.



Fonte: Autor. Gerado por MolProbyte. Regiões delimitadas por azul claro são as mais favorecidas, as regiões delimitadas por cor azul escuro são permitidas e a branca é a região não permitida.

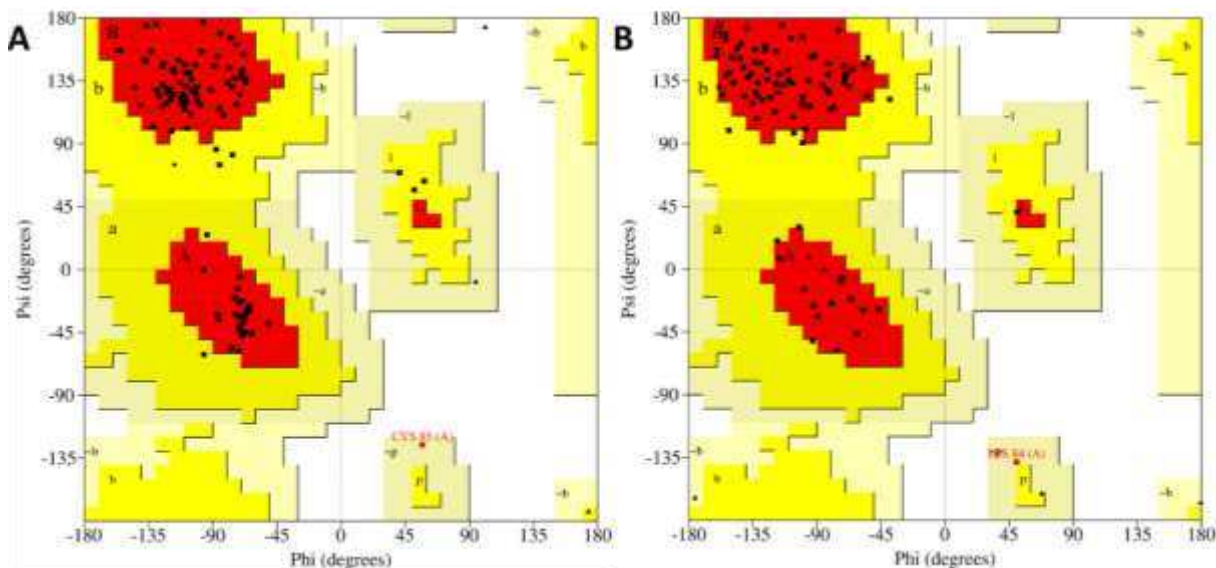
Figura 47 – Distribuição dos aminoácidos no gráfico de *Ramachandran* do modelo de CiL-2.



Fonte: Autor. Gerado por Procheck.

O modelo apresenta uma estrutura geral formada por seis β -fitas dispostas em duas β -folhas antiparalelas que formam uma estrutura de um β -sanduíche, as fitas β são conectadas por alças de diferentes tamanhos, com uma das alças que ligam as folhas β possuindo uma estrutura mais alongada, o modelo ainda apresenta dois locais de α -hélice, um na alça estendida e outro na região do C-terminal da sequência (Figura 49).

Figura 48 – Gráficos de *Ramachandran* para o modelo estrutural de CiL-2 e para estrutura determinada de HPA.



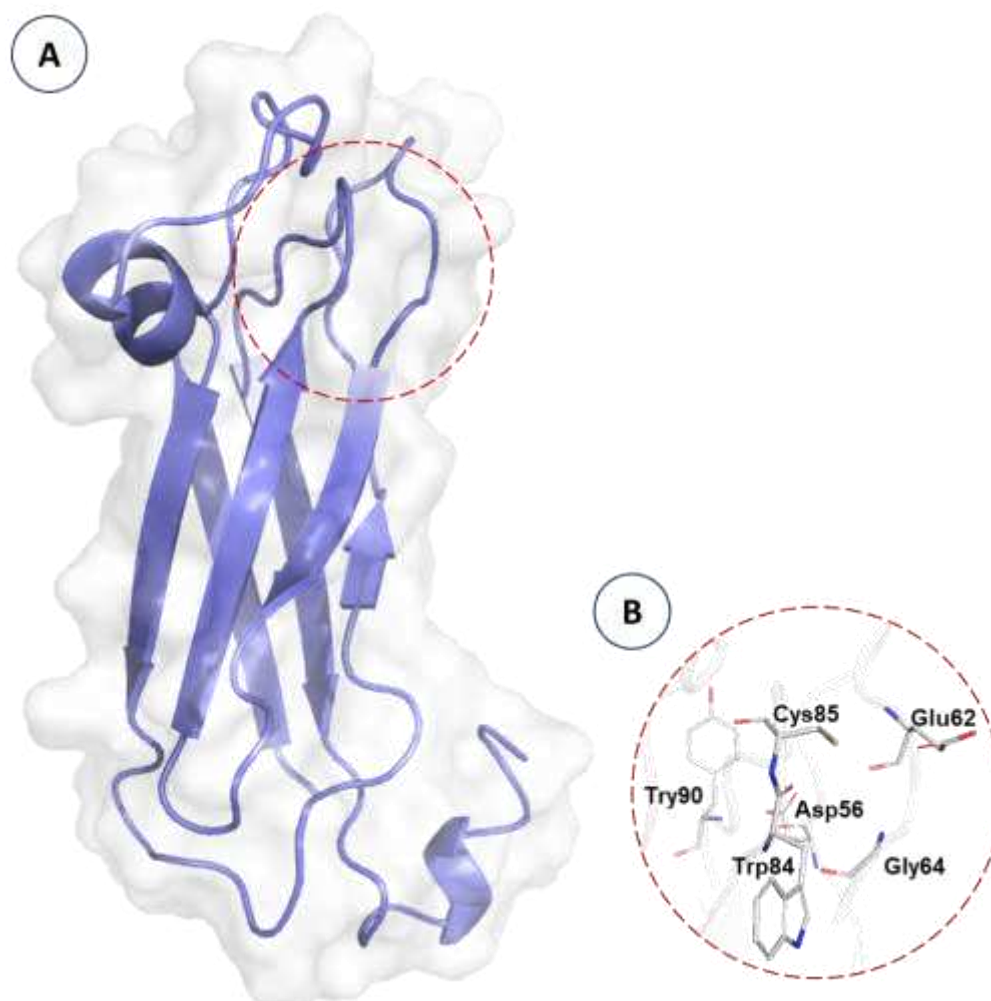
Fonte: Autor. Gerado por Prochck. A – Gráfico de *Ramachandran* do modelo estrutural de CiL-2; B – Gráfico de *Ramachandran* da estrutura tridimensional de HPA. Regiões na cor vermelha são as mais favorecidas, as regiões na cor amarela são permitidas e a branca é a região não permitida.

CiL-2 apresentou *score* de 90.2 com *E-value* de $3e^{-20}$ da pontuação de alinhamento estrutural com a estrutura da HPA em complexo com zinco e GalNac (PDB ID:2ccv), pela análise de 3D-BLAST usando SASM (*Structural Alphabet Substitution Matrix*), matrizes de substituição empregado em métodos de alinhamento proteico (YANG; TUNG, 2006). Esse valor corresponde a 48,5% de identidade entre as estruturas, com um RMSD (*Root Mean Square Deviation*) de 1.274 Å e 0% de *gaps* no alinhamento tridimensional.

Além disso, o modelo foi alinhado estruturalmente com a lectina HPA sem ligantes (PDB ID:2ce6) e com a estrutura predita da lectina BPL-3 (UniProt ID: A0A1J0CRG2) através do servidor *web* RaptorX, apresentando RMSD de 1.84 Å entre os átomos da cadeia principal de CiL-2 com HPA e um RMSD de 2.00 Å com BPL-3 demonstrando neste caso um menor grau de conservação estrutural apesar da maior similaridade de sequência (Figura 50).

Quando as três estruturas foram alinhadas apresentaram um valor de RMSD de 1.85 Å (Figura 50-C). O valor RMSD analisa a similaridade estrutural e variações conformacionais, variando de 0 a 30 Å, quanto menor o valor maior a similaridade (LEÃO *et al.*, 2020; YANG; ZANG, 2015).

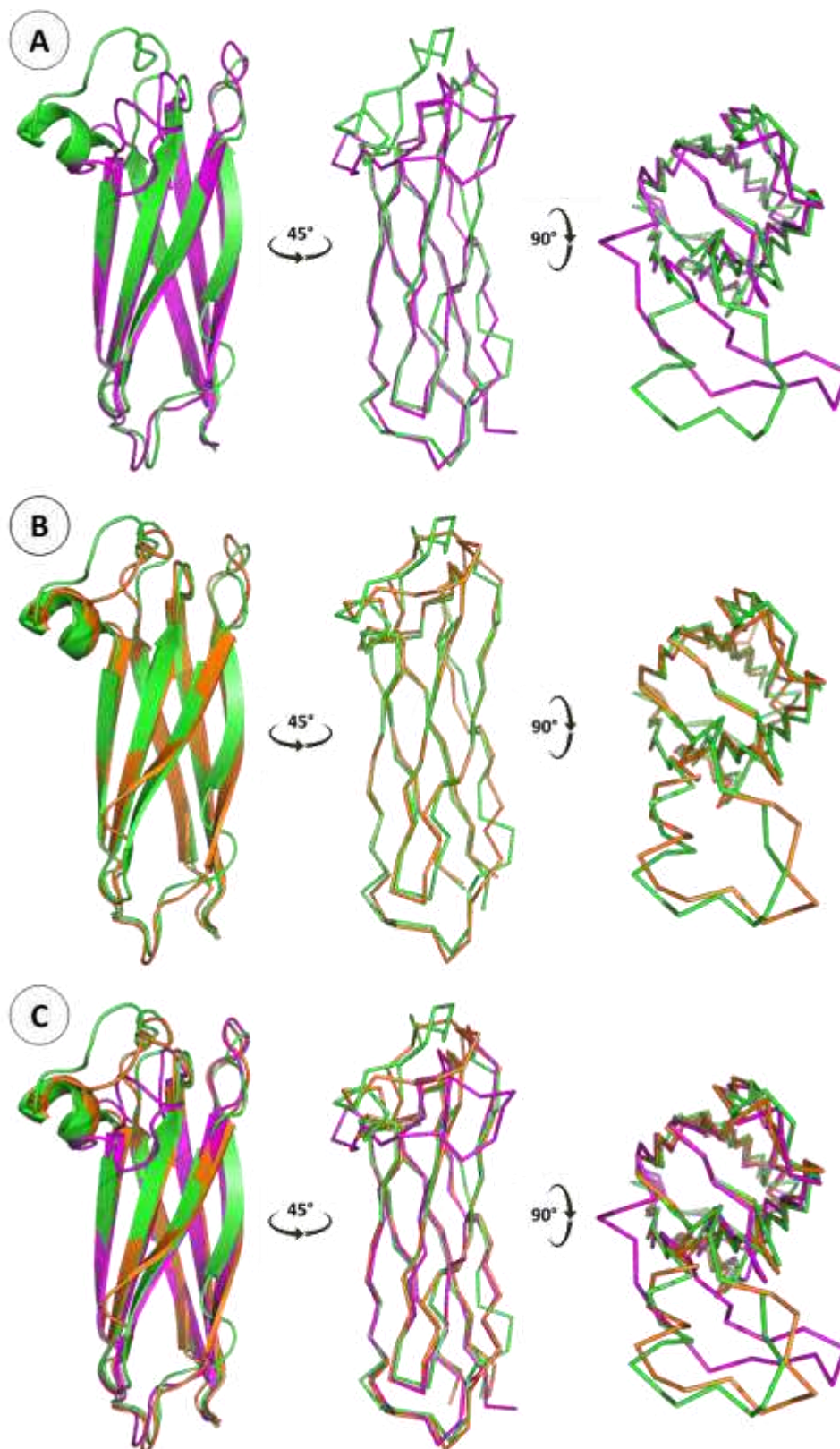
Figura 49 – Estrutura geral de CiL-2.



Fonte: Autor. A – Estrutura de CiL-2 em *cartoon* roxo claro coberta por superfície branca com 80% de transparente; B – Sítio de ligação ao carboidrato conservado das lectinas do Tipo-H presente em CiL-2. A estrutura da proteína é representada como *cartoon* branco com 50% de transparência, com resíduos do sítio de ligação apresentados como bastões cinza.

A sobreposição das estruturas permite a melhor visualização da conservação estrutural entre os modelos de CiL-2 e BPL-3 com a estrutura tridimensional determinada de HPA. É possível observar que existe uma clara conservação geral das estruturas e uma sobreposição sem *gaps* (Figura 50-C). Contudo, entre as estruturas de CiL-2 e HPA é possível notar uma conformação diferenciada na região correspondente a alça alongada que liga as folhas β . Além da presença de uma estrutura α -hélice maior em CiL-2 do que a que aparece em HPA, é possível notar um afastamento vertical da alça em relação a HPA. A visão superior permite ainda uma melhor visualização dessa diferença entre as estruturas (Figura 50-A).

Figura 50 – Sobreposição da estrutura de CiL-2 com as lectinas HPA e BPL-3.



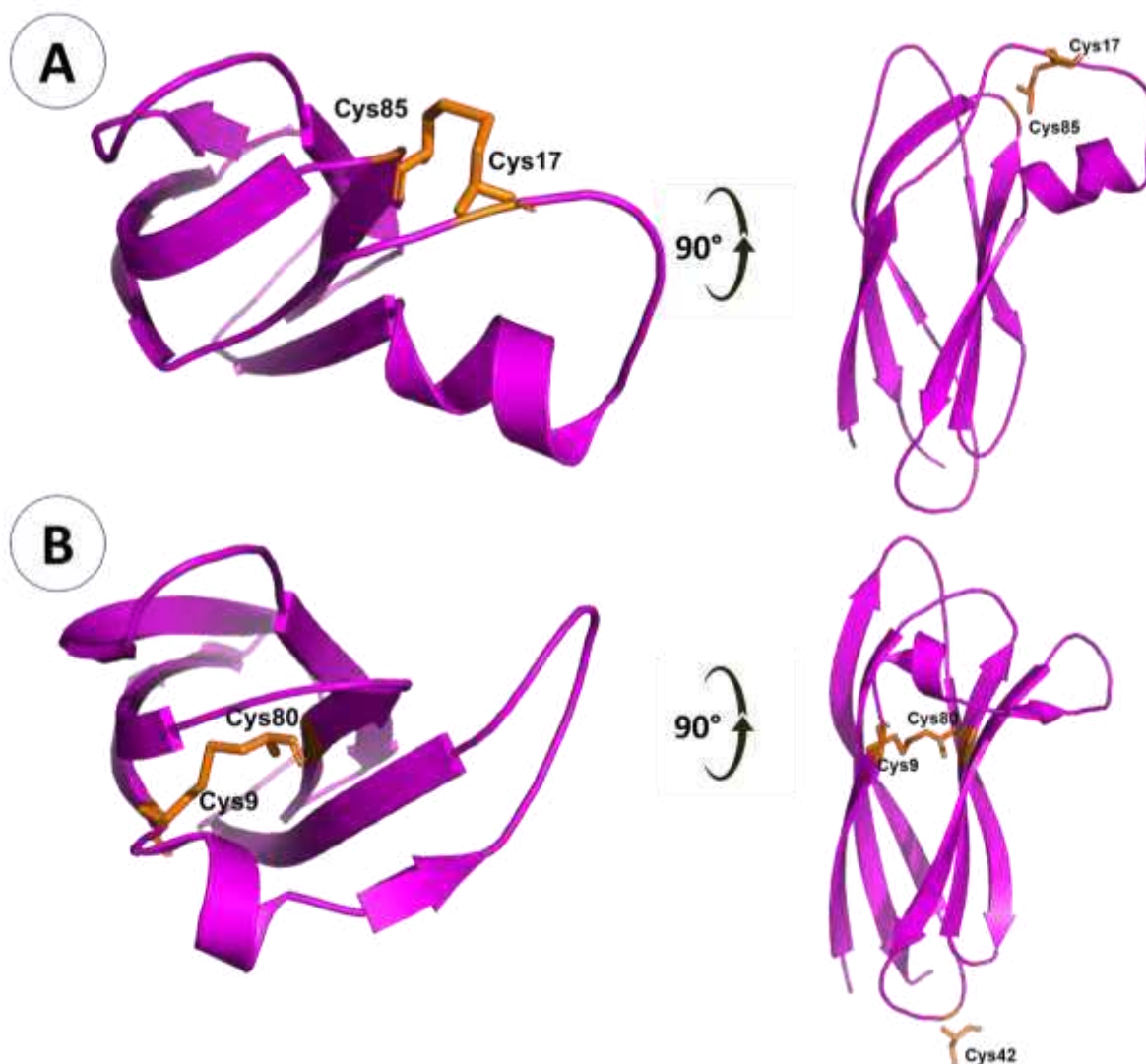
Fonte: Autor. A – Sobreposição da estrutura de CiL-2 em *cartoon* e bastões verdes com HPA em *cartoon* e bastões magenta, visões frontais e superior. B – Sobreposição da estrutura de CiL-2 em *cartoon* e bastões verdes com BPL-3 em *cartoon* e bastões laranja, visões frontais e superior. C – Sobreposição da estrutura de CiL-2 em *cartoon* e bastões verdes com HPA em *cartoon* e bastões magenta e com BPL-3 em *cartoon* e bastões laranja, visões frontais e superior.

Essa modificação local é bem menos observada entre o modelo de CiL-2 e BPL-3, onde a conformação da alça estendida é bem mais similar, apesar da similaridade da conformação geral das estruturas ser menor do que a de CiL-2 com a HPA ($2.00 > 1.84 \text{ \AA}$) (Figura 50-B). Essa região não é conservada nas lectinas do grupo H, sendo observada quase que unicamente nas de origem de caramujos, nelas essa ligação alongada tem participação no sítio de contato com carboidratos pelos aminoácidos G²⁴, R²⁵, D²⁶ (em HPA), esses aminoácidos não são conservados em CiL-2 ou BPL-3, nessas lectinas algais uma estrutura de α -hélice mais prolongada que a presente em HPA está na região dos três aminoácidos.

Como discutido, um dos resíduos que faz parte do sítio de contato a carboidratos das lectinas do Tipo-H (H⁸⁴) é substituído por uma C⁸⁵ nas lectinas de algas, essa cisteína se envolve na formação de uma ponte dissulfeto que pode ser observada no modelo tridimensional (Figura 51). Essa ligação covalente parece ter envolvimento direto na conformação da alça alongada, ajudando na sustentação de sua orientação mais vertical do que a observada em HPA (Figura 51-A). Na lectina de *H. pomatia*, a ligação interna entre as cisteínas está localizada em uma região completamente distinta, sem nenhum envolvimento direto com qualquer alça de conexão das folhas- β (Figura 51-B).

Essa observação ajuda a entender e dar suporte ao modelo proposto, já que a região significativamente diferenciada entre CiL-2 e o principal *template* utilizado para sua geração é baseado em uma ligação forte capaz de proporcionar essa modificação, é bom lembrar que proteínas são moléculas flexíveis, principalmente em locais de conexão/*loop*, assim a presença dessa ligação nesse local favorece a sua existência *in vivo* (YAN *et al.*, 2021). Essa região, também é o alvo do principal ligante dessa família de lectinas, o que pode significar uma das chaves para entender diferenças de especificidade, como a derivados de GalNAc e galactose ou glicanos e glicoproteínas (mucina em CiL-2), entre as lectinas de algas e de invertebrados do Tipo-H.

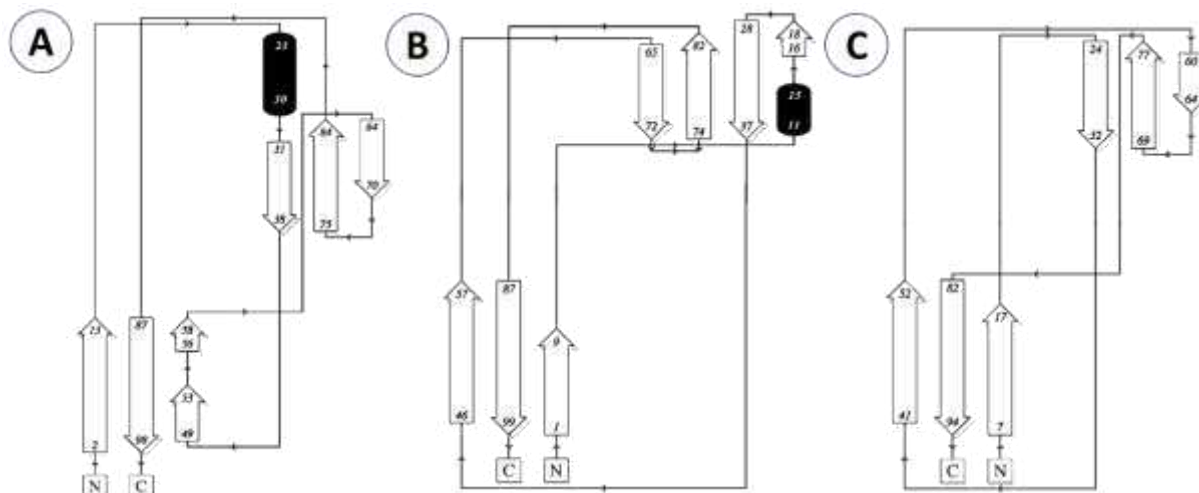
Figura 51 – Localização das pontes dissulfeto nas estruturas de CiL-2 e HPA.



Fonte: Autor. A – Localização da ponte dissulfeto na estrutura de CiL-2, lectina em *cartoon* magenta, resíduos de cisteína em bastões laranjas; B – Localização da ponte dissulfeto na estrutura de HPA, lectina em *cartoon* magenta, resíduos de cisteína em bastões laranjas.

De maneira geral, a estrutura tridimensional prevista para CiL-2 concorda com a arquitetura geral das lectinas Tipo-H, apresentando uma topologia muito similar (Figura 52), contendo as seis fitas que formam as duas folhas β que promovem a dobra em β -sanduíche, também demonstrou possuir um prolongamento em uma de suas alças de conexão das β -folhas que está presente nas lectinas de caramujo e parece ser uma característica observada nas LOA que pertencem a essa família (PIETRZYK-BRZEZINSKA; BUJACZ, 2020).

Figura 52 – Diagrama de topologia das estruturas de CiL-2, HPA e SLL-2.



Fonte: Autor. A – Diagrama de topologia de CiL-2; B – Diagrama de topologia de HPA; C – Diagrama de topologia de SLL-2. Setas brancas indicam fitas- β . Cilindros pretos indicam α -hélices. Linhas indicam alças. Numerações indicam a posição de aminoácidos na sequência. N indica N-terminal da sequência. C indica C-terminal da sequência. Os comprimentos das alças não são proporcionais ao número de resíduos de aminoácidos nesses elementos.

É possível observar no diagrama de topologia a conformação espacial das estruturas secundárias e suas similaridades entre as estruturas das lectinas HPA e SLL-2 com CiL-2. As seis fitas- β que formam duas folhas- β antiparalelas são facilmente perceptíveis em todas as estruturas. A primeira fita- β ($\beta 1$) se conecta com a segunda ($\beta 2$) pela alça alongada tanto em CiL-2, quanto em HPA (Figura 52-A e B). O comprimento da $\beta 1$ é um pouco maior na lectina algal ($^{2E-D^{13}}$) em comparação a HPA ($^{1R-C^9}$), ambas seguem para uma porção de estrutura em α -hélice que já faz parte da conexão extensa que existe nessas proteínas e é ausente em SLL-2 (Figura 52-C). Assim como $\beta 1$, a α -hélice em CiL-2 é mais alongada ($^{23P-R^{30}}$) do que HPA ($^{11D-W^{15}}$), no entanto, talvez como uma compensação estrutural na lectina de *Helix* existe uma nova estrutura β ($^{16A-V^{18}}$), porção similar à que será observada em CiL-2 estendendo a terceira fita- β ($\beta 3$) ($^{56D-E^{58}}$).

A alça alongada em si ($^{14K-R^{30}}$) em CiL-2 e ($^{10G-N^{27}}$) em HPA tem basicamente a mesma extensão, 17 e 18 resíduos, respectivamente. Evidentemente não é observada nos outros membros da família, por exemplo em SLL-2, que apresenta 6 resíduos nesta região ($^{18W-D^{23}}$) (Figura 52-C) (JIMBO *et al.*, 2005).

A fita $\beta 2$ é bem consistente em tamanho entre as três lectinas variando de 8 a 10 resíduos, e a fita $\beta 3$ varia apenas em CiL-2, apresentando a região β ($^{56D-E^{58}}$) anteriormente mencionada, separada por uma pequena estrutura de *loop* (Figura 52-A). A quarta fita- β ($\beta 4$), assim como a $\beta 2$ tem pouca variação (7 e 8 resíduos) em CiL-2 e HPA, sendo um pouco menor em SLL-2 (4 resíduos). Já a quinta fita- β ($\beta 5$), tem pouca variabilidade entre as três lectinas (9-

10 resíduos).

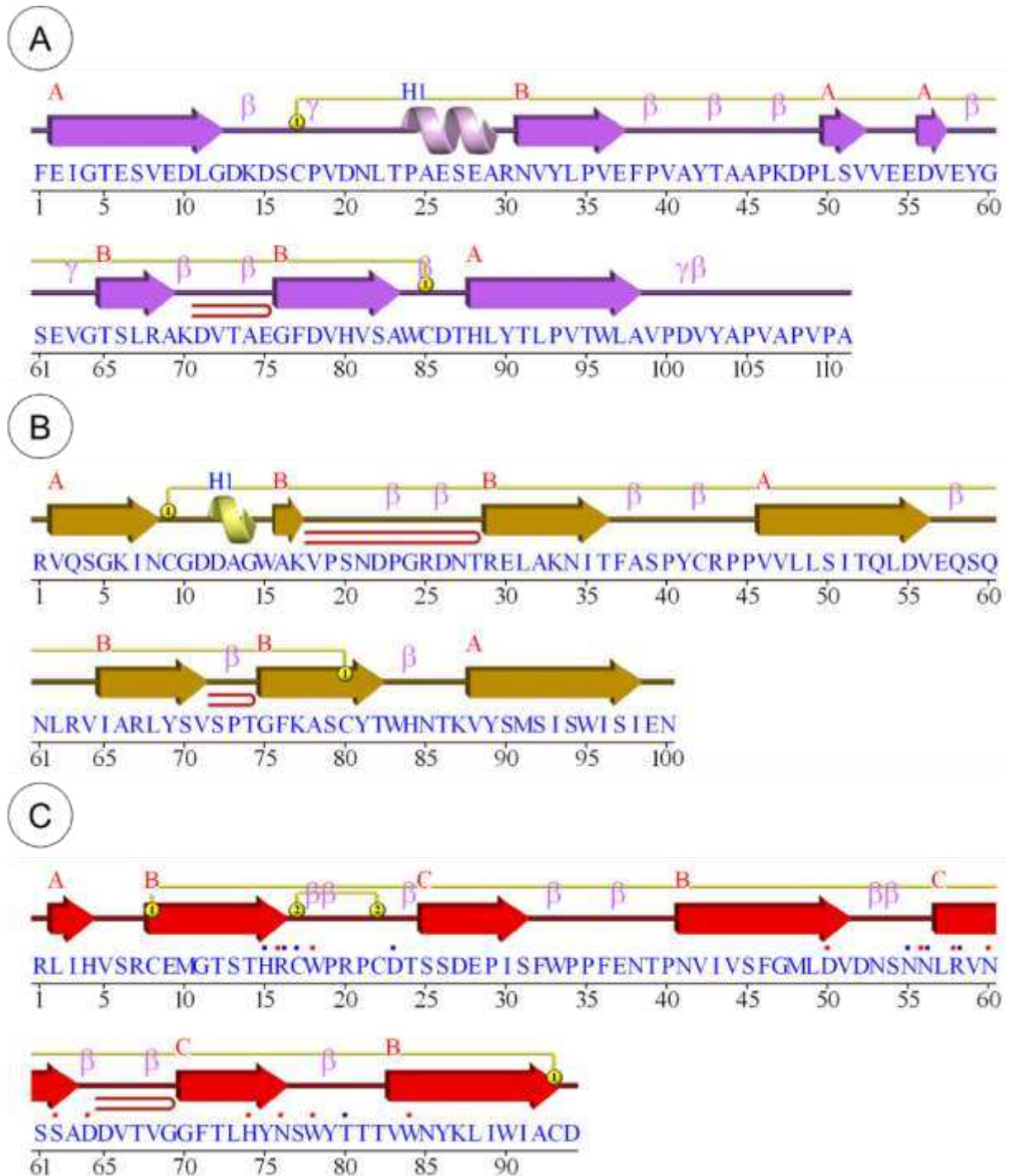
A última fita- β (β_6) é a mais longa de todas com 12-13 resíduos (12 em CiL-2), ela se encontra no centro da primeira folha- β (β_1 - β_3 - β_6) e parece ser o pilar estrutural dessa folha e da estrutura β -sanduíche. A fita β_5 ocupa o local central da segunda folha- β (β_2 - β_4 - β_5) e como visto é a outra estrutura β que menos difere entre as três estruturas.

O modelo tridimensional ainda pode fornecer informações que relacionam a estrutura primária com a secundária e assim servir para discutir a localização das pontes dissulfeto nas lectinas, e principalmente que estruturas elas estão ligando (Figura 53). Em CiL-2 a C^{17} (localizada na alça longa) conecta o local de alça entre β_1 - β_2 ao local de alça entre β_5 - β_6 , em HPA a C^9 conecta a fita β_1 com β_5 em C^{80} , e ainda apresenta C^{42} na região de *loop* entre β_2 - β_3 envolvida na oligomerização (ver a frente).

Em SLL-2 o C^{17} forma uma ponte dissulfeto com C^{22} ambas estão na alça entre β_1 - β_2 e C^8 - C^{93} conectam as fitas β_1 - β_6 . Essa análise demonstra que tanto a presença, como a função estrutural principal desses resíduos de cisteínas seguem não sendo uma característica conservada da família das lectinas do Tipo-H com esses novos membros de origem algal.

Assim como outras lectinas do Tipo-H, o servidor GalaxyWeb previu o modelo tridimensional de CiL-2 com um padrão oligomérico de um trímero, observado em todas as lectinas da família, e também um arranjo em forma de hexâmero observado em lectinas como HPA, HAA e SLL-2 (Figura 54). Esses arranjos estão de acordo com resultados de massa molecular estimados em gel de SPS-PAGE referente ao trímero e em condições nativas referente ao hexâmero (CARNEIRO *et al.*, 2020).

Figura 53 – Estruturas secundárias alinhadas com seqüências de aminoácidos de CiL-2, HPA e SLL-2.



Fonte: Autor. A – Estrutura secundária de CiL-2 alinhada a sua seqüência de aminoácidos. B – Estrutura secundária de HPA alinhada à sua seqüência de aminoácidos. C – Estrutura secundária de SLL-2 alinhada a sua seqüência de aminoácidos. Setas indicam fitas- β . Espirais indicam α -hélices. Linhas indicam alças. Numerações indicam a posição de aminoácidos na seqüência. Conexão amarela acima da estrutura indicam pontes dissulfeto. Grampos indicam β -hairpin. Pontos acima da seqüência indicam contatos com ligantes. A, B e C indicam folhas- β .

Figura 54 – Predição do padrão oligomérico de CiL-2.

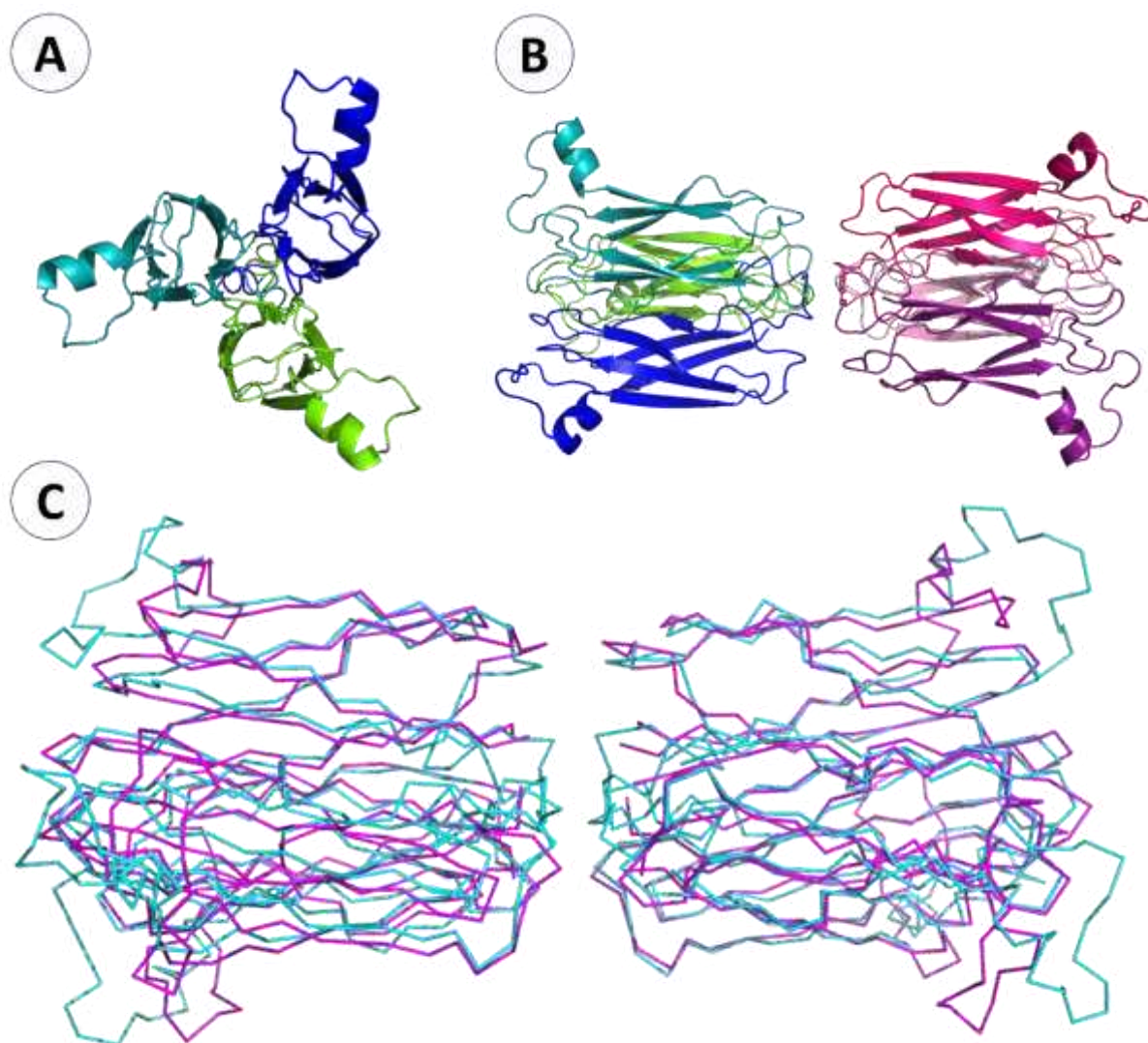


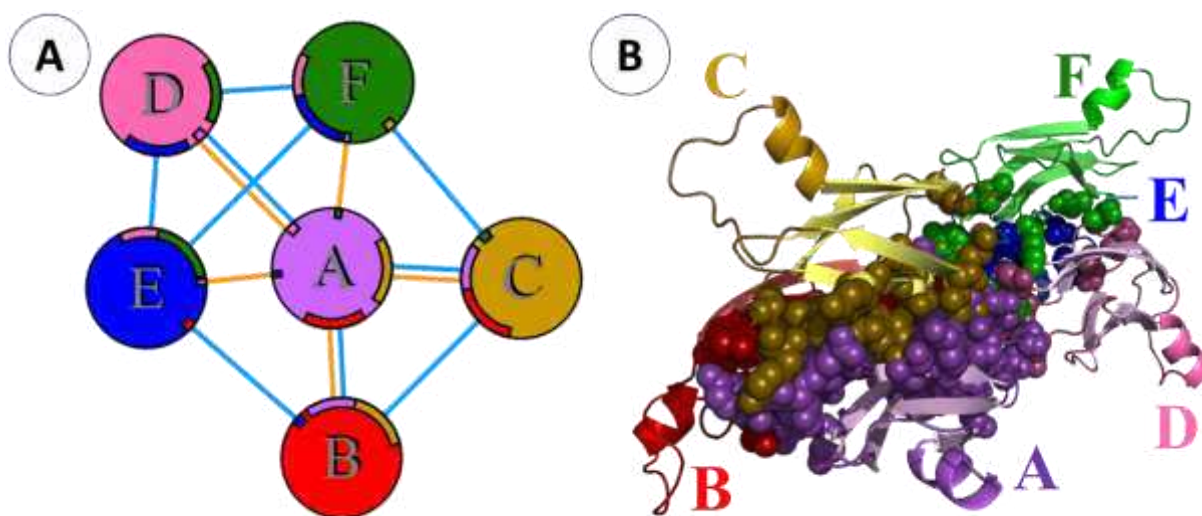
Figura: Autor. A – Padrão de trímeros de CiL-2. A proteína é representada em *cartoon* ciano, azul e verde por monômero; B – Padrão hexamérico de CiL-2. A proteína é representada em *cartoon* ciano, azul, verde, magenta, rosa e roxo; C – Alinhamento da estrutura de CiL-2 com HPA, representadas como fitas ciano e roxa, respectivamente.

Entendendo que a lectina pode obter a conformação de um hexâmero típico da família H é interessante estudar as possíveis interações que formam o contato proteína-proteína entre as cadeias afim de entender qual a configuração oligomérica mais abundante que a proteína possui na natureza. Esse conhecimento é importante, por exemplo, porque a forma de trímero dessas lectinas assumem a arquitetura de um β -trevo, que é uma dobra comum na natureza, capaz de aumentar características como simetria e número de domínios, além de se associarem a outros domínios como nas *Discoidins* (NOTOVA *et al.*, 2022). Como já evidenciado, as LOA geralmente se apresentam como monômeros, que potencializa a compactação e tamanho reduzido, no entanto, todas essas conformações oligoméricas foram

observadas em CiL-2, nas análises de massas.

Isso pode significar que a molécula pode assumir três configurações principais de oligomerização (monômero, trímero e hexâmero) e pode ser investigada em prol de se determinar qual seu estado natural predominante. CiL-2 parece ter pontes de hidrogênio envolvidas em todos os contatos que formam os trimeros, além de uma grande interface de contato (Figura 55).

Figura 55 – Diagrama químico de interações entre cadeias do padrão hexamérico de CiL-2.

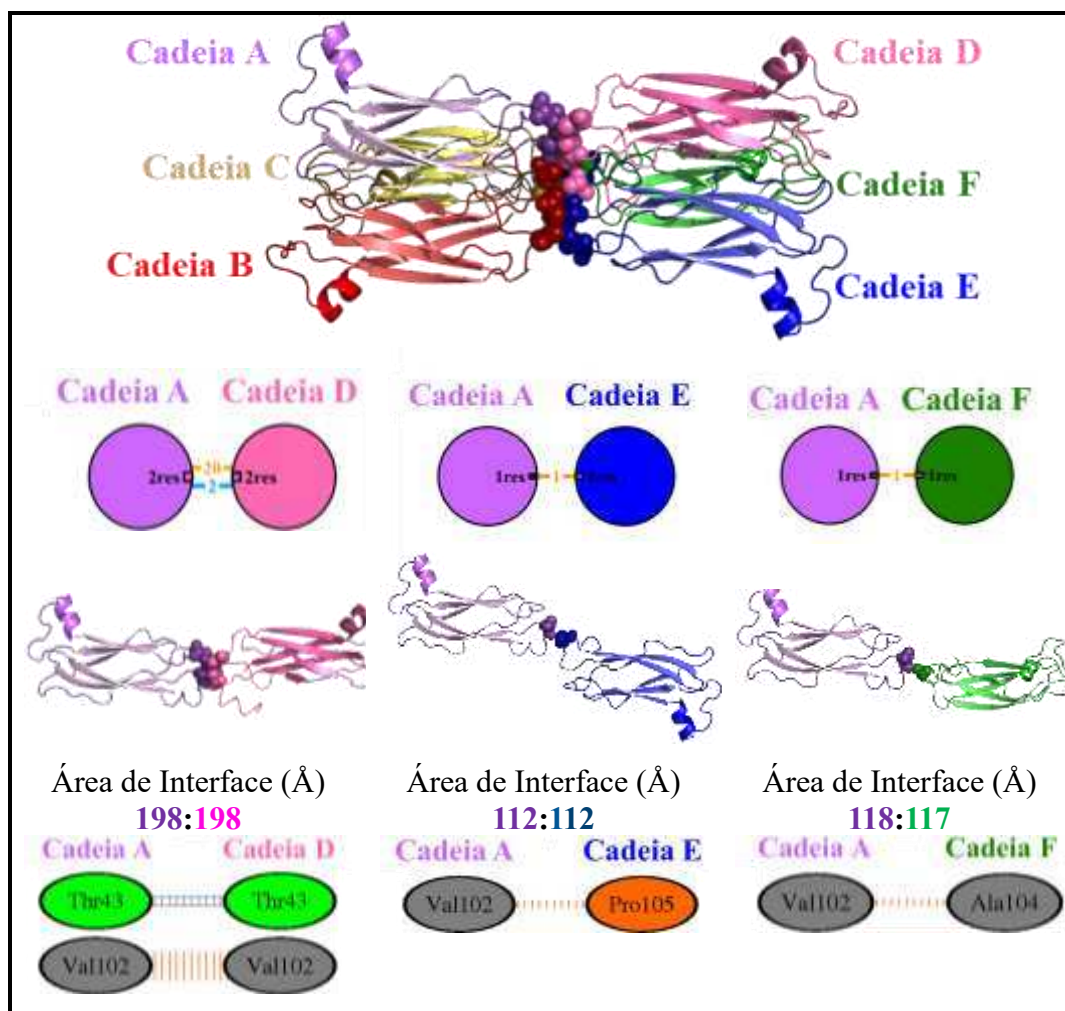


Fonte: Autor. Gerado por PDBsum. A – Círculos indicam cadeias e interação são unidas por linhas coloridas. Linhas azuis indicam ligações de hidrogênio. Linhas laranjas indicam interações não-ligantes. A área de cada círculo é proporcional à área superficial da cadeia proteica correspondente. A extensão da região de interface em cada cadeia é representada por uma cunha colorida cuja cor corresponde à cor da outra cadeia e cujo tamanho significa a área de superfície da interface. Letras indicam cadeias diferentes; B – Padrão hexamérico de CiL-2 em *cartoon* nas cores correspondentes ao diagrama (A). Letras indicam cadeias diferentes. Esferas indicam resíduos na interface de contato com outra cadeia.

Ao denominarmos um dos monômeros da proteína como “Cadeia-A” e utilizarmos como estrutura principal podemos entender melhor as interações que ocorrem na oligomerização de CiL-2. Primeiramente em relação ao trímero, a Cadeia-A se relaciona com a Cadeia-B com uma área de interface de 1.151 Å e a com a Cadeia-C com 1.236 Å, são quatro ligações com cada cadeia, no entanto, com a Cadeia-B são 677 interações não vinculadas, esse número é menor com a Cadeia-C (Figura 56). Os aminoácidos envolvidos nas ligações de hidrogênio são Val⁵⁷-Val⁶³, com duas pontes H; Lys⁴⁷-Pro¹⁰⁸ e Asp¹⁰¹-Pro¹⁰⁸ (Resíduos a esquerda: Cadeia-A/ direita: Cadeia-B). Já entre a cadeia-A e C: Val⁶³-Val⁵⁷, também formando duas pontes H; Ala¹⁰⁷-Tyr¹⁰³ e Pro¹⁰⁸-Lys⁴⁷ (Resíduos a esquerda: Cadeia-A/ direita: Cadeia-C).

não covalentes, essa não é uma característica comum a todas as lectinas do Tipo-H (ver a frente). No modelo proposto para CiL-2, existe a formação de pontes de hidrogênio apenas entre os monômeros diretamente paralelos (Cadeia-A/Cadeia-D), mas não com as outras subunidades que não estão alinhados, contudo há pelo menos uma interação entre essas cadeias (Figura 57). Dois aminoácidos, Thr⁴³ e Val¹⁰², estão envolvidas nas interações com seus correspondentes nas cadeias paralelas A e D, com duas pontes H sendo formadas entre as treoninas. A Valina na posição 102 na cadeia-A interage com sua correspondente na cadeia-D e com Pro¹⁰⁵ da cadeia-E e a Ala¹⁰⁴ da cadeia-F (Figura 57).

Figura 57 – Diagrama de interações entre cadeias do hexâmero de CiL-2.

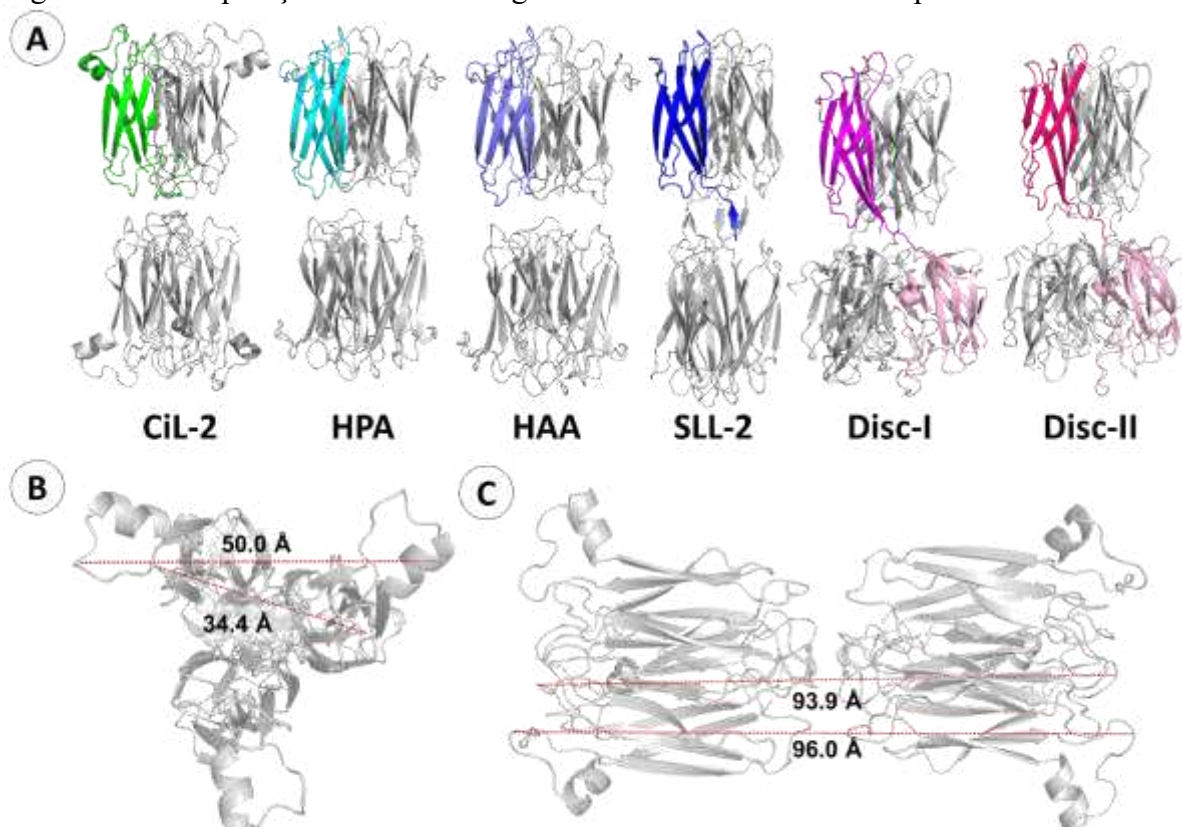


Fonte: Autor. Gerado por PDBsum. Linhas azuis indicam ligações de hidrogênio. Linhas laranjas indicam interações não-ligantes. O número de linhas de ligação H entre quaisquer dois resíduos indica o número de potenciais ligações de hidrogênio entre eles. Para contatos não-ligantes, que podem ser abundantes, a largura da linha listrada é proporcional ao número de contatos atômicos. Resíduos: azul-carregados positivamente; vermelho-carregados negativamente; verde-neutros; cinza-alifáticos; roxo-aromáticos; laranja-Pro e Gly; amarelo-cisteína.

CiL-2 parece seguir o mesmo padrão das lectinas da família H tanto na conformação oligomérica como nas dimensões (Figura 58). As proteínas da família H com estrutura

tridimensional elucidada apresentam-se em um hexâmero em forma de bastonete com cerca de 100 Å de comprimento e cerca de 35–45 Å de diâmetro, CiL-2 possui cerca de 96 Å entre as alças mais alongadas de cadeias paralelas e cerca de 34.4 Å de diâmetro médio e chega a 50 Å considerando a extensão das alças (Figura 58-B e C).

Figura 58 – Comparação das estruturas gerais de CiL-2 e lectinas do Tipo-H.



Fonte: Autor. A – Estruturas gerais do padrão oligomérico de CiL-2, HPA, HAA, SLL-2, Disc-I e Disc-II. Monômeros de CiL-2, HPA, HAA e SLL-2 em *cartoon* verde, ciano, roxo claro e azul, respectivamente. Domínio tipo lectina de Disc-I e II em *cartoon* magenta e vermelho, respectivamente. Domínio tipo *discoidin* de Disc-I e II em *cartoon* rosa. Demais monômeros que formam os oligômeros estão em *cartoons* cinzas; B – Estimativa do diâmetro de CiL-2 em *cartoon* cinza claro; C – Estimativa do comprimento de CiL-2 em *cartoon* cinza claro.

As Disc. I e II consistem em dois domínios, um domínio N-terminal Tipo-*discoidin* e um domínio C-terminal tipo lectina-like do tipo-H. A conservação estrutural entre as cinco lectinas e CiL-2 parece ser alta em todas as conformações para o monômero e na oligomerização considerando a distância dos organismos, apesar de existir um número reduzido de estruturas resolvidas (PIETRZYK-BRZEZINSKA; BUJACZ, 2020).

Uma característica estrutural interessante observada nessas moléculas em comparação com CiL-2 são as conexões entre os trímeros que podem ser por interações covalentes ou não-covalentes entre cada dois monômeros. Como discutido, a lectina de *Codium* parece se envolver na formação de um dímero de trímeros, considerando as poucas interações

não-covalentes nessa ligação e a frequente observação da massa correspondente a três monômeros em SDS-PAGE (Figura 33). A maioria dos resíduos envolvidos nessa conexão pertencem ao C-terminal da lectina (Val¹⁰², Ala¹⁰⁴ e Pro¹⁰⁵), entre os demais membros da família H a lectina SLL-2 também se observa a utilização da extremidade da cadeia para a formação do hexâmero (KITA *et al.*, 2017) (Figura 59).

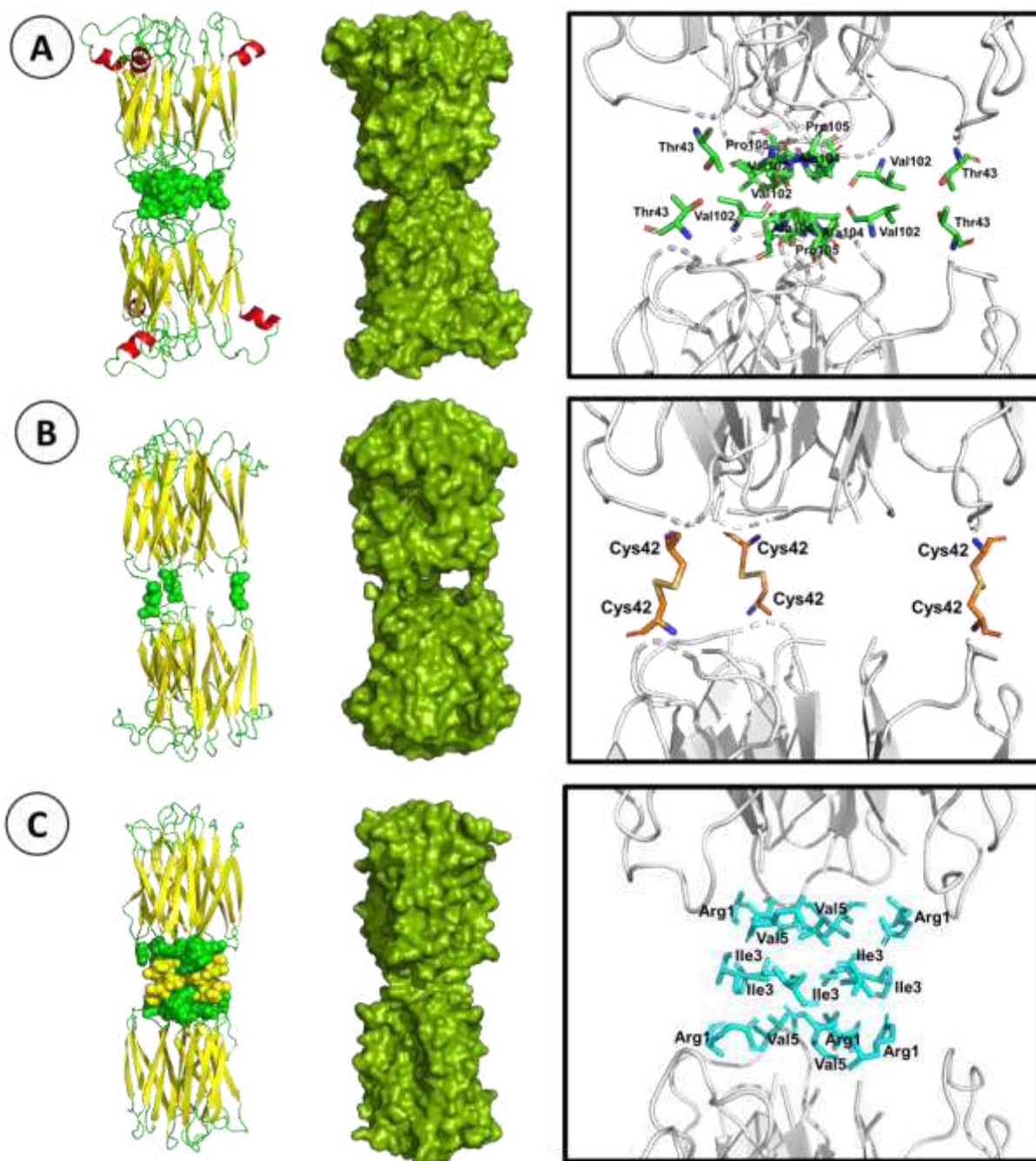
A proteína SLL-2 utiliza ainda mais resíduos nessa interação e provavelmente CiL-2 se comporte de forma ainda mais similar na sua conformação determinada com a lectina do octocoral, apesar da ocupação espacial já ser bastante semelhante entre as duas. No entanto, CiL-2 também utiliza o resíduo Thr⁴³ para a manutenção dessa forma e essa configuração é bastante similar com as lectinas de caramujos, apesar de nessas moléculas serem formadas pontes dissulfeto aonde podem ser consideradas como trímeros de dímeros, já que a ligação forte entre Cys⁴² ocorre nesse lugar (SANCHEZ *et al.*, 2006). A similaridade ocorre porque o lugar onde existe a ponte SS em HPA e HAA é formada as duas ligações de hidrogénio em CiL-2.

Dessa forma, CiL-2 parece usar uma estratégia de oligomerização entre o que ocorre em SLL-2 e nas lectinas dos gastrópodes, utilizando ligações de hidrogênio para compensar o menor envolvimento de seu C-terminal na ligação de trímeros.

4.5.1 Caracterização do sítio de ligação a carboidratos

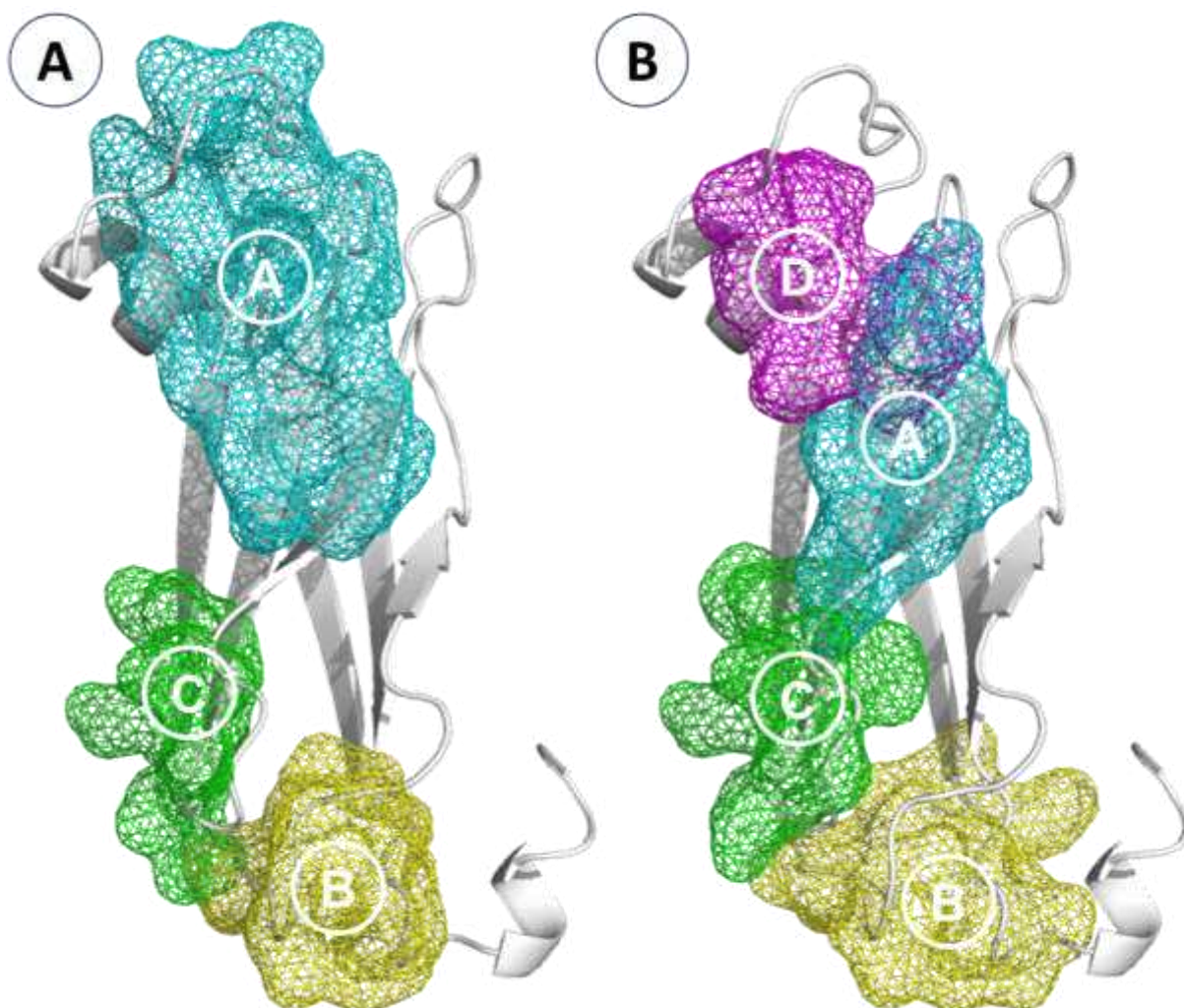
O principal sítio de ligação das lectinas Tipo-H é bem preservado nas proteínas de invertebrados. A fim de investigar essa conservação em CiL-2 os sítios de ligação de carboidratos mais confiáveis na estrutura da lectina foram identificados pela ferramenta DogSiteScorer e DogSite3, que são métodos baseados em grade que usa uma diferença de filtro Gaussiano para detectar potenciais bolsas de ligação baseando-se na estrutura tridimensional da proteína, com DogSite3 podendo ainda utilizar viés de ligante (GRAEF; EHRT; RAREY, 2023; VOLKAMER *et al.*, 2012). Para a predição utilizando um viés foi utilizado monossacarídeo α -GalNAc, que é o principal ligante da família H e inibidor de CiL-2. O local de cada sítio é mostrado na Figura 60 e os dados para cada um estão resumidos na Tabela 9.

Figura 59 – Análise da interação dos trimeros em CiL-2, HPA e SLL-2.



Fonte: Autor. A – Interação entre os trimeros de CiL-2. CiL-2 em *cartoon* nas cores verde, amarela e vermelha. Resíduos em contato entre trimeros como esferas. CiL-2 com superfície em verde musgo. Local do contato entre trimeros de CiL-2 em *cartoon* branco com resíduos envolvidos em verde; B – Interação entre os trimeros de HPA. HPA em *cartoon* nas cores verde e amarela. Resíduos em contato entre trimeros como esferas. HPA com superfície em verde musgo. Local do contato entre trimeros de HPA em *cartoon* branco com resíduos envolvidos em laranja; C – Interação entre os trimeros de SLL-2. SLL-2 em *cartoon* nas cores verde e amarela. Resíduos em contato entre trimeros como esferas. SLL-2 com superfície em verde musgo. Local do contato entre trimeros de SLL-2 em *cartoon* branco com resíduos envolvidos em azul. Para fins de clareza, alguns resíduos e interações envolvidos no contato entre trimeros foram omitidos

Figura 60 – Predição de sítios de ligação a carboidratos de CiL-2.



Fonte: Autor. A – Predição de sítios de ligação a carboidratos de CiL-2. Estrutura de CiL-2 em *cartoon* branco. Sítios de ligação a carboidratos A, B e C com superfícies em estruturas de arame nas cores azul, amarela e verde, respectivamente. Resíduos que compõem cada sítio estão descritos na Tabela 9 (Abaixo); B - Predição de sítios de ligação a α -GalNAc de CiL-2. Estrutura de CiL-2 em *cartoon* branco. Sítios de ligação a α -GalNAc A, B, C e D com superfícies em estruturas de arame nas cores azul, amarela, verde e magenta, respectivamente. Resíduos que compõem cada sítio estão descritos na Tabela 9 (Abaixo).

Tabela 10 – Resumo das características dos sítios de ligação a carboidratos de CiL-2 preditos.

(Continua)

Sítio	Ligante	Volume (\AA^3)	Superfície (\AA^2)	Profundidade (\AA)	Score Drog.	Aminoácidos
A	Geral	481.41	1004.56	-	0.70	¹⁰ DLGD ¹³ , ¹⁶ SCPVD ²⁰ , L ²² , ²⁶ ES ²⁷ , ²⁹ ARN ³¹ , ⁶⁶ SLR ⁶⁸ , K ⁷⁰ , ⁸⁰ HVSAWCDT ⁸⁷
B	Geral	201.34	587.39	-	0.49	¹ FE ² , ⁴⁰ VAYTAAP ⁴⁶ , ⁹⁹ VPDVY ¹⁰³
C	Geral	156.48	474.73	-	0.00	³⁵ PVEF ³⁸ , ⁴⁰ VA ⁴¹ , D ⁷¹ , T ⁷³ , ⁷⁵ EGFD ⁷⁸
A- α	α -GalNAc	43.52	294.9	5.06	-	S ⁶⁶ , R ⁶⁸ , K ⁷⁰ , S ⁸² , W ⁸⁴
B- α	α -GalNAc	65.54	307.52	7.55	-	¹ FE ² , ⁴⁰ VAYT ⁴³ , P ¹⁰⁰ , ¹⁰² VY ¹⁰³

Tabela 10 – Resumo das características dos sítios de ligação a carboidratos de CiL-2 preditos. (Conclusão)

Sítio	Ligante	Volume (Å ³)	Superfície (Å ²)	Profundidade (Å)	Score Drog.	Aminoácidos
C-α	α-GalNAc	48.64	302.34	4.73	-	³⁵ PVE ³⁷ , D ⁷¹ , T ⁷³ , ⁷⁵ EGFD ⁷⁸
D-α	α-GalNAc	46.08	232.85	5.88	-	L ²² , S ²⁷ , ³⁰ RN ³¹ , ⁸² SAW ⁸⁴

Fonte: Autor. Dados gerados por DogSiteScorer e DogSite3. *Score* Drog. – Potencial de drogabilidade.

Três sítios independentes de ligação foram preditos (A, B e C), sendo que o sítio A ainda pode ser dividido quando ligado a unidades mais simples, como α-GalNAc (A-α e D-α). Os sítios A e C estariam disponíveis na forma hexamérica da lectina, no entanto, o sítio B seria mais bem exposto nas formas monomérica, dimérica e trimérica. O sítio A ou D-α teriam o auxílio da alça longa nos aminoácidos L²², S²⁷, R³⁰ e N³¹, algo similar ao que acontece nas lectinas HPA e HAA (PIETRZYK *et al.*, 2015; SANCHEZ *et al.*, 2006).

Os sítios A e B também apresentaram potencial de drogabilidade ou *Druggability*, que seria a capacidade de um bolsão de proteína de se ligar a moléculas semelhantes a fármacos (AGONI *et al.*, 2020). Essa característica dos sítios pode ser prevista por ferramentas de bioinformática e hoje vem sendo uma das bases para descoberta de novos fármacos (RAIES *et al.*, 2022).

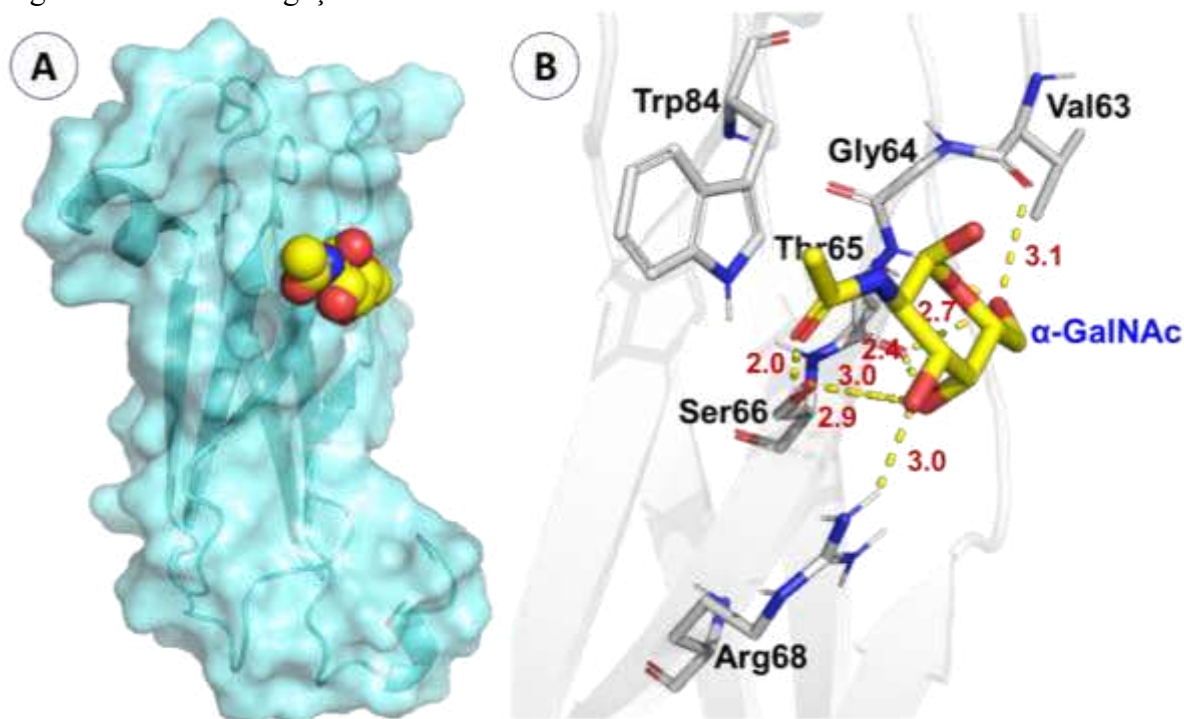
Como visto, as lectinas de algas relacionadas possuem as regiões ¹¹LGD¹³ e ¹⁶SCPV¹⁹ altamente conservadas (Figura 42) e essas regiões não são conservadas em lectinas do tipo-H de outros organismos (Figura 44). Esses resíduos correspondem ao previsto sítio A, o que pode indicar que esse sítio de ligação pode ser próprio das lectinas oriundas de algas que pertencem a essa família vinculada a necessidades desses organismos.

O acoplamento dos estereoisômeros α- e β-GalNAc foi realizado por GalaxyWeb e o local de contato corresponderia aos sítios A e A-α. Todos os sítios encontram-se na segunda folha-β, o que pode significar como observado na análise da topografia, que a primeira folha-β incluindo a fita-β6 que parece ser o pilar mais conservado da proteína, funciona como a base estrutural formando o núcleo da lectina quando na forma de β-trevo e de hexâmero. Deixando assim, a segunda β-folha como face disponível para o contato com ligantes.

Em CiL-2, os resíduos que compõe os sítios de contato com os carboidratos foram: E⁶², V⁶³, G⁶⁴, T⁶⁵, S⁶⁶, R⁶⁸, W⁸⁴ e C⁸⁵ (Figura 61) e (Figura 62). Esse sítio está muito próximo em conservação de local do que geralmente é observado em lectinas do Tipo-H (D⁵⁵, N/Q⁶¹, R⁶³, W⁸³, Y⁸⁹, H⁸⁴), no caso, os principais aminoácidos em comum são aqueles substituídos discutidos na análise da estrutura primária (E⁶², G⁶⁴, C⁸⁵). O único aminoácido completamente

conservado é o W⁸⁴. Como já destacado, o triptofano é um aminoácido importantíssimo em sítios de ancoragem de moléculas devido suas características físico-químicas e sendo conservado em outras famílias de lectinas nos locais de contato com ligantes, na verdade, é evidenciado como um dos resíduos mais importantes na ligação a carboidratos (SOUSA, 2021).

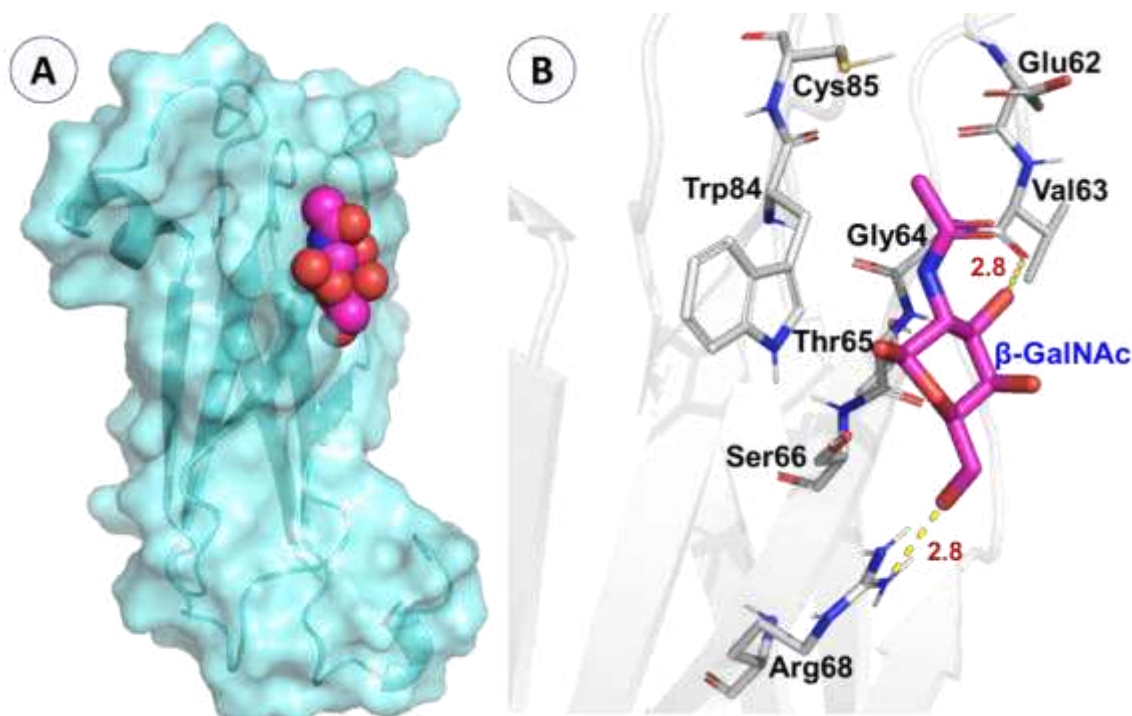
Figura 61 – Sítio de ligação do monossacarídeo I de CiL-2.



Fonte: Autor. A – Local do sítio de ligação a α -GalNAc na estrutura geral de CiL-2 em *cartoon* e superfície com transparência de 40% em ciano. Ligante α -GalNAc representado em esferas amarelas; B – Coordenação de α -GalNAc no sítio de ligação de CiL-2. Estrutura de CiL-2 representada em *cartoon* branco com transparência de 40%, resíduos envolvidos na coordenação do monossacarídeo representados em bastões cinzas. Ligante α -GalNAc representado em bastões amarelos. As interações moleculares são representadas em angstroms por linhas tracejadas amarelas.

Os aminoácidos D⁵⁵ e Y⁸⁹ só se juntam ao sítio das lectinas do Tipo-H quando analisamos a molécula oligomerizada em pelo menos um dímero (duas partes do trímeros), pois o sítio dessas lectinas é formado por resíduos pertencentes a dois monômeros vizinhos ((N/Q⁶¹, R⁶³, W⁸³, H⁸⁴) / (D⁵⁵, Y⁸⁹)). A análise do local de ligação do oligômero não foi realizada nesse trabalho, o que abre precedente para uma conservação completa do principal local de contato conservado dessa família em CiL-2.

Figura 62 – Sítio de ligação do monossacarídeo II de CiL-2.



Fonte: Autor. A – Local do sítio de ligação a β -GalNAc na estrutura geral de CiL-2 em *cartoon* e superfície com transparência de 40% em ciano. Ligante β -GalNAc representado em esferas magentas; B – Coordenação de β -GalNAc no sítio de ligação de CiL-2. Estrutura de CiL-2 representada em *cartoon* branco com transparência de 40%, resíduos envolvidos na coordenação do monossacarídeo representados em bastões cinzas. Ligante α -GalNAc representado em bastões magentas. As interações moleculares são representadas em angstroms por linhas tracejadas amarelas.

Todos os aminoácidos correspondentes a um monômero foram observados no sítio de CiL-2 (E^{62} , G^{64} , W^{84} e C^{85}) o que indica que possivelmente seu complemento (D^{56} e Y^{90}) também deve fazer parte do sítio dessa lectina. Juntamente com W na posição 84, os dois aminoácidos D e Y são altamente conservados nas lectinas da família (Figura 43). Diferentemente da maior parte do sítio observada para CiL-2, que está sobre a segunda folha- β que está voltada para fora em relação ao hexâmero, o complemento (D^{56} / Y^{90}) está sobre a primeira folha- β que é a região que cria o núcleo da forma oligomerizada da lectina.

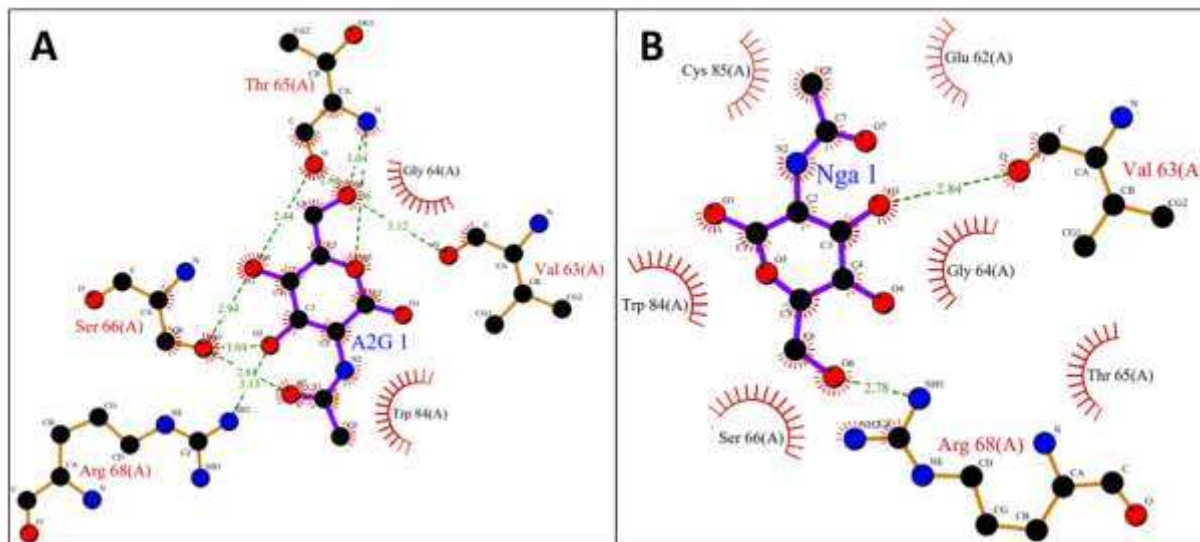
O sítio da proteína para α -GalNAc (V^{63} , G^{64} , T^{65} , S^{66} , R^{68} e W^{84}) difere ao observado nos outros membros pelo acréscimo dos resíduos V-T-S-R todos pertencentes a fita β_4 e parecem formar uma estrutura no bolsão de acoplamento que melhor acomoda o monossacarídeo (Figura 61). Essa ancoragem envolve várias ligações de hidrogênio e outras interações não-ligantes entre os resíduos do sítio e a estrutura de α -GalNAc.

Com relação a ligação de CiL-2 com β -GalNAc, o sítio observado foi: E^{62} , V^{63} , G^{64} , T^{65} , S^{66} , R^{68} , W^{84} e C^{85} (Figura 62). Os resíduos requeridos para esse contato foram os mesmos utilizados para α -GalNAc com o acréscimo de E e C nos posicionamentos correspondentes a N

e R em outras lectinas do tipo-H.

A Figura 63 permite observar melhor as interações que ocorrem nos acoplamentos proteína-ligante previstos.

Figura 63 – Diagrama de interações dos sítios de ligação a monossacarídeos de CiL-2.



Fonte: Autor. Gerado por PDBsum. A – Diagrama de interações do sítio de ligação a α -GalNAc; B – Diagrama de interações do sítio de ligação a β -GalNAc. Linhas roxas indicam estrutura do ligante. Linhas marrons indicam estrutura de aminoácido. Tracejados verdes indicam ligações de hidrogênio e seu comprimento em angstroms. Estruturas em pente semicircular indicam resíduos não-ligantes envolvidos em interações hidrofóbicas. Círculos: carbono em preto, oxigênio em vermelho e nitrogênio em azul.

As lectinas do tipo-H baseiam suas interações com estruturas Gal/GalNAc e derivados pelas ligações de hidrogênio entre resíduos dos seus sítios de ligação e o oxigênio O4 axial característico desses carboidratos (PIETRZYK-BRZEZINSKA; BUJACZ, 2020). Em GalNAc seu O4 interage com a cadeia lateral do aspartato e da arginina do sítio conservado da família para HPA, SLL e Disc I (D^{55} e R^{63} em HPA), já em CiL-2 o O4 interage por pontes de hidrogênio com o oxigênio da carboxila da T^{65} e com a cadeia lateral da S^{66} para α -GalNAc, realmente nessa ancoragem o O4 parece exercer maior interação com sítio graças a sua orientação que o coloca voltado para fundo bolsão do sítio (Figura 61). O triptofano também exerce ligação de H com o O4 de α -GalNAc em HPA e SLL-2, já em CiL-2 o W^{84} exerce interações hidrofóbicas sobre o ligante auxiliando em sua acomodação.

Algumas modificações de interação ocorrem em Disc I devido a orientação que o ligante apresenta no sítio, formando algumas ligações com O3 com seu resíduo de aspartato. Aqui é relatado os contatos entre O3 de α -GalNAc com as cadeias laterais da S^{66} e R^{68} e com O3 de β -GalNAc com a carboxila da V^{63} (MATHIEU *et al.*, 2010). Ainda existe uma ligação conservada entre o O5 anel da estrutura de GalNAc com a cadeia lateral da arginina (R^{63} em

HPA), esse mesmo O5 forma uma ligação hidrogênio com o nitrogênio da amina da T⁶⁵ em CiL-2.

Além dessas, o sítio de CiL-2 ainda forma mais duas pontes de hidrogênio entre o O7 do substituinte do carbono C2 com a cadeia lateral da S⁶⁶ e entre o O6 com o nitrogênio da amina da T⁶⁵ para α -GalNAc e com a forma β do açúcar entre este O6 com a cadeia lateral da R⁶⁸. Os sítios de ligação dessas lectinas também apresentam várias interações hidrofóbicas importantes, por exemplo, em SLL-2 há um contato semelhante ao observado em CiL-2 entre GalNAc e o triptofano, no caso, formando interações de *van der Waals* com o anel aromático do aminoácido (KITA *et al.*, 2017).

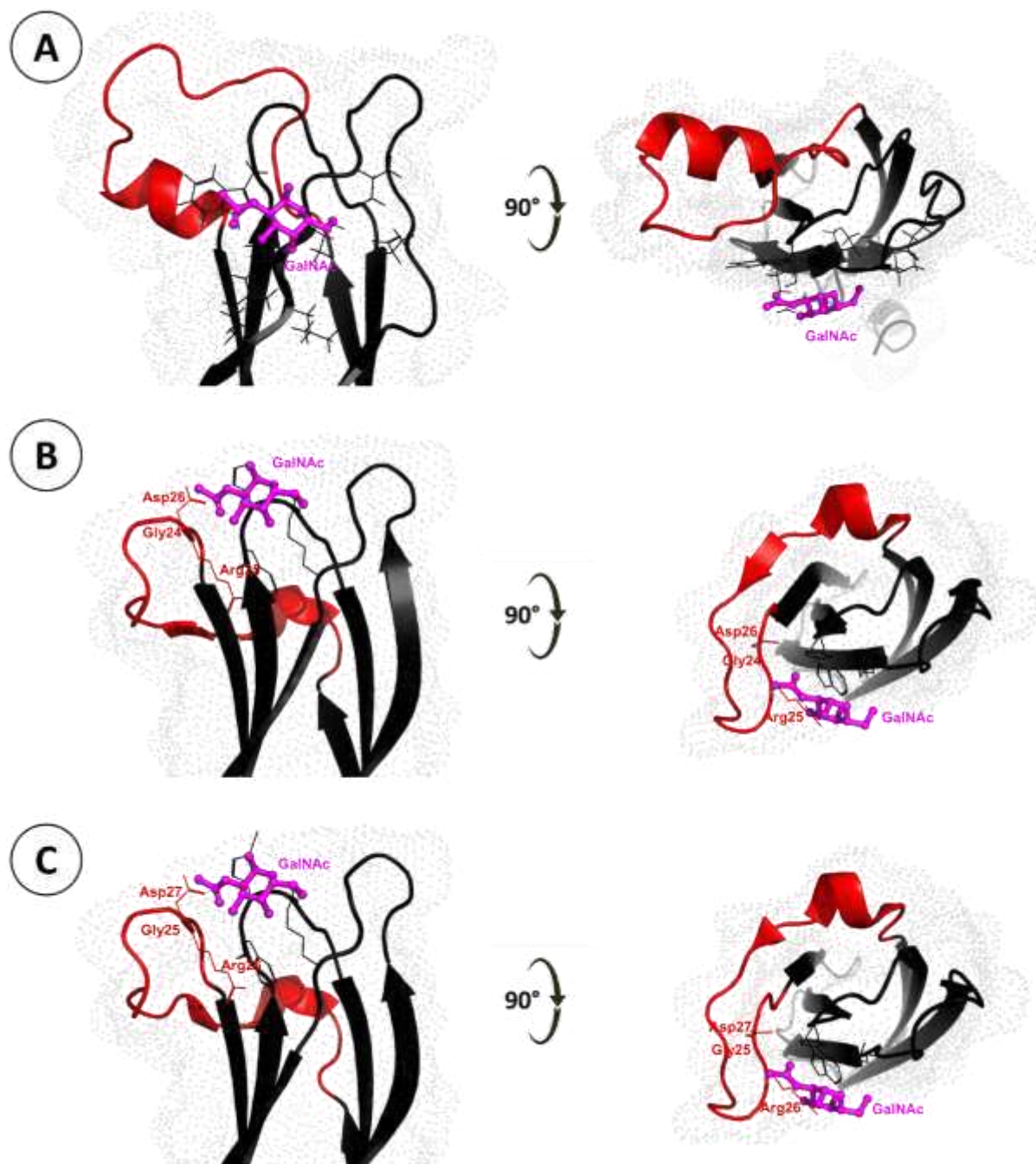
Essa investigação inicial da ligação de CiL-2 pelos anômeros α - e β - de GalNAc é importante porque, lectinas do tipo-H diferem em sua especificidade por essas formas. As lectinas de caramujo, HPA e HAA, e de coral a SLL-2 ligam-se especificamente a α -GalNAc, já as *discoidins* reconhecem ambos os anômeros (PIETRZYK-BRZEZINSKA; BUJACZ, 2020).

Assim como em CiL-2, outros resíduos fora do sítio conservado também exercem importantes interações com os ligantes analisados e formam os sítios próprios de outros membros da família H, são os casos de W¹⁸ em SLL-2 e dos três resíduos (G²⁴, R²⁵, D²⁶ em HPA; G²⁵, R²⁶, D²⁷ em HAA) que pertencem a alça estendida entre as fitas β 1- β 2 e formam ligações de hidrogênio com o anel de oxigênio O3 e oxigênio O7 do grupo *N*-acetil de GalNAc e aumentam a especificidade dessas lectinas a GalNAc.

Apesar de CiL-2 também apresentar uma alça alongada sua participação na interação com o monossacarídeo GalNAc não foi observado nessa lectina (Figura 64). Como observado nos possíveis sítios (Figura 60) da lectina, o sítio A é um bolsão mais estendido com volume de 481.41 Å³ e superfície de 1004.56 Å² que pode ser usado por estruturas mais complexas, como as mucinas reconhecidas por CiL-2 (CARNEIRO *et al.*, 2020).

As mucinas encaixam-se perfeitamente nos tipos de resíduos de açúcares específicos da família de lectinas do tipo-H, pois são formadas por cadeias de *O*-glicanos, ricamente constituídos por resíduos GalNAc e terminais Gal/GalNAc (HANSSON, 2020). As mucinas são moléculas altamente importantes porque são frequentemente expressas em tecidos vinculados a muitas doenças e membranas de diversos patógenos, e já que o reconhecimento de glicopeptídeos contendo GalNAc é determinado por certos aminoácidos comuns e por ligações de hidrogênio, assim como ocorre no sítio de CiL-2, é possível e cada vez mais realizado a busca por biomoléculas que identificam moléculas com essas características estruturais observadas nas mucinas (SANZ-MARTINEZ *et al.*, 2023).

Figura 64 – Participação da alça alongada no sítio de ligação a carboidratos de CiL-2, HPA e HAA.



Fonte: Autor. A – Interação da alça alongada de CiL-2 com α -GalNAc; B – Interação da alça alongada de HPA com α -GalNAc; C – Interação da alça alongada de HAA com α -GalNAc. Estrutura das lectinas CiL-2, HPA e HAA representadas em *cartoon* preto com superfície em pontos com transparência de 50%. Estrutura das alças estendidas representadas em *cartoon* vermelho. Resíduos envolvidos no contato com ligante pertencentes a alça longa representados em linhas vermelhas. Resíduos envolvidos no contato com ligante não pertencentes a alça longa representados em linhas pretas. Ligante α -GalNAc representado em bastões e esferas em magenta. Visões laterais e superiores.

De acordo com os dados apresentados, é possível hipotetizar que o sítio A (Figura

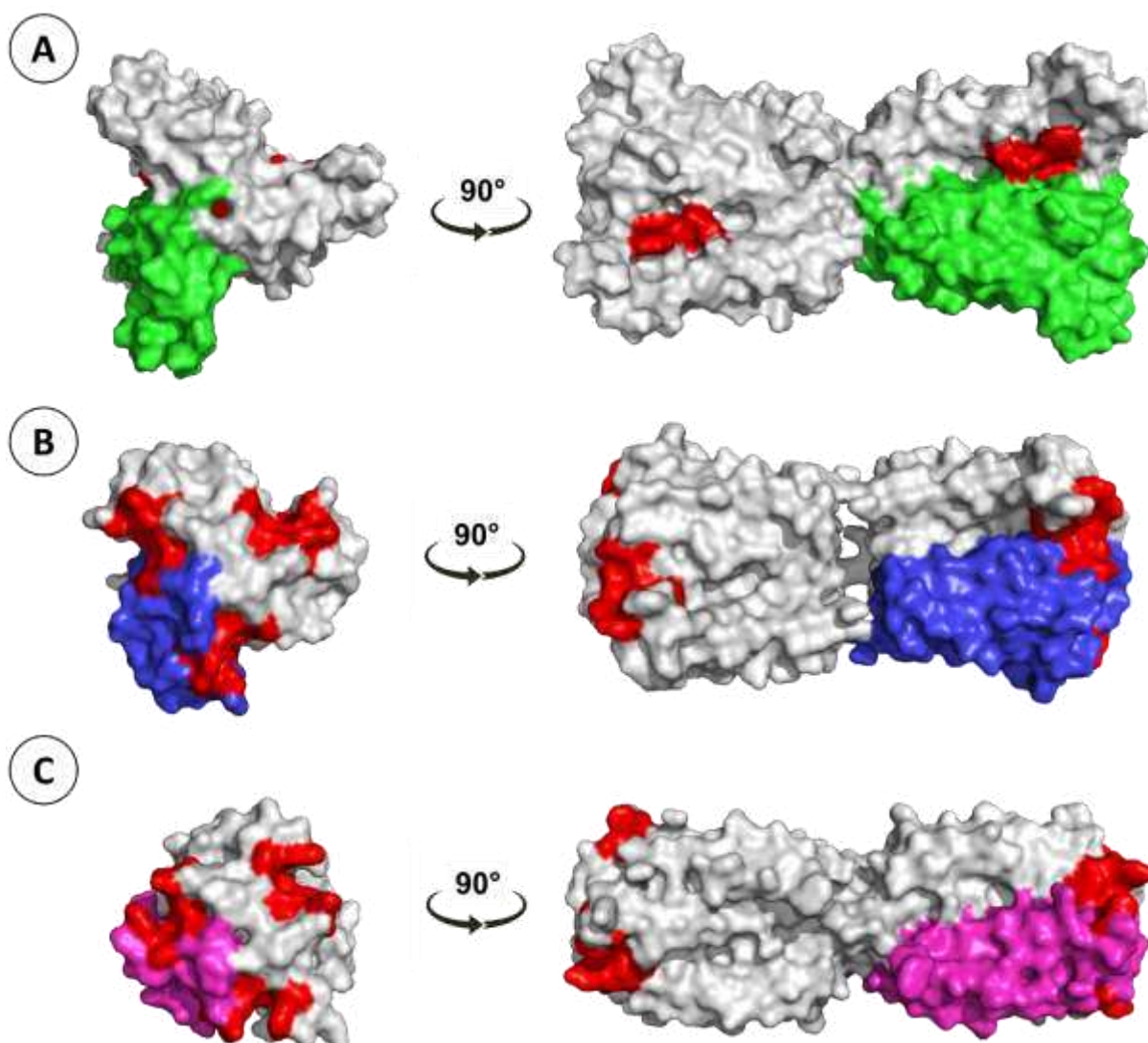
60) seja funcional e o principal local de ligação com estruturas glicídicas mais complexas como glicoproteínas observadas com capacidade inibitória (mucina) e outros polissacarídeos, assim sendo, utilizando toda sua totalidade e tendo resíduos de sua alça alongada atuando sobre os ligantes, visto sua conformação fortificada pela ponte dissulfeto (Figura 51) e sua função nas lectinas tipo-H de caramujos, e dessa forma tendo o seu sítio possuindo características observadas nessa família de lectinas e também comuns em LOA, no caso, o bolsão estendido, como nas lectinas da família OAAH e que também é teorizado na sua “lectina-irmã” CiL-1 (CARNEIRO *et al.*, 2020; CHAVES *et al.*, 2023). Além disso, como visto nos resultados de ancoragem para GalNAc, esse sítio seria funcional para estruturas simples, sendo utilizado por um ou mais monômeros de sacarídeos por vez (Figura 60-B).

Essas informações prévias de possíveis locais de contato com os carboidratos são importantes para, por exemplo, cálculos de *docking* molecular que é uma interessante ferramenta para revelar potenciais fármacos e identificar melhores ligantes que podem ser utilizados em ensaios de cristalografia (STANZIONE; GIANGRECO; COLE, 2021). Investigações futuras podem explorar melhor essas possíveis interações nesse sítio visto o seu potencial de atuar em processos de diagnóstico de doenças e biomarcação de moléculas.

Existem seis sítios de ligação de carboidratos por hexâmero em HPA, HAA e SLL-2 (um sítio por cadeia monômero). As cavidades de ligação estão localizadas nas extremidades das estruturas em forma de haste (três locais em cada extremidade), em CiL-2 os mesmos três sítios estão localizados um pouco abaixo das extremidades (Figura 65).

Os resíduos de asparagina/glutamina e arginina (N⁶¹ e R⁶³ em HPA) pertencentes à extremidade da fita β 4 e os resíduos E⁶² e G⁶⁴ seus correspondentes em CiL-2 estão localizadas no mesmo local, os resíduos de triptofano e histidina estão localizados no final de β 5 (W⁸³ e H⁸⁴ em HPA) mesma localização dos correspondentes W⁸⁴ e C⁸⁵ em CiL-2, e os dois resíduos da cadeia vizinha, aspartato e tirosina (D⁵⁵ e Y⁸⁹ em HPA), pertencentes às extremidades de β 3 e β 6, respectivamente, as quais corresponderiam aos resíduos D⁵⁶ e Y⁹⁰, o que ressalta a possibilidade de sua participação no sítio. Essas similaridades evidenciam novamente a conservação estrutural entre CiL-2 e HPA, e o fato do sítio ao monossacarídeo se encontrar em uma região menos extrema da haste hexamérica se da por conta da maior extensão vertical da alça alongada em CiL-2 (Figura 64).

Figura 65 – Local de ligação do monossacarídeo nos oligômeros de CiL-2, HPA e SLL-2.



Fonte: Autor. A – Local de ligação a GalNAc do hexâmero de CiL-2; B – Local de ligação a GalNAc do hexâmero de HPA; C – Local de ligação a GalNAc do hexâmero de SLL-2. Os sítios de ligação de CiL-2, HPA e SLL-2 são representados em superfície em cor vermelha. Os monômeros de CiL-2, HPA e SLL-2 são representados em superfície em cores verde, azul e magenta, respectivamente. Os demais monômeros que constituem as formas oligoméricas são representados por superfícies em cor cinza. Visões superiores e laterais.

4.6 Predição de função

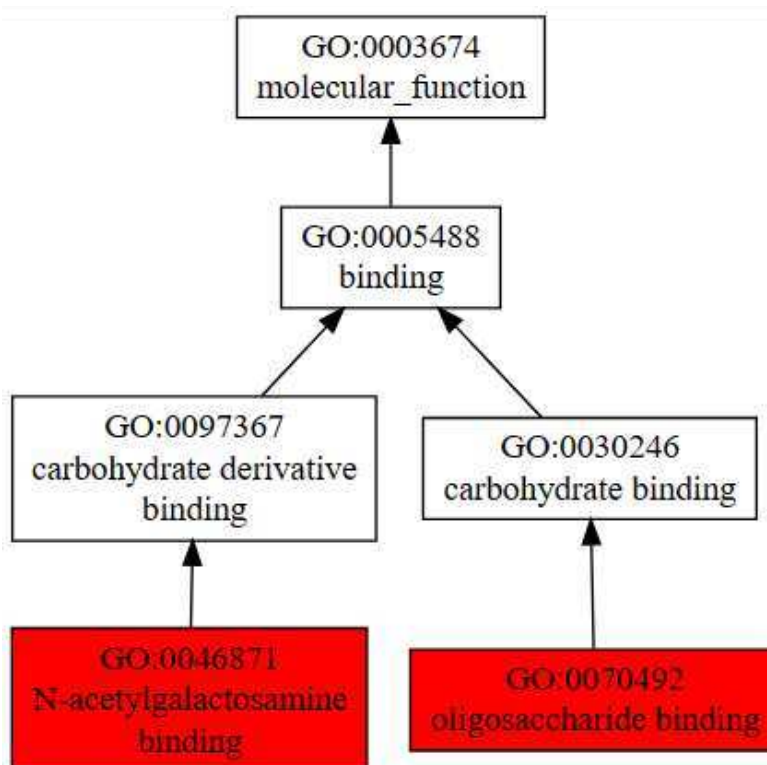
Informações sobre a função molecular, processo biológico e a localização de CiL-2 no compartimento celular foram previstas pelo servidor C-I-TASSER. O programa utilizou a lectina HPA como *template*, por ser a proteína mais similar estruturalmente de CiL-2, com um TM-score de 0.87, RMSD de 0.79 e Cov de 0.901 (ZHENG *et al.*, 2021). Os valores TM-score e o RMSD são usados para medir a similaridade estrutural entre modelos, onde o TM-score varia de 0 a 1, sendo quanto mais próximo de 1 e maior que 0,5 é o ideal indicando uma correspondência perfeita entre duas estruturas. Já o Cov é a cobertura de alinhamento,

sendo igual ao número de resíduos estruturalmente alinhados dividido pelo comprimento da proteína de consulta, sendo quanto mais próximo de 1 mais confiável (YANG; ZANG, 2015). Assim, todos os parâmetros confirmam uma boa similaridade e confiança entre as estruturas.

CiL-2 tem como função molecular prevista de ser um ligante de oligossacarídeos (GO:0070492) e a *N*-acetilgalactosamina, o GalNAc (GO:0046871), como esperado por ser muito provavelmente uma lectina pertencente à família das lectinas do Tipo-H, que por definição é uma proteína ligante a esses carboidratos, com C-score^{GO} de 1.00 para ambas, sendo esse o maior valor possível (Figura 66). C-score^{GO} é o parâmetro de confiança para predição de função, variando de 0 a 1, onde os valores mais altos indicam maior confiabilidade (ZHENG *et al.*, 2021).

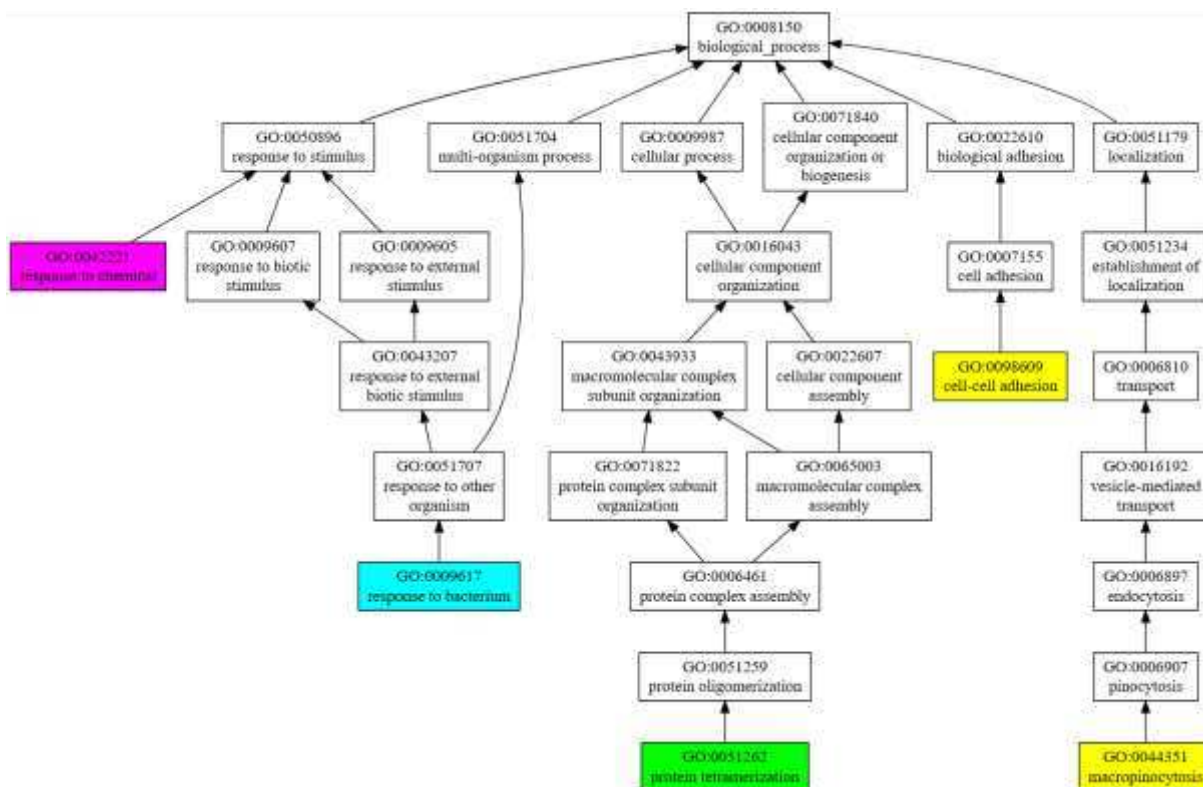
Na predição do processo biológico, CiL-2 participa do processo de macropinocitose (GO:0044351) e adesão célula-célula (GO:0098609), com C-score^{GO} de 0.77 e 0.75, respectivamente, como maiores confianças. Além disso, também pode participar do processo de tetramerização de proteínas (C-score^{GO} de 0.63/GO:0051262), resposta à bactéria (C-score^{GO} de 0.55/GO:0009617) e da resposta a produtos químicos (C-score^{GO} de 0.50/GO:0042221) (Figura 67).

Figura 66 – Função molecular prevista de CiL-2.



Fonte: ZHENG *et al.*, (2021). O gráfico mostra os termos previstos dentro da hierarquia de ontologia genética para função molecular. Os termos previstos com segurança são codificados por cores. Termos vermelhos: C-score^{GO} de 0.9-1.0.

Figura 67 – Predição do processo biológico de CiL-2.



Fonte: ZHENG *et al.* (2021). O gráfico mostra os termos previstos dentro da hierarquia de ontologia genética para processo biológico. Os termos previstos com segurança são codificados por cores. Termos roxos: C-score^{GO} de 0.4-0.5. Termos azuis: C-score^{GO} de 0.5-0.6. Termos verdes: C-score^{GO} de 0.6-0.7. Termos amarelos: C-score^{GO} de 0.7-0.8.

Os termos em amarelo estão relacionados a um processo de endocitose, chamado macropinocitose que resulta na captação de material líquido pelas células de seu ambiente externo por fluidos da membrana celular para formar vesículas intracelulares de tamanho heterogêneo chamadas macropinosomos e a ligação de uma célula a outra célula através de moléculas de adesão (ZHENG *et al.*, 2021).

Lectinas já foram relatadas possuindo como mecanismo predominante de endocitose em certas células cancerígenas a macropinocitose (RESNIK *et al.*, 2023). Em relação a ligação célula-célula está é fortemente atrelada a característica de lectinas de reconhecer estruturas glicídicas de superfície de moléculas.

O termo em verde indica formação de um tetrâmero de proteína, uma estrutura macromolecular constituída por quatro subunidades idênticas ou não idênticas associadas não covalentemente que está vinculado a capacidade de oligomerização de CiL-2.

Já os termos em azul e magenta estão relacionados a qualquer processo que resulte em uma mudança no estado ou atividade de uma célula ou organismo como resultado de um

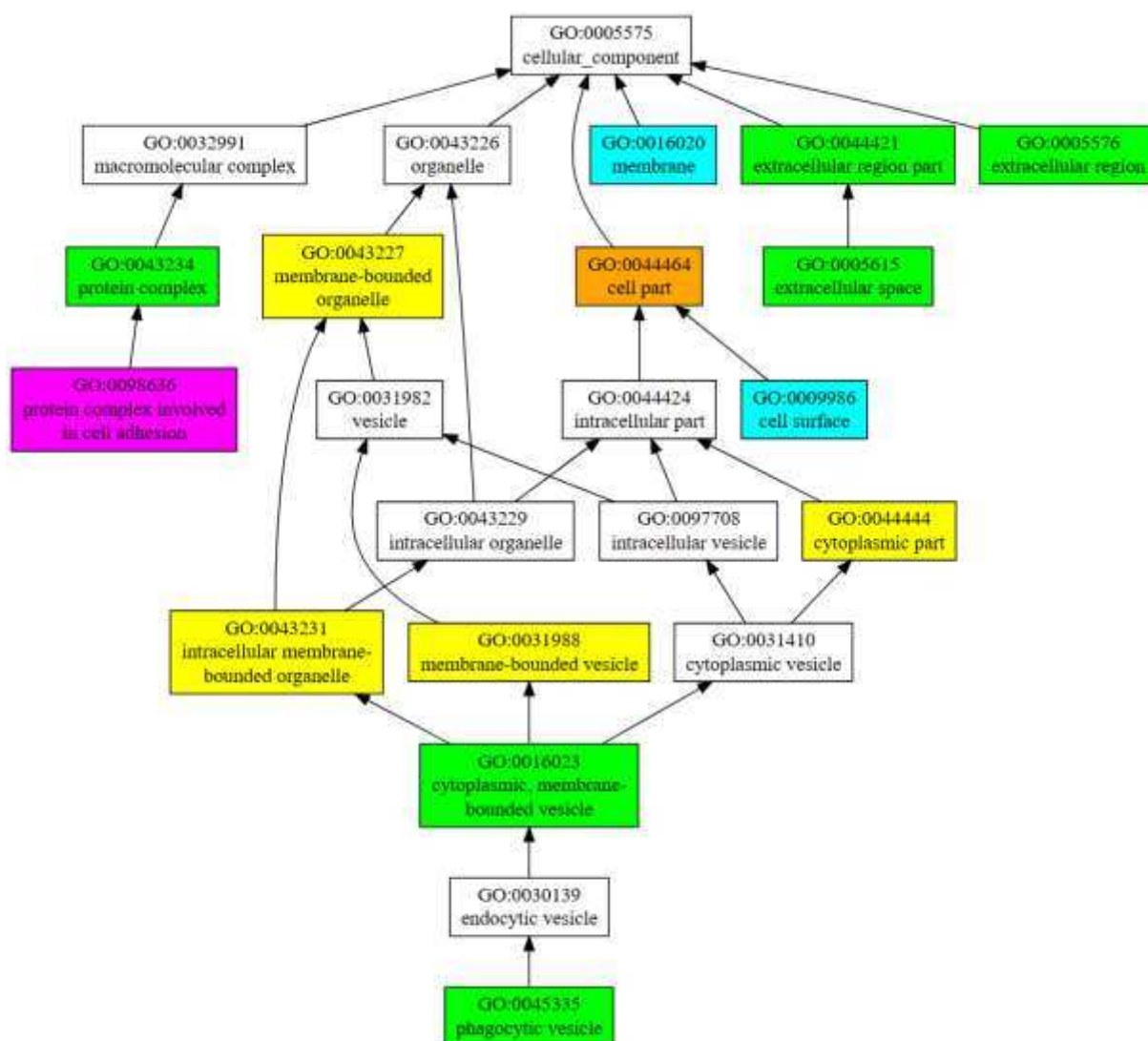
estímulo de uma bactéria e estímulo químico, respectivamente (ZHENG *et al.*, 2021).

Segundo C-I-TASSER, CiL-2 pode está localizada em inúmeros locais no compartimento celular (Figura 68), faz parte da célula (GO:0044464) com C-score^{GO} de 0.86 com maior confiança, mas também pode estar na organela ligada por membrana (GO:0043227), na vesícula ligada à membrana (GO:0031988), parte citoplasmática (GO:0044444), na organela ligada à membrana intracelular (GO:0043231), na vesícula citoplasmática ligada à membrana (GO:0016023), parte da região extracelular (GO:0044421), na vesícula fagocítica (GO:0045335), na região extracelular (GO:0005576), no espaço extracelular (GO:0005615), no complexo proteico (GO:0043234), na superfície celular (GO:0009986), na membrana (GO:0016020) e no complexo proteico envolvido na adesão celular (GO:0098636).

Os termos para a localização de CiL-2 são bastante diversos indo de localizada em uma estrutura organizada de morfologia e função distintas, delimitada por uma membrana bicamada lipídica simples ou dupla e que ocorre no interior da célula, inclui o núcleo, mitocôndrias, plastídios, vacúolos e vesículas, e também o espaço externo à estrutura mais externa de uma célula, tanto para células sem estruturas protetoras externas ou encapsulantes externas, isso se refere ao espaço fora da membrana plasmática (ZHENG *et al.*, 2021).

Sua vinculação a vesícula intracelular ligada à membrana que surge da ingestão de material particulado por fagocitose também foi sugerida e se relaciona com possíveis funções preditas (Figura 67). Uma característica comum aos termos de localização com pontuação C-score^{GO} mais altos foi de não estar na membrana plasmática, de fato, esse foi um dos termos de pontuação mais baixa relatados. Além disso, CiL-2 ainda foi relacionada a qualquer complexo proteico que seja capaz de realizar alguma parte do processo de adesão celular à matriz celular ou a outra célula e a parte externa da parede celular e/ou membrana plasmática (ZHENG *et al.*, 2021).

Figura 68 – Localização de CiL-2 no compartimento celular.



Fonte: ZHENG *et al.* (2021). O gráfico mostra os termos previstos dentro da hierarquia de ontologia genética para componente celular. Os termos previstos com segurança são codificados por cores. Termos roxos: C-score^{GO} de 0.4-0.5. Termos azuis: C-score^{GO} de 0.5-0.6; Termos verdes: C-score^{GO} de 0.6-0.7; Termos amarelos: C-score^{GO} de 0.7-0.8; Termos laranjas: C-score^{GO} de 0.8-0.9.

4.7 Atividade da lectina combinada a antibióticos

Visto que CiL-2 foi capaz aglutinar bactérias e inibir o crescimento de biofilme bacteriano em certas cepas bacterianas (CARNEIRO *et al.*, 2020; SILVA, 2013), avaliamos se a combinação lectina-antibiótico teria a capacidade de modificar o efeito da ampicilina ou tetraciclina contra as cepas testadas. A concentração de 125 µg/mL da lectina foi utilizada para realização do efeito da lectina em combinação com o antibiótico. Os resultados da associação dos antibióticos oxacilina e tetraciclina obtidos para CiL-2 contra as cepas bacterianas testadas mostraram valores distintos (Tabela 11).

No CIM1 (individual) da oxacilina não foi verificada redução quando combinada

com a lectina contra a bactérias *S.aureus* ATCC 25923, que apresentou para esse antibiótico CIM individual de $0,250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, que foi o mesmo de quando combinada com a lectina, ou seja, não houve interação entre CiL-2 e oxacilina para essa cepa. Com relação a *S. aureus* ATCC 700698, uma cepa considerada resistente, o CIM1 individual do antibiótico de $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e quando combinado com CiL-2 aumentou para $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (2X CIM1). O mesmo foi observado para a bactéria gram-negativa *E. coli* ATCC 11303, que apresentou para oxacilina CIM1 individual de $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e quando combinada com a lectina, esse valor foi para $512 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (2X CIM1). Dessa forma, o antibiótico oxacilina associado à lectina não resultou em sinergismo para nenhuma das cepas testadas e apresentou atividade antagonista nas cepas *S. aureus* ATCC 700698 e *E. coli* ATCC 11303 (Tabela 11).

Em associação com a tetraciclina os resultados observados foram diferentes, apresentando efeitos aditivos e sinérgicos nas cepas. O CIM1 individual de $0,250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi reduzido para $0,0625 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (1/4 da CIM1) quando associado com a lectina para *S.aureus* ATCC 25923, enquanto para *S. aureus* ATCC 700698, o CIM1 individual, passou de $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em ambos os casos o efeito de sinergismo entre o antibiótico e CiL-2 foi observado (Tabela 11). Quanto a cepa de *E. coli* ATCC 11303, onde o CIM individual do antibiótico de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ reduziu para $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ quando associado com a lectina foi caracterizado como efeito aditivo.

Assim, observamos que a lectina tem efeitos distintos quando administrado em conjunto com os fármacos testados. Esses resultados, de certa forma são os melhores possíveis, uma vez que nosso objetivo principal é caracterizar os aspectos estruturais da lectina e interligá-los a suas capacidades biotecnológicas, e esses efeitos dispares são bons para esse fim, pois provavelmente estão ligados a uma das principais características dessas moléculas, sua especificidade.

Tabela 11 – Efeito da lectina CIL-2 combinada aos antibióticos Oxacilina e Tetraciclina sobre *Staphylococcus aureus* e *E. coli*.

BACTÉRIAS	ANTIBIÓTICO			EFEITO
	Oxacilina			
	CIM1 µg/mL (individual)	CIM2 µg/mL (combinado)	Relação entre CIMs	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,250	0,250	1	Não interação
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	128	256	2	Antagônico
<i>E. coli</i> ATCC 11303	256	512	2	Antagônico
	Tetraciclina			
	CIM1 µg/mL (individual)	CIM2 µg/mL (combinado)	Relação entre CIMs	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,250	0,0625	1/4	Sinergismo
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	128	32	1/4	Sinergismo
<i>E. coli</i> ATCC 11303	1	0,5	1/2	Aditivo

Fonte: Autor. Valores da Concentração Inibitória Mínima individual (CIM1), Concentração Inibitória Mínima Combinada (CIM2) dos antibióticos combinados a lectina CIL-2, e da relação entre CIM2/CIM1. As concentrações dos antibióticos variaram de 512 a 0,250 µg/mL para oxacilina e de 256 a 0,250 µg/mL para tetraciclina. A concentração de CIL-2 se manteve constante (125 µg/mL). Valores da relação entre as CIMs iguais a 1/2 foram interpretados como efeito aditivo, e valores entre 1/4 a 1/16 foram considerados como efeito sinérgico. Valores igual a 1x, 2x da CIM, foram considerados como não interação ou antagônico.

Hoje, uma das maiores preocupações para a saúde global são infecções bacterianas por cepas resistentes e a capacidade de surgimento de novos mecanismos de resistência que se espalham globalmente, causada principalmente pela adaptação dos micro-organismos aos antibióticos e também pelo uso excessivo desses fármacos, que foi intensificada durante a recente pandemia de Covid-19, graças ao uso indiscriminado de antimicrobianos para tratar doenças bacterianas que progrediam de infecções respiratórias virais (MALIK; MUNDRA, 2022; MORIEL *et al.*, 2023). Dessa maneira, além da descoberta de novas moléculas para compor esses antibióticos, também se faz necessário estratégias para aumentar suas eficácias.

CiL-2 potencializou a atividade do antibiótico tetraciclina quando complexado com

este contra cepas de *S. aureus* e *E. coli*. CiL-2 em combinação com a tetraciclina apresentou efeito aditivo, ou seja, houve um leve aumento na inibição do antibiótico contra *E. coli*, e apresentou efeito sinérgico, exibindo um aumento significativo na ação do antibiótico contra *S. aureus* (Tabela 11).

Os antibióticos em geral possuem mecanismos de ação diferentes, sendo os principais a inibição de processos essenciais de replicação do DNA, síntese do RNA, síntese de proteínas, biossíntese da parede celular e/ou membrana celular e da síntese de ácidos graxos (BAQUERO; LEVIN, 2021). A tetraciclina e oxacilina são exemplos de mecanismos de ação distintos, enquanto a tetraciclina age na síntese de proteínas, a oxacilina é uma penicilina resistente à β -lactamase e penicilinase estafilocócica que age sobre a síntese de parede celular (NOMURA *et al.*, 2020).

CiL-2 parece não ter nenhuma ação que auxilie os antibióticos na parede celular, o que pode ser melhor observado no seu resultado associada a oxacilina sobre *E. coli*, que é a bactéria Gram-negativa que apresenta as estratégias de resistência, mas vinculadas a parede celular, nas purinas usadas para passagens de moléculas. Já em relação a ação negativa da lectina com esse antibiótico sobre *S. aureus* pode estar relacionado a capacidade de CiL-2 de reconhecer as estruturas glicídicas da superfície da bactéria, observados por sua capacidade aglutinante dessa bactéria (SILVA, 2013), assim, ela poderia atuar mascarando ou diminuindo os locais de entrada na parede celular utilizados pelo microbicida.

A tetraciclina por sua vez é bacteriostático, ou seja, atua causando a interrupção do crescimento celular, especificamente ela atua na inibição da síntese de proteína ao se ligar ao centro de decodificação na subunidade ribossomal 30S, impedindo assim a ligação do RNAt (WARNER *et al.*, 2022). A resistência das bactérias a tetraciclina pode ocorrer por vários mecanismos, sendo os principais o sistema de bombas de efluxo ativo da droga pela célula e produção de proteínas de proteção ribossomal (LAPLANTE *et al.*, 2022).

Essas duas estratégias envolvem a síntese de proteínas, como Tet(K) e Tet(L) que atuam nos sistemas de bombas de efluxo em Gram-positivas, que funcionam como anticarregadores que trocam um complexo monocatiônico magnésio-tetraciclina por um próton, e Tet(O) e Tet(M) proteínas de proteção ribossomal encontradas tanto em organismos Gram-positivos quanto Gram-negativas que provavelmente agem causando uma mudança conformacional na estrutura do ribossomo, impedindo a ligação da tetraciclina ou resultando em sua dissociação (ERO *et al.*, 2019; LAPLANTE *et al.*, 2022; YADAV *et al.*, 2021).

Provavelmente CiL-2 tem ação em um desses processos, uma das hipóteses está ligada à sua participação na inibição ou perturbação nos processos de glicosilação que teriam

papel crítico no funcionamento dessas estratégias de resistência. Essa presença indispensável das glicosilações para o bom funcionamento de bombas de efluxo auxiliando na termoestabilidade proteica, na estabilização de complexos proteicos e na promoção da interação proteína-proteína já foi evidenciado em cepas de Gram-negativas e deve ser similar ao sistema efluxo de outras bactérias (ABOUEHADID *et al.*, 2020; DUBB *et al.*, 2020). Aliás, as estruturas de glicanos que realizam essa modificação pós-traducional nessa bactéria são muito similares os carboidratos específicos de CiL-2, que provavelmente decoram as proteínas sintetizadas por *S. aureus* para essa função (ABOUEHADID *et al.*, 2020).

A capacidade de antibióticos modificados com glicosilações de serem reconhecidos por essas bombas também destaca a possibilidade da lectina já acoplada ao seu ligante de ser utilizada como substituinte aumentando assim a concentração de microbicida na bactéria (KAMAZ *et al.*, 2021).

Como não foi possível identificar o mecanismo específico que CiL-2 utiliza para potencializar o antibiótico em sua ação antibacteriana, cabe então ressaltar que as tetraciclina têm demonstrado propriedades anticancerígenas que talvez poderiam ser auxiliados pela lectina, já que ela apresenta forte similaridade com lectinas do Tipo-H que possuem essa capacidade contra o câncer (LI *et al.*, 2023). De fato, CiL-2 tem o potencial de ser utilizada contra diversas linhagens de células cancerígenas, pois essa capacidade esta ligada à sua especificidade, o reconhecimento de padrão de glicosilação alterado e contendo resíduos de Gal/GalNAc que é frequentemente encontrado na superfície dessas células como um componente de epítomos de câncer (HUANG *et al.*, 2022).

Além do reconhecimento desses resíduos livres ou terminais, CiL-2 reconhece mucinas *O*-glicosiladas que são superexpressas em células tumorais, essas glicoproteínas possuem estruturas como os antígenos Tn (GalNAc α 1-Ser/Thr) e T (Gal β 3-GalNAc α 1-Ser/Thr) que ainda podem ser convertidos em diversas estruturas de *O*-glicanos que possivelmente podem se ligar a CiL-2 (BROCKHAUSEN; MELAMED, 2021; SANZ-MARTINEZ *et al.*, 2023). Essa capacidade evidencia o potencial dessa lectina de ser usada como biomarcador capaz de identificar alterações distintas de glicosilações associadas a, por exemplo, metástase de células cancerígenas altamente invasivas como ocorre com HPA que muitas vezes apresenta maior eficácia que outros antígenos T/Tn (KHOSROWABADI *et al.*, 2022; GUPTA, 2020; LIYANAGE; YAN, 2020; PINTO; PARAMESWARAN, 2023; STROUHALOVA; BOBALOVA, 2020; SIMPLICIEN *et al.*, 2021).

Essas lectinas podem ainda ser utilizadas contra doenças de origem não ontológicas que também expressam glicosilações que carregam estruturas glicídicas como os terminais

GalNAc, como nefropatia, síndrome mielodisplásica, síndrome de hiper-IgM-D e síndrome da febre periódica (CHRASTINOVÁ *et al.*, 2023; PIETRZYK-BRZEZINSKA; BUJACZ, 2020). Essa capacidade também já é utilizada contra infecções causadas por bactérias, como *Streptococcus pneumoniae* e *S. aureus* no reconhecimento específico, semelhante ao observado para CiL-2, o que sugere que essa lectina pode ser cepa-específica e funcionar no diagnóstico de doenças relacionadas a esses micro-organismos tal como gastrite crônica e biofilmes dentários vinculados a doenças bucais (DIGE *et al.*, 2022; DOMENECH; GARCÍA, 2017; OGAWA *et al.*, 2022; VERNYGORODSKYI; SHKOLNIKOV; SUHAN, 2017).

Mais estudos são necessários para entender os mecanismos de ação de CiL-2 no auxílio e potencialização de antibióticos. Além disso, suas características estruturais de reconhecimento e ligação a carboidratos e gliconjugados a colocam como uma ótima molécula a ser investigada contra outras cepas bacterianas, assim como, a outros patógenos e doenças, podendo atuar não só no combate, mas também como uma ferramenta de diagnóstico.

5 CONCLUSÃO

A lectina CiL-2 da alga marinha verde *Codium isthmocladum* foi investigada a respeito de aspectos estruturais, tendo sua estrutura primária determinada por MS/MS. Além disso, a estrutura tridimensional, assim como os resíduos envolvidos na ligação ao carboidrato foram previstos por programas computacionais, e foram caracterizadas com auxílio de diversas ferramentas de bioinformática estrutural. As análises realizadas confirmam CiL-2 como uma nova lectina pertencente à família das lectinas do Tipo-H. Sendo a primeira lectina oriunda de algas dessa família com evidências estruturais suficientes para sua classificação. Contudo, apesar das predições realizadas atingirem altos padrões de confiabilidade, a resolução de sua estrutura cristalina é fundamental para confirmar nossos prognósticos.

Em acréscimo, CiL-2 ainda se provou uma molécula com alto potencial biotecnológico vinculado a suas características de especificidade, que aqui foram capazes de potencializar o efeito microbicida de antibióticos contra cepas bacterianas. Provando que essa lectina pode ser ainda mais investigada a respeito de atividades biológicas que explorem de forma ainda mais precisa seu padrão de decodificação do glicocódigo, baseando-se nas informações estruturais obtidos nesse trabalho, que reforçam a função insubstituível dos estudos estruturais de caracterização e direcionamento da aplicabilidade dessas moléculas.

REFERÊNCIAS

- ABOUEHADID, S.; RAYNES, J.; BUI, T.; CUCCUI, J.; WREN, B. W. Characterization of posttranslationally modified multidrug efflux pumps reveals an unexpected link between glycosylation and antimicrobial resistance. **MBio**, v. 11, n. 6, p. 10.1128/mbio. 02604-20, 2020.
- ABREU, T. M.; CORPE, F. P.; TELES, F. B.; DA CONCEIÇÃO RIVANOR, R. L.; DE SOUSA, C. N. S.; DA SILVA MEDEIROS, I.; QUEIROZ, I. N. L.; FIGUEIRA-MANSUR, J.; MOTA, E. F.; MOHANA-BORGES, R.; MACEDO, D. S.; DE VASCONCELOS, S. M. M.; JUNIOR, J. E. R. H.; BENEVIDES, N. M. B. Lectin isolated from the red marine alga *Solieria filiformis* (Kützing) PW Gabrielson: Secondary structure and antidepressant-like effect in mice submitted to the lipopolysaccharide-induced inflammatory model of depression. **Algal Research**, v. 65, p. 102715, 2022.
- ABREU, T. M.; MONTEIRO, V. S.; MARTINS, A. B. S.; TELES, F. B.; DA CONCEIÇÃO RIVANOR, R. L.; MOTA, É. F.; MACEDO, D. S.; VASCONCELOS, S. M. M.; JUNIOR, J. E. R. H.; BENEVIDES, N. M. B. Involvement of the dopaminergic system in the antidepressant-like effect of the lectin isolated from the red marine alga *Solieria filiformis* in mice. **International journal of biological macromolecules**, v. 111, p. 534-541, 2018.
- ABREU, T. M.; RIBEIRO, N. A.; CHAVES, H. V.; JORGE, R. J. B.; BEZERRA, M. M.; MONTEIRO, H. S. A.; VASCONCELOS, I. M.; MOTA, E. F.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the lectin from marine red alga *Solieria filiformis*. **Planta medica**, v. 82, n. 07, p. 596-605, 2016.
- ABREU, T. M.; SILVA, L. M. C. M.; VANDERLEI, E. S. O.; MELO, C. M. L.; PEREIRA, V. R. A.; BENEVIDES, N. M. B. Cytokine production induced by marine algae lectins in BALB/c mice splenocytes. **Protein and Peptide Letters**, v. 19, n. 9, p. 975-981, 2012.
- AGNIHOTRY, S.; PATHAK, R. K.; SINGH, D. B.; TIWARI, A.; HUSSAIN, I. Protein structure prediction. In: **Bioinformatics**. Academic Press, 2022. p. 177-188.
- AGONI, C.; OLOTU, F. A.; RAMHARACK, P.; SOLIMAN, M. E. Druggability and drug-likeness concepts in drug design: are biomodelling and predictive tools having their say?. **Journal of molecular modeling**, v. 26, p. 1-11, 2020.
- AHMED, A. B. A.; ADEL, M.; KARIMI, P.; PEIDAYESH, M. Pharmaceutical, cosmeceutical, and traditional applications of marine carbohydrates. **Advances in food and nutrition research**, v. 73, p. 197-220, 2014.
- AHMED, I.; ASGHER, M.; SHER, F.; HUSSAIN, S. M.; NAZISH, N.; JOSHI, N.; SHARMA, A.; PARRA-SALDÍVAR, R.; BILAL, M.; IQBAL, H. M. Exploring marine as a rich source of bioactive peptides: Challenges and opportunities from marine pharmacology. **Marine drugs**, v. 20, n. 3, p. 208, 2022.
- AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H.; FREITAS, A. L. P.; BENEVIDES, N. M. B.; MAPURUNGA, S. Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal (Brazil)**, 1995.

ALEXANDRE, K.B.; GRAY, E.S.; LAMBSON, B.E.; MOORE, P.L.; CHOGE, I.A.; MLISANA, K.; KARIM, S.S.A.; MCMAHON, J.; O'KEEFE, B.; CHIKWAMBA, R.; MORRIS, L.; 2010. Mannose-rich glycosylation patterns on HIV-1 subtype C gp120 and sensitivity to the lectins, Griffithsin, Cyanovirin-N and Scytovirin. **Virology**, 402(1), pp.187-196.

ALFARO, J. A., BOHLÄNDER, P., DAI, M., FILIUS, M., HOWARD, C. J., VAN KOOTEN, X. F., OHAYON, S.; POMORSKI, A.; SCHMID, S.; AKSIMENTIEV, A.; ANSLYN, E. V.; BEDRAN, G.; CAO, C.; CHINAPPI, M.; COYAUD, E.; DEKKER, C.; DITTMAR, G.; DRACHMAN, N.; EELKEMA, R.; GOODLETT, D.; HENTZ, S.; KALATHIYA, U.; KELLEHER, N. L.; KELLY, R. T.; KELMAN, Z.; KIM, S. H.; KUSTER, B.; RODRIGUEZ-LARREA, D.; LINDSAY, S.; MAGLIA, G.; MARCOTTE, E. M.; MARINO, J. P.; MASSELON, C.; MAYER, M.; SAMARAS, P.; SARTHAK, K.; SEPIASHVILI, L.; STEIN, D.; WANUNU, M.; WILHELM, M.; YIN, P.; MELLER, A.; JOO, C. The emerging landscape of single-molecule protein sequencing technologies. **Nature methods**, v. 18, n. 6, p. 604-617, 2021.

ALMAGRO ARMENTEROS, J. J., TSIRIGOS, K. D., SØNDERBY, C. K., PETERSEN, T. N., WINTHER, O., BRUNAK, S., HEIJNE, G. V.; NIELSEN, H. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 420-423, 2019.

ALYOUSEF, A. A.; ALQASIM, A.; ALOAHD, M. S. Isolation and characterization of lectin with antibacterial, antibiofilm and antiproliferative activities from *Acinetobacter baumannii* of environmental origin. **Journal of applied microbiology**, v. 124, n. 5, p. 1139-1146, 2018.

ALVAREZ-HERNANDEZ, S.; DE LARA-ISASSI, G.; ARREGUIN-ESPINOZA, R.; ARREGUIN, B.; HERNANDEZ-SANTOYO, A.; RODRIGUEZ-ROMERO, A. Isolation and partial characterization of giraffine, a lectin from the Mexican endemic alga *Codium giraffa* Silva. 1999.

ALVAREZ, C.; FÉLIX, C.; LEMOS, M. F. The Antiviral Potential of Algal Lectins. **Marine Drugs**, v. 21, n. 10, p. 515, 2023.

AMBROSIO, A. L.; SANZ, L.; SÁNCHEZ, E. I.; WOLFENSTEIN-TODEL, C.; CALVETE, J. J. Isolation of two novel mannan-and L-fucose-binding lectins from the green alga *Enteromorpha prolifera*: biochemical characterization of EPL-2. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 415, n. 2, p. 245-250, 2003.

ANAM, C.; PRASEPTIANGGA, D.; FAJARNINGSIH, N. D.; CHASANAH, E.; YUNUS, A. Preliminary characterization of crude lectins fractions of red macroalgae species collected from the southern coast of gunungkidul Indonesia. **Int. J. Adv. Sci. Eng. Inf. Technol**, v. 9, p. 1309-1316, 2019.

ANDRADE, F.; TABOSA, P. A.; TORRES, R. C.; CARNEIRO, R. F.; VASCONCELOS, M. A.; ANDRADE, A. L.; NASCIMENTO, E.; PINHEIRO, U.; TEIXEIRA, E. H.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H. New lectin isolated from the tropical sponge *Haliclona* (Reniera) *implexiformis* (Hechtel, 1965) shows antibiofilm effect. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 95, p. e20220379, 2023.

ARAGÃO, K. S.; SATRE, M.; IMBERTY, A.; VARROT, A. Structure determination of Discoidin II from *Dictyostelium discoideum* and carbohydrate binding properties of the lectin domain. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 73, n. 1, p. 43-52, 2008.

ARMARIO-NAJERA, V.; BLANCO-PERERA, A.; SHENOY, S. R.; SUN, Y.; MARFIL, S.; MUÑOZ-BASAGOITI, J.; PEREZ-ZSOLT, D.; BLANCO, J.; IZQUIERDO-USEROS, N.; CAPELL, T.; O'KEEFE, B. R.; CHRISTOU, P. Physicochemical characterization of the recombinant lectin scytovirin and microbicidal activity of the SD1 domain produced in rice against HIV-1. **Plant Cell Reports**, v. 41, n. 4, p. 1013-1023, 2022.

BAINS, A.; FISCHER, K.; GUAN, W.; LIWANG, P. J. The Antiviral Activity of the Lectin Griffithsin against SARS-CoV-2 Is Enhanced by the Presence of Structural Proteins. **Viruses**, v. 15, n. 12, p. 2452, 2023.

BAQUERO, F.; LEVIN, B. R. Proximate and ultimate causes of the bactericidal action of antibiotics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 123-132, 2021.

BARRE, A.; DAMME, E. J. V.; SIMPLICIEN, M.; BENOIST, H.; ROUGÉ, P. Man-specific, GalNAc/T/Tn-specific and Neu5Ac-specific seaweed lectins as glycan probes for the SARS-CoV-2 (COVID-19) coronavirus. **Marine drugs**, v. 18, n. 11, p. 543, 2020.

BARRE, A.; SIMPLICIEN, M.; BENOIST, H.; VAN DAMME, E. J.; ROUGÉ, P. Mannose-specific lectins from marine algae: diverse structural scaffolds associated to common virucidal and anti-cancer properties. **Marine drugs**, v. 17, n. 8, p. 440, 2019.

BARRE, A.; VAN DAMME, E. J.; SIMPLICIEN, M.; LE PODER, S.; KLONJKOWSKI, B.; BENOIST, H.; PEYRADE, D.; ROUGÉ, P. Man-specific lectins from plants, fungi, algae and cyanobacteria, as potential blockers for SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 (COVID-19) coronaviruses: Biomedical perspectives. **Cells**, v. 10, n. 7, p. 1619, 2021.

BARRIENTOS, L. G.; O'KEEFE, B. R.; BRAY, M.; SANCHEZ, A.; GRONENBORN, A. M.; BOYD, M. R. Cyanovirin-N binds to the viral surface glycoprotein, GP1, 2 and inhibits infectivity of Ebola virus. **Antiviral research**, v. 58, n. 1, p. 47-56, 2003.

BEKTAS, S.; KAPTAN, E. Therapeutic potential of lectins in the treatment of breast cancer: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 126073, 2023.

BELLAN, D. L. D. L.; BISCAIA, S. M. P.; ROSSI, G. R.; CRISTAL, A. M.; GONÇALVES, J. P.; OLIVEIRA, C. C.; TRINDADE, E. S. Green does not always mean go: A sulfated galactan from *Codium isthmocladum* green seaweed reduces melanoma metastasis through direct regulation of malignancy features. **Carbohydrate polymers**, v. 250, p. 116869, 2020.

BENEVIDES, N. M. B.; HOLANDA, M. L.; MELO, F. R.; FREITAS, A. L. P.; SAMPAIO, A. H. Purification and partial characterization of the lectin from the red marine alga *Enantiocladia duperreyi* (C. Agardh) Faalkenberg. **Botanica Marina** v. 41, p. 521-525, 1998.

BENEVIDES, N. M. B.; HOLANDA, M. L.; MELO, F. R.; PEREIRA, M. G.; MONTEIRO, A. C. O.; FREITAS, A. L. P. Purification and partial characterization of the lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh. 2001.

BENEVIDES, N. M. B.; LEITE, A. M.; FREITAS, A. L. P. Atividade hemaglutinante na alga vermelha *Solieria filiformis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, n. 2, p. 117-122, 1996.

BEWLEY, C. A.; CAI, M.; RAY, S.; GHIRLANDO, R.; YAMAGUCHI, M.; MURAMOTO, K. New carbohydrate specificity and HIV-1 fusion blocking activity of the cyanobacterial protein MVL: NMR, ITC and sedimentation equilibrium studies. **Journal of molecular biology**, v. 339, n. 4, p. 901-914, 2004.

BITENCOURT, F. D. S., FIGUEIREDO, J. G., MOTA, M. R., BEZERRA, C. C., SILVESTRE, P. P., VALE, M. R., NASCIMENTO, K. S.; SAMPAIO, A. H.; NAGANO, C. S.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W. R. L., CAVADA, B. S.; ASSREUY, A. M. S.; ALENCAR, N. M. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 377, p. 139-148, 2008.

BOKESCH, H. R.; O'KEEFE, B. R.; MCKEE, T. C.; PANNELL, L. K.; PATTERSON, G. M.; GARDELLA, R. S.; BOYD, M. R. A potent novel anti-HIV protein from the cultured cyanobacterium *Scytonema varium*. **Biochemistry**, v. 42, n. 9, p. 2578-2584, 2003.

BONNARDEL, F. **Bioinformatics study of lectins: new classification and prediction in genomes**. 2021. Tese de Doutorado. Université Grenoble Alpes [2020-....]; Université de Genève.

BOTOS, I.; WLODAWER, A. Cyanovirin-N: a sugar-binding antiviral protein with a new twist. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 60, p. 277-287, 2003.

BOYD, M. R.; GUSTAFSON, K. R.; MCMAHON, J. B.; SHOEMAKER, R. H.; O'KEEFE, B. R.; MORI, T.; GULAKOWSKI, R. J.; WU, L.; RIVERA, M. I.; LAURENCOT, C. M.; CURRENS, M. J.; CARDELLINA, J. H.; BUCKHEIT, R. W.; NARA, P. L.; PANNELL, L. K.; SOWDER, R. C.; HENDERSON, L. E. Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 7, p. 1521-1530, 1997.

BOYD, W. C.; ALMODÓVAR, L. R.; BOYD, L. G. Agglutinins in marine algae for human erythrocytes. **Transfusion**, v. 6, n. 1, p. 82-83, 1966

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Antigenic relations of blood group antigens as suggested by tests with lectins. **The Journal of Immunology**, v. 73, n. 4, p. 226-231, 1954.

BRAND, R. Griffithsin-Based Rectal Microbicide for PREvention of Viral ENTRY (PREVENT) (PREVENT). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04032717. Updated 6 July 2023. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04032717> (accessed on 27 December 2023).

BROCKHAUSEN, I.; MELAMED, J. Mucins as anti-cancer targets: Perspectives of the glycobiologist. **Glycoconjugate journal**, v. 38, p. 459-474, 2021.

BROOKS, S. A. Lectin Histochemistry: Historical Perspectives, State of the Art, and Future Directions. **Histochemistry of Single Molecules**, p. 65-84, 2023.

CALVETE, J. J.; COSTA, F. H. F.; SAKER-SAMPAIO, S.; MURCIANO, M. P. M.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T.B.; RAMOS, M.V.; BLOCH, C.; SILVEIRA, S.B., FREITAS, B.T.; SAMPAIO, A.H. The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 57, n. 2, p. 343-350, 2000.

CAVALCANTI, V. L. R.; BRANDÃO-COSTA, R. M. P.; PONTUAL, E. V.; DE ANDRADE, A. F.; ALVES, L. C.; PORTO, A. L. F.; BEZERRA, R. P. *Chlorella vulgaris* lectin kills *Aedes aegypti* larvae. **Algal Research**, v. 56, p. 102290, 2021.

CARNEIRO, R. F.; DUARTE, P. L.; CHAVES, R. P.; DA SILVA, S. R.; FEITOSA, R. R.; DE SOUSA, B. L.; ALVES, A. W. S.; VASCONCELOS, M. A.; ROCHA, B. A. M.; TEIXEIRA, E. H.; SAMPAIO, A. H.; NAGANO, C. S. New lectins from *Codium isthmocladum* Vickers show unique amino acid sequence and antibiofilm effect on pathogenic bacteria. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, p. 4263-4276, 2020.

CARPINELLI, E. C.; TELATIN, A.; VITULO, N.; FORCATO, C.; D'ANGELO, M.; SCHIAVON, R.; VEZZI, A.; GIACOMETTI, G. M.; MOROSINOTTO, T.; VALLE, G. Chromosome scale genome assembly and transcriptome profiling of *Nannochloropsis gaditana* in nitrogen depletion. **Molecular plant**, v. 7, n. 2, p. 323-335, 2014.

CHAVES, R. P.; DA SILVA, S. R.; DA SILVA, J. P. F. A.; CARNEIRO, R. F.; DE SOUSA, B. L.; ABREU, J. O.; CARVALHO, F. C. T.; ROCHA, C. R. C.; FARIAS, W. R. L.; SOUSA, O. V.; SILVA, A. L. C.; SAMPAIO, A. H.; NAGANO, C. S. *Meristiella echinocarpa* lectin (MEL): A new member of the OAAH-lectin family. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 4, p. 2629-2638, 2018a.

CHAVES, R. P.; DA SILVA, S. R.; NETO, L. G. N.; CARNEIRO, R. F.; DA SILVA, A. L. C.; SAMPAIO, A. H.; SOUSA, B. L.; CABRAL, M. G.; VIDEIRA, P. A.; TEIXEIRA, E. H.; NAGANO, C. S. Structural characterization of two isolectins from the marine red alga *Solieria filiformis* (Kützing) PW Gabrielson and their anticancer effect on MCF-7 breast cancer cells. **International journal of biological macromolecules**, v. 107, p. 1320-1329, 2018b.

CHAVES, R. P.; DOS SANTOS, A. K. B.; ANDRADE, A. L.; DE AZEVEDO PINHEIRO, A.; DE SENA SILVA, J. M.; DA SILVA, F. M. S.; SOUSA, J. P.; NETO, I. L. B.; BEZERRA, E. H. S.; ABREU, J. O.; CARVALHO, F. C. T.; SOUSA, O. V.; SOUSA, B. L.; ROCHA, B. A. M.; SILVA, A. L. C.; NETO, L. G. N.; VASCONCELOS, M. A.; TEIXEIRA, E. H.; CARNEIRO, R. F.; SAMPAIO, A. H.; NAGANO, C. S. Structural study and antimicrobial and wound healing effects of lectin from *Solieria filiformis* (Kützing) PW Gabrielson. **Biochimie**, 2023.

CHEETRI, D.; BORO, M.; SARKAR, L.; VERMA, A. K. Lectins: Biological significance to biotechnological application. **Carbohydrate Research**, v. 506, p. 108367, 2021.

CHILES, T. C.; BIRD, K. T. *Gracilaria tikvahiae* agglutinin. Partial purification and preliminary characterization of its carbohydrate specificity. **Carbohydrate research**, v. 207,

n. 2, p. 319-326, 1990.

CHRASTINOVÁ, L.; PASTVA, O.; BOCKOVÁ, M.; KOVÁŘOVÁ, H.; CEZNEROVÁ, E., KOTLÍN, R.; PECHERKOVÁ, P.; ŠTIKAROVÁ, J.; HLAVÁČKOVÁ, A.; HAVLÍČEK, M.; VÁLKA, J.; HOMOLA, J.; SUTTAR, J. Linking aberrant glycosylation of plasma glycoproteins with progression of myelodysplastic syndromes: a study based on plasmonic biosensor and lectin array. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 12816, 2023.

CHU, C.; HUANG, R.; LING, L. Purification and characterization of a novel haemagglutinin from *Chlorella pyrenoidosa*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 11, p. 967, 2006.

CONRADO, F. M.; FURTADO, L. E. T. A.; TEIXEIRA, A. H.; COUTINHO, N. L.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S.; BEZERRA, M. M.; SILVA, A. A. R.; BARBOSA, F. C. B.; CHAVES, H. V.; FILHO, G. C.; PINTO, V. P. *Erythrina velutina* and *Bryothamnion seaforthii* lectins binding to proteins of primary central nervous system tumors. **J. Cancer Res. Exp. Oncol**, v. 4, p. 21-26, 2012.

COSTA FILHO, M. F. **Caracterização bioquímica e estrutural de uma lectina da alga marinha vermelha *Osmundaria obtusiloba* (C. Agardh) R.E. Norris, 1991**. 2022. 73 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.

COSTA, F. H. F.; SAMPAIO, A. H.; NEVES, S. A.; ROCHA, M. L. A.; BENEVIDES, N. M. B. Marine Alga *Amansia multifida*. **Biol. Plantas**, v. 553, p. 61, 1999.

CUMMINGS, R. D.; SCHNAAR, R. L.; ESKO, J. D.; WOODS, R. J.; DRICKAMER, K.; TAYLOR, M. E. Principles of glycan recognition. **Essentials of Glycobiology. 4th edition**, 2022.

CUNHA, S. A.; PINTADO, M. E. Bioactive peptides derived from marine sources: Biological and functional properties. **Trends in Food Science & Technology**, v. 119, p. 348-370, 2022.

DALIRI, E. B. M.; LEE, B. H.; OH, D. H. Current trends and perspectives of bioactive peptides. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, n. 13, p. 2273-2284, 2018.

DANILOVA, I. S.; FOTINA, T. I.; DANILOVA, T. M. Histological Studies of Snails at Different Periods of Their Life Activity. **Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences**, v. 5, n. 3, p. 18-22, 2022.

DARA, M., GIULIANINI, P. G., MANFRIN, C., PARISI, M. G., PARRINELLO, D., LA CORTE, C., VASTA, G. R.; CAMMARATA, M. F-type lectin from serum of the Antarctic teleost fish *Trematomus bernacchii* (Boulenger, 1902): Purification, structural characterization, and bacterial agglutinating activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 256, p. 110633, 2021.

DA SILVA ALVES, A. W.; SOUSA, B. L.; MOURA, L. F. W. G.; DE LIMA REBOUÇAS, E.; COUTINHO, M. R.; SILVA, A. W.; CHAVES, R. P.; CARNEIRO, R. F.; BEZERRA, E. H. S.; GUEDES, M. I. F.; FLOREAN, E. O. P. T.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H.; ROCHA, B. A. M. *Codium isthmocladum* lectin 1 (CiL-1): Interaction with N-glycans explains

antinociceptive and anti-inflammatory activities in adult zebrafish (*Danio rerio*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 208, p. 1082-1089, 2022.

DA SILVA, S. P.; DA SILVA, J. D. F.; DA COSTA, C. B. L.; DA SILVA, P. M.; DE FREITAS, A. F. S.; DA SILVA, C. E. S.; DA SILVA, A. R.; OLIVEIRA, A. M.; SÁ, R. A.; PEIXOTO, A. R.; OLIVEIRA, A. P. S.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H. Purification, characterization, and assessment of antimicrobial activity and toxicity of *Portulaca elatior* leaf lectin (PeLL). **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 15, n. 2, p. 287-299, 2023.

DE ALENCAR ALVES, M. F., DE ALMEIDA BARRETO, F. K., DE VASCONCELOS, M. A., DO NASCIMENTO NETO, L. G., CARNEIRO, R. F., DA SILVA, L. T., NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H.; TEIXEIRA, E. H. Antihyperglycemic and antioxidant activities of a lectin from the marine red algae, *Bryothamnion seaforthii*, in rats with streptozotocin-induced diabetes. **International journal of biological macromolecules**, v. 158, p. 773-780, 2020.

DE ARRUDA, M. C. S.; DA SILVA, M. R. O. B.; CAVALCANTI, V. L. R.; BRANDAO, R. M. P. C.; MARQUES, D. D. A. V.; DE LIMA, L. R. A.; BEZERRA, R. P. Antitumor lectins from algae: A systematic review. **Algal Research**, p. 102962, 2023.

DE ASSIS DUARTE, J.; DE OLIVEIRA NETO, J. E.; TORRES, R. C. F.; DE OLIVEIRA SOUSA, A. R.; ANDRADE, A. L.; CHAVES, R. P.; CARNEIRO, R. F.; VASCONCELOS, M. A.; TEIXEIRA, C. S.; TEIXEIRA, E. H.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H. Structural characterization of a galectin from the marine sponge *Aplysina lactuca* (ALL) with synergistic effects when associated with antibiotics against bacteria. **Biochimie**, v. 214, p. 165-175, 2023.

DE CONINCK, T.; VAN DAMME, E. J. The multiple roles of plant lectins. **Plant Science**, v. 313, p. 111096, 2021.

DEDOLA, S.; RUGEN, M. D.; YOUNG, R. J.; FIELD, R. A. Revisiting the language of glycoscience: readers, writers and erasers in carbohydrate biochemistry. **ChemBioChem**, v. 21, n. 3, p. 423-427, 2020.

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

DERELLE, E.; FERRAZ, C.; ROMBAUTS, S.; ROUZÉ, P.; WORDEN, A. Z.; ROBBENS, S.; PARTENSKY, F.; DEGROEVED, H. S.; COOKEI, S. E. R.; SAEYSD, Y.; WUYTSD, J.; JABBARIJ, K.; BOWLERK, C.; PANAUDI, O.; PIE'GUI, B.; BALLK, S. G.; RALK, J.; BOUGETA, F. O.; PIGANEAUA, G.; DE BAETSH, B.; PICARDA, A.; DELSENYI, M.; DEMAILLEC, J.; DE PEER, Y. V.; MOREAU, H. Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 31, p. 11647-11652, 2006.

DIGE, I.; PAQUÉ, P. N.; DEL REY, Y. C.; LUND, M. B.; SCHRAMM, A.; SCHLAFER, S. Fluorescence lectin binding analysis of carbohydrate components in dental biofilms grown in situ in the presence or absence of sucrose. **Molecular Oral Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 196-205, 2022.

- DJABAYAN-DJIBEYAN, P., CARPENTER, B., MEDINA-RAMÍREZ, G., ANDUEZA-LEAL, F., LEÓN-LEAL, A., DJABAYAN-RUSSO, A., JARAMILLO-ABRILG, D.; VALAREZO-GARCÍA, C.; ARAUJO-BAPTISTA, L. Cold steeping infusion, a novel lectin extraction technique for the isolation, purification and partial characterization of lectins from the green Venezuelan marine alga *Caulerpa serrulata*. **Natural Product Communications**, v. 13, n. 12, p. 1934578X1801301233, 2018.
- DOMENECH, M.; GARCÍA, E. Fluorescence imaging of *Streptococcus pneumoniae* with the helix pomatia agglutinin (HPA) as a potential, rapid diagnostic tool. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1333, 2017.
- DO NASCIMENTO, A. S.; SERNA, S.; BELOQUI, A.; ARDA, A.; SAMPAIO, A. H.; WALCHER, J.; OTT, D.; UNVERZAGT, C.; REICHARDT, N. C.; JIMENEZ-BARBERO, J.; NASCIMENTO, K. S.; IMBERTY, A.; CAVADA, B. S.; VARROT, A. Algal lectin binding to core (α 1–6) fucosylated N-glycans: Structural basis for specificity and production of recombinant protein. **Glycobiology**, v. 25, n. 6, p. 607-616, 2015.
- DUARTE, P. L.; ANDRADE, F. R. N.; DE OLIVEIRA SOUSA, A. R.; ANDRADE, A. L.; DE VASCONCELOS, M. A.; TEIXEIRA, E. H.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H.; CARNEIRO, R. F. A fibrinogen-related Lectin from *Echinometra lucunter* represents a new FReP family in *Echinodermata phylum*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 131, p. 150-159, 2022.
- DUBB, R. K.; NOTHAFT, H.; BEADLE, B.; RICHARDS, M. R.; SZYMANSKI, C. M. N-glycosylation of the CmeABC multidrug efflux pump is needed for optimal function in *Campylobacter jejuni*. **Glycobiology**, v. 30, n. 2, p. 105-119, 2020.
- EDELMAN, G.M.; CUNNINGHAM, B.A.; REEKE, G.N.J.; BECKER, J.W.; WAXDAL, M.J.; WANG, J.L. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. **Proceedings of the national academy of sciences**, [s.l]. v. 69, n. 9, p. 2580-2584, 1972.
- EL-FAKHARANY, E. M.; SAAD, M. H.; SALEM, M. S.; SIDKEY, N. M. Biochemical characterization and application of a novel lectin from the cyanobacterium *Lyngabya confervoides* MK012409 as an antiviral and anticancer agent. **International journal of biological macromolecules**, v. 161, p. 417-430, 2020.
- ERBA, E. B.; SIGNOR, L.; PETOSA, C. Exploring the structure and dynamics of macromolecular complexes by native mass spectrometry. **Journal of proteomics**, v. 222, p. 103799, 2020.
- ERO, R.; KUMAR, V.; SU, W.; GAO, Y. G. Ribosome protection by ABC-F proteins—molecular mechanism and potential drug design. **Protein Science**, v. 28, n. 4, p. 684-693, 2019.
- FABREGAS, J.; MUÑOZ, A.; LLOVO, J.; CARRACEDO, A. Purification and partial characterization of tomentine. An N-acetylglucosamine-specific lectin from the green alga *Codium tomentosum* (Huds.) Stackh. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 124, n. 1, p. 21-30, 1988.
- FAJARNINGSIH, N. D.; INTAQTA, N.; PRASEPTIANGGA, D.; ANAM, C. Extraction and

Partial Characterization of Lectin from Indonesian Brown Algae *Padina australis* and *Padina minor*. **Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 103-111, 2019.

FAMIL SAMAVATI, S.; NIKKHAH, M.; EIDI, A.; KHODARAHMI, R. Reduced thermodynamic stability as prerequisite for aggregation of SOD1 mutants: a path through the reduction in intramolecular disulfide bonds. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 17, p. 2053-2071, 2020.

FERNANDES, R. S.; DEY, N. Synthetic Supramolecular Host for D-(–)-Ribose: Ratiometric Fluorescence Response via Multivalent Lectin-Carbohydrate Interactions. **ChemBioChem**, v. 23, n. 13, p. e202200044, 2022.

FERREIROS, C. M.; CRIADO, M. T. Selective interaction of a *Fucus vesiculosus* lectin-like mucopolysaccharide with several *Candida* species. In: **Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie**. Elsevier Masson, 1983. p. 149-154.

FONTENELLE, T. P. C.; LIMA, G. C.; MESQUITA, J. X.; DE SOUZA LOPES, J. L.; DE BRITO, T. V.; JÚNIOR, F. D. C. V.; SALES, A. B.; ARAGÃO, K. S.; SOUZA, M. H. L. P.; BARBOSA, A. L. R.; FREITAS, A. L. P. Lectin obtained from the red seaweed *Bryothamnion triquetrum*: Secondary structure and anti-inflammatory activity in mice. **International journal of biological macromolecules**, v. 112, p. 1122-1130, 2018.

GABBA, A.; BOGUCA, A.; LUZ, J. G.; DINIZ, A.; COELHO, H.; CORZANA, F.; CAÑADA, F. J.; MARCELO, F.; MURPHY, P. V.; BIRRANE, G. Crystal structure of the carbohydrate recognition domain of the human macrophage galactose C-type lectin bound to GalNAc and the tumor-associated Tn antigen. **Biochemistry**, v. 60, n. 17, p. 1327-1336, 2021.

GAO, C.; WEI, M.; MCKITRICK, T. R.; MCQUILLAN, A. M.; HEIMBURG-MOLINARO, J.; CUMMINGS, R. D. Glycan microarrays as chemical tools for identifying glycan recognition by immune proteins. **Frontiers in chemistry**, v. 7, p. 833, 2019.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S. E.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. **Protein identification and analysis tools on the ExPASy server**. Humana press, 2005.

GUAN, W.; ZHANG, N.; BAINS, A.; MARTINEZ, A.; LIWANG, P. J. Sustained Delivery of the Antiviral Protein Griffithsin and Its Adhesion to a Biological Surface by a Silk Fibroin Scaffold. **Materials**, v. 16, n. 16, p. 5547, 2023.

GUO, S.; VANCE, T. D.; ZAHIRI, H.; EVES, R.; STEVENS, C.; HEHEMANN, J. H.; VIDAL-MELGOSA, S.; DAVIES, P. L. Structural basis of ligand selectivity by a bacterial Adhesin Lectin involved in multispecies biofilm formation. **MBio**, v. 12, n. 2, p. 10.1128/mbio.00130-21, 2021.

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

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

GUPTA, R.; SRIVASTAVA, D.; SAHU, M.; TIWARI, S.; AMBASTA, R. K.; KUMAR, P. Artificial intelligence to deep learning: machine intelligence approach for drug discovery. **Molecular diversity**, v. 25, p. 1315-1360, 2021.

GRAEF, J.; EHRT, C.; RAREY, M. Binding Site Detection Remastered: Enabling Fast, Robust, and Reliable Binding Site Detection and Descriptor Calculation with DoGSite3. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 63, n. 10, p. 3128-3137, 2023.

GRANT, R. P.; BUTTERY, S. M.; EKMAN, G. C.; ROBERTS, T. M.; STEWART, M. Structure of MFP2 and its function in enhancing MSP polymerization in *Ascaris* sperm amoeboid motility. **Journal of molecular biology**, v. 347, n. 3, p. 583-595, 2005.

HABERMANN, F. A.; KALTNER, H.; HIGUERO, A. M.; CABALLERO, G. G.; LUDWIG, A. K.; MANNING, J. C.; BAD-RODRÍGUEZ, J.; GABIUS, H. J. What cyto- and histochemistry can do to crack the sugar code. **Acta Histochemica et Cytochemica**, v. 54, n. 2, p. 31-48, 2021.

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

HAN, J. W., KLOCHKOVA, T. A.; SHIM, J. B.; YOON, K., KIM, G. H. Isolation and characterization of a sex-specific lectin in a marine red alga, *Aglaothamnion oosumiense* Itono. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 20, p. 7283-7289, 2012a.

HAN, J. W.; JUNG, M. G.; KIM, M. J.; YOON, K. S.; LEE, K. P.; KIM, G. H. Purification and characterization of a D-mannose specific lectin from the green marine alga, *Bryopsis plumosa*. **Phycological Research**, v. 58, n. 2, p. 143-150, 2010.

HAN, J. W.; YOON, K. S.; JUNG, M. G.; CHAH, K. H., KIM, G. H. Molecular characterization of a lectin, BPL-4, from the marine green alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta). **Algae**, v. 27, n. 1, p. 55-62, 2012b.

HAN, J. W.; YOON, K. S.; KLOCHKOVA, T. A.; HWANG, M. S.; KIM, G. H. Purification and characterization of a lectin, BPL-3, from the marine green alga *Bryopsis plumosa*. **Journal Applied of Phycology**. v.23, p.745-753, 2011.

HANSSON, G. C. Mucins and the microbiome. **Annual review of biochemistry**, v. 89, p. 769-793, 2020.

HARB, T. B.; VEGA, J.; BONOMI-BARUFI, J.; CASAS, V.; ABDALA-DÍAZ, R.; FIGUEROA, F. L.; CHOW, F. Brazilian Beach-Cast Seaweeds: Antioxidant, Photoprotection and Cytotoxicity Properties. **Waste and Biomass Valorization**, v. 14, n. 7, p. 2249-2265, 2023.

HARCUS, Y.; NICOLL, G.; MURRAY, J.; FILBEY, K.; GOMEZ-ESCOBAR, N.; MAIZELS, R. M. C-type lectins from the nematode parasites *Heligmosomoides polygyrus* and *Nippostrongylus brasiliensis*. **Parasitology International**, v. 58, n. 4, p. 461-470, 2009.

- HARTWEG, M.; JIANG, Y.; YILMAZ, G.; JARVIS, C. M.; NGUYEN, H. V. T.; PRIMO, G. A.; JOHNSON, J. A. Synthetic glycomacromolecules of defined valency, absolute conformation, and topology distinguish between human lectins. **JACS Au**, v. 1, n. 10, p. 1621-1630, 2021.
- HATAKEYAMA, T.; UNNO, H. Functional Diversity of Novel Lectins with Unique Structural Features in Marine Animals. **Cells**, v. 12, n. 14, p. 1814, 2023.
- HAYASHI, K.; WALDE, P.; MIYAZAKI, T.; SAKAYAMA, K.; NAKAMURA, A.; KAMEDA, K.; MASUDA, S.; UMAKOSHI, H.; KATO, K. Active targeting to osteosarcoma cells and apoptotic cell death induction by the novel lectin *Eucheuma serra* agglutinin isolated from a marine red alga. **Journal of drug delivery**, v. 2012, 2012.
- HIDALGO ROA, D. J. **Detección, purificación y caracterización parcial de lectinas presentes en algas marinas colombianas**. 2017. Tese de Doutorado.
- HIRATA, T.; KIZUKA, Y. N-glycosylation. **The Role of Glycosylation in Health and Disease**, p. 3-24, 2021.
- HIRAYAMA, M.; LY, B. M.; HORI, K. Biological activity, cDNA cloning and primary structure of lectin KSA-2 from the cultivated red alga *Kappaphycus striatum* (Schmitz) Doty ex Silva. **Phytochemistry Letters**, v. 14, p. 99-105, 2015.
- HIRAYAMA, M.; SHIBATA, H.; IMAMURA, K.; SAKAGUCHI, T.; HORI, K. High-mannose specific lectin and its recombinants from a carrageenophyta *Kappaphycus alvarezii* represent a potent anti-HIV activity through high-affinity binding to the viral envelope glycoprotein gp120. **Marine biotechnology**, v. 18, p. 215-231, 2016.
- HOLANDA, M. L.; MELO, V. M. M.; SILVA, L. M. C. M.; AMORIM, R. C. N.; PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B. Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1769-1773, 2005.
- HORI, K. Novel polypeptide, polynucleotide encoding the polypeptide and use the polypeptide and polynucleotide. **European patent application. App Num. 06714741.3**, 2007.
- HORI, K.; MIYAZAWA, K.; ITO, K. Some common properties of lectins from marine algae. **Hydrobiologia**, v. 204, p. 561-566, 1990.
- HORI, K.; MATSUBARA, K.; MIYAZAWA, K. Primary structures of two hemagglutinins from the marine red alga, *Hypnea japonica*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1474, n. 2, p. 226-236, 2000.
- HORI, K.; MATSUDA, H.; MIYAZAWA, K.; ITO, K. A mitogenic agglutinin from the red alga *Carpopeltis flabellata*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 5, p. 1335-1338, 1987.
- HORI, K.; SATO, Y.; ITO, K.; FUJIWARA, Y.; IWAMOTO, Y.; MAKINO, H.; KAWAKUBO, A. Strict specificity for high-mannose type N-glycans and primary structure of a red alga *Eucheuma serra* lectin. **Glycobiology**, v. 17, n. 5, p. 479-491, 2007.

HE, J.; SHEN, C.; LIANG, H.; FANG, X.; LU, J. Antimicrobial properties and immunerelated gene expression of a C-type lectin isolated from *Pinctada fucata martensii*. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 105, p. 330-340, 2020.

HUANG, J.; LI, M.; MEI, B.; LI, J.; ZHU, Y.; GUO, Q.; ZHANG, G. Whole-cell tumor vaccines desialylated to uncover tumor antigenic Gal/GalNAc epitopes elicit anti-tumor immunity. *Journal of Translational Medicine*, v. 20, n. 1, p. 496, 2022.

HUNG, L. D.; HIRAYAMA, M.; LY, B. M.; HORI, K. Purification, primary structure, and biological activity of the high-mannose N-glycan-specific lectin from cultivated *Euचेuma denticulatum*. *Journal of applied phycology*, v. 27, n. 4, p. 1657-1669, 2015.

HUNG, L. D.; TRINH, P. T. H. Structure and anticancer activity of a new lectin from the cultivated red alga, *Kappaphycus striatus*. *Journal of natural medicines*, v. 75, n. 1, p. 223-231, 2021.

HUSKENS, D.; FÉRIR, G.; VERMEIRE, K.; KEHR, J. C.; BALZARINI, J.; DITTMANN, E.; SCHOLS, D. Microvirin, a novel α (1, 2)-mannose-specific lectin isolated from *Microcystis aeruginosa*, has anti-HIV-1 activity comparable with that of cyanovirin-N but a much higher safety profile. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 32, p. 24845-24854, 2010.

HWANG, H. J.; HAN, J. W.; JEON, H.; CHO, K.; KIM, J. H.; LEE, D. S.; HAN, J. W. Characterization of a novel mannose-binding lectin with antiviral activities from red alga, *Grateloupia chiangii*. *Biomolecules*, v. 10, n. 2, p. 333, 2020.

HWANG, H. J.; HAN, J. W.; JEON, H.; HAN, J. W. Induction of recombinant lectin expression by an artificially constructed tandem repeat structure: A case study using *Bryopsis plumosa* mannose-binding lectin. *Biomolecules*, v. 8, n. 4, p. 146, 2018a.

HWANG, H. J.; HAN, J. W.; KIM, G. H.; HAN, J. W. Functional expression and characterization of the recombinant N-acetyl-glucosamine/N-acetyl-galactosamine-specific marine algal lectin BPL3. *Marine Drugs*, v. 16, n. 1, p. 13, 2018b.

ICHIHARA, K.; ARAI, S.; SHIMADA, S. cDNA cloning of a lectin-like gene preferentially expressed in freshwater from the macroalga *Ulva limnetica* (Ulvales, Chlorophyta). *Phycological research*, v. 57, n. 2, p. 104-110, 2009.

JIMBO, M.; KOIKE, K.; SAKAI, R.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. Cloning and characterization of a lectin from the octocoral *Sinularia lochmodes*. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 330, n. 1, p. 157-162, 2005.

JIMBO, M.; YAMAGUCHI, M.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. Cloning of the *Microcystis aeruginosa* M228 lectin (MAL) gene. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 273, n. 2, p. 499-504, 2000.

JUMPER, J.; EVANS, R.; PRITZEL, A.; GREEN, T.; FIGURNOV, M.; RONNEBERGER, O.; TUNYASUVUNAKOO, K.; BATES, R.; ŽÍDEK, A.; POTAPENKO, A.; BRIDGLAND, A.; MEYER, C.; KOHL, S. A. A.; BALLARD, A. J.; COWIE, A.; ROMERA-PAREDES, B.;

- NIKOLOV, S.; JAIN, R.; ADLER, J.; BACK, T.; PETERSEN, S.; REIMAN, D.; CLANCY, E.; ZIELINSKI, M.; STEINEGGER, M.; PACHOLSKA, M.; BERGHAMMER, T.; BODENSTEIN, S.; SILVER, D.; VINYALS, O.; SENIOR, W. A.; KAVUKCUOGLU, K.; KOHLI, P.; HASSABIS, D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583-589, 2021.
- JUNG, M. G.; LEE, K. P.; CHOI, H. G.; KANG, S. H.; KLOCHKOVA, T. A.; HAN, J. W.; KIM, G. H. Characterization of carbohydrate combining sites of Bryohealin, an algal lectin from *Bryopsis plumosa*. **Journal of applied phycology**, v. 22, p. 793-802, 2010.
- KAMAZ, Z. A.; UMAR, H. I.; DOSHI, P.; SURI, P. Glycosylated Antibiotics: New Promising Bacterial Efflux Pumps Inhibitors. **bioRxiv**, p. 2021.03. 31.437923, 2021.
- KAMIYA, H.; OGATA, K.; HORI, K. Isolation and characterization of a new agglutinin in the red alga *Palmaria palmata* (L.) O. Kuntze. 1982.
- KAMIYA, H.; SHIOMI, K.; SHIMIZU, Y. Marine Biopolymers With Cell Specificity--III--Agglutinins in the Red Alga *Cystocolonium purpureum*: Isolation and Characterization. **Journal of Natural Products**, v. 43, n. 1, p. 136-139, 1980.
- KANO, H.; KITAMURA, T.; KOBAYASHI, Y. A sulfated proteoglycan from the red alga *Gracilaria verrucosa* is a hemagglutinin. **Comparative Biochemistry and physiology. B, Comparative Biochemistry**, v. 102, n. 3, p. 445-449, 1992.
- KAWAKUBO, A.; MAKINO, H.; OHNISHI, J. I.; HIROHARA, H.; HORI, K. Occurrence of highly yielded lectins homologous within the genus *Eucheuma*. **Journal of applied phycology**, v. 11, p. 149-156, 1999.
- KAWAKUBO, A.; MAKINO, H.; OHNISHI, J. I.; HIROHARA, H.; HORI, K. The marine red alga *Eucheuma serra* J. Agardh, a high yielding source of two isolectins. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 331-338, 1997.
- KEHR, J. C.; ZILLIGES, Y.; SPRINGER, A.; DISNEY, M. D.; RATNER, D. D.; BOUCHIER, C.; DITTMANN, E. A mannan binding lectin is involved in cell-cell attachment in a toxic strain of *Microcystis aeruginosa*. **Molecular microbiology**, v. 59, n. 3, p. 893-906, 2006.
- KHEMAISSA, S.; SAGAN, S.; WALRANT, A. Tryptophan, an amino-acid endowed with unique properties and its many roles in membrane proteins. **Crystals**, v. 11, n. 9, p. 1032, 2021.
- KHOSROWABADI, E.; WENTA, T.; KESKITALO, S.; MANNINEN, A.; KELLOKUMPU, S. Altered glycosylation of several metastasis-associated glycoproteins with terminal GalNAc defines the highly invasive cancer cell phenotype. **Oncotarget**, v. 13, p. 73, 2022.
- KIESSLING, L. L. Chemistry-driven glycoscience. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 19, p. 5229-5238, 2018.
- KIESSLING, L. L.; DIEHL, R. C. CH- π interactions in glycan recognition. **ACS Chemical Biology**, v. 16, n. 10, p. 1884-1893, 2021.

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

KITA, A.; JIMBO, M.; SAKAI, R.; MORIMOTO, Y.; TAKEUCHI, R.; TANAKA, H.; TAKAHASHI, T.; MIKI, K. Crystal structure of octocoral lectin SLL-2 complexed with Forssman antigen tetrasaccharide. **Glycobiology**, v. 27, n. 8, p. 696-700, 2017.

KOHARUDIN, L. M.; GRONENBORN, A. M. Structural basis of the anti-HIV activity of the cyanobacterial *Oscillatoria agardhii* agglutinin. **Structure**, v. 19, n. 8, p. 1170-1181, 2011.

KOHARUDIN, L. M.; KOLLIPARA, S.; AIKEN, C.; GRONENBORN, A. M. Structural insights into the anti-HIV activity of the *Oscillatoria agardhii* agglutinin homolog lectin family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 40, p. 33796-33811, 2012.

KUMARI RAYALA, V. P.; KANDULA, J. S.; P, R. Advances and challenges in the pharmacokinetics and bioanalysis of chiral drugs. **Chirality**, v. 34, n. 10, p. 1298-1310, 2022.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680–683, 1970.

LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 89, p. 45-55, 2011.

LANDSTEINER, K. **The Specificity of Serological Reactions: Rev. Ed. With a Chapter on Molecular Structure and Intermolecular Forces, by Linus Pauling, and with a Bibliography of Dr. Landsteiner's Works and a New Pref., by Merrill W. Chase.** Dover Publications, 1962.

LAPLANTE, K. L.; DHAND, A.; WRIGHT, K.; LAUTERIO, M. Re-establishing the utility of tetracycline-class antibiotics for current challenges with antibiotic resistance. **Annals of Medicine**, v. 54, n. 1, p. 1686-1700, 2022.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; THORNTON, J. M. PROCHECK: validation of protein-structure coordinates. 2012. doi, v. 10, n. 97809553602060000882, p. 684-687.

LASKOWSKI, R. A. PDBsum 1: A standalone program for generating PDBsum analyses. **Protein Science**, v. 31, n. 12, p. e4473, 2022.

LASTOVICKOVA, M.; STROUHALOVA, A.; BOBALOVA, J. Use of lectin-based affinity techniques in breast cancer glycoproteomics: a review. **Journal of proteome research**, v. 19, n. 5, p. 1885-1899, 2020.

LEÃO, R. P.; CRUZ, J. V.; DA COSTA, G. V.; CRUZ, J. N.; FERREIRA, E. F.; SILVA, R. C.; LIMA, L. R.; BORGES, R. S.; SANTOS, G. B.; SANTOS, C. B. Identification of new rofecoxib-based cyclooxygenase-2 inhibitors: A bioinformatics approach. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 9, p. 209, 2020.

LECHARTIER, B.; HARTKOONR, R. C.; COLE, S. T. In vitro combination studies of benzothiazinone lead compound BTZ043 against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial**

Agentes and C hemotherapy, [s.l.], v. 56, n. 11, p. 5790-5793, 2012.

LEE, C. Griffithsin, a highly potent broad-spectrum antiviral lectin from red algae: From discovery to clinical application. **Marine drugs**, v. 17, n. 10, p. 567, 2019.

LEE, G. R.; WON, J.; HEO, L.; SEOK, C. GalaxyRefine2: simultaneous refinement of inaccurate local regions and overall protein structure. **Nucleic acids research**, v. 47, n. W1, p. W451-W455, 2019.

LEE, J. H.; LEE, S. B.; KIM, H.; SHIN, J. M.; YOON, M.; AN, H. S.; HAN, J. W. Anticancer Activity of Mannose-Specific Lectin, BPL2, from Marine Green Alga *Bryopsis plumosa*. **Marine Drugs**, v. 20, n. 12, p. 776, 2022.

LEITE, Y. F. M. M.; SILVA, L. M. C. M.; DAS NEVES AMORIM, R. C.; FREIRE, E. A.; DE MELO JORGE, D. M.; GRANGEIRO, T. B.; BENEVIDES, N. M. B. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1724, n. 1-2, p. 137-145, 2005.

LETUNIC, I.; KHEDKAR, S.; BORK, P. SMART: recent updates, new developments and status in 2020. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 49, n. D1, p. D458-D460, 2021.

LI, G.; ZHAO, Z.; WU, B.; SU, Q.; WU, L.; YANG, X.; CHEN, J. Ulva pertusa lectin 1 delivery through adenovirus vector affects multiple signaling pathways in cancer cells. **Glycoconjugate Journal**, v. 34, p. 489-498, 2017.

LI, J.; QIN, Y.; ZHAO, C.; ZHANG, Z.; ZHOU, Z. Tetracycline antibiotics: Potential anticancer drugs. **European journal of pharmacology**, p. 175949, 2023.

LIMA, M. E.; CARNEIRO, M. E.; NASCIMENTO, A. E.; GRANGEIRO, T. B.; HOLANDA, M. L.; AMORIM, R. C.; BENEVIDES, N. M. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria cornea* and its effects on the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 16, p. 6414-6419, 2005.

LIMA, R. F.; CRIDDLE, D. N.; SOUZA, E. P.; SAMPAIO, A. H.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; ASSREUY, A. M. S. Red marine alga *Bryothamnion triquetrum* lectin induces endothelium-dependent relaxation of the rat aorta via release of nitric oxide. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 11, p. 1415-1421, 2004.

LIAO, W. R.; LIN, J. Y.; SHIEH, W. Y.; JENG, W. L.; HUANG, R. Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine *vibrios*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 7, p. 433-439, 2003.

LI, P.; BAI, J.; ZHANG, X.; YAN, Z.; HE, P.; CHEN, Y. Structure and Anticoagulant Activity of a Galactofuranose-Containing Sulfated Polysaccharide from the Green Seaweed, *Codium isthmocladum*. **Molecules**, v. 27, n. 22, p. 8012, 2022.

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

LIYANAGE, S. H.; YAN, M. Quantification of binding affinity of glyconanomaterials with lectins. **Chemical Communications**, v. 56, n. 88, p. 13491-13505, 2020.

LI, Y.; WANG, J.; CHEN, W.; LU, H.; ZHANG, Y. Comprehensive review of MS-based studies on N-glycoproteome and N-glycome of extracellular vesicles. **Proteomics**, p. 2300065, 2023.

LIU, J., LI, J., YI, D., LIU, Y., LIU, R., XUE, Y., HUANG, Q.; LIU, S.; JIANG, Y. Non-derivatization strategy for the comprehensive characterization of neutral monosaccharide isomers and neutral disaccharide isomers using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to quadrupole/time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1185, p. 122972, 2021a.

LIU, Y., WU, Q., WU, X., ALGHARIB, S. A., GONG, F., HU, J., LUO, W.; ZHOU, M.; PAN, Y.; YAN, Y.; WANG, Y. Structure, preparation, modification, and bioactivities of β -glucan and mannan from yeast cell wall: A review. **International journal of biological macromolecules**, v. 173, p. 445-456, 2021b.

LOO, S.; TAY, S. V.; KAM, A.; TANG, F.; FAN, J. S.; YANG, D.; TAM, J. P. Anti-fungal Hevein-like peptides biosynthesized from quinoa cleavable hololectins. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 5909, 2021.

LOPES, J. F.; GASPAR, E. M. Simultaneous chromatographic separation of enantiomers, anomers and structural isomers of some biologically relevant monosaccharides. **Journal of Chromatography A**, v. 1188, n. 1, p. 34-42, 2008.

LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. 5th ed. New Yourk. Williams & Willkins. 851p, 2005.

LÓSSIO, C. F. **Análise da estrutura tridimensional, especificidade e atividade anticâncer da lectina *Canavalia villosa* (Benth)**. 2021. 279 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia de Recursos Naturais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

LOVELESS R.W.; ROGERS D.J. Biochemical studies on the lectins from subspecies of *Codium fragile*. **British Phycology Journal** v. 20, p.185, 1985.

LUDWIG, A. K.; KALTNER, H.; KOPITZ, J.; GABIUS, H. J. Lectinology 4.0: altering modular (ga) lectin display for functional analysis and biomedical applications. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1863, n. 5, p. 935-940, 2019.

LUPO, F.; INGERSOLL, M. A.; PINEDA, M. A. The glycobiology of uropathogenic *E. coli* infection: the sweet and bitter role of sugars in urinary tract immunity. **Immunology**, v. 164, n. 1, p. 3-14, 2021.

LUSVARGHI, S.; BEWLEY, C. A. Griffithsin: an antiviral lectin with outstanding therapeutic potential. **Viruses**, v. 8, n. 10, p. 296, 2016.

MADANI, A.; MCCANN, B.; NAIK, N.; KESKAR, N. S.; ANAND, N.; EGUCHI, R. R.; HUANG, P.; SOCHER, R. Progen: Language modeling for protein generation. **arXiv**

preprint arXiv:2004.03497, 2020.

MALIK, S. S.; MUNDRA, S. Increasing consumption of antibiotics during the COVID-19 pandemic: Implications for patient health and emerging anti-microbial resistance. **Antibiotics**, v. 12, n. 1, p. 45, 2022.

MARX, V. Method of the Year: protein structure prediction. **Nature methods**, v. 19, n. 1, p. 5-10, 2022.

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

MATHIEU, S. V.; ARAGÃO, K. S.; IMBERTY, A.; VARROT, A. Discoidin I from *Dictyostelium discoideum* and interactions with oligosaccharides: specificity, affinity, crystal structures, and comparison with discoidin II. **Journal of molecular biology**, v. 400, n. 3, p. 540-554, 2010.

MATSUBARA, K.; SUMI, H.; HORI, K. Platelet aggregation is inhibited by phycolectins. **Experientia**, v. 52, p. 540-543, 1996.

MEINITA, M. D. N.; HARWANTO, D.; CHOI, J. S. A concise review of the bioactivity and pharmacological properties of the genus *Codium* (Bryopsidales, Chlorophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 34, n. 6, p. 2827-2845, 2022.

MELO, F.R.; BENEVIDES, N.; PEREIRA, M.G.; HOLANDA, M.L.; MENDES, F.N.; OLIVEIRA, S.R.; FREITAS, A.L.P.; SILVA, L.M. Purification and partial characterisation of a lectin from the red marine alga *Vidalia obtusiloba* C. Agardh. **Brazilian Journal of Botany**, v. 27, n. 2, p. 263-269, 2004.

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

MELHEM, H.; REGAN-KOMITO, D.; NIESS, J. H. Mucins dynamics in physiological and pathological conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 24, p. 13642, 2021.

MESQUITA, J. X.; DE BRITO, T. V.; FONTENELLE, T. P. C.; DAMASCENO, R. O. S.; DE SOUZA, M. H. L. P.; DE SOUZA LOPES, J. L.; BELTRAMINI, L. M.; BARBOSA, A.L.R.; FREITAS, A. L. P. Lectin from red algae *Amansia multifida* Lamouroux: Extraction, characterization and anti-inflammatory activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 170, p. 532-539, 2021.

MIRDITA, M.; SCHÜTZE, K.; MORIWAKI, Y.; HEO, L.; OVCHINNIKOV, S.; STEINEGGER, M. ColabFold: making protein folding accessible to all. **Nature methods**, v. 19, n. 6, p. 679-682, 2022.

- MISHRA, N.; TIWARI, V. K.; SCHMIDT, R. R. Recent trends and challenges on carbohydrate-based molecular scaffolding: General consideration toward impact of carbohydrates in drug discovery and development. **Carbohydrates in Drug Discovery and Development**, p. 1-69, 2020.
- MOHANTY, S.; P CHAUDHARY, B.; ZOETEWEEY, D. Structural insight into the mechanism of N-linked glycosylation by oligosaccharyltransferase. **Biomolecules**, v. 10, n. 4, p. 624, 2020.
- MOLCHANOVA, V.; CHERNIKOV, O.; CHIKALOVETS, I.; LUKYANOV, P. Purification and partial characterization of the lectin from the marine red alga *Tichocarpus crinitus* (Gmelin) Rupr.(Rhodophyta). *Bot Mar* 53:69–78. 2010.
- MOLCHANOVA, V.; CHIKALOVETS, I.; CHERNIKOV, O.; BELOGORTSEVA, N.; LI, W.; WANG, J. H.; YANG, D. O.; ZHENG, Y.; LUKYANOV, P. A new lectin from the sea worm *Serpula vermicularis*: Isolation, characterization and anti-HIV activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, n. 2, p. 184-193, 2007.
- MORIEL, D. G.; PICCIOLI, D.; RASO, M. M.; PIZZA, M. The overlooked bacterial pandemic. In: **Seminars in Immunopathology**. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2023. p. 1-11.
- MORI, T.; O'KEEFE, B. R.; SOWDER, R. C.; BRINGANS, S.; GARDELLA, R.; BERG, S.; COCHRAN, P.; TURPIN, J. A.; JÚNIOR, B. R. W.; MCMAHON, J. B.; BOYD, M. R. Isolation and characterization of griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia* sp. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 10, p. 9345-9353, 2005.
- MOSSUTO, M. F. Disulfide bonding in neurodegenerative misfolding diseases. **International journal of cell biology**, v. 2013, 2013.
- MOULAEI, T.; BOTOS, I.; ZIÓŁKOWSKA, N. E.; BOKESCH, H. R.; KRUMPE, L. R.; MCKEE, T. C.; O'KEEFE, B. R.; DAUTER, Z.; WLODAWER, A.; WLODAWER, A. Atomic-resolution crystal structure of the antiviral lectin scytovirin. **Protein Science**, v. 16, n. 12, p. 2756-2760, 2007.
- MUHA, T. P.; SKUKAN, R.; BORRELL, Y. J.; RICO, J. M.; GARCIA DE LEANIZ, C.; GARCIA-VAZQUEZ, E.; CONSUEGRA, S. Contrasting seasonal and spatial distribution of native and invasive *Codium* seaweed revealed by targeting species-specific eDNA. **Ecology and Evolution**, v. 9, n. 15, p. 8567-8579, 2019.
- MU, J.; HIRAYAMA, M.; SATO, Y.; MORIMOTO, K.; HORI, K. A novel high-mannose specific lectin from the green alga *Halimeda renschii* exhibits a potent anti-influenza virus activity through high-affinity binding to the viral hemagglutinin. **Marine drugs**, v. 15, n. 8, p. 255, 2017.
- MUKHAMMADIEV, R.S.; SKVORTSOV, E.V.; VALIULLIN, L.R.; GLINUSHKIN, A.P.; BAGAEVA, T. V. Isolation, Purification, and Characterization of a Lectin from the Fungus *Fusarium solani* 4. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 206-211, 2021.

NABETA, H. W.; KOUOKAM, J. C.; LASNIK, A. B.; FUQUA, J. L.; PALMER, K. E. Novel antifungal activity of Q-Griffithsin, a broad-spectrum antiviral lectin. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 2, p. e00957-21, 2021.

NABETA, H. W.; ZAHIN, M.; LASNIK, A.; CASH, E. D.; WU, X.; RAI, S.; KITTERMANN, K.; WANG, L.; PATEL, S.; ROHAN, L.; HILLIER, S. L.; MATOBA, N.; POTTS, K. L.; DRYDEN, G.; PALMER, K. E. PHASE 1 CLINICAL TRIALS OF A Q-GRIFFITHSIN NASAL SPRAY FOR SARS-CoV-2 PROPHYLAXIS. **Topics in Antiviral Medicine**, p. 217-218, 2023.

NABI-AFJADI, M.; HEYDARI, M.; ZALPOOR, H.; ARMAN, I.; SADOUGHI, A.; SAHAMI, P.; AGHAZADEH, S. Lectins and lectin bodies: potential promising antiviral agents. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 27, n. 1, p. 37, 2022.

NAGANO, C. S.; DEBRAY, H.; NASCIMENTO, K. S.; PINTO, V. P.; CAVADA, B. S.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W. R. L.; SAMPAIO, A. H.; CALVETE, J. J. HCA and HML isolated from the red marine algae *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis* define a novel lectin family. **Protein Science**, v. 14, n. 8, p. 2167-2176, 2005a.

NAGANO, C. S.; GALLEGO DEL SOL, F.; CAVADA, B. S.; NASCIMENTO, K. S.; NUNES, E. V.; SAMPAIO, A. H.; CALVETE, J. J. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of HML, a lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 61, n. 11, p. 997-999, 2005b.

NAIDOO, D.; KAR, P.; ROY, A.; MUTANDA, T.; BWAPWA, J.; SEN, A.; ANANDRAJ, A. Structural insight into the binding of cyanovirin-n with the spike glycoprotein, mpro and PLpro of SARS-CoV-2: Protein-protein interactions, dynamics simulations and free energy calculations. **Molecules**, v. 26, n. 17, p. 5114, 2021.

NAIK, S.; KUMAR, S. Lectins from plants and algae act as anti-viral against HIV, influenza and coronaviruses. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 12, p. 12239-12246, 2022.

NAITHANI, S.; KOMATH, S. S.; NONOMURA, A.; GOVINDJEE, G. Plant lectins and their many roles: Carbohydrate-binding and beyond. **Journal of Plant Physiology**, v. 266, p. 153531, 2021.

NASCIMENTO DA SILVA, L. C.; MENDONÇA, J. S. P.; DE OLIVEIRA, W. F.; BATISTA, K. L. R.; ZAGMIGNAN, A.; VIANA, I. F. T.; DOS SANTOS CORREIA, M. T. Exploring lectin-glycan interactions to combat COVID-19: Lessons acquired from other enveloped viruses. **Glycobiology**, v. 31, n. 4, p. 358-371, 2021.

NASCIMENTO-NETO, L. G.; CARNEIRO, R. F.; DA SILVA, S. R.; DA SILVA, B. R.; VASSILIEPE SOUSA ARRUDA, F.; CARNEIRO, V. A.; NASCIMENTO, K. S.; SAKER-SAMPAIO, S.; SILVA JUNIOR, V. A.; PORTO, A. L. F.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H.; TEIXEIRA, E. H.; NAGANO, C. S. Characterization of isoforms of the lectin isolated from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and its pro-healing effect. **Marine drugs**, v. 10, n. 9, p. 1936-1954, 2012.

NEVES, S. A.; DIAS-BARUFFI, M.; FREITAS, A. L. P.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Neutrophil migration induced in vivo and in vitro by marine algal lectins. **Inflammation Research**, v. 50, p. 486-490, 2001.

NEVES, S. A.; FREITAS, A. L. P.; SOUZA, B. W. S.; ROCHA, M. L. A.; CORREIA, M. V. O.; SAMPAIO, D. A.; VIANA, G. S. B. Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 127-134, 2007.

NEVES, S. A. **Lectina de *Gracilaria caudata*: Isolamento, Caracterização Parcial e Estudo Comparativo do seu Efeito Indutor de Migração de Neutrófilos, in vivo e in vitro, com o de outras Lectinas de Algas Marinhas**. Master's thesis, Universidade Federal do Ceará, 1999; pp. 97.

NIU, J.; WANG, G.; LÜ, F.; ZHOU, B.; PENG, G. Characterization of a new lectin involved in the protoplast regeneration of *Bryopsis hypnoides*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 27, n. 3, p. 502-512, 2009.

NOMURA, R.; NAKAMINAMI, H.; TAKASAO, K.; MURAMATSU, S.; KATO, Y.; WAJIMA, T.; NOGUCHI, N. A class A β -lactamase produced by borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* hydrolyses oxacillin. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 244-247, 2020.

NOTOVA, S.; BONNARDEL, F.; LISACEK, F.; VARROT, A.; IMBERTY, A. Structure and engineering of tandem repeat lectins. **Current opinion in structural biology**, v. 62, p. 39-47, 2020.

NOTOVA, S.; BONNARDEL, F.; ROSATO, F.; SIUKSTAITE, L.; SCHWAIGER, J.; LIM, J. H.; BOVIN, N.; VARROT, A.; OGAWA, Y.; RÖMER, W.; LISACEK, F.; IMBERTY, A. The choanoflagellate pore-forming lectin SaroL-1 punches holes in cancer cells by targeting the tumor-related glycosphingolipid Gb3. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 954, 2022.

NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer research**, v. 20, n. 4, p. 462-466, 1960.

OCHIAI, K. K.; HANAWA, D.; OGAWA, H. A.; TANAKA, H.; UESAKA, K.; EDZUKA, T.; SHIRAE-KURABAYASHI, M.; TOYODA, A.; ITOH, T.; GOSHIMA, G. Genome sequence and cell biological toolbox of the highly regenerative, coenocytic green feather alga *Bryopsis*. **bioRxiv**, p. 2023.11. 22.568388, 2023.

OGAWA, R.; OKIMOTO, T.; KODAMA, M.; TOGO, K.; FUKUDA, K.; OKAMOTO, K.; MIZUKAMI, K.; MURAKAMI, K. Changes in Gastric Mucosal Glycosylation Before and After *Helicobacter pylori* Eradication Using Lectin Microarray Analysis. **The Turkish Journal of Gastroenterology**, v. 33, n. 2, p. 88, 2022.

OKAMOTO, R.; HORI, K.; MIYAZAWA, K.; ITO, K. Isolation and characterization of a new hemagglutinin from the red alga *Gracilaria bursa-pastoris*. **Experientia**, v. 46, p. 975-977, 1990.

O'KEEFE, B.R.; SMEE, D.F.; TURPIN, J.A.; SAUCEDO, C.J.; GUSTAFSON, K.R.; MORI,

- T.; BLAKESLEE, D.; BUCKHEIT, R. BOYD, M.R. 2003. Potente atividade antigripal da cianovirina-N e interações com hemaglutinina viral. *Antimicrobianos e quimioterapia*, 47(8), pp.2518-2525.
- OKUYAMA, S.; NAKAMURA-TSURUTA, S.; TATENO, H.; HIRABAYASHI, J.; MATSUBARA, K.; HORI, K. Strict binding specificity of small-sized lectins from the red alga *Hypnea japonica* for core (α 1-6) fucosylated N-glycans. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 73, n. 4, p. 912-920, 2009.
- OLIVEIRA, A. S.; LOSSIO, C. F.; RANGEL, A. J.; MARTINS, M. G.; NASCIMENTO, F. E.; ANDRADE, M. L. D.; CAVADA, B. S.; LACERDA, S. R.; NASCIMENTO, K. S. Detection, purification and characterization of a lectin from freshwater green algae *Spirogyra* spp. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, p. 2113-2117, 2017.
- OLIVEIRA, S. R.; NASCIMENTO, A. E.; LIMA, M. E.; LEITE, Y. F.; BENEVIDES, N. Purification and characterisation of a lectin from the red marine alga *Pterocladia capillacea* (SG Gmel.) Santel. & Hommers. **Brazilian Journal of Botany**, v. 25, p. 397-403, 2002.
- OMOKAWA, Y.; MIYAZAKI, T.; WALDE, P.; AKIYAMA, K.; SUGAHARA, T.; MASUDA, S.; INADA, A.; OHNISHI, Y.; SAEKI, T.; KATO, K. In vitro and in vivo anti-tumor effects of novel Span 80 vesicles containing immobilized *Eucheuma serra* agglutinin. **International journal of pharmaceutics**, v. 389, n. 1-2, p. 157-167, 2010.
- PATEL, A. K.; ALBARICO, F. P. J. B.; PERUMAL, P. K.; VADRALE, A. P.; NIAN, C. T.; CHAU, H. T. B.; ANWAR, C.; WANI, H. M. U. D.; PAL, A.; SAINI, R.; HA, L. H.; SENTHILKUMAR, B.; TSANG, Y.; CHEN, C.; DONG, C.; SINGHANIA, R. R. Algae as an emerging source of bioactive pigments. **Bioresource Technology**, v. 351, p. 126910, 2022.
- PANG, Q.; LIU, X.; ZHAO, B.; WEI, W.; ZHANG, X.; ZHAO, L.; XIE, J.; SUN, H. Purification, characterization and induction of a C-type lectin in the freshwater *planarian Dugesia japonica*. **Central European Journal of Biology**, v. 7, n. 2, p. 354-361, 2012.
- PARK, J.; KIM, C. H.; CHO, S. H. Genome Sequencing-Based Evolutionary Prediction of Glycan-Adhering Lectins and Experimental Evaluation of a Lectin (FimH) Inhibitor Using an Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strain Isolated in Korea. 2022.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. N. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347-352, 1995.
- PIETRZYK, A. J.; BUJACZ, A.; MAK, P.; POTEMPA, B.; NIEDZIELA, T. Structural studies of *Helix aspersa* agglutinin complexed with GalNAc: A lectin that serves as a diagnostic tool. **International journal of biological macromolecules**, v. 81, p. 1059-1068, 2015.
- PIETRZYK-BRZEZINSKA, A. J.; BUJACZ, A. H-type lectins—Structural characteristics and their applications in diagnostics, analytics and drug delivery. **International journal of biological macromolecules**, v. 152, p. 735-747, 2020.
- PINTO, D.; PARAMESWARAN, R. Role of Truncated O-GalNAc Glycans in Cancer Progression and Metastasis in Endocrine Cancers. **Cancers**, v. 15, n. 13, p. 3266, 2023.

PINTO, V.; DEBRAY, H.; DUS, D.; TEIXEIRA, E. H.; DE OLIVEIRA, T. M.; CARNEIRO, V. A.; TEIXEIRA, A. H.; FILHO, G. C.; NAGANO, C. S.; NASCIMENTO, K. S.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S. Lectins from the red marine algal species *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum* as tools to differentiate human colon carcinoma cells. **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, v. 2009, 2009.

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

QUEIROZ, I. N. L. **Caracterização estrutural preliminar e efeitos na inflamação da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides***. 115 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará Fortaleza, 2013.

RABECCA, R.; DOSS, A.; POLE, R. P.; SATHEESH, S. Phytochemical and anti-inflammatory properties of green macroalga *Codium tomentosum*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 45, p. 102492, 2022.

RADHAKRISHNAN, A.; PARK, K.; KWAK, I. S.; JAABIR, M.; SIVAKAMAVALLI, J. Classification of lectins. In: **Lectins: Innate immune defense and Therapeutics**. Singapore: Springer Singapore, 2022. p. 51-72.

RAIES, A.; TULODZIECKA, E.; STAINER, J.; MIDDLETON, L.; DHINDSA, R. S.; HILL, P.; ENGVIST, O.; HARPER, A. R.; PETROVSKI, S.; VITSIOS, D. DrugnomeAI is an ensemble machine-learning framework for predicting druggability of candidate drug targets. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 1291, 2022.

RAPOSO, C. D.; CANELAS, A. B.; BARROS, M. T. Human lectins, their carbohydrate affinities and where to find them. **Biomolecules**, v. 11, n. 2, p. 188, 2021.

RATHEESH, S.; APPU, A.; RAUF, A. A. Antibacterial activity of GVL, a lectin isolated from marine algae *Gracilaria verrucosa*. **Journal of Fundamental and Applied Sciences**, v. 14, n. 3, p. 509-517, 2022.

RESNIK, N.; VIŠNJAR, T.; SMRKOLJ, T.; KREFT, M. E.; ROMIH, R.; ZUPANČIČ, D. Selective targeting of lectins and their macropinocytosis in urothelial tumours: translation from in vitro to ex vivo. **Histochemistry and cell biology**, p. 1-18, 2023.

RODRIGUES R. F. **Purificação, Caracterização de uma Lectina encontrada na alga marinha verde *Codium isthmocladum* (Vickers)**. 2011. 49 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J.; FISH, B.; MUNOZ, A. HPLC studies on the lectin from *Griffithsia flosculosa*. **Br Phycol J** 1989; 24(3): 311-2.

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

ROGERS, D. J.; FISH, B.; BARWELL, C. J. Isolation and properties of lectins from two red

marine algae: *Plumaria elegans* and *Ptilota serrata*. **Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry**, v. 7, p. 49-52, 1990.

ROGERS, D. J.; FISH, B. C. Marine algal lectins. **Lectin reviews**, v. 1, p. 129-142, 1991.

ROGERS D. J.; FLANGU H. Lectins from *Codium* species. **Br. Phycology. Journal**. v. 26, p. 95-96, 1991.

ROGERS D. J.; SWAIN, L.; CARPENTER, B. G.; CRITCHLEY, A. T. Binding of N-acetyl- α -D-galactosamine by lectins from species of green marine alga genus, *Codium*. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. v. 10, p. 162-165, 1994.

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

ROSALES-MENDOZA, S.; GARCÍA-SILVA, I.; GONZÁLEZ-ORTEGA, O.; SANDOVAL-VARGAS, J. M.; MALLA, A.; VIMOLMANGKANG, S. The potential of algal biotechnology to produce antiviral compounds and biopharmaceuticals. **Molecules**, v. 25, n. 18, p. 4049, 2020.

SAAD, M. H.; EL-FAKHARANY, E. M.; SALEM, M. S.; SIDKEY, N. M. In vitro assessment of dual (antiviral and antitumor) activity of a novel lectin produced by the newly cyanobacterium isolate, *Oscillatoria acuminata* MHM-632 MK014210. 1. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 40, n. 8, p. 3560-3580, 2022.

SAAD, M. H.; SIDKEY, N. M.; KHAN, R. H.; EL-FAKHARANY, E. M. *Nostoc muscorum* is a novel source of microalgal lectins with potent antiviral activity against herpes simplex type-1. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 210, p. 415-429, 2022.

SABOYA, J. P. S. **Isolamento, caracterização parcial de lectinas presentes nas algas marinhas verdes *Udotea flabellum* (J. Ellis & Solander) M. A. Howe 1904 e *Codium isthmocladum* Vickers 1905 (CIL-3) e avaliação da toxicidade e atividade antibacteriana**. 2016. 87 f. Tese (Doutorado em engenharia de pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

SABRY, D. A.; CORDEIRO, S. L.; SILVA, C. H. F.; FARIAS, E. H. C.; SASSAKI, G. L.; NADER, H. B.; ROCHA, H. A. O. Pharmacological prospection and structural characterization of two purified sulfated and pyruvylated homogalactans from green algae *Codium isthmocladum*. **Carbohydrate polymers**, v. 222, p. 115010, 2019.

SAHOO, S., BADHE, M. R., PAUL, A., SAHOO, P. K., SURYAWANSHI, A. R., PANDA, D., PILLAI, B. R.; BALIARSINGH, S.; PATNAIK, B. B.; MOHANTY, J. Isolation and characterization of a lectin-like chitinase from the hepatopancreas of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Biochimie**, 2023.

SAMPAIO, A. H.; AINOUZ, I. L.; FREITAS, A. L. P.; BENEVIDES, N. M. B. Hemaglutininas de algas marinhas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, n. 2, p. 171-177, 1993.

SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J.; FARNHAM, W. F. Characterization of

a new lectin from the green marine alga *Ulva laetevirens*. In: **Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry**. Textop Hellerup Denmark, 1996. p. 96-100.

SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 5, p. 765-769, 1998b.

SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J. Isolation and characterization of the lectin from the green marine alga *Ulva lactuca* L. 1998a.

SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J.; SAKER-SAMPAIO, S.; COSTA, F. H.; RAMOS, M. V. A new isolation procedure and further characterisation of the lectin from the red marine alga *Ptilota serrata*. **Journal of Applied Phycology**, v. 10, p. 539-546, 1998.

SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J.; SAKER-SAMPAIO, S.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; FARIAS, W. R. New affinity procedure for the isolation and further characterization of the blood group B specific lectin from the red marine alga *Ptilota plumosa*. **Journal of applied phycology**, v. 14, p. 489-495, 2002.

SANCHEZ, J. F.; LESCAR, J.; CHAZALET, V.; AUDFRAY, A.; GAGNON, J.; ALVAREZ, R.; BRETON, C.; IMBERTY, A.; MITCHELL, E. P. Biochemical and structural analysis of *Helix pomatia* agglutinin: A hexameric lectin with a novel fold. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 29, p. 20171-20180, 2006.

SAN CLEMENTE, H.; JAMET, E. N-Glycoproteins in plant cell Walls: a survey. **Plants**, v. 11, n. 23, p. 3204, 2022.

SANZ-MARTINEZ, I.; PEREIRA, S.; MERINO, P.; CORZANA, F.; HURTADO-GUERRERO, R. Molecular Recognition of GalNAc in Mucin-Type O-Glycosylation. **Accounts of Chemical Research**, v. 56, n. 5, p. 548-560, 2023.

SATO, Y.; HIRAYAMA, M.; MORIMOTO, K.; HORI, K. The OAAH Family: Anti-Influenza Virus Lectins. **Lectin Purification and Analysis: Methods and Protocols**, p. 683-693, 2020.

SATO, Y.; HIRAYAMA, M.; MORIMOTO, K.; YAMAMOTO, N.; OKUYAMA, S.; HORI, K. High mannose-binding lectin with preference for the cluster of α 1-2-mannose from the green alga *Boodlea coacta* is a potent entry inhibitor of HIV-1 and influenza viruses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 22, p. 19446-19458, 2011a.

SATO, Y.; HORI, K. High-mannose N-glycan-specific lectin from the red alga *Kappaphycus striatum* (Carrageenophyte). **Phytochemistry**, v. 72, n. 9, p. 855-861, 2011b.

SATO, Y.; MORIMOTO, K.; HIRAYAMA, M.; HORI, K. High mannose-specific lectin (KAA-2) from the red alga *Kappaphycus alvarezii* potently inhibits influenza virus infection in a strain-independent manner. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 405, n. 2, p. 291-296, 2011c.

SATO, Y.; MORIMOTO, K.; KUBO, T.; SAKAGUCHI, T.; NISHIZONO, A.; HIRAYAMA, M.; HORI, K. Entry inhibition of influenza viruses with high mannose binding lectin ESA-2 from the red alga *Euclima serra* through the recognition of viral hemagglutinin. **Marine drugs**, v. 13, n. 6, p. 3454-3465, 2015.

SATO, Y.; MURAKAMI, M.; MIYAZAWA, K.; HORI, K. Purification and characterization of a novel lectin from a freshwater cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 125, n. 2, p. 169-177, 2000.

SATO, Y.; OKUYAMA, S.; HORI, K. (2007). Primary structure and carbohydrate binding specificity of a potent anti-HIV lectin isolated from the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), 11021-11029.

SHAHZAD-UL-HUSSAN, S.; GUSTCHINA, E.; GHIRLANDO, R.; CLORE, G. M.; BEWLEY, C. A. Solution structure of the monovalent lectin microvirin in complex with Man α (1–2) Man provides a basis for anti-HIV activity with low toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 23, p. 20788-20796, 2011.

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

SHEEHAN, S. A.; HAMILTON, K. L.; RETZBACH, E. P.; BALACHANDRAN, P.; KRISHNAN, H.; LEONE, P.; GOLDBERG, G. S. Evidence that *Maackia amurensis* seed lectin (MASL) exerts pleiotropic actions on oral squamous cells to inhibit SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease progression. **Research Square**, 2020.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLI, J.; OLSEN, J.V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2859-2860, 2007.

SHIM, E.; SHIM, J.; KLOCHKOVA, T. A.; HAN, J. W.; KIM, G. H. Purification of a sex-specific lectin involved in gamete binding of *aglaothamnion callophyllidicola* (rhodophyta) 1. **Journal of phycology**, v. 48, n. 4, p. 916-924, 2012.

SHIN, W. H.; LEE, G. R.; HEO, L.; LEE, H.; SEOK, C. J. B. D. Prediction of protein structure and interaction by GALAXY protein modeling programs. **Bio Design**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2014.

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

SHIOMI, K.; YAMANAKA, H.; KIKUCHI, T. Biochemical properties of hemagglutinins in the red alga *Serraticardia maxima*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 46: 1369-1373, 1980.

SHIOMI, K.; YAMANAKA, H.; KIKUCHI, T. Purification and physicochemical properties of a hemagglutinin (GVA-1) in the red alga *Gracilaria verrucosa*. **Bulletin of the Japanese Society of Science Fisheries** v. 47, n.8, p. 1079 — 1081.

SILVA, A. J.; CAVALCANTI, V. L. R.; PORTO, A. L. F.; GAMA, W. A.; BRANDÃO-COSTA, R. M. P. BEZERRA, R. P. The green microalgae *Tetradismus obliquus* (*Scenedesmus acutus*) as lectin source in the recognition of ABO blood type: purification and characterization. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, p. 103-110, 2020.

SILVA, L. M. C. M.; LIMA, V.; HOLANDA, M. L.; PINHEIRO, P. G.; RODRIGUES, J. A. G.; LIMA, M. E. P.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from marine red alga *Pterocladia capillacea*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 5, p. 830-835, 2010.

SILVA, N. R. G.; ARAÚJO, F. N. D. Antibacterial activity of plant lectins: a review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 64, 2021.

SILVA, S. R. **Estrutura primária e análise do potencial biotecnológico de uma lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida* J.V. lamouroux**. 2016. 89 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

SILVA, S. R. **Purificação e caracterização de CiL-2, uma nova lectina isolada da alga marinha verde *Codium isthmocladum* Vickers**. 2013. 71 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

SIMPLICIEN, M.; BARRE, A.; BENKERROU, Y.; VAN DAMME, E. J.; ROUGÉ, P.; BENOIST, H. The T/Tn-specific Helix pomatia lectin induces cell death in lymphoma cells negative for T/Tn antigens. **Cancers**, v. 13, n. 17, p. 4356, 2021.

SINGH, R. S.; WALIA, A. K. Lectins from red algae and their biomedical potential. **Journal of applied phycology**, v. 30, p. 1833-1858, 2018.

SIUKSTAITE, L.; IMBERTY, A.; RÖMER, Winfried. Structural diversities of lectins binding to the glycosphingolipid Gb3. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, p. 704685, 2021.

SOHRAB, S. S.; SUHAIL, M.; KAMAL, M. A.; AHMAD, F.; AZHAR, E. The emergence of human pathogenic coronaviruses: Lectins as antivirals for sars-cov-2. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 41, p. 5286-5292, 2020.

SOUSA, A. R. O. **Caracterização estrutural de uma lectina da esponja marinha *Chondrilla caribensis***. 2021. 122 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

SOUSA, V.; PEREIRA, R. N.; VICENTE, A. A.; DIAS, O.; GEADA, P. Microalgae biomass as an alternative source of biocompounds: New insights and future perspectives of extraction methodologies. **Food Research International**, p. 113282, 2023.

SOUZA, B. W. S.; ANDRADE, F. K.; TEIXEIRA, D. I. A.; MANSILLA, A.; FREITAS, A. L. P. Haemagglutinin of the antarctic seaweed *Georgiella confluens* (Reinsch) Kylin: isolation and partial characterization. **Polar biology**, v. 33, p. 1311-1318, 2010.

STANZIONE, F.; GIANGRECO, I.; COLE, J. C. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 273-343, 2021.

STILLMARK, H. Über Ricin ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus communis L. und einige anderen Euphorbiaceen. **MD Thesis, University of Dorpat, Dorpat, Estonia**, 1888.

SUGAHARA, T.; OHAMA, Y.; FUKUDA, A.; HAYASHI, M.; KAWAKUBO, A.; KATO, K. The cytotoxic effect of *Eucheuma serra* agglutinin (ESA) on cancer cells and its application to molecular probe for drug delivery system using lipid vesicles. **Cytotechnology**, v. 36, p. 93-99, 2001.

SUN, X.; HE, S.; YE, Y.; CAO, X.; LIU, H.; WU, Z.; YUE, J.; JIN, R.; SUN, H. Combined effects of pH and thermal treatments on IgE-binding capacity and conformational structures of lectin from black kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food chemistry**, v. 329, p. 127183, 2020.

SUPEKAR, N. T.; SHAJAHAN, A.; GLEINICH, A. S.; ROUHANI, D. S.; HEISS, C.; CHAPLA, D. G.; MOREMEN, K. W.; AZADI, P. Variable posttranslational modifications of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 nucleocapsid protein. **Glycobiology**, v. 31, n. 9, p. 1080-1092, 2021.

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

SUTTISRISUNG, S.; SENAPIN, S.; WITHYACHUMNARNKUL, B.; WONGPRASERT, K. Identification and characterization of a novel legume-like lectin cDNA sequence from the red marine algae *Gracilaria fisheri*. **Journal of biosciences**, v. 36, p. 833-843, 2011.

TAKAHASHI, K.; EZEKOWITZ, R. A. B. The role of the mannose-binding lectin in innate immunity. **Clinical infectious diseases**, v. 41, n. Supplement_7, p. S440-S444, 2005.

TAKEUCHI, R.; JIMBO, M.; TANIMOTO, F.; IJIMA, M.; YAMASHITA, H.; SUZUKI, G.; HARI, S.; NAKANO, Y.; YASUMOTO, K.; WATABE, S. N-Acetyl-D-Glucosamine-binding lectin in *Acropora tenuis* attracts specific Symbiodiniaceae cell culture strains. **Marine Drugs**, v. 19, n. 3, p. 146, 2021.

TAYLOR, M.; DRICKAMER, K.; IMBERTY, A.; VAN KOOYK, Y.; SCHNAAR, R.; ETZLER, M.; VARKI, A. Discovery and classification of glycan-binding proteins. **Essentials of Glycobiology, 4th edition**, 2022.

TEIXEIRA, E. H.; ARRUDA, F. V. S.; DO NASCIMENTO, K. S.; CARNEIRO, V. A.; NAGANO, C. S.; DA SILVA, B. R.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S. **Biological applications of plants and algae lectins: An overview**. IntechOpen, 2012.

TEIXEIRA, E. H.; NAPIMOGA, M. H.; CARNEIRO, V. A.; DE OLIVEIRA, T. M.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; SOUZA, J.B.; HAVT, A.; PINTO, V.P.T.; GONÇALVES, R.B.; FARIAS, W.R.L.; SAKER-SAMPAIO, S.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B. S. In vitro inhibition of oral streptococci binding to the acquired pellicle by algal lectins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 1001-1006, 2007.

TEUFEL, F.; ARMENTEROS, J. J. A.; JOHANSEN, A. R.; GÍSLASON, M. H.; PIHL, S. I.; TSIRIGOS, K. D.; WINTHER, O.; BRUNAK, S.; HEIJNE, G. V.; NIELSEN, H. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. **Nature biotechnology**, v. 40, n. 7, p. 1023-1025, 2022.

TRUNG, D. T.; HUNG, L. D. Cloning cDNA sequence coding the KSA-1 lectin from red alga *Kappaphycus striatum* cultivated in Vietnam. **Vietnam Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 689-697, 2016.

TSANEVA, M.; VAN DAMME, E. J. 130 years of plant lectin research. **Glycoconjugate journal**, v. 37, p. 533-551, 2020.

VAJRAVIJAYAN, S.; PLETNEV, S.; LUO, Z.; PLETNEV, V. Z.; NANDHAGOPAL, N.; GUNASEKARAN, K. Crystallographic and calorimetric analysis on *Pleurotus ostreatus* lectin and its sugar complexes-promiscuous binding driven by geometry. **International journal of biological macromolecules**, v. 152, p. 862-872, 2020.

VALVERDE, P.; MARTINEZ, J. D.; CAÑADA, F. J.; ARDA, A.; JIMÉNEZ-BARBERO, J. Molecular recognition in C-type lectins: the cases of DC-SIGN, Langerin, MGL, and L-sectin. **ChemBioChem**, v. 21, n. 21, p. 2999-3025, 2020.

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

VAN DAMME, E. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P.; PEUMANS, W. J. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. **Trends in plant science**, v. 9, n. 10, p. 484-489, 2004.

VAN DAMME, E. J. History of plant lectin research. **Lectins: methods and protocols**, p. 3-13, 2014.

VANDERLEI, E. S. O.; PATOILLO, K. K. N. R.; LIMA, N. A.; LIMA, A. P. S.; RODRIGUES, J. A. G.; SILVA, L. M. C. M.; LIMA, M. E. P.; LIMA, V.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 9, p. 1113-1118, 2010.

VARKI, A.; CUMMINGS, R. D.; ESKO, J. D.; STANLEY, P.; HART, G. W.; AEBI, M.; MOHNEN, D.; KINOSHITA, T.; PACKER, N. H.; PRESTEGARD, J. H.; SCHNAAR, R. L.; SEEBERGER, P. H. **Essentials of Glycobiology** [internet]. 2022.

VASCONCELOS, M. A.; ARRUDA, F. V. S.; CARNEIRO, V. A.; SILVA, H. C.; NASCIMENTO, K. S.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B.; TEIXEIRA, E. H.; HENRIQUES, M.; PEREIRA, M. O. Effect of algae and plant lectins on planktonic growth and biofilm formation in clinically relevant bacteria and yeasts. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

VECCHI, M. M.; XIAO, Y.; WEN, D. Identification and sequencing of N-terminal peptides in proteins by LC-fluorescence-MS/MS: An approach to replacement of the Edman degradation. **Analytical chemistry**, v. 91, n. 21, p. 13591-13600, 2019.

VERNYGORODSKYI, S.; SHKOLNIKOV, V.; SUHAN, D. Lectin binding patterns in normal, dysplastic and helicobacter pylori infected gastric mucosa. 2017.

VIANA, G. S. B.; FREITAS, A. L. P.; LIMA, M. M. L.; VIEIRA, L. A. P.; ANDRADE, M. C.

H.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red alga *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz. and *B. triquetrum* (SG Gmel.) M. Howe. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 713-722, 2002.

VOLKAMER, A.; KUHN, D.; GROMBACHER, T.; RIPPMANN, F.; RAREY, M. Combining global and local measures for structure-based druggability predictions. **Journal of chemical information and modeling**, v. 52, n. 2, p. 360-372, 2012.

XU, T.; CUI, Y.; QIN, S.; WANG, Y. C. Genome-wide analysis of lectins in cyanobacteria: from evolutionary mode to motif patterns. **BMC genomics**, v. 24, n. 1, p. 1-8, 2023.

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

WANG, S.; CHEN, C.; GADI, M. R.; SAIKAM, V.; LIU, D.; ZHU, H.; BOLLAG, R.; LIU, K.; CHEN, X.; WANG, F.; WANG, P. G.; LING, P.; GUAN, W.; LI, L. Chemoenzymatic modular assembly of O-GalNAc glycans for functional glycomics. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 3573, 2021.

WANG, S.; ZHONG, F. D.; ZHANG, Y. J.; WU, Z. J.; LIN, Q. Y.; XIE, L. H. Molecular Characterization of a New Lectin from the Marine Alga *Ulva pertusa*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v. 36, n. 2, p. 111-117, 2004.

WARNER, A. J.; HATHAWAY-SCHRADER, J. D.; LUBKER, R.; DAVIES, C.; NOVINCE, C. M. Tetracyclines and bone: Unclear actions with potentially lasting effects. **Bone**, v. 159, p. 116377, 2022.

WATERHOUSE, A.; BERTONI, M.; BIENERT, S.; STUDER, G.; TAURIELLO, G.; GUMIENNY, R.; HEER, F. T.; BEER, T. A. P.; REMPFER, C.; BORDOLI, L.; LEPORE, R.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic acids research**, v. 46, n. W1, p. W296-W303, 2018.

WATKINS, W. M.; MORGAN, W. T. J. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. **Nature**, v. 169, n. 4307, p. 825-826, 1952.

WEBB, B.; SALI, A. **Protein structure modeling with MODELLER**. Springer US, 2021.

WANG, S.; MA, J.; PENG, J.; XU, J. Protein structure alignment beyond spatial proximity. **Scientific reports**, v. 3, n. 1, p. 1448, 2013.

WILLIAMS, C. J.; HEADD, J. J.; MORIARTY, N. W.; PRISANT, M. G.; VIDEAU, L. L.; DEIS, L. N.; VERMA, V.; KEEDY, D. A.; HINTZE, B. J.; CHEN, V. B.; JAIN, S.; LEWIS, S. M.; ARENDALL, W. B.; SNOEYINK, J.; ADAMS, P. D.; LOVELL, S. C.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 293-315, 2018.

WILLIAMS, D. C.; LEE, J. Y.; CAI, M.; BEWLEY, C. A.; CLORE, G. M. Crystal structures of the HIV-1 inhibitory cyanobacterial protein MVL free and bound to Man3GlcNAc2: structural basis for specificity and high-affinity binding to the core pentasaccharide from n-linked oligomannoside. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 32, p. 29269-29276,

2005.

WISNOVSKY, S.; BERTOZZI, C. R. Reading the glyco-code: New approaches to studying protein-carbohydrate interactions. **Current opinion in structural biology**, v. 75, p. 102395, 2022.

WU, A. M.; SONG, S. C.; CHANG, S. C.; WU, J. H.; CHANG, K. S.; KABAT, E. A. Further characterization of the binding properties of a GalNAc specific lectin from *Codium fragile* subspecies *tomentosoides*. **Glycobiology**, v. 7, n. 8, p. 1061-1066, 1997.

WU, L.; HUANG, C.; EMERY, B. P.; SEDGWICK, A. C.; BULL, S. D.; HE, X. P.; TIAN, H.; YOON, J.; SESSLER, J. L.; JAMES, T. D. Förster resonance energy transfer (FRET)-based small-molecule sensors and imaging agents. **Chemical Society Reviews**, v. 49, n. 15, p. 5110-5139, 2020.

WANG, Z.; FRIEDRICH, M. G.; TRUSCOTT, R. J.; SCHEY, K. L. Cleavage C-terminal to Asp leads to covalent crosslinking of long-lived human proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1867, n. 9, p. 831-839, 2019.

WU, M.; TONG, C.; WU, Y.; LIU, S.; LI, W. A novel thyroglobulin-binding lectin from the brown alga *Hizikia fusiformis* and its antioxidant activities. **Food chemistry**, v. 201, p. 7-13, 2016.

WU, R.; PATOCKA, J.; NEPOVIMOVA, E.; OLEKSAK, P.; VALIS, M.; WU, W.; KUCA, K. Marine invertebrate peptides: Antimicrobial peptides. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 785085, 2021.

YADAV, K.; GAROFF, L.; HUSEBY, D. L.; HUGHES, D. Phenotypic and genetic barriers to establishment of horizontally transferred genes encoding ribosomal protection proteins. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 76, n. 6, p. 1441-1447, 2021.

YAMADA, N.; EMORI, M.; FURUTANI, S.; AMAGAI, Y.; MURAMATSU, K. On the hemagglutinins contained in agar seaweed (*Gelidium*): III. Purification and its biological specific character of a *Gelidium amansii* hemagglutinin. **Bulletin of Institute of Oceanic Research and Development. Tokai University**, 1999.

YAMAGUCHI, M.; JIMBO, M.; SAKAI, R.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. Purification and characterization of *Microcystis aeruginosa* (freshwater cyanobacterium) lectin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 119, n. 3, p. 593-597, 1998.

YAMAGUCHI, M.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K.; KAMIO, Y.; JIMBO, M.; KAMIYA, H. Isolation and characterization of a mannan-binding lectin from the freshwater cyanobacterium (blue-green algae) *Microcystis viridis*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 265, n. 3, p. 703-708, 1999.

YANG, H.; WU, J.; HUANG, X.; ZHOU, Y.; ZHANG, Y.; LIU, M.; LIU, Q.; KE, S.; HE, HAO FU, M.; FANG, S.; XIONG, X.; JIANG, H.; CHEN, Z.; WU, Z.; GONG, H.; TONG, X.; HUANG, Y.; MA, J.; GAO, J.; CHARLIER, C.; COPPIETERS, W.; SHAGAM, L.; ZHANG, Z.; AI, H.; YANG, B.; GEORGES, M.; CHEN, C.; HUANG, L. ABO genotype

alters the gut microbiota by regulating GalNAc levels in pigs. **Nature**, v. 606, n. 7913, p. 358-367, 2022.

YANG, J. M.; TUNG, C. H. Protein structure database search and evolutionary classification. **Nucleic acids research**, v. 34, n. 13, p. 3646-3659, 2006.

YANG, J.; ZHANG, Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. **Nucleic acids research**, [s.l.], v. 43, n. W1, p. W174-W181, 2015.

YAN, S.; XU, J.; ZHANG, S.; LI, Y. Effects of flexibility and surface hydrophobicity on emulsifying properties: Ultrasound-treated soybean protein isolate. **Lwt**, v. 142, p. 110881, 2021.

YAO, Y.; LI, M.; XU, H.; YAN, S.; HE, P.; DAI, Q.; QI, Z.; LIAO, B. Protein subcellular localization prediction based on PSI-BLAST profile and principal component analysis. **Current Proteomics**, v. 16, n. 5, p. 402-414, 2019.

YI, Z.; PING, Y.; YANRU, L. Purification and partial characterization of *Chlorella pyrenoidosa* lectin. **Shui Sheng Sheng wu Hsueh bao= Acta Hydrobiologica Sinica**, v. 27, n. 1, p. 36-40, 2003.

YOON, K. S.; LEE, K. P.; KLOCHKOVA, T. A.; KIM, G. H. Molecular Characterization of the Lectin, bryohealin, involved in protoplast regeneration of the Marine alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta). **Journal of phycology**, v. 44, n. 1, p. 103-112, 2008.

ZARLENGA, D. S. cDNA Cloning and the Construction of Recombinant DNA. In: **Recombinant DNA Principles and Methodologies**. CRC Press, 2021. p. 353-382.

ZHENG, W.; ZHANG, C.; LI, Y.; PEARCE, R.; BELL, E. W.; ZHANG, Y. Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations. **Cell reports methods**, v. 1, n. 3, 2021.

ZHANG, H.; ZHAO, Z.; TURLEY, A. T.; WANG, L.; MCGONIGAL, P. R.; TU, Y.; LI, Y.; WANG, Z.; KWOK, R. T. K.; LAM, J. W. Y.; TANG, B. Z. Aggregate science: from structures to properties. **Advanced Materials**, v. 32, n. 36, p. 2001457, 2020.

ZHANG, X.; YU, X.; VOGLMEIR, J.; WEI, M.; LIU, J.; SHANG, Y.; JIN, W.; WANG, D.; LYU, Y. Improving the thermostability of *Cyclobacterium marinum* chitin deacetylase by disulfide bond engineering. **Process Biochemistry**, v. 133, p. 142-150, 2023.

ZHOU, X.; ZHENG, W.; LI, Y.; PEARCE, R.; ZHANG, C.; BELL, E. W.; ZHANG, G.; ZHANG, Y. I-TASSER-MTD: a deep-learning-based platform for multi-domain protein structure and function prediction. **Nature Protocols**, v. 17, n. 10, p. 2326-2353, 2022.

ZHU, B.; NI, F.; XIONG, Q.; YAO, Z. Marine oligosaccharides originated from seaweeds: Source, preparation, structure, physiological activity and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 1, p. 60-74, 2021.

ZIÓŁKOWSKA, H.; WU, J.; HUANG, X.; ZHOU, Y.; ZHANG, Y.; LIU, M.; KE, S.; ELE, M.; FU, H.; FANG, S.; XIONG, X.; JIANG, H.; CHEN, Z.; WU, Z.; GONGO, H.; TONG, X.;

HUANG, Y.; MA, J.; GAO, J.; CHARLIER, C.; COPPIETERS, W.; SHAGAM, L.; ZHANG, Z.; AI, H.; YANG, B.; GEORGES, M.; CHEN, C.; HUANG, L. Domain-swapped structure of the potent antiviral protein griffithsin and its mode of carbohydrate binding. **Structure**, v. 14, n. 7, p. 1127-1135, 2006.

ZIÓŁKOWSKA, N. E.; SHENOY, S. R.; O'KEEFE, B. R.; WLODAWER, A. Crystallographic studies of the complexes of antiviral protein griffithsin with glucose and N-acetylglucosamine. **Protein science**, v. 16, n. 7, p. 1485-1489, 2007.

ZIZZARI, A. T.; PLIATSIKA, D.; GALL, F. M.; FISCHER, T.; RIEDL, R. New perspectives in oral peptide delivery. **Drug discovery today**, v. 26, n. 4, p. 1097-1105, 2021.