



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

RENATO CÉZAR FARIAS TORRES

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, ESTRUTURAL E
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE UMA GALECTINA DA ESPONJA MARINHA
Aiolochoia crassa (HYATT, 1875)

FORTALEZA

2024

RENATO CÉZAR FARIAS TORRES

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, ESTRUTURAL E ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DE UMA GALECTINA DA ESPONJA MARINHA *Aiolochoiria crassa*
(HYATT, 1875)

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.

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)

T648p Torres, Renato Cázar Farias.
Purificação, caracterização bioquímica, estrutural e atividade antibacteriana de uma galectina da esponja marinha *Aiolochoira crassa* (Hyatt, 1875) / Renato Cázar Farias Torres. – 2024.
72 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio.
Coorientação: Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro.

1. porifera. 2. purificação. 3. lectina. I. Título.

CDD 630

RENATO CÉZAR FARIAS TORRES

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, ESTRUTURAL E ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DE UMA GALECTINA DA ESPONJA MARINHA *Aiolochoiria crassa*
(HYATT, 1875)

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

Aprovada em: 14/06/2024.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ito Liberato Barroso Neto
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

Aos meus pais e irmã, Maria de Fátima Torres,
Vicente Pereira Torres e Renata Cristian Farias
Torres.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha família, em especial minha mãe e minha irmã, Maria de Fátima Torres e Renata Cristian Farias Torres por todo o suporte amor e apoio em minha vida. Sem vocês duas eu não teria chegado até aqui.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio pelo convite de trabalho e oportunidade de desenvolver projetos no BioMar Lab, ao longo desses 10 anos. No laboratório, tive a oportunidade de participar e contribuir com alguns trabalhos de colegas e amigos.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro, pelos ensinamentos, pelas orientações de bancada e de vida e pela paciência durante esses 10 anos, além da amizade estabelecida entre nós. Muito obrigado por tudo, meu coorientador e amigo!

Ao Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano por toda a ajuda, colaboração com os trabalhos e os ensinamentos passados, além da amizade também estabelecida entre nós. Lembro, em especial, dos momentos do mestrado em que eu, você e Regi íamos jantar juntos como amigos e na volta, no laboratório, você sempre tinha um ensinamento para nós. Muito obrigado por tudo, Celso!

À Dra. Renata Pinheiro Chaves, técnica do laboratório, orientadora e colaboradora de bancada nos momentos de desespero de todos os alunos do BioMar, obrigado por todos os ensinamentos, pela paciência e pela amizade. Muito obrigado, Renatinha!

À toda a equipe do Biomar e do LIBS, pela ajuda direta ou indireta em todos esses anos de trabalhos. Em especial, ao Israel, aluno da iniciação científica, que me auxiliou em bancada por 3 anos. Muito obrigado a todos!

Aos meus grandes amigos Carlos David e Regivânio, pela amizade iniciada dentro do laboratório e trazida por todos esses anos. Muito obrigado, meus amigos!

Às minhas amigas Andressa e Jéssica pela amizade, carinho e respeito. Nos apoiamos muitas vezes no ombro um do outro quando era necessário. Muito obrigado, meninas!

Aos nobres colegas e amigos que não foram citados ou foram citados indiretamente e contribuíram para o meu crescimento acadêmico e pessoal durante toda essa jornada de 10 anos.

A todos os professores e funcionários da Universidade Federal do Ceará que de forma direta ou indireta contribuírem para a minha formação como aluno, pesquisador e ser humano.

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

À Instituição FINEP, através do programa CT-INFRA e ao CNPq, pelo apoio financeiro durante os projetos de pesquisa desenvolvidos.

“O sucesso é a soma de pequenos esforços –
repetidos dia, sim, e no outro dia também”
(Robert Collier).

RESUMO

Esponjas são organismos pertencentes ao filo Porifera e produzem um diversificado arsenal de biomoléculas ativas importantes para a indústria farmacêutica, uma vez que podem apresentar atividade antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, antimitótica, entre outras. Dentre essas moléculas, estão as lectinas. Lectinas são proteínas, ou glicoproteínas, que se ligam reversivelmente a mono ou oligossacarídeos. A espécie *Aiolochoxia crassa* está presente na classe Desmospongiae e demonstra amplo potencial na produção de compostos com potencial para serem usados como ferramentas biomédica. O objetivo desse trabalho foi purificar uma lectina de *A. crassa*, determinar as características bioquímicas e estruturais da lectina isolada e avaliar seus efeitos antimicrobianos na inibição de biofilmes bacterianos e na associação com antibióticos. A lectina de *Aiolochoxia crassa* (AcrL) foi purificada através de precipitação com sulfato de amônio seguida de cromatografia de afinidade em matriz de Sepharose 4B. Em SDS-PAGE, a nova lectina é um monômero de aproximadamente 15 kDa. No teste de atividade hemaglutinante, a proteína foi estável em pH neutro-alcálico e em temperaturas abaixo de 70°C. A atividade hemaglutinante de AcrL foi inibida pelas glicoproteínas PSM tipo II e III, fetuína, BSM e asialofetuína. No estudo de calorimetria isotérmica (ITC), a lectina mostrou alta afinidade pela glicoproteína fetuína com K_a de $3039 \times 10^4 M^{-1}$. No sequenciamento de aminoácidos por MS/MS, AcrL possui 146 aminoácidos, com massa molecular somada de 16.201 Da. Essa proteína possui a sequência de aminoácidos contendo resíduos conservados típicos da família das galectinas. A predição de estrutura secundária de AcrL por dicroísmo circular mostrou que a proteína é composta por 4% de α -hélice, 40% de β -folha, 22% de dobras- β e 34% de estruturas aleatórias e teve a temperatura de *melting* determinada em 84,5°C. A predição da estrutura tridimensional de AcrL mostrou que a lectina é composta por β -sanduíche típico de galectinas, com duas β -folhas antiparalelas compostas por cinco fitas cada. AcrL foi capaz de aglutinar e causou significativa redução dos biofilmes de cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*. Além disso, quando combinada com os antibióticos ampicilina, tetraciclina e oxacilina mostrou atividade sinérgica e/ou aditiva contra *S. aureus* e *S. epidermidis*. Assim, uma nova proteína foi isolada e os resultados apresentados servirão como base de aplicação biotecnológica em modelo biológico contra bactérias patogênicas.

Palavras-chave: porifera; purificação; lectina.

ABSTRACT

Sponges are organisms belonging to the phylum Porifera and produce a diverse arsenal of active biomolecules important to the pharmaceutical industry, as they can exhibit antimicrobial, antiviral, anti-inflammatory, antimitotic, and other activities. Among these molecules are lectins. Lectins are proteins or glycoproteins that reversibly bind to mono- or oligosaccharides. The species *Aiolochoia crassa* belongs to the class Desmospongiae and shows broad potential in the production of compounds that could be used as biomedical tools. The aim of this study was to purify a lectin from *A. crassa*, determine the biochemical and structural characteristics of the isolated lectin, and evaluate its antimicrobial effects in inhibiting bacterial biofilms and in combination with antibiotics. The lectin from *Aiolochoia crassa* (AcrL) was purified through ammonium sulfate precipitation followed by affinity chromatography on a Sepharose 4B matrix. In SDS-PAGE, the new lectin is a monomer of approximately 15 kDa. In the hemagglutination activity assay, the protein was stable in neutral-alkaline pH and at temperatures below 70°C. The hemagglutination activity of AcrL was inhibited by PSM type II and III glycoproteins, fetuin, BSM, and asialofetuin. In the isothermal calorimetry (ITC) study, the lectin showed high affinity for the glycoprotein fetuin with a K_a of $3039 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. In MS/MS amino acid sequencing, AcrL has 146 amino acids with a combined molecular mass of 16,201 Da. This protein has an amino acid sequence containing conserved residues typical of the galectin family. The secondary structure prediction of AcrL by circular dichroism showed that the protein is composed of 4% α -helix, 40% β -sheet, 22% β -turns, and 34% random structures, with a melting temperature determined at 84.5°C. The three-dimensional structure prediction of AcrL showed that the lectin is composed of a typical galectin β -sandwich, with two antiparallel β -sheets consisting of five strands each. AcrL was able to agglutinate and significantly reduce biofilms of bacterial strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli*. Additionally, when combined with the antibiotics ampicillin, tetracycline, and oxacillin, it showed synergistic and/or additive activity against *S. aureus* and *S. epidermidis*. Thus, a new protein was isolated, and the presented results will serve as a basis for biotechnological application in a biological model against pathogenic bacteria.

Keywords: porifera; purification; lectin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação diagramática de uma esponja simples.....	14
Figura 2 – Representação diagramática de uma esponja leuconoide.....	16
Figura 3 – <i>Aiolochoiria crassa</i> (Hyatt, 1875) no mar do Caribe.....	16
Figura 4 – Ensaio de atividade hemaglutinante para a detecção de lectinas em extratos.	18
Figura 5 – Mecanismo de bioadesão de lectina.....	19
Figura 6 – Resíduos conservados na ligação de galectinas a carboidratos.....	23
Figura 7 – Diferentes classificações de galectinas.....	24
Figura 8 – Diagrama de estruturas cristalinas de galectinas.....	24
Figura 9 – Cromatografia de afinidade em matriz de Sepharose 4B da fração 0-70 de sulfato de amônio do extrato de <i>Aiolochoiria crassa</i>	38
Figura 10 – Avaliação da atividade hemaglutinante de AcrL.....	40
Figura 11 – Termograma e curva de titulação para a interação AcrL-Fetuína.....	41
Figura 12 – Estimativa da massa molecular de AcrL em gel de eletroforese.....	42
Figura 13 – Estimativa da massa molecular de AcrL em cromatografia de exclusão molecular.....	42
Figura 14 – Determinação da massa molecular nativa de AcrL.....	43
Figura 15 – Espectros de dicroísmo circular de AcrL.....	44
Figura 16 – Curva de regressão da Temperatura de <i>Melting</i> de AcrL em diferentes temperaturas.....	44
Figura 17 – Mapa peptídico de AcrL.....	45
Figura 18 – Alinhamento da estrutura de AcrL com outras galectinas de esponjas.....	46
Figura 19 – Alinhamento da estrutura de AcrL com outras galectinas de vertebrados.....	47
Figura 20 – Arvore filogenética de AcrL em comparação a outras galectinas.....	48
Figura 21 – Modelo estrutural de AcrL.....	49

Figura 22 – Análise comparativa da arquitetura do sítio de ligação a carboidratos de AcrL e congerina II.....	50
Figura 23 – Conformações de ligação calculadas para Fetuína e Asialofetuína sobre AcrL.....	51
Figura 24 – Aglutinação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas por AcrL.....	52
Figura 25 – Efeito da AcrL sobre biofilmes de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. epidermidis</i>	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Famílias de lectinas e principais funções.....	22
Tabela 2 – Purificação da lectina presente no extrato da esponja marinha <i>Aiolochoia crassa</i>	39
Tabela 3 – Inibição da atividade hemaglutinante de AcrL por glicoproteínas.....	39
Tabela 4 – Termodinâmica de associação AcrL-Fetuína.....	40
Tabela 5 – Sequências de peptídeos obtidos por digestão enzimática da lectina AcrL...	45
Tabela 6 – Efeito da lectina AcrL combinada aos antibióticos oxacilina, tetraciclina e ampicilina sobre <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> e <i>E. coli</i>	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Esponjas.....	14
1.1.1	<i>Classe Demospongiae.....</i>	15
1.2	Lectinas.....	17
1.2.1	<i>Definição e aspectos gerais.....</i>	17
1.2.2	<i>Lectinas animais.....</i>	20
1.2.3	<i>Galectinas.....</i>	22
1.2.4	<i>Lectinas em esponjas.....</i>	25
1.2.5	<i>Atividade biotecnológica de lectinas de esponjas.....</i>	25
2	OBJETIVOS.....	27
3	METODOLOGIA.....	28
3.1	Coleta dos animais.....	28
3.2	Purificação da lectina.....	28
3.3	Avaliação da atividade hemaglutinante e inibição.....	29
3.4	Caracterização bioquímica de AcrL.....	29
3.5	Estudo de Calorimetria de Titulação isotérmica.....	30
3.6	Estimativa de massa molecular.....	31
3.7	Dicroísmo Circular.....	32
3.8	Determinação da sequência de aminoácidos.....	32
3.9	Análise da sequência.....	33
3.10	Predição da estrutura.....	33
3.11	<i>Docking Molecular.....</i>	34
3.12	Avaliação do potencial antibacteriano e antibiofilme.....	35
3.12.1	<i>Cepas bacterianas e condições de cultura.....</i>	35
3.12.2	<i>Teste de aglutinação bacteriana.....</i>	35
3.12.3	<i>Efeito da lectina sobre células planctônicas.....</i>	35
3.12.4	<i>Efeito da lectina associadas a antibióticos.....</i>	36
3.12.5	<i>Teste de formação de biofilme.....</i>	36
3.12.5.1	<i>Quantificação de massa do biofilme.....</i>	36
3.12.5.2	Quantificação do número de células viáveis no biofilme.....	37
3.12.6	<i>Análise estatística.....</i>	37

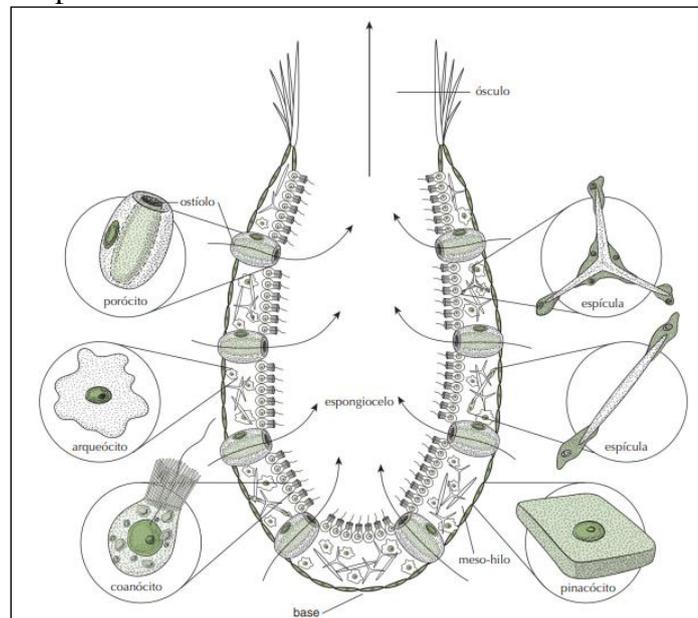
4	RESULTADOS.....	38
4.1	Purificação da Lectina.....	38
4.2	Ensaio da Atividade Hemaglutinante e Inibição.....	39
4.3	Efeito do pH, Temperatura e Íons Divalentes na Atividade Hemaglutinante.....	39
4.4	Estudo de Calorimetria de Titulação Isotérmica.....	40
4.5	Eletroforese e Estimativa de Massa Molecular por Exclusão Molecular.....	42
4.6	Predição de Estrutura Secundária e <i>Tmelting</i> por Dicroísmo Circular.....	43
4.7	Determinação da Sequência de Aminoácidos por MS/MS.....	44
4.8	Predição da Estrutura de AcrL.....	48
4.9	Efeito antimicrobiano da lectina e combinação com antibióticos.....	51
4.10	Efeitos de AcrL na formação de Biofilme.....	53
5	DISCUSSÃO.....	55
6	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esponjas

Esponjas são organismos pertencentes ao filo Porifera (do latim *porus* = “poro”, *ferre* = “possuir”). Esses organismos não possuem órgãos, células sensoriais ou nervosas, são animais pluricelulares, sésseis e filtradores, geralmente sustentados por um esqueleto interno de espículas de carbonato de cálcio, sílica ou espongina. Em sua forma mais simples, uma esponja é uma bolsa perfurada, suficientemente rígida, cuja superfície interna é revestida com células flageladas. O espaço vazio dentro dessa bolsa é chamado de espongiocele. As células flageladas que revestem a espongiocele são denominadas coanócitos. A água flui para a espongiocele através de aberturas estreitas chamadas de ostíolos e sai dele através de aberturas mais largas denominada de ósculos (Figura 1) (BRUSCA, 2019; FRANSOZO, 2017; HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2004; PECHENIK, 2016).

Figura 1- Representação diagramática de uma esponja simples



Fonte: Pechenik, J. A; 2016 - Biologia dos invertebrados

Estes animais possuem um grande número de poros e canais que constituem um sistema aquífero inalante e exalante diferenciado. Os coanócitos são responsáveis por bombear água, formando uma corrente unidirecional que passa pelos canais da esponja, levando para o interior do animal o alimento e o oxigênio, e levando para o exterior seus dejetos. Além disso,

esse sistema promove a troca gasosa e a disseminação e coleta de espermatozoides (BRUSCA, 2019; FRANSOZO, 2017; HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2004; PECHENIK, 2016).

Espojas são encontradas principalmente no mar e em menor quantidade na água doce. Até 2019, cerca de 9.000 espécies de esponjas descritas, sendo 220 de ambiente dulcícola e o restante de ambiente marinho. Esses animais podem apresentar diversos tamanhos e formas, variando de milímetros até 2 metros de altura e diâmetro. Além disso, podem apresentar uma diversidade de cores com quase todas as tonalidades de vermelho, amarelo, laranja, verde e púrpura (BRUSCA, 2019; HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2004; PECHENIK, 2016).

Historicamente, estes animais têm sido classificados pela natureza dos esqueletos internos. Espojas são classificadas em 4 classes: Demospongiae, Homoscleromorpha, Hexactinellida e Calcarea. As três primeiras utilizam sílica para a formação de espículas em seus esqueletos minerais e a última utiliza carbonato de cálcio. Esses animais constituem o único filo animal que utiliza sílica em vez de cálcio nos esqueletos minerais (BRUSCA, 2019; FRANSOZO, 2017; PECHENIK, 2016). Mais adiante a classe Demospongiae, classificação da espécie utilizada neste trabalho, será detalhada.

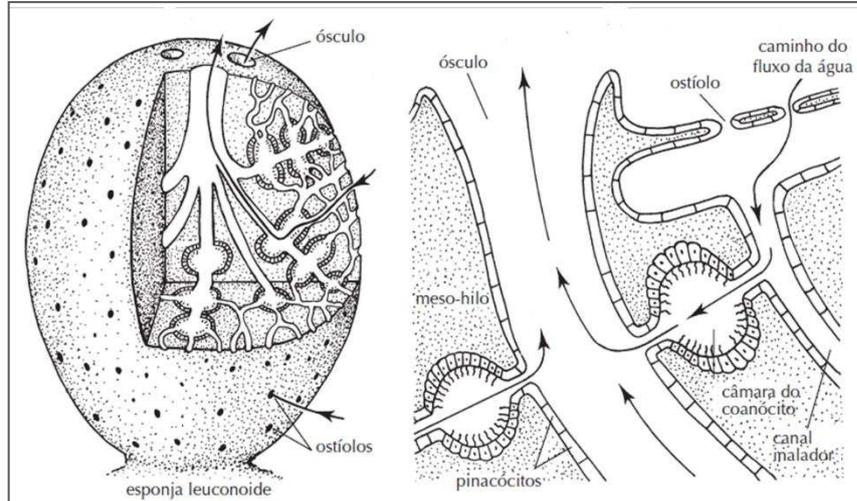
As esponjas produzem o maior e o mais diversificado arsenal de biomoléculas ativas entre todos os filos animais. Esses compostos têm a função de deter predadores, evitar incrustações na superfície da esponja, filtrar a radiação e nutrir seus parceiros simbióticos. Devido as suas propriedades, essas moléculas têm sido importantes alvos da indústria farmacêutica, uma vez que podem apresentar atividade antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, antimitótica, entre outras. Algumas dessas moléculas já foram, inclusive, transformadas em medicamentos contra o câncer, infecções virais e bacterianas (BRUSCA, 2019; FRANSOZO, 2017; PAPON; COPP; COURDAVAULT, 2022).

1.1.1 Classe Demospongiae

A classe Demospongiae contém pelo menos 80% de todas as espécies de esponjas existentes, abrangendo todas as espécies de água doce. Os elementos de sustentação são compostos por sílica, espongina ou ambas. Todos os membros são de construção leuconóide, ou seja, um sistema aquífero no qual os coanócitos estão restritos a câmaras discretas, dispersos no meso-hilo, interligadas com os poros e ósculos através de canais inalantes e exalantes (Figura 2). As espécies leuconóides exibem uma diversidade de formas: fina e incrustante, ereta e ramificada, multilobada, esférica, tubular, e um único indivíduo pode apresentar mais de 2 m de diâmetro. Existem 65 famílias, contendo cerca de 7 mil espécies (BRUSCA, 2019;

FRANSOZO, 2017; PECHENIK, 2016).

Figura 2- Representação diagramática de uma esponja leuconoide



Fonte: Pechenik, J. A; 2016 - Biologia dos invertebrados

O gênero *Aiolochoia* (Figura 3) está presente nessa classe e as espécies deste grupo são comuns em zonas tropicais e subtropicais. Possuem formas maciças e lobadas, com as cores marrom-avermelhado, amarelo, dourado, laranja, rosa vermelho, carmim ou roxo escuro (CAVALCANTI, 2019).

Figura 3 – *Aiolochoia crassa* (Hyatt, 1875), no mar do Caribe



Fonte: The sponge guide.

Acesso: <https://spongeguide.uncw.edu/speciesinfo.php?species=70>

A espécie *Aiolochoia crassa* (Hyatt, 1875) produz composto com o potencial de serem usados como ferramenta biomédica, visto que os extratos são capazes de apresentar atividades diversas. O extrato de orgânico de *A. crassa* exibe atividade contra cepas bacterianas,

inibindo o crescimento de *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumonia* (PECH-PUCH *et al.*, 2020). Além disso, ainda na década de 1980 e 1990, foram publicados dados que mostram que compostos ativos bromotirosinados oriundos de *A. crassa* (Ex. *Ianthella basta*) foram capazes de exibir atividade antibacteriana contra *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* (KAZLAUSKAS *et al.*, 1981; PETTIT *et al.*, 1996).

Os extratos de *A. crassa* também apresentaram atividade antifúngica contra cepas de *Candida glabrata* e *C. albicans* (PECH-PUCH *et al.*, 2023). Alcaloides bromotirosinados isolados de extratos da esponja exibiram atividade contra as cepas fúngicas de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *Cryptococcus gattii* e *C. grubii* (SALIB; HENDRA; MOLINSKI, 2022).

Compostos derivados de cromo e bromo L-tirosina isolados de *A. crassa* foram capazes de combater os protozoários *Plasmodium falciparum*, causador da malária, e *Leishmania panamensis*, causador da leishmaniose (RESTREPO *et al.*, 2018). Além disso, dois compostos derivados da bromotirosina e um alcaloide bromado foram capazes de exibir atividade contra o protozoário *Trypanosoma cruzi* (THOMAS, 2012). Outros compostos também derivados da bromotirosina foram capazes de inibir de forma dose-dependente a replicação do vírus HIV-I e exibiram baixa citotoxicidade para células saudáveis (GÓMEZ-ARCHILA *et al.*, 2014).

Assim, o estudo de biomoléculas e a atividade biológica de extratos aquosos da esponja marinha do gênero *Aiolochoia* mostram a importância desse gênero de esponjas frente às inúmeras aplicações biomédicas apresentadas. Além disso, até o presente trabalho, não há informações sobre lectinas isoladas desse gênero de esponjas.

1.2 Lectinas

1.2.1 Definição e aspectos gerais

A ocorrência na natureza de proteínas aglutinantes de eritrócitos tem sido relatada desde o final do século XIX. Essas proteínas foram referidas como hemaglutininas ou fitohemaglutininas, já que eram, geralmente, detectadas em extratos de plantas (SHARON; LIS, 2004; SHARON, 2008).

Em 1954, Boyd e Shapleigh denominaram de lectinas (do latim *legere*, escolher, selecionar, optar) as proteínas aglutinantes capazes de reconhecer especificamente carboidratos e distinguir diferentes tipos sanguíneos. Esse termo foi generalizado para todas as aglutininas

específicas a carboidratos, de origem não imune (SHARON; LIS, 1972). Assim, a forma mais simples de detectar lectinas em extratos de material biológico é examinando a habilidade de aglutinação de eritrócitos (Figura 4) (SHARON; LIS, 2004).

Figura 4 – Ensaio de atividade hemaglutinante para a detecção de lectinas em extratos

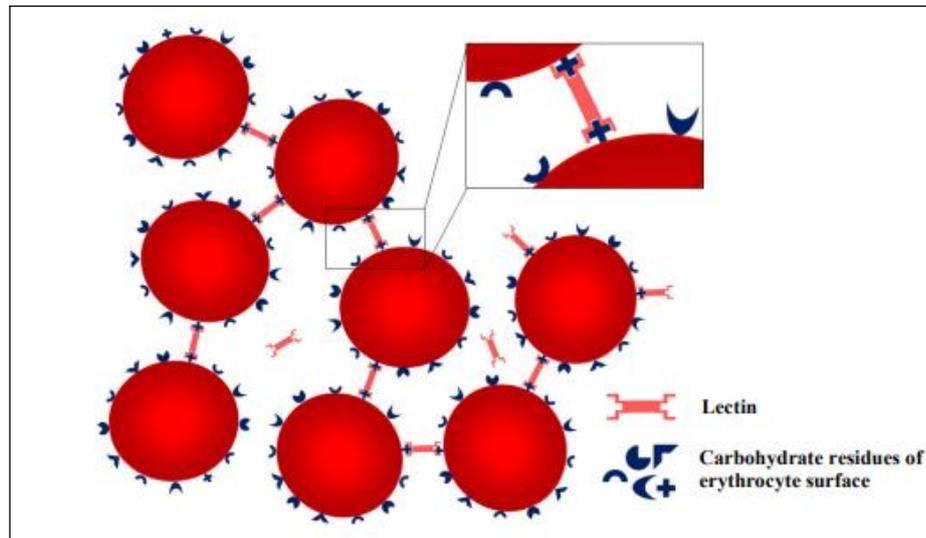


Imagem ilustrativa de lectinas reconhecendo os carboidratos presentes na membrana celular de eritrócitos e promovendo a aglutinação de células. Lectin: lectina; Carbohydrate residues of erythrocyte surface: resíduos de carboidratos da membrana do eritrócito.

Fonte: (SANTOS *et al.*, 2014)

Lectinas são proteínas, ou glicoproteínas, que não fazem parte de qualquer classe de imunoglobulinas, capazes de se ligarem reversivelmente a mono ou oligossacarídeos, através de um sítio de reconhecimento que não altera as estruturas desses carboidratos (KILPATRICK, 2000).

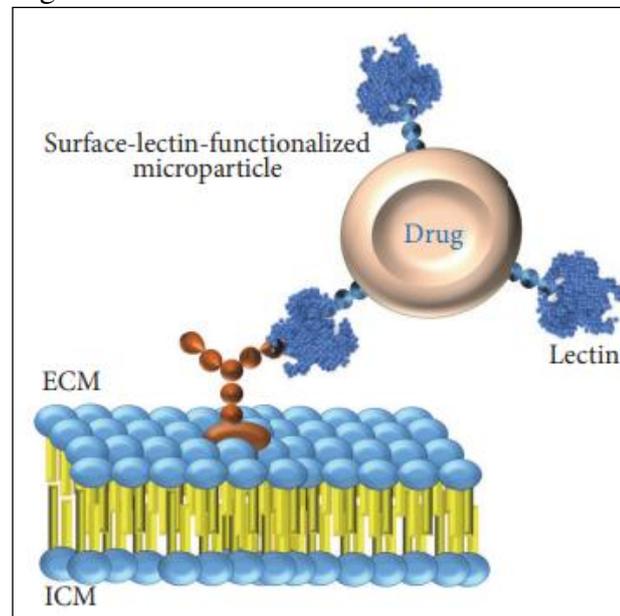
Essas proteínas podem ser classificadas com base em sua estrutura geral em 4 tipos: merolectinas, hololectinas, superlectinas e quimerolectinas. As merolectinas são proteínas com um único domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC), assim são incapazes de aglutinar células. As hololectinas possuem pelo menos dois DRCs idênticos, são de natureza divalente ou multivalente, assim sendo capazes de aglutinar células. As superlectinas possuem dois DRCs não idênticos que reconhecem açúcares estruturalmente diferentes como manose e *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), por exemplo. As quimerolectinas possuem um DRC e um outro domínio com atividade enzimática e a depender do número de monômeros ligados podem atuar como merolectinas ou hololectinas (MISHRA *et al.*, 2019).

As interações entre proteínas e carboidratos constituem uma parte das vias de sinalização mais eficientes que ocorrem nos organismos vivos ou entre eles e o ambiente em

que vivem, desenvolvendo papel celular importante. Lectinas, ao interagirem com carboidratos, são capazes de atuar como moléculas de reconhecimento no interior das células, superfícies celulares e fluidos fisiológicos. Devido a esta capacidade de decifrar o glicocódigo, essas proteínas podem ser utilizadas numa variedade de estudos biotecnológicos incluindo pesquisa sobre o câncer e imunologia (DOS SANTOS SILVA *et al.*, 2019; SHARON, 2008).

O interesse nas lectinas foi amplamente estimulado pela demonstração de que são ferramentas valiosas para a detecção, isolamento e caracterização de glicoconjugados, principalmente de glicoproteínas, para histoquímica de células e tecidos e para o exame de alterações que ocorrem nas superfícies celulares durante processos fisiológicos patológicos, da diferenciação celular ao câncer. Lectinas podem apresentar afinidade específica a epítomos relacionados a câncer e induzir as células neoplásicas a apoptose (NOTOVA *et al.*, 2022; SHARON, 2008). Além disso, podem atuar como transportadoras de drogas direcionadas a tecidos ou células específicas. Este mecanismo de bioadesão pode ser explicado devido a capacidade destas proteínas reconhecerem padrões de glicosilação diferenciados, como as de células tumorais (Figura 5)(COELHO *et al.*, 2017).

Figura 5 – Mecanismo de bioadesão de lectina



Representação esquemática de lectinas realizando entrega de droga bioaderida. A lectina que leva a droga reconhece e se ancora em glicoconjugados da superfície celular.
ECM: Meio extracelular; MCI: Meio intracelular.
Fonte:(COELHO *et al.*, 2017)

Lectinas têm apresentado uma diversidade de atividades biológicas, tais como inseticida, antitumoral, imunomodulatória, anti-inflamatória, antinoceptiva, antimicrobiana,

antiviral; e aplicações terapêuticas, como reestruturação epitelial através da produção de queratina, dentre outras (AHMMED *et al.*, 2022; CHEUNG *et al.*, 2015; COELHO *et al.*, 2017; HAMID *et al.*, 2013).

1.2.2 Lectinas animais

Em animais, lectinas são responsáveis por mediar interações entre células, entre células e a matriz extracelular, reconhecendo carboidratos codificados em glicoproteínas ou glicolipídios presentes na superfície celular. Assim, essas proteínas podem estar envolvidas em papéis biológicos de tráfego intracelular, dobramento de outras proteínas, sinalização celular e imunidade (AHMMED *et al.*, 2022; SHARON; LIS, 2013; VASTA; AHMED, 2008).

Apesar de lectinas desempenharem diversas funções, sabe-se que o principal papel biológico dessas moléculas em animais está relacionado a imunidade. Essas aglutininas podem desempenhar papel como potentes moléculas que estão envolvidas em defesa direta, reconhecimento e tráfico dentro do sistema imunológico, regulação imune, prevenção de autoimunidade, inflamação, opsonização, fagocitose, encapsulamento e lise de células estranhas (AHMMED *et al.*, 2022; KILPATRICK, 2002).

Em invertebrados marinhos, lectinas podem estar associadas ao reconhecimento e defesa contra patógenos. Estas proteínas podem ter a expressão aumentada mediante infecções virais ou bacterianas, sendo capazes de aglutinar bactérias e funcionar como opsoninas ou regular a expressão de peptídeos antimicrobianos em camarões marinhos e em moluscos. Em geral, essas lectinas podem ser específicas ao ácido siálico ou a *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), carboidratos componentes da parede celular bacteriana. Esta especificidade evidencia a função destas lectinas como proteínas de reconhecimento de padrões (PRP) capazes de detectar padrões moleculares associados a patógenos (PMAPs) (LEYN *et al.*, 2012; SANCHEZ *et al.*, 2006; UTARABHAND *et al.*, 2017 ZHANG *et al.*, 2013, 2018).

Lectinas também podem estar relacionadas a reprodução e a embriogênese de invertebrados marinhos. Essas proteínas têm a expressão aumentada em fêmeas de camarão marinho durante o avanço da maturação gonadal e estão presentes nos ovos de moluscos e artrópodes marinhos, onde parecem estar envolvidas no desenvolvimento das larvas desses animais (CARNEIRO *et al.*, 2017; NAGAI *et al.*, 1999; MOTOHASHI *et al.*, 2017; UTARABHAND *et al.*, 2017).

As lectinas também podem estar envolvidas na interação entre organismos simbiotes. A presença de lectinas em metazoários marinhos evidencia a função de mediação

entre os hospedeiros e de organismos simbiotes. As lectinas podem estar envolvidas na mudança morfológica das células e do estágio de vida do organismo simbiote, bem como, defesa e manutenção dos endossimbiontes nos animais metazoários (JIMBO *et al.*, 2000; KITA *et al.*, 2015; KVENNEFORS *et al.*, 2008; WOOD-CHARLSON *et al.*, 2006)

De uma maneira geral, a função das lectinas está intimamente ligada à sua estrutura, portanto há um constante esforço de catalogar estas proteínas quanto a seus aspectos estruturais. Inicialmente, essas proteínas foram classificadas em duas grandes famílias: tipo C e tipo S, com base na arquitetura dos domínios de ligação que requeriam cálcio ou um grupo tiol, respectivamente, para exibirem atividade (DRICKAMER, 1988; IWAKI *et al.*, 1999)

A família de lectinas do tipo C é a mais abundante em animais, pode ser dividida em subfamílias e possui uma diversidade de funções biológicas, atuando no sistema imune inato e sendo capazes de eliminar patógenos ou mesmo auxiliar na fagocitose realizada por células dendríticas ou macrófagos. Lectinas do tipo C também podem atuar no sistema imune adaptativo ativando respostas imune específica de linfócitos T. Em peixes, essas proteínas foram isoladas de ovos, do intestino, das brânquias, do soro e do muco. Essas lectinas podem reconhecer galactose, *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) de lipopolissacarídeos (LPS), ácido lipoteicoico e peptidoglicano, presentes na composição da parede celular bacteriana, e desempenhar papel de defesa imunológica (AHMMED *et al.*, 2022; AO *et al.*, 2015; GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011).

A família das galectinas (tipo S) também está relacionada a uma ampla variedade de papéis biológicos e estão envolvidas, por exemplo, na transmissão de sinais celulares através da interação lectina-carboidrato, reconhecendo glicoproteínas e glicolipídios presentes nas superfícies das células. Além disso, mediam funções entre os ambientes intra e extracelular reconhecendo glicanos endógenos. Em peixes, galectinas estão envolvidas com o sistema imune e também são encontradas no fígado e intestino desses animais, tendo a expressão regulada positivamente ou negativamente em resposta a infecções de bactérias patogênicas. Em invertebrados, como, crustáceos e bivalves, estas lectinas estão envolvidas com o sistema imune inato dos animais, funcionando como PRPs ao identificar glicanos exógenos presentes nas superfícies de vírus, bactérias, parasitas protistas e fungos. As PRPs reconhecem patógenos, causando a aglutinação e imobilização destes, facilitando assim a fagocitose (AHMMED *et al.*, 2022; ARASU *et al.*, 2017; GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011; VASTA; WANG, 2020). Mais aspectos sobre galectinas serão abordados no próximo tópico – **1.2.3 Galectinas**.

Sabe-se que há pelo menos 19 famílias de lectinas identificadas (Tabela 1), as quais são classificadas por sua estrutura primária, especificidade à carboidratos e função

(CARNEIRO, 2013).

Tabela 1 - Famílias de lectinas e principais funções

Família de Lectinas	Ligante	Função
Anexinas	Glicosaminoglicano; heparina	Inibição de fosfolipase, coagulação sanguínea, tráfego de membrana, ligação a proteínas do citoesqueleto, atividade de canal de membrana, sinalização intracelular
Canelxina e Calreticulina	Glc ₁ Man ₉ GlcNAc ₂	Asseguram a dobragem adequada de proteínas recém-sintetizadas
Ficolinas	ManNAc;GlcNAc; GalNAc	Sistema imune inato
Kaliklectinas	Manose	Protease serínica
Lectinas do tipo C	Manose/glicose ou galactose e derivados	Adesão celular, sistema imune inato, proteína surfactante, opsonização
Lectinas do tipo F	Fucose	Função intra e extracelular, secreção de glicoproteínas, interação célula-célula, sinalização, transporte
Lectinas do tipo F-box	GlcNAc	Reconhecimento de proteínas mal enoveladas
Lectinas do tipo H	Galactose	Adesão celular, Reconhecimento <i>self/non-self</i> de células
Lectinas do tipo I (Siglecs)	Ácido siálico	Inibidores de Sinalização, Infecção, adesão celular
Lectinas do tipo L	Ácido siálico	Tráfego e secreção de glicoproteínas
Lectinas do tipo M	Glicanos de manose	Degradação de glicoproteínas malformadas
Lectinas do tipo P	Manose-6-fosfato	Papel essencial na formação de lisossomos funcionais, tráfego de glicoproteínas
Lectinas do tipo R	GalNAc, lactose, lactulose	Defesa
Lectinas do tipo S (Galectinas)	β-galactosídeos	Atividade anti-apoptótica, atividade apoptótica, <i>Splicing</i> doRNA, embriogênese, função imune, regulação de crescimento celular
Lectinas do tipo X	GalNAc	Imunidade inata, fertilização, embriogênese
Lectinas ligantes de Ramnose	L-Ramnose;D-Galactose	Proteínas de reconhecimento padrões associados a patógenos
Pentraxinas	DNA e fosfolipídio	Sistema imune inato, atenuação de resposta inflamatória, reconhecimento de patógeno específico
Tachylectinas	Lipopolissacarídeo	Resposta imune

Fonte: Tabela adaptada de Carneiro, 2013

1.2.3 Galectinas

As galectinas são uma família de lectinas caracterizadas por se ligarem especificamente a resíduos de β-galactosídeos e possuem um motivo de sequência conservado com cerca de 130 resíduos de aminoácidos. Alguns resíduos de aminoácidos e partes da sequência são conservados em todas as galectinas, podendo haver pequenas modificações. Essa família de lectinas é encontrada em diversos organismos, desde esponjas até humanos e são conhecidas por terem origem dentro do citosol celular, desempenhando papéis biológicos dentro e fora das células (CAPASSO *et al.*, 2023; CUMMINGS *et al.*, 2022; VASTA; WANG,

2020).

Galectinas possuem o Domínio de Reconhecimento a Carboidratos (DRC) comumente conservado. Ao comparar sequências de galectinas oriundas de diferentes organismos é possível observar que 8 resíduos de aminoácidos, normalmente envolvidos na ligação de glicanos, são, na maioria das sequências, invariáveis (Figura 6). Entretanto, é possível observar alterações de posição e/ou substituição de alguns resíduos de aminoácidos. Essas alterações e/ou substituições podem ser responsáveis pelas diferentes afinidades a galactosídeos encontradas nessa família de lectinas. Além disso, galectinas podem conter um número variável de resíduos de cisteínas livres, cujo estado redox normalmente está relacionado a estabilidade de ligação a carboidratos (CAPASSO *et al.*, 2023; CUMMINGS *et al.*, 2022; DUARTE *et al.*, 2023; SOUSA *et al.*, 2021).

Figura 6 – Resíduos conservados envolvidos na ligação de galectinas a carboidratos

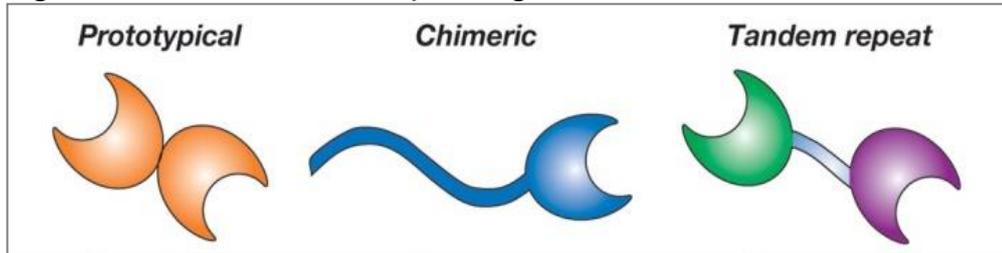
	41	*	*	*		56	*		*	71	*	*				
Galectin-1	-NLCL	H	F	N	P	R	F	NAHGD	-----	ANTIV	C	NSKD	-GGAWG-TEQRE-			
Galectin-2	-KLN	L	H	F	N	P	R	F	S	-----	ESTIV	C	NSLD	-GSNWG-QEQRE-		
Galectin-3	-DVA	F	H	F	N	P	R	F	NENN	-----	RRVIV	C	N	TKL	-DNNWG-REERQ-	
Galectin-4	-DVA	F	H	F	N	P	R	F	DG	-----	WDKVV	F	N	TLQ	-GGKWG-SEERK-	N-Terminal
	-DIAL	H	I	N	P	R	M	G	-----	NGTVV	R	N	SLL	-NGSWG-SEEK-	C-Terminal	
Galectin-7	-DAAL	H	F	N	P	R	L	D	-----	TSEVV	F	N	SKE	-QGSWG-REERG-		

Parte de sequências de galectinas alinhadas. Os resíduos conservados estão destacados nas cores vermelha e azul. Os aminoácidos destacados em azul são aqueles que estão envolvidos na ligação a carboidratos.

Fonte: (CUMMINGS *et al.*, 2022)

Galectinas podem ser classificadas em 3 categorias com base nas diferenças e nos arranjos estruturais: *Proto type*, *Tandem Repeat type* e *Chimera type*. As galectinas do tipo *Proto* são caracterizadas por serem homodímeros em que cada unidade monomérica possui um único CRD, ligadas por interações não covalentes. As do tipo *Tandem* são compostas por dois DRCs, em motivos estruturais diferentes que estão na mesma unidade monomérica e conectados por um peptídico, um DRC está localizado na porção C-terminal e o outro na porção N-terminal da cadeia polipeptídica. As do tipo Quimera são identificadas pela presença de um único domínio lectínico, com DRC presente na porção C-terminal, ligado a um domínio não lectínico presente na porção N-terminal da proteína (Figura 7) (CAPASSO *et al.*, 2023; CUMMINGS *et al.*, 2022; VASTA; WANG, 2020).

Figura 7 – Diferentes classificações de galectinas

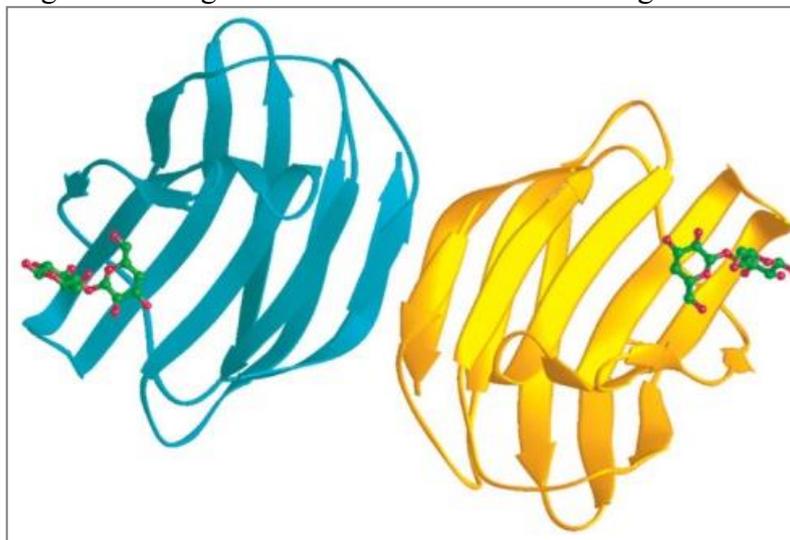


Esquema representativo dos diferentes tipos e organização de galectinas encontradas em vertebrados e invertebrados. Prototypical: galectina do tipo Proto; Chimerec: galectina do tipo Quimera; Tandem repeat: galectina do tipo Tandem

Fonte: (CUMMINGS *et al.*, 2022)

O dobramento dessas proteínas consiste em um β -sanduíche composto por duas folhas β -antiparalelas côncavas e cinco fitas convexas. A estrutura primária presente nas superfícies côncavas é composta por resíduos de aminoácidos do DRC, responsável pela ligação específica aos carboidratos. Em lectinas diméricas, os locais de ligação de glicanos no DRC estão presentes nas extremidades opostas do dímero. As interações com glicanos acontecem através de ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e interações de *van der Waals* (Figura 8) (CAPASSO *et al.*, 2023; CUMMINGS *et al.*, 2022).

Figura 8 – Diagrama de estruturas cristalinas de galectinas



Homodímero representado por diagrama de fita da estrutura da galectina-1 humana ligada com a galactose. As unidades monoméricas estão coloridas de formas diferentes.

Fonte: (CUMMINGS *et al.*, 2022)

Embora possam reconhecer β -galactosídeos simples, como dissacarídeos e trissacarídeos, as galectinas se ligam fortemente a diferentes estruturas de glicoconjugados. Essa característica é evidenciada com a capacidade destas lectinas de ligarem a glicanos

expostos na superfície de vírus, bactérias, fungos e parasitas (AHMMED *et al.*, 2022; CUMMINGS *et al.*, 2022).

1.2.4 Lectinas em esponjas

Atualmente, há 45 lectinas isoladas de esponjas marinhas, sendo 42 pertencentes a espécies da classe Desmospongie. Estas proteínas podem ser classificadas nas famílias de lectinas do tipo C, tipo S e Tachylectinas. Entretanto, 24 delas não pertencem a famílias caracterizadas (ANDRADE, 2021). Em esponjas marinhas, as lectinas podem desempenhar uma variedade de funções, incluindo interação celular, espiculogênese e defesa. As lectinas de *Aphrocallistes vastus* (AvL) e *Geodia cydonium* (CGC), por exemplo, são capazes de mediar a agregação de células da própria esponja (CONRAD *et al.*, 1981; GUNDACKER *et al.*, 2001). As lectinas purificadas de *Axinella polypoides*, ApL I e ApL II, estão envolvidas na produção de espongina do meso-hilo (BRETTING *et al.*, 1983). Duas lectinas purificadas de *Suberites domuncula*, Sd galectin 1 e Sd galectin 2, estão envolvidas em processos de formação dos canais na esponja e no processo de biomineralização e formação de espículas de sílica (SCHRÖDER *et al.*, 2003; WIENS *et al.*, 2003). As lectinas de *Haliclona caerulea* (H-1 e H-2) apresentaram citotoxicidade contra náuplios de artêmia, o que sugere o envolvimento dessas lectinas na defesa do organismo contra patógenos (CARNEIRO *et al.*, 2013).

1.2.5 Atividade biológica de lectinas de esponjas

Além dos estudos de purificação e caracterização dessas proteínas, vários trabalhos demonstram o potencial biotecnológico das lectinas de poríferos. As lectinas de *Chondrilla caribensis* (CCL) e *Aplysina lactuca* (ALL) foram capazes de reduzir a biomassa e aglutinar bactérias patogênicas, tais como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Escherichia coli* (CARNEIRO *et al.*, 2017; MARQUES *et al.*, 2018). Além disso, CCL, lectina também pertencente à família das galectinas, foi capaz de inibir o desenvolvimento de maneira dose-dependente de formas promastigotas de *Leishmania infantum*, parasita causador da leishmaniose (SOUSA *et al.*, 2021). Em trabalho recente, ALL, também pertencente à família das galectinas, mostrou efeito sinérgico quando consorciada aos antibióticos ampicilina e tetraciclina ministrados contra *S. epidermidis* (DUARTE *et al.*, 2023).

Uma lectina isolada do extrato de *A. fistularis* (AFiL) foi capaz de inibir a formação de biofilmes de duas diferentes cepas de *S. aureus*, em todas as concentrações testadas

(ANDRADE, 2021). A lectina de *Haliclona implexiformis* (HIL) reduziu a biomassa do biofilme e o número de células viáveis de *S. aureus*, *S. epidermidis* (ANDRADE *et al.*, 2023).

A lectina de *Axinella donnani* (ADL) mostrou significativa atividade antibacteriana quando testada em discos de difusão contra os patógenos *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. Além disso, foi capaz de reduzir a biomassa do biofilme de *P. aeruginosa* e *S. aureus* (SADANANDAN; RAUF, 2018)

A lectina de *Halichondria okadai* (HOL-18) inibiu o crescimento das bactérias patogênicas *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Shigella boydii* e *P. aeruginosa*, além disso, mostrou atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* (HASAN; OZEKI, 2019).

Uma lectina isolada da esponja marinha *Fasciospongia cavernosa* (FCL) exibiu atividade antifúngica inibindo o crescimento e o desenvolvimento de micélios fúngicos de *Penicillium chrysogenum* e *Candida albicans* (SADANANDAN; RAUF, 2021).

A lectina AvL, de *Aphrocallistes vastus*, teve seu gene inserido em vetor de vírus vacinal oncolítico e mostrou atividade antiproliferativa em células de diferentes linhagens de câncer (WU *et al.*, 2019). A lectinas de *H. caerulea* (H-3) também foi capaz de induzir a apoptose células de câncer de mama humano da linhagem MCF7 (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2018). A lectina de *H. cratera* (HcL) também mostrou atividade contra células de câncer da linhagem HeLa. (PAJIC, 2002). Quando testada para células de câncer, HOL-18 exibiu efeito citotóxico dose-dependente contra células da linhagem HeLa e MCF-7 (HASAN; OZEKI, 2019).

As lectinas H-3 e de *H. manglares* (HMA) mostraram atividade antioxidante na proteção contra oxidação e branqueamento do β -caroteno e na quelação de íons ferrosos (CARNEIRO *et al.*, 2013a; 2015). Além disso, FCL também exibiu atividade inseticida contra *Aphis craccivora*, inseto conhecido como pulgão do feijão-caupi (SADANANDAN; RAUF, 2021).

Tendo em vista o potencial biotecnológico, e considerando a disponibilidade destes organismos no litoral cearense, aliado a existência de uma contínua bioprospecção em espécies de esponjas, na busca de novas moléculas com aplicações biomédicas, tornam o estudo de isolamento e caracterização bioquímica e estrutural de novas lectinas de esponjas extremamente relevantes.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Purificar, realizar a caracterização bioquímica e estrutural de uma nova lectina e avaliar os efeitos antibacterianos da lectina sobre a formação de biofilmes bacterianos e sua associação com antibióticos.

Objetivos específicos

- Avaliar a atividade hemaglutinante nos extratos aquosos da esponja marinha *A. crassa*;
- Isolar uma nova lectina de *A. crassa*;
- Caracterizar bioquimicamente a nova proteína isolada, estimando massa molecular, efeitos do pH e temperatura, inibição de carboidratos e dependência de íons metálicos sobre a atividade hemaglutinante;
- Avaliar a interação da lectina com um ligante através de Estudo de Calorimetria de Titulação isotérmica (ITC);
- Determinar a massa molecular da proteína através de espectrometria de massas (MS);
- Determinar a sequência de aminoácidos da nova lectina através da combinação de peptídeos sequenciados através de espectrometria de massas (MS/MS);
- Avaliar a estrutura secundária da lectina através de dicroísmo circular;
- Realizar a predição da estrutura tridimensional e prever o sítio de ligação da proteína através de meio de modelagem estrutural;
- Realizar o *Docking* Molecular da proteína com um ligante;
- Avaliar a atividade antibacteriana da lectina de *A. crassa* e sua ação sobre a formação de biofilmes bacterianos;
- Avaliar a ação da lectina em associação aos antibióticos ampicilina, tetraciclina e oxacilina sobre bactérias patogênicas.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta dos animais

Espécimes da esponja marinha *Aiolochoxia crassa* foram coletados em um ponto de mergulho no Parque Estadual Marinho da Pedra da Risca do Meio (03°35'19"S e 038°24'32"W), localizado no município de Fortaleza, no litoral do estado do Ceará, Brasil. A coleta de animais foi previamente autorizada pelos órgãos ambientais competentes (SISBIO ID: 33913-12). Após a coleta, os animais foram transportados em caixas térmicas até o laboratório e armazenados a -20° C para posterior utilização. O acesso ao patrimônio genético dos animais também foi previamente autorizado pelos órgãos competentes (SISGEN ID: A1792FE).

Um *voucher* contendo uma amostra da esponja foi enviada para identificação na Universidade Federal de Pernambuco, onde está depositado sob o código UFPEPOR2699.

3.2 Purificação da lectina

As esponjas foram cortadas em pequenos pedaços e maceradas em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM e cisteína 5 mM (TBS/Cys), na proporção de 1:2 (p/v). A mistura foi filtrada através de um tecido de *nylon* para reter partículas maiores e posteriormente centrifugada a 8.000 x g, por 30 minutos, a 4 °C. O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi utilizado para a determinação de proteínas solúveis totais pelo método de Bradford (1976) e ensaio de atividade hemaglutinante.

O extrato bruto foi então submetido à precipitação com sulfato de amônio, com saturação de 70% e a mistura foi mantida em repouso por 4 h. Em seguida, o material foi centrifugado, o sobrenadante descartado e o precipitado solubilizado em tampão TBS/Cys. A suspensão foi dialisada contra água destilada e posteriormente contra tampão TBS/Cys. Em seguida, a suspensão foi centrifugada novamente e 10 mL do sobrenadante aplicado em uma matriz de afinidade Sepharose 4B (1,0 cm x 6,0 cm) ativada com HCl 0,1 M, previamente equilibrada com TBS/Cys. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com o mesmo tampão de equilíbrio e os eluatos foram monitorados por absorbância a 280 nm. Finalmente, o material retido na coluna foi eluído com lactose 0,3 M em TBS/Cys. O material retido foi coletado em frações de 3 mL e as frações que apresentaram atividade hemaglutinante foram reunidas, dialisadas contra água destilada, liofilizadas. A proteína purificada foi denominada

AcrL (lectina de *Aiolochoiria crassa*).

3.3 Avaliação da atividade hemaglutinante e inibição

Os ensaios de hemaglutinação foram realizados com o extrato, a fração e a lectina purificada para a detecção da presença da atividade hemaglutinante. A inibição da atividade hemaglutinante da fração foi realizada com o objetivo de determinar a utilização da melhor matriz cromatográfica de purificação.

Os ensaios foram realizados utilizando eritrócitos de coelho, mantidos no setor de cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará. A utilização dos animais foi previamente autorizada pelo Comitê de Ética para Uso de Animais de Produção (CEUAP), sob o código 2211202101.

Após a obtenção do tipo sanguíneo, foram preparadas as suspensões de eritrócitos nativos. Os eritrócitos foram lavados 6 vezes em diluição de 10 volumes de NaCl 150 mM. Em seguida, foram preparadas as suspensões a 3% de eritrócitos em NaCl 150 mM (v/v).

Os ensaios de hemaglutinação e a inibição para a purificação foram realizados através do método da dupla diluição seriada, em placas de titulação de 96 poços com fundo em V, seguindo metodologia padrão descrita por Sampaio *et al.*, 1998. Inicialmente, foram adicionados aos poços 50 μ L de TBS/ Ca^{2+} , 50 μ L da amostra, que foi diluída seriadamente em cada fileira de poços, e em seguida, 50 μ L das soluções de eritrócitos preparadas. As amostras permaneceram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente e a atividade hemaglutinante foi observada macroscopicamente e expressa em títulos de hemaglutinação (U.H.), unidade inversa da maior diluição de amostra capaz de aglutinar os eritrócitos.

3.4 Caracterização bioquímica de AcrL

O efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante de AcrL (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi avaliado através de ensaio de atividade hemaglutinante em tampões de diferentes pH, incubando a solução da lectina por 1 hora aos seguintes tampões: acetato de sódio 100 mM pH 4 e pH 5, fosfato de sódio 100 mM pH 6, Tris 100 mM pH 7 e pH 8 e glicina 100 mM pH 9 e pH 10, todos contendo NaCl 150 mM.

Para avaliar o efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante de AcrL (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), amostras da lectina, solubilizada em NaCl 150 mM, foram aquecidas por 1 hora em

diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C) e posteriormente submetidas a testes de atividade hemaglutinante em tampão TBS/Cys.

O efeito do íon cálcio na atividade hemaglutinante também foi avaliado. AcrL (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) solubilizada em NaCl 150 mM, foi submetida ao teste de hemaglutinação em tampão TBS/ Ca^{2+} e em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM e EDTA 20 mM. Após 1 hora de incubação, a atividade hemaglutinante foi determinada.

Na inibição da atividade hemaglutinante foram utilizados carboidratos e glicoproteínas, utilizando-se AcrL em TBS/Cys purificada com a finalidade de determinação da mínima concentração capaz de inibir a aglutinante de eritrócitos.

Os carboidratos utilizados foram: D-xilose 100 mM, D-ribose 100 mM, L-fucose 100 mM, L-arabinose 100 mM, L-ramnose 100 mM, D-galactose 100 mM, D-manose 100 mM, D-glicose 100 mM, D-glicosamina 100 mM, D-galactosamina 100 mM, N-acetil-D-glicosamina 100 mM, N-acetil-D-galactosamina 100 mM, N-acetil-D-manosamina 100 mM, ácido D-galacturônico 100 mM, D-frutose 100 mM, D-sacarose 100 mM, D-melibiose 100 mM, α -D-lactose 100 mM, β -D-lactose 100 mM, D-lactulose 100 mM, D-maltose 100 mM, D-rafinose 100 mM, *Saccharomyces cerevisiae* manana 100 mM, metil- α -D-galactopiranosídeo, metil- β -D-galactopiranosídeo 100 mM, metil- β -D-tiogalactose 100 mM, fenil- β -D-galactopiranosídeo 100 mM, 4-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo 100 mM, 4-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo 100 mM, 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo 100 mM e as glicoproteínas mucina de estômago de porco tipo 2 (PSM-II) (1 mg.mL^{-1}) e mucina de estômago de porco tipo 3 (PSM- III) (1 mg.mL^{-1}), fetuína, mucina submaxilar bovina (BSM) (1 mg.mL^{-1}) e asialofetuína (1 mg.mL^{-1}).

O teste de inibição da atividade hemaglutinante foi realizado em placas de microtitulação de fundo V, no qual foram adicionados aos poços 25 μL da solução da lectina em TBS com concentração capaz de aglutinar eritrócitos com título igual a 4 UH e 25 μL das soluções de açúcares diluídas em cada poço. A lectina permaneceu incubada na presença dos carboidratos por 30 minutos e posteriormente foram adicionados 25 μL da solução de eritrócitos dos quais a lectina teve menor preferência. Os resultados observados foram expressos em unidade de concentração mínima de carboidratos e/ou glicoproteínas capaz de inibir a atividade hemaglutinante (SAMPAIO *et al*, 1998).

3.5 Estudo de Calorimetria de Titulação Isotérmica

As análises de microcalorimetria foram realizadas em um calorímetro MicroCal PEAQ-

ITC (Malvern). A lectina e o ligante (fetuína – melhor inibidor da atividade hemaglutinante) foram solubilizadas em TBS/Cys nas concentrações de 35 μM e 112 μM , respectivamente. As concentrações das soluções foram estimadas por absorvância a 280 nm usando os respectivos coeficientes de extinção molar.

A solução contendo o ligante foi injetada na solução de lectina em alíquotas de 2 μL através de uma micro seringa automática, as injeções tiveram intervalos de 150 s. A solução de lectina (Volume de 250 μL) recebeu um total de 19 injeções, durante todo o experimento a célula de amostra foi agitada a 750 rpm e a temperatura foi mantida em 25°C. O controle negativo consistiu em uma titulação nos moldes acima descritos tendo apenas o tampão Tris/Cys na célula de amostra.

As análises termodinâmicas para determinação dos parâmetros K_d (constante de dissociação), N (número de sítios), ΔH variação de entalpia, $-T\Delta S$ (variação de entropia) e ΔG (energia livre) foram realizadas usando o software MicroCal PEAQ-ITC Analysis (Malvern), baseadas no modelo *one-set-of-sites* e com o parâmetro de compensação ajustado aplicado a cada titulação seguindo as diretrizes do fabricante. A constante de afinidade foi determinada pela equação abaixo:

$$K_a = 1/K_d$$

3.6 Estimativa de massa molecular

A pureza e homogeneidade da proteína foram avaliadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e na presença e ausência de β -mercaptoetanol (LAEMMLI, 1970). O gel a 15% foi submetido a uma corrente de 25 mA e uma voltagem de 150 V, durante 1 hora.

A massa molecular da proteína sob condições desnaturantes foi estimada comparando a migração da proteína purificada com proteínas de peso molecular conhecido, presentes em marcador molecular caseiro (HSA - NP_0000468, 66kDa; rSFL - 7UMJ_AA, 30 kDa; CCL - COHLX7.1, 15 kDa)

Para estimar a massa em condições nativas, a proteína foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna BEH SEC (4,6 mm x 300 nm, tamanho de partícula 1,7 μm), acoplada ao sistema Acquity H-Class UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, Waters Corp.).

A massa da proteína alvo foi estimada pelo tempo de eluição em comparação com

proteínas de massa molecular conhecida (tiroglobulina, 669 kDa, apoferritina, 443 kDa, β -amilase, 200 kDa, álcool desidrogenase, 150 kDa, BSA, 66 kDa, anidrase do ácido carbônica, 29 kDa e lisozima, 14 kDa). A coluna foi previamente equilibrada e a cromatografia realizada em tampão TBS, monitorada a 280 nm.

A massa molecular média da lectina isolada nas formas nativa e alquilada, utilizando AcrL incubado com IAA (iodoacetamida), foi determinada por espectrometria de massa utilizando um espectrômetro de massa híbrido Synapt HDMS (Waters Corp.), através de *Nano Electrospray Ionization* (nESI). Soluções proteicas ($10 \mu\text{mol } \mu\text{L}^{-1}$) em 50% de acetonitrila (ACN), contendo 0,1% de ácido fórmico foram infundidas diretamente no espectrômetro com vazão de $1 \mu\text{L min}^{-1}$ e os dados foram adquiridos com auxílio do programa Mass Lynx 4.1.

3.7 Dicroísmo Circular

Os estudos de espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD) foram realizados utilizando um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco International Co., Tóquio, Japão). A proteína solubilizada em tampão fosfato 20 mM, pH 7,0, com concentração de $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ foi adicionada em uma cubeta retangular de quartzo com caminho ótico de 5 mm, volume total de 2 mL. Os espectros foram adquiridos na faixa de 190 a 240 nm (*far-UV*), com 8 repetições, a uma velocidade de varredura de 100 nm.min^{-1} , em diferentes temperaturas (25 a 100 °C).

A predição da estrutura secundária foi realizada pelo servidor online DICROWEB (WHITMORE; WALLACE, 2008). A temperatura de *melting* (TM) foi calculada em função da mudança nos valores de elipticidade (GREENFIELD, 2007).

3.8 Determinação da sequência de aminoácidos

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

As proteínas no gel foram reduzidas e alquiladas, conforme descrito por Shevchenko *et al.* (2007). A lectina foi digerida com diferentes enzimas proteolíticas (tripsina, quimotripsina, Lys-C, Asp-N), e a estrutura primária foi obtida pela sobreposição das sequências dos peptídeos gerados após a digestão (SEIDLER *et al.*, 2010; SHEVCHENKO *et al.*, 2007).

Os peptídeos oriundos de digestões proteolíticas foram aplicados a uma coluna de fase reversa C18 (75 μm x 100 mm) e eluídos por um gradiente linear de ACN contendo 0,1% de AF. Os eluatos foram infundidos diretamente em um espectrômetro de massa SYNAPT HDMS (Waters Corp.).

O espectrômetro de massas operou em modo positivo na faixa de m/z 50 a 3000, sob tensão capilar de 3,0 kV e temperatura da fonte de 363 K. As análises LC-MS/MS foram realizadas de acordo com a função DDA (Data Dependent Analysis).

Os íons selecionados foram fragmentados por Dissociação Induzida por Colisão (CID), utilizando argônio como gás de fragmentação. Os espectros foram coletados e processados pelo MassLynx v4.1 e ProteinLynx v2.4 (Waters Corp.). Os espectros de fragmentação CID foram interpretados manualmente usando a ferramenta PepSeq (Waters). Leucina e isoleucina foram diferenciadas por comparação com proteínas similares no banco de dados, bem como foi considerada a especificidade da quimotripsina.

3.9 Análise da sequência

O ponto isoelétrico (Ie) do AcrL foi determinado pela ferramenta ProtParam (GASTEIGER *et al.*, 2005). A busca por proteínas semelhantes a AcrL foi realizada pelo BLASTp. O alinhamento entre AcrL e proteínas similares foi construído utilizando servidores web Multalin e ESPRIPT, a matriz Blosum62-12-2 foi selecionada (CORPET, 1988; ROBERT; GOUET, 2014).

Uma árvore filogenética baseada em alinhamento múltiplo foi construída pelo pacote de software MEGA X, por algoritmo *neighbor-joining* (NJ), (KUMAR *et al.*, 2018), conforme descrito por (DUARTE *et al.*, 2022). Foram realizadas 1000 replicações de análises de *bootstrap* (SAITOU; NEI, 1987).

3.10 Predição da estrutura

Uma estrutura tridimensional predita de AcrL foi produzida pelo Modeller, v 10.4 (WEBB; SALI, 2016). A predição da estrutura e o refinamento do modelo foram realizados conforme descrito por Sousa *et al.* (2021). A estrutura cristalina da galectina da enguia *Conger myriaster*, Congerin 2 (PDB 1is3), foi utilizada como modelo.

Os modelos produzidos foram validados através do servidor web VoromQA (<https://bioinformatics.lt/wtsam/voromqa/>) (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011) e da

ferramenta QMEAN (<https://swissmodel.expasy.org/qmean/>) (OLECHNOVIČ; VENCLOVAS, 2019). O melhor modelo foi selecionado e visualizado usando *Pymol*.

O padrão oligômero de AcrL foi previsto com a ferramenta *Homomer*, do *GalaxyWeb Server* (KO *et al.*, 2012). O local de ligação aos carboidratos foi previsto pela ferramenta *Galaxysite* do *GalaxyWeb* (SHIN *et al.*, 2014).

3.11 Docking Molecular

A base estrutural para o reconhecimento de carboidratos por AcrL foi explorada através de cálculos de acoplamento molecular. Para este propósito, dois epítopos diferentes de carboidratos glicoproteicos foram selecionados com base em evidências experimentais, representando resíduos terminais de fetuína [Sialil(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc] e asialofetuína [Gal(β 1-4)GlcNAc]. As coordenadas tridimensionais para esses epítopos foram construídas e otimizadas através do pacote *Discovery Studio* (Biovia).

Os cálculos de *docking* foram realizados com o *AutoDock Vina*, versão 1.1.2 que aplica um otimizador global de busca local iterado para o procedimento de otimização, onde a sucessão de cada etapa consiste em uma mutação e otimização local (TROTT; OLSON, 2010). A proteína e os carboidratos ligantes foram tratados como moléculas rígidas e flexíveis, respectivamente, e uma busca específica foi realizada utilizando um espaço cúbico de 20 Å \times 20 Å \times 20 Å centrado no sítio de ligação do carboidrato. Para cada *docking*, foram analisadas as dez gerações mais bem classificadas com base na afinidade de ligação prevista (em quilocalorias por mol). O *AutoDock Vina* foi validado para o propósito apresentado através de cálculos de *redocking* utilizando a estrutura cristalina da Congerina II em complexo com lactose (ID 1IS3), cujos resultados foram analisados pelo *Root Mean Square Deviation* (RMSD) das posições atômicas entre o cristal e os ligantes calculados, através da ferramenta calculadora RMSD do software *Visual Molecular Dynamics* (VMD) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996; SHIRAI *et al.*, 2002). As energias de ligação foram calculadas para as conformações de acoplamento selecionadas através do servidor web *Prodigy* ([//bianca.science.uu.nl/prodigy/](http://bianca.science.uu.nl/prodigy/)) (KURKCUOGLU *et al.*, 2018).

3.12 Avaliação do potencial antibacteriano e antibiofilme

3.12.1 Cepas bacteriana e condições de cultura

Os ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana foram realizados com as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 700698, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 353984 e *Escherichia coli* ATCC 11303. As bactérias foram cultivadas em meio Agar Triptona de Soja (TSA; Himedia, Índia) e incubadas a 37 °C, por 24 horas. Após crescimento em meio sólido, algumas colônias isoladas foram removidas, inoculadas em Caldo Triptona de Soja (TSB; Himedia, Índia) e incubadas por 24h, a 37 °C, sob agitação constante. As células foram colhidas por centrifugação durante 10 minutos, 9000 xg, a 4 °C. As células foram suspensas em TSB e a densidade celular de cada suspensão bacteriana foi ajustada para uma concentração final de 1×10^6 unidades formadoras de colônia (UFC.mL⁻¹) por densidade óptica a 620 nm.

3.12.2 Teste de aglutinação bacteriana

O experimento foi realizado seguindo um método adotado por Melo *et al.* (2014), com modificações.

Em microtubos foram adicionados 50 µL da suspensão das células bacterianas (2×10^8 CFU.mL⁻¹) com 50 µL de uma solução de AcrL (1 mg.mL⁻¹). As misturas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora e transferidas para lâminas de microscópio antes da visualização.

Além disso, foi realizada uma análise da capacidade aglutinante da lectina na presença de fetuína (glicoproteína inibidora), na qual a lectina foi pré-incubada com 50 µL de fetuína a uma concentração de 1 mg.mL⁻¹, por 30 minutos. Após este período foram adicionados 100 µL da suspensão bacteriana. O grupo controle consistiu apenas das células bacterianas, com ou sem a presença de fetuína. A observação da atividade foi realizada utilizando um microscópio óptico Basic Trinocular Planocromático – K55TP.

3.12.3 Efeito da lectina sobre células planctônicas

Os efeitos da lectina nas células planctônicas foram avaliados pelo método de microdiluição, com modificações (CLSI, 2015). Resumidamente, a lectina foi diluída em NaCl 150 mM em concentrações variando de 7,8 a 500 µg.mL⁻¹ em meio MHB (Caldo Mueller

Hinton). As soluções de lectina foram incubadas em placas de poliestireno de 96 poços com 100 µL de células bacterianas, previamente ajustadas 1×10^6 células.mL⁻¹, para cada poço. As microplacas foram incubadas a 37 °C, por 24 horas e a densidade óptica foi medida a 620 nm utilizando um leitor de microplacas (SpectraMax® I3, Molecular Devices LLC, CA, EUA).

3.12.4 Efeito da lectina associadas a antibióticos

A avaliação do efeito da lectina combinada com antibióticos foi realizada pelo método *checkerboard*, segundo Duarte *et al.* (2023).

As combinações da lectina com os antibióticos ampicilina, tetraciclina e oxacilina foram avaliadas contra as bactérias listadas no ponto 3.10.1. Para cada combinação testada, cada antibiótico foi diluído no sentido vertical da placa, nas concentrações de CIM, ½ x CIM, ¼ x CIM, 1/8 x CIM e 1/16 x CIM, e a lectina em concentração constante (250 µg.mL⁻¹) em colunas 1 a 5. Os antibióticos e a lectina foram diluídos separadamente em placas de microdiluição, e logo após foram misturados em uma nova placa, que foi preenchida com 50 µL do antibiótico, 50 µL da lectina e 100 µL inóculo bacteriano previamente ajustado.

As placas foram então incubadas a 37 °C por 24 horas e para determinação da nova CIM em combinação, a DO foi medida no comprimento de onda de 620 nm em leitor de microplacas (SpectraMax® I3).

Para resultados que apresentaram valores iguais a ½ x MIC, foi considerado efeito aditivo; valores entre ¼ e 1/16, efeito sinérgico.

3.12.5 Teste de formação de biofilme

Os efeitos na formação de biofilme foram avaliados conforme proposto por Vasconcelos *et al.* (2014), com algumas modificações. Placas estéreis de poliestireno de 96 poços foram preparadas seguindo as mesmas etapas previamente estabelecidas para o crescimento de células planctônicas. Os biofilmes foram avaliados através da quantificação da biomassa por coloração com violeta de cristal e enumeração de células viáveis no biofilme.

3.12.5.1 Quantificação de massa do biofilme

Para quantificar a biomassa total do biofilme, foi utilizado um método colorimétrico. Após o desenvolvimento do biofilme, o conteúdo de cada poço foi removido e

os poços foram lavados duas vezes com 200 μL de NaCl 150 mM para remover células frouxamente aderentes. Para fixar os biofilmes, foram adicionados 200 μL de metanol (99%) a cada poço. Após 15 min, o metanol foi removido e as placas foram deixadas secar a 25 °C. Em seguida, 200 μL de cristal violeta foram adicionados a cada poço. Após 5 min, o excesso de cristal violeta foi removido e as placas foram lavadas duas vezes com água. Por fim, 200 μL de ácido acético (33%, v/v) foram adicionados aos poços para dissolver o cristal violeta ligado à massa do biofilme e a absorbância foi medida a 590 nm utilizando um leitor de microplacas (SpectraMax® I3).

3.12.5.2 Quantificação do número de células viáveis no biofilme

Para determinar o número de células viáveis, os poços foram lavados duas vezes com NaCl 150 mM e em seguida foram adicionados 200 μL da mesma solução a cada poço contendo biofilmes. As placas foram colocadas em banho ultrassônico por 10 minutos para liberar as células envolvidas pelo biofilme. Diluições decimais em série das suspensões obtidas foram plaqueadas em TSA para permitir a determinação da viabilidade. As placas foram incubadas por 24 horas, a 37 °C, e foi determinado o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC.mL⁻¹).

3.12.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism® versão 7.0 para Microsoft Windows®. Os dados de todos os ensaios foram comparados usando análise de variância unidirecional (ANOVA) com teste de Bonferroni *post hoc*. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

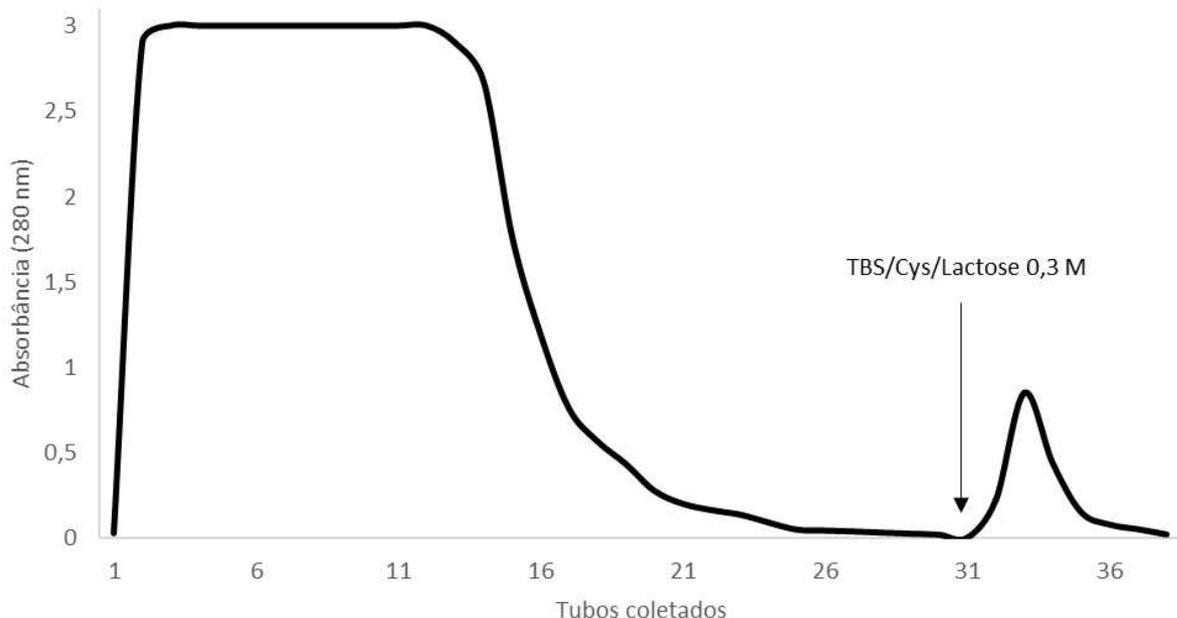
4 RESULTADOS

4.1 Purificação da Lectina

O extrato e a fração 0-70% de sulfato de amônio do extrato de *A. crassa* apresentaram atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho não tratado proteoliticamente. As atividades foram submetidas a inibição com carboidratos e glicoproteínas e foi constatada a preferência por glicoproteínas que em sua composição possuem polímeros de galactose. Assim, o método de purificação escolhido foi o de afinidade através da matriz de Sepharose 4B.

Uma lectina presente no extrato da esponja marinha *A. crassa*, denominada de AcrL (*Aiolochoiria crassa* Lectin), foi isolada através de cromatografia de afinidade em coluna Sepharose 4B (Figura 9). A interação da lectina com a matriz foi interrompida por eluição com TBS/Cys, contendo lactose 0,3 M. O índice de purificação de AcrL foi de 20 vezes e a atividade específica foi de 5120 U.H.mg⁻¹ (Tabela 2).

Figura 9 – Cromatografia de afinidade em matriz de Sepharose 4B da fração 0-70 de sulfato de amônio do extrato de *A. crassa*



Fonte: elaborado pelo autor.

Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B (1,0 cm x 6,0 cm), previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM e Cisteína 5 mM. Foram aplicados 10 mL da fração 0-70 do extrato de *Aiolochoiria crassa*. A coluna foi eluída em tampão TBS/Cisteína, contendo 0,3 M de lactose. A lectina eluída foi denominada de AcrL – *Aiolochoiria crassa* Lectin.

Tabela 2 - Purificação da lectina presente no extrato da esponja marinha *Aiolochoiria crassa*

Fração	Vol (mL)	Título (H.U.mL ⁻¹)	Proteína Total (mg)	U.H. Total	Atividade específica (U.H.mg ⁻¹)	Purificação (vezes)	Recuperação (%)
Extrato Aquoso	315	256	321,3	80.640	251	1	100
F ₀₋₇₀	53	1024	228,43	54.272	237	0,9	67
<i>A. crassa</i> lectin	44	256	2,2	11.264	5.120	20	14

Fonte: elaborado pelo autor.

4.2 Ensaio de Atividade Hemaglutinante e Inibição

AcrL foi capaz de aglutinar eritrócitos de coelho nativos, exibindo título de 256 U.H.mL⁻¹ e atividade específica de 5120 U.H.mg⁻¹.

A atividade hemaglutinante da lectina foi inibida apenas por glicoproteínas. Mucina de estômago de porco tipo 2 (PSM-II), mucina de estômago de porco tipo 3 (PSM-III), fetuína, mucina submaxilar bovina (BSM) e asialofetuína foram capazes de inibir a atividade hemaglutinante da AcrL (Tabela 3).

Tabela 3 - Inibição da atividade hemaglutinante de AcrL por glicoproteínas

Glicoproteínas	CIM (µg.mL ⁻¹)
Fetuina	15,62
BSM	15,62
Asialofetuina	62,5
PSM tipo II	250
PSM tipo III	250

Fonte: elaborado pelo autor

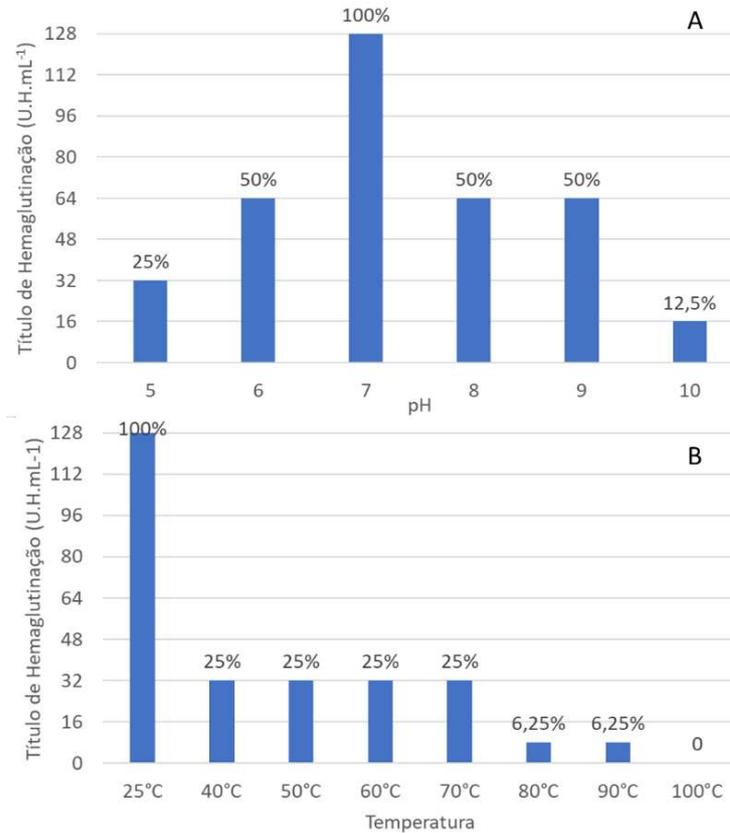
CIM – Concentração inibitória mínima

4.3 Efeitos do pH, Temperatura e Íons Divalentes na Atividade Hemaglutinante

AcrL (500 µg.mL⁻¹) exibiu atividade de hemaglutinação entre pH 5 e 10, com seu maior título de hemaglutinação em pH 7 (Figura 10A). No ensaio de termoestabilidade, AcrL exibiu maior título de hemaglutinação a 25 °C. Entretanto, a proteína perdeu 75% de sua atividade quando aquecida por 1 hora, a 40 °C, enquanto a 70 °C, a atividade hemaglutinante foi reduzida a 6,25% da atividade total e completamente abolida a 100 °C (Figura 10B). A atividade hemaglutinante da AcrL não foi afetada pela presença (128 U.H.mL⁻¹) ou ausência

(128 U.H.mL⁻¹) do íon Ca²⁺ através da evidência da presença da atividade hemaglutinante da AcrL mesmo na presença de EDTA.

Figura 10 – Avaliação da atividade hemaglutinante



Fonte: elaborado pelo autor

A - Atividade hemaglutinante frente a diferentes pH. Os tampões usados foram: acetato de sódio 100 mM, pH 4 e pH 5; fosfato de sódio, pH6; Tris 100 mM, pH 7 e pH 8; glicina 100 mM, pH 9 e pH 10; todos contendo NaCl 150 mM. B - AcrL foi aquecida em 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C e posteriormente submetida a teste de atividade hemaglutinante.

4.4 Estudo de Calorimetria de Titulação Isotérmica

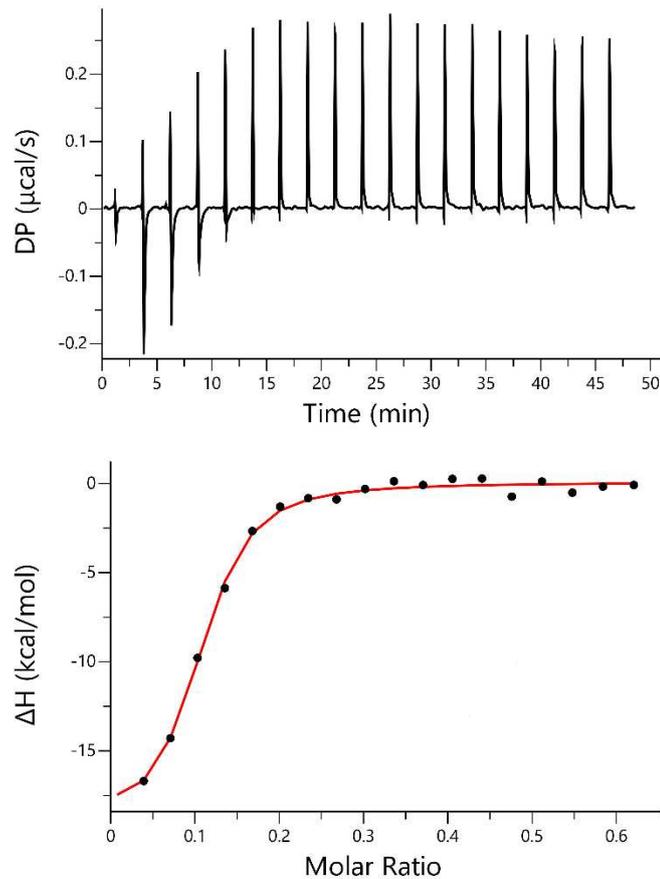
Os parâmetros termodinâmicos resultantes das análises de microcalorimetria para a interação AcrL – fetuína estão resumidos na Tabela 4. O termograma e a curva de titulação ajustada estão ilustrados na Figura 11.

Tabela 4 - Termodinâmica da associação AcrL-Fetuína

	Ka (x10 ⁴ M ⁻¹)	ΔG (kcal.Mol ⁻¹)	ΔH (kcal.Mol ⁻¹)	-TΔS (kcal.Mol ⁻¹)	n	Kd (ηM)
Fetuína	3039	-8,85	-19,3	10.5	0,098	329

Fonte: elaborado pelo autor

Figura 11 - Termograma e curva de titulação para a interação AcrL-Fetuína.



Fonte: elaborado pelo autor.

O ligante (fetuína) à 112 μL foi titulado em injeções intervaladas de 2 μL contra a lectina (35 μM) disposta na célula de amostra ($V=250\text{ uML}$). A temperatura foi mantida em 25°C e a câmara foi constantemente agitada a 750 rpm. Os dados foram analisados com o software MicroCal PEAQ Analysis.

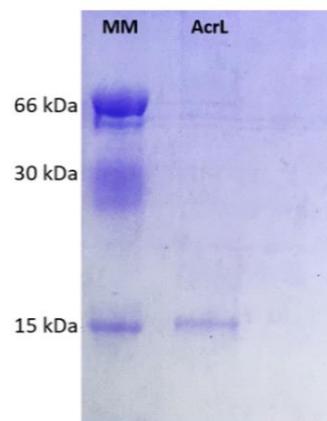
AcrL demonstrou elevada afinidade por fetuína, conforme expresso pela K_d da interação na casa de nanomolar (ηM). O n apresentado pela interação (0,098) denota a ligação de pelo menos 10 cadeias polipeptídicas de AcrL com 1 molécula de fetuína simultaneamente. A glicoproteína fetuína bovina, usada nesse ensaio, possui três N -glicanos triantenários com o terminal $\text{NeuAc}(\alpha 1-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ (Sialil-LacNAc), sendo assim são nove pontos de ligação para AcrL. Além das glicosilações do tipo N , a fetuína possui ainda glicosilações do tipo- O , o antígeno T sialisado ($\text{NeuAc}(\alpha 1-3)\text{Gal}(\beta 1-3)\text{GalNAc}$) (GUPTA; BREWER; 1994). Portanto, os dados termodinâmicos indicam que AcrL foi capaz de se ligar tanto aos N -glicanos quanto aos O -glicanos da fetuína bovina.

4.5 Eletroforese e Estimativa de Massa Molecular

Em SDS-PAGE, sob condições não redutoras, AcrL apresentou uma única banda com massa molecular estimada de 15 kDa (Figura 12). Sob condições redutoras, não houve diferença na massa molecular estimada (dado não mostrado).

Na cromatografia de exclusão molecular, AcrL exibiu massa molecular de 36 kDa, sugerindo que a lectina é um dímero ligado por interações moleculares fracas (Figura 13).

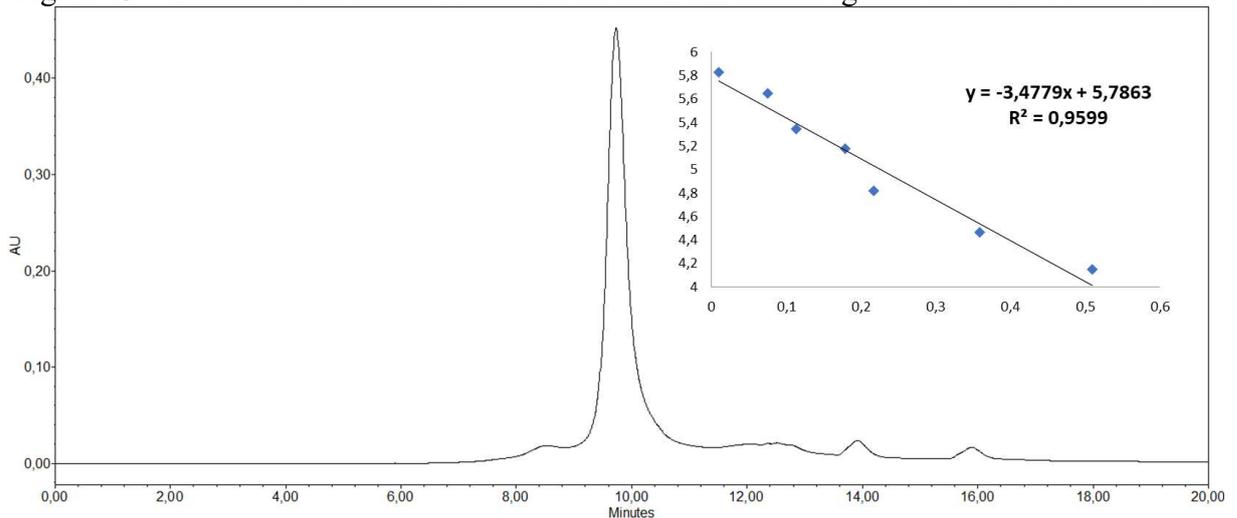
Figura 12 – Estimativa da massa molecular de AcrL em gel de eletroforese.



Fonte: elaborado pelo autor

SDS-PAGE, na ausência de β -mercaptanol, 15%. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. MM – Marcadores Moleculares caseiros: HSA - 66 kDa; rSFL - 30 kDa e CCL - 15 kDa. AcrL – *Ailochroia crassa lectin* na ausência de β -mercaptanol: 15 kDa.

Figura 13 – Estimativa da massa molecular de AcrL em cromatografia de exclusão molecular.

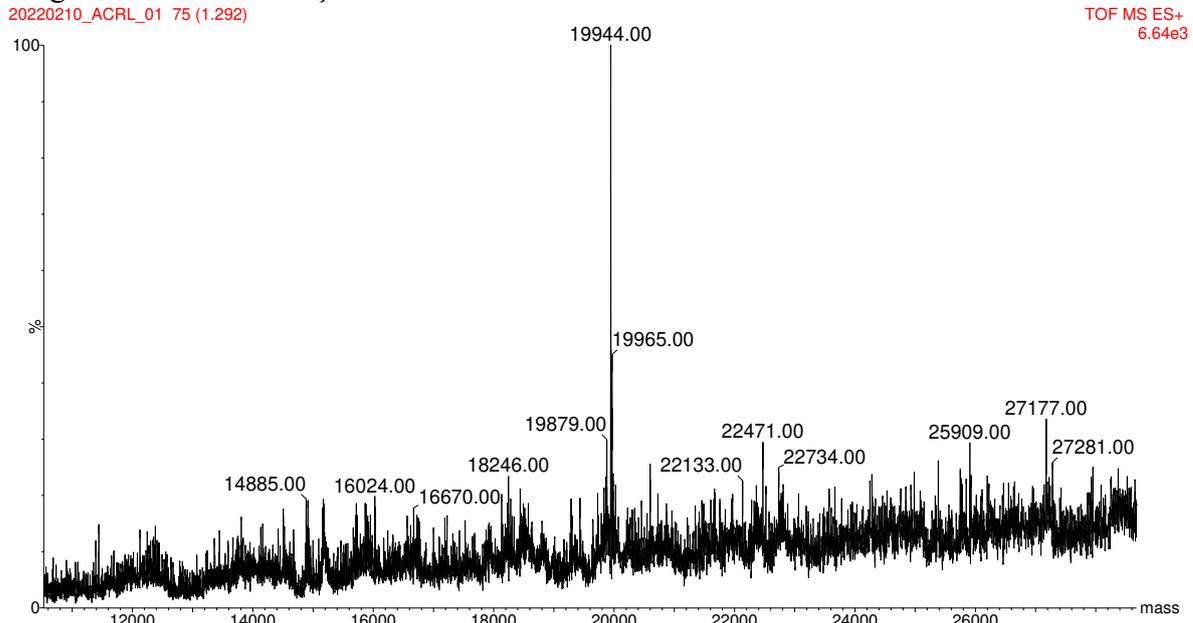


Fonte: elaborado pelo autor

Cromatografia de exclusão molecular em coluna BEH SEC (4,6 mm x 300 nm, tamanho de partícula 1,7 μ m) acoplada em sistema Acquity UPLC. Foram aplicados 100 μ L (1 mg.mL⁻¹) de AcrL purificada. A coluna foi previamente equilibrada e a cromatografia foi conduzida em tampão Tris-HCl 20mM, pH 7,6, contendo NaCl 150 mM com fluxo de 0,3 mLmin⁻¹. Marcadores: 1) tiroglobulina (669 kDa); 2) apoferritina (443 kDa); 3) β -amilase (220 kDa); 4) álcool desidrogenase (150 kDa); 5) BSA (66 kDa); 6) anidrase carbônica (29 kDa); 7) lisozima (14kDa).

A massa molecular média de AcrL, determinada por ESI-MS após a deconvolução dos espectros de massa, foi de 19.944 ± 5 Da (Figura 14).

Figura 14 – Determinação da massa molecular nativa de AcrL.



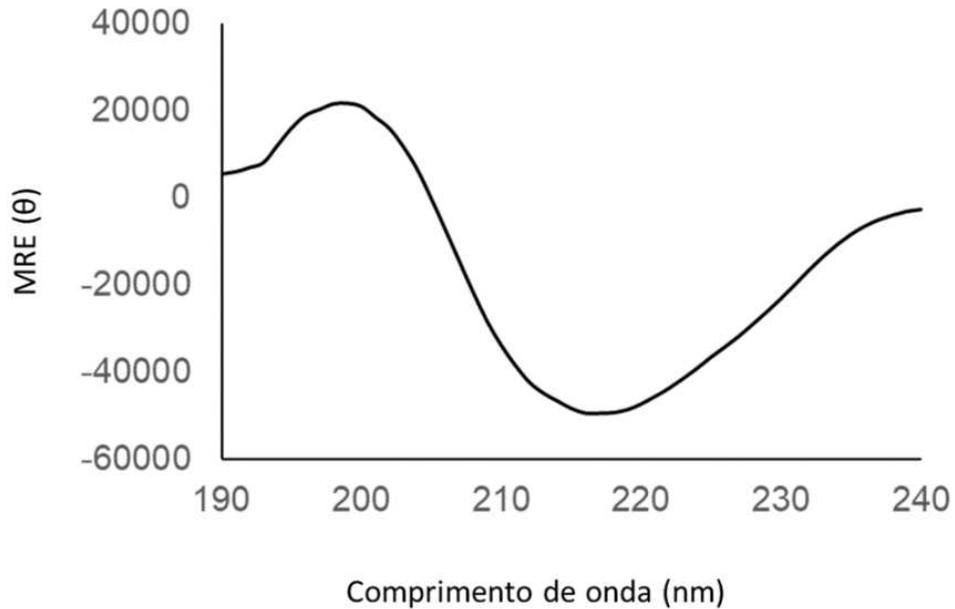
Fonte: elaborado pelo autor

Massa molecular média de AcrL determinada em condições nativas

4.6 Predição de Estrutura Secundária e $T_{melting}$ por Dicroísmo Circular

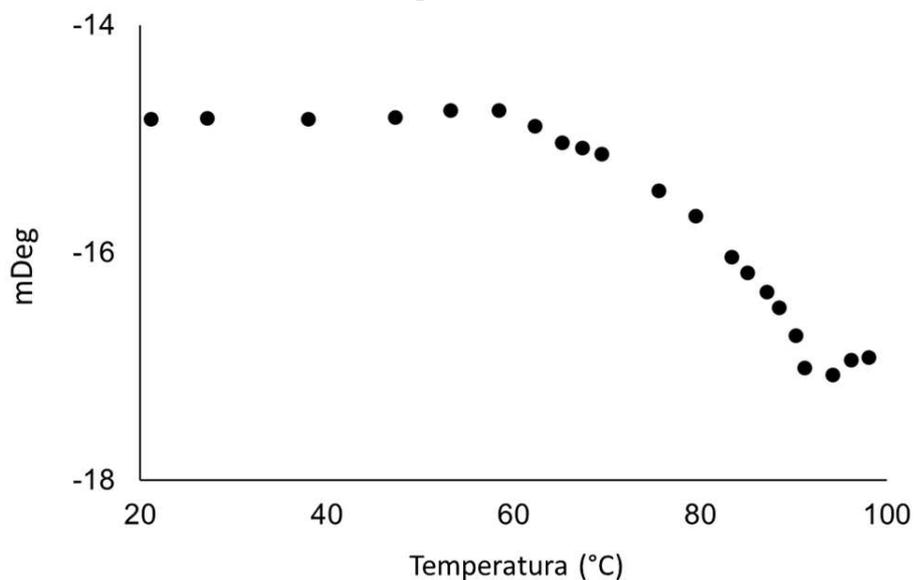
Os espectros de dicroísmo circular de AcrL adquiridos mostraram uma grande banda positiva em torno de 195 nm e uma banda negativa com mínimo em 218 nm. Quando os espectros foram analisados com auxílio da ferramenta de predição CONTIN, alocada no servidor online DICROWEB (SPOELDER; GRONDELLE; GROEN, 1990), percebeu-se que a estrutura secundária da proteína é formada por 4% de α -hélice, 40% de β -folha, 22% de dobras- β e de 34% de estruturas aleatórias (Figura 15). A temperatura de $melting$ TM de AcrL foi estimada em 84,5 °C (Figura 16).

Figura 15 – Espectros de dicroísmo circular de AcrL.



Fonte: elaborado pelo autor
Espectro de Dicroísmo Circular de AcrL (*Far* – UV; 190 a 240 nm).

Figura 16 – Curva de regressão da Temperatura de *Melting* de AcrL em diferentes temperaturas.



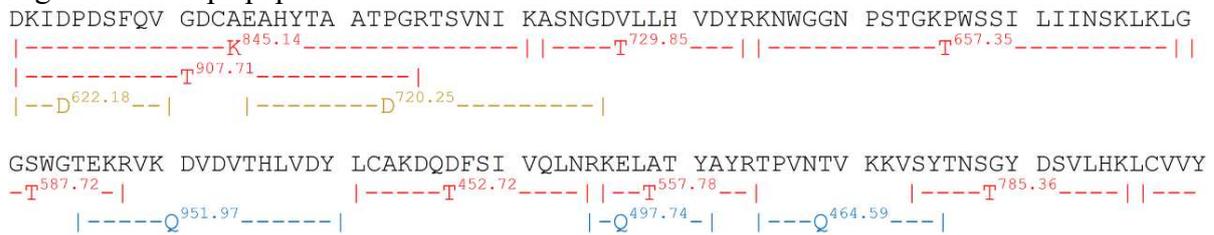
Fonte: elaborado pelo autor.

4.7 Determinação da Sequência de Aminoácidos por MS/MS

A sequência de aminoácidos determinada de AcrL consiste em 146 resíduos de aminoácidos (Figura 17), derivados da interpretação do sequenciamento manual dos espectros de massa CID, de oito peptídeos obtidos por digestão com tripsina, três peptídeos obtidos por digestão com quimotripsina, dois peptídeos obtidos com Asp-N e um peptídeo obtido por

digestão com Lys-C (Tabela 5). Os resíduos identificados resultaram em um total de 16.201 Da.

Figura 17 – Mapa peptídico de AcrL.



AEPAGH

T^{608.25} - |

Fonte: elaborado pelo autor

Mapa peptídico de AcrL montado por sobreposição de peptídeos obtidos a partir de digestões enzimáticas com tripsina (T), quimotripsina (Q), Lys-C (K) e Asp – N (D).

Tabela 5 – Sequências de peptídeos obtidas por digestão enzimática da lectina AcrL.

m/z	Sequência	Massa		Δ (Da)
		Observada	Calculada	
T _{908.05}	DKIDPDSFQVGDCAEAHYTAATPGR	2720.21	2720.12	0.11
T _{729.84}	ASNGDVLHVDYR	1457.68	1457.68	0.00
T _{657.35}	KNWGGNPSTGKPWSSILILNSKLLK	2624.38	2624.40	0.02
T _{545.75}	LGGSWGTEKR	1089.46	1089.55	0.09
T _{452.72}	LCAKDQDFSLVLRK	1805.94	1805.86	0.02
T _{557.78}	KELATYAYR	1113.55	1113.58	0.03
T _{785.37}	VSYTNSGYDSVLHK	1568.71	1568.74	0.03
T _{711.01}	APRLCAKDQDFSLVLR	2130.02	2130.13	0.11
T _{608.25}	LCVVYAEPAGH	1214.49	1214.57	0.08
Q _{464.59}	RTPVNTVKQVSY	1390.75	1390.75	0.00
Q _{497.74}	NRKELATY	993.47	993.52	0.05
K _{845.64}	DKIDPDSFQVGDCAEAHYTAATPGRITVNLK	3376.53	3376.59	0.06
D _{720.59}	EAHYTAATPGRITVNLKASNG	2158.07	2157.75	0.32

Fonte: elaborado pelo autor

Peptídeos manualmente sequenciados após digestão enzimática dos spots e em solução de AcrL e sob condição redutora. T- peptídeos obtidos a partir da digestão com tripsina. Q- peptídeos obtidos a partir da digestão com quimotripsina. K – peptídeos obtidos a partir da digestão com Lys-C. D – peptídeos obtidos a partir da digestão com Asp – N. m/z: massa/ carga. Δ: massa calculada – massa observada.

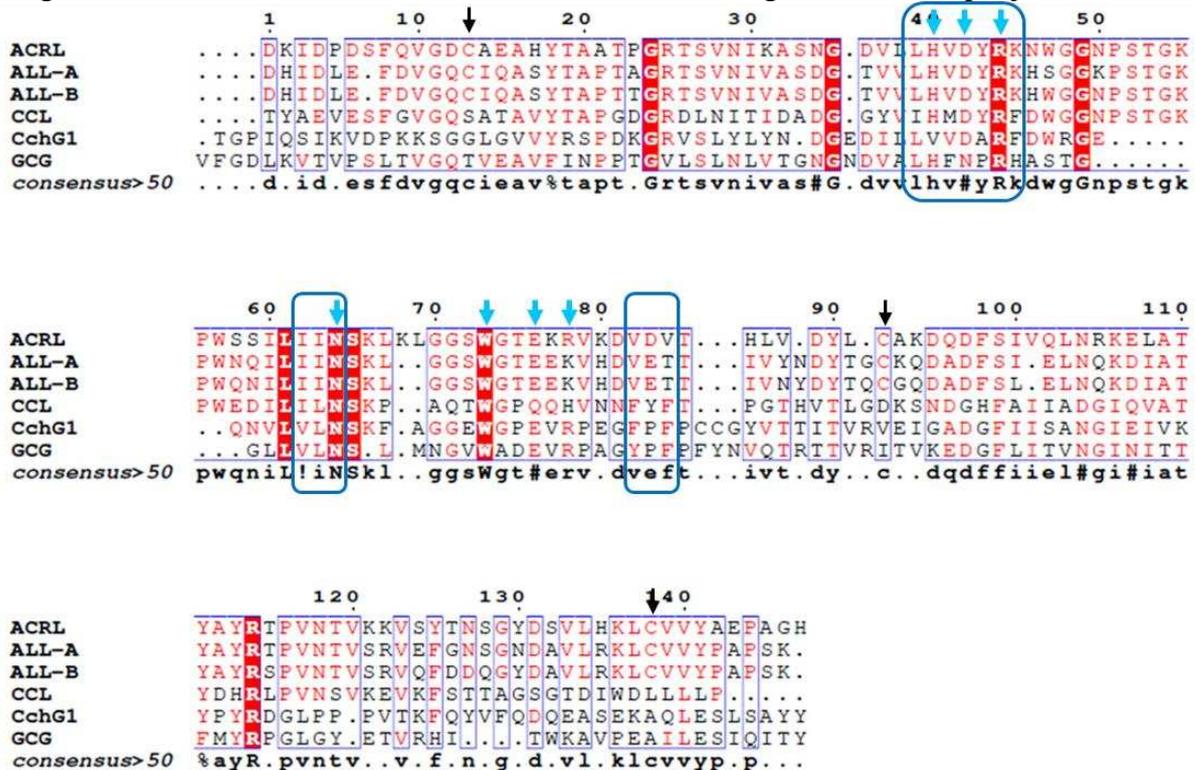
O pI teórico de AcrL foi 8,41, não sendo observados sítios de glicosilação na sequência de aminoácidos e algumas heterogeneidades foram evidenciadas durante o sequenciamento de aminoácidos.

A sequência de AcrL apresentou uma arquitetura de domínio semelhante à galectina entre os aminoácidos nas posições K² e V¹⁴⁰ (*e-value* de 0,0142), conforme indicado pelo servidor web SMART (LETUNICK; KHEDKAR; BORK, 2021). Os resíduos de aminoácidos tipicamente envolvidos na ligação de galectinas à carboidratos também foram conservados em AcrL nas posições ⁴⁰H, ⁴²D, ⁴⁴R, ⁶⁴N, ⁷³W, ⁷⁶E e ⁷⁸R.

Outros motivos conservados de galectinas foram identificados na sequência de aminoácidos da AcrL, com algumas modificações. O heptapeptídeo principal ³⁹LHFNPRF⁴⁵ foi alterado para ³⁹LHVDYRK⁴⁵, enquanto que o tripéptido ⁶²VLN⁶⁴ foi modificado para ⁶²(I/L)(I/L)N⁶⁴ e o tripéptido ⁸⁰FPF⁸² foi substituído por ⁸²VDV⁸⁴ na sequência AcrL.

O alinhamento de AcrL com galectinas de esponjas resultou em semelhanças com galectinas de esponjas marinhas (Figura 18).

Figura 18 – Alinhamento da estrutura de AcrL com outras galectinas de esponja.



Fonte: elaborado pelo autor

Sequência da cadeia de AcrL e outras galectinas de esponjas alinhadas com o auxílio da ferramenta MultiAlin.

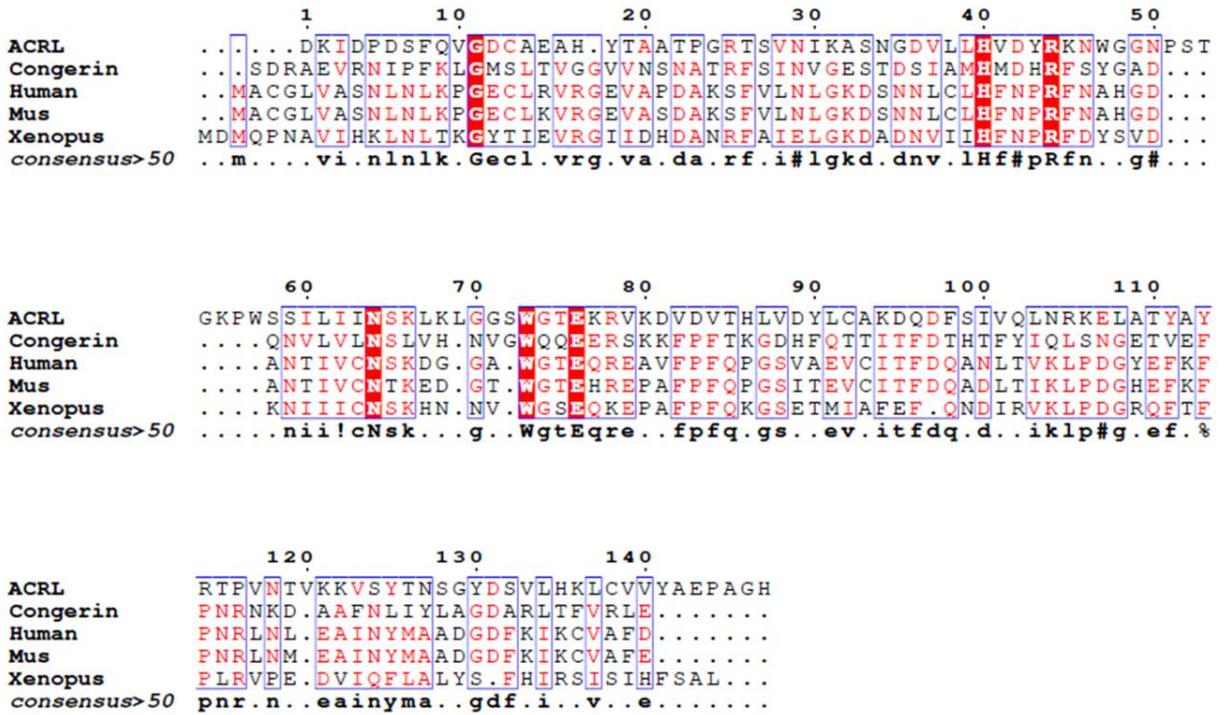
ALL – A (*Aplysina lactuca* lectin, isoforma a); ALL – B (*Aplysina lactuca* lectin, isoforma b); CCL (galectina

de *Chondrilla caribensis*); CchG1 (isogalectina de *Cinachyrella* sp). GCG (galectina de *Geodia cydonium*).

Setas azuis: Resíduos de aminoácidos de galectinas tipicamente envolvidos em ligação à carboidratos presentes em AcrL. Setas pretas: Resíduos de cisteínas encontradas no sequenciamento de AcrL. Quadrados azuis: motivos de sequências conservadas em galectinas e encontradas em AcrL com algumas modificações

AcrL também apresentou identificação moderada com galectinas de vertebrados (Figura 19).

Figura 19 – Alinhamento da estrutura de AcrL com outras galectinas de vertebrados.

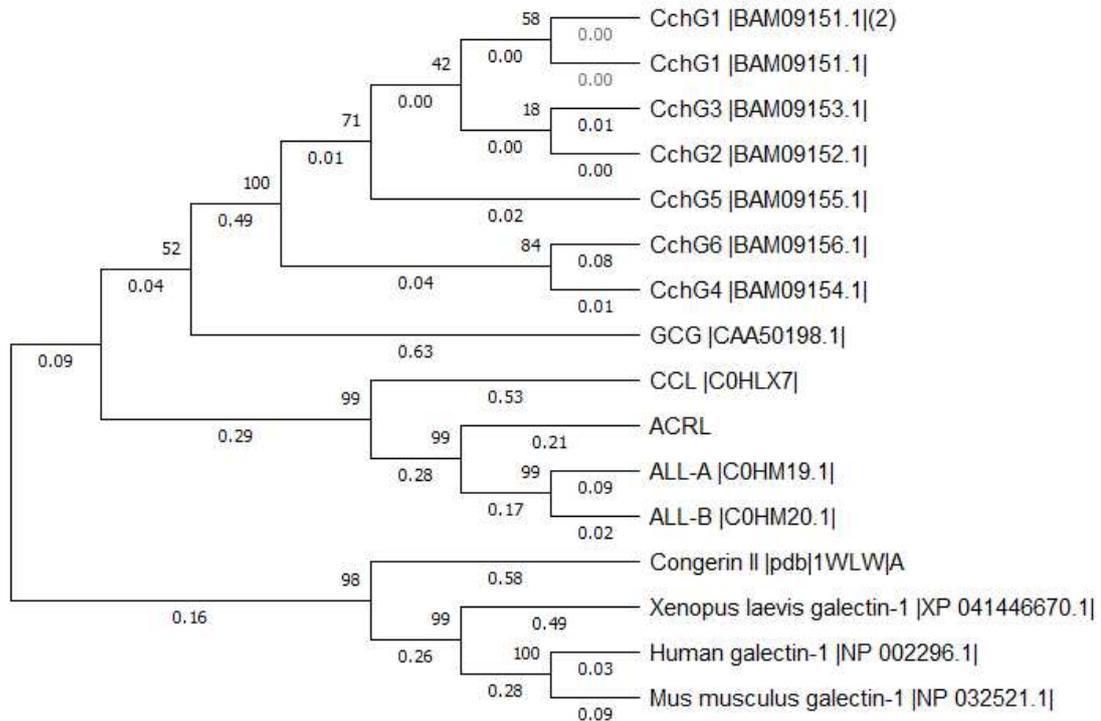


Fonte: elaborado pelo autor

Sequência da cadeia de AcrL e outras galectinas de vertebrados alinhadas com o auxílio da ferramenta MultiAlin. Congerin (galectina de *Conger myriaster*); Human (galectina de *Homo sapiens*); Mus (galectina de *Mus musculus*); Xenopus (galectina de *Xenopus laevis*).

A distribuição das diversas sequências de galectinas em uma árvore filogenética indicou que as galectinas de vertebrados pertencem a um ramo separado das galectinas de poríferos. As galectinas de esponjas podem ser divididas em dois subgrupos: um primeiro grupo contendo galectinas de *Cinachirella* sp. e CGC; e um segundo grupo incluindo AcrL, ALLs e CCL (Figura 20).

Figura 20 – Árvore filogenética de AcrL em comparação a outras galectinas.



Fonte: elaborado pelo autor.

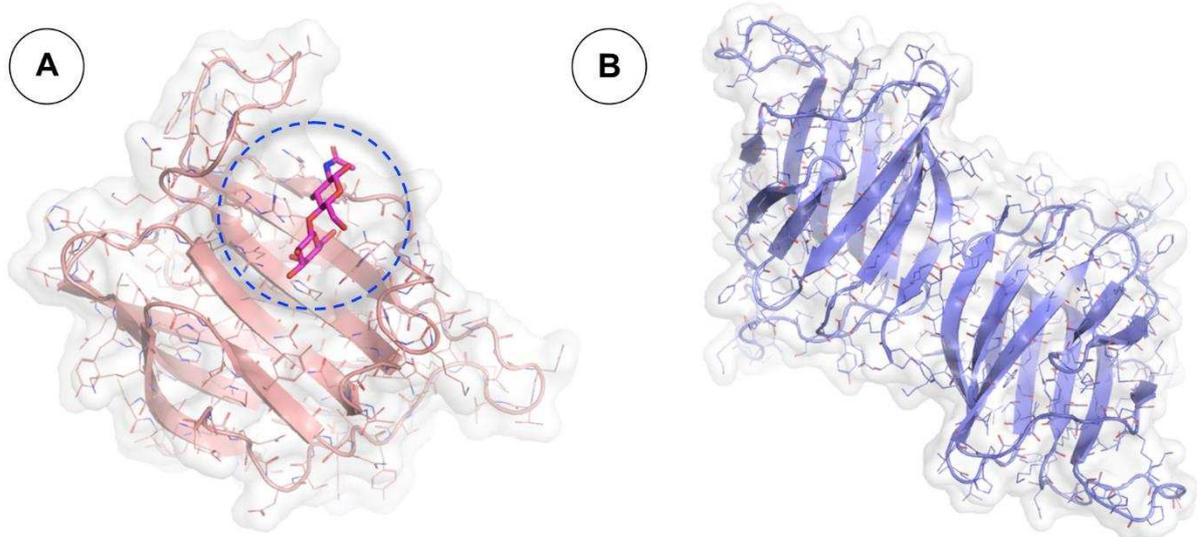
Distribuição filogenética de galectinas de vertebrados e de esponjas em comparação com AcrL. CchG (isogalectinas de *Cinachyrella* sp); GCG (galectina de *Geodia cydonium*); CCL (galectina de *Chondrilla caribensis*); ALL - A (*Aplysina lactuca* lectin, isoforma a); ALL - B (*Aplysina lactuca* lectin, isoforma b); Congerin II (galectina de *Conger myriaster*); *Xenopus laevis* galectin-1 (galectina de *Xenopus laevis*); Human galectin-1 (galectina de *Homo sapiens*); *Mus musculus* galectin-1 (galectina de *Mus musculus*).

4.8 Predição da Estrutura de AcrL

O modelo de AcrL exibiu 100% dos resíduos dentro das regiões permitidas no gráfico de Ramachandran, com pontuação global VoronMQA e pontuação QMEAN de 0,53 e 0,57, respectivamente, atestando a adequação do modelo.

Uma estrutura típica de β -sanduíche de galectina caracteriza o modelo de AcrL, apresentando duas β -folhas antiparalelas com cinco fitas cada (Figura 21A). Essas fitas β são interconectadas por alças de tamanhos variados, com cada alça contribuindo com resíduos alifáticos e/ou aromáticos, para formar o núcleo hidrofóbico da proteína. A análise conduzida pelo servidor GalaxyWeb indicou que o AcrL forma dímeros (Figura 21B), consistente com os resultados experimentais (isto é, cromatografia de exclusão molecular). Além disso, o servidor GalaxyWeb previu o sítio de ligação a carboidratos (Figura 21B), compreendendo oito aminoácidos (R²⁵, H⁴⁰, D⁴², R⁴⁴, W⁴⁷, I⁶², N⁶⁴, W⁷³) disposto em diferentes loops e β -segmentos, que interagem diretamente com o ligante.

Figura 21 – Modelo estrutural de AcrL

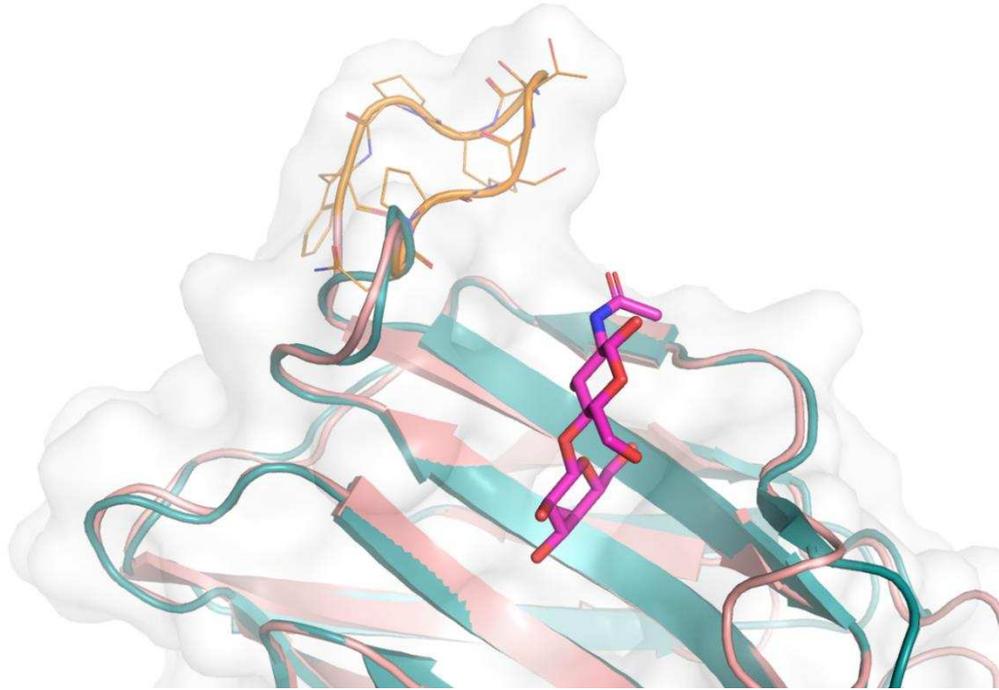


Fonte: elaborado pelo autor.

(A) Monômero de AcrL representada em desenhos em rosa claro, sobreposta com uma superfície branca transparente, exibindo a arquitetura conservada de galectina. A asialofetuína, representada por bastões rosa, é colocada no local de ligação a carboidratos, destacado por um círculo azul tracejado. (B) Arranjo dimérico de AcrL. A proteína é ilustrada em desenho roxo claro, sobreposta com uma superfície branca transparente.

A comparação com a congerina (1IS3) (MURAMOTO *et al.*, 1999) revelou que o AcrL mantém uma dobra conservada, mantendo as principais características do arranjo típico das galectinas (Figura 21A). Notavelmente, o modelo AcrL inclui uma extensão, a região ⁴⁹NPSTGKPW⁵⁷, ausente na congerina, formando uma alça mais extensa que possivelmente facilita a interação com carboidratos maiores (Figura 22).

Figura 22 – Análise comparativa da arquitetura do sítio de ligação a carboidratos de AcrL e congerina II (desenho verde).

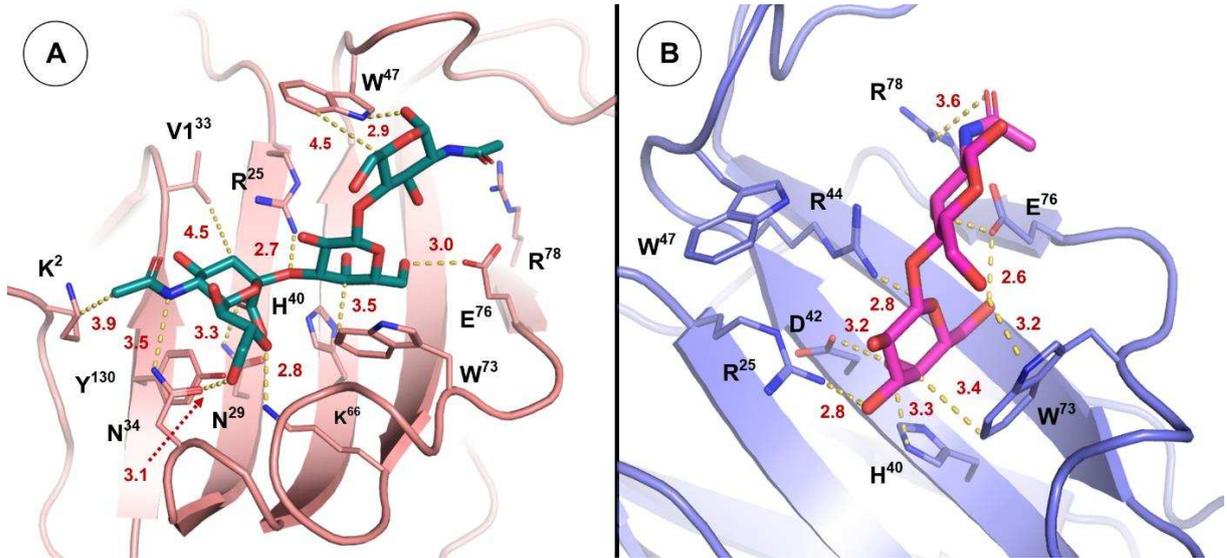


Fonte: elaborado pelo autor.

AcrL representada em desenhos em rosa claro e superfície branca transparente. Congerina II representada em desenho verde. O segmento ⁴⁹NPSTGKPW⁵⁷ é destacado como um desenho de linhas amarelo-claro. A asialofetúina é representada como bastões rosa.

Cálculos de *docking* revelaram que, assim como outras galectinas, AcrL apresenta um sítio de ligação a carboidratos composto por um sítio principal, capaz de hospedar galactopiranosídeos, e um sítio estendido, que possibilita principalmente a ligação de carboidratos complexos. Os resultados obtidos demonstram isso claramente, uma vez que a fetúina e a asialofetúina assumiram conformações muito semelhantes no sítio principal, interagindo com os resíduos R²⁵, H⁴⁰, D⁴², R⁴⁴, W⁴⁷, W⁷³, E⁷⁶ e R⁷⁸, enquanto o grupo sialil da fetúina interage adicionalmente com os resíduos K², N²⁹, N³⁴, K⁶⁶, Y¹³⁰ e V¹³³ no sítio estendido (Figuras 23A e 23B). A esse respeito, as energias de ligação teóricas calculadas para esses epítomos de carboidratos glicoproteicos são consistentes com o maior número de contatos estabelecidos pela fetúina (-9,04 Kcal.mol⁻¹) quando comparada com a asialofetúina (-7,52 Kcal.mol⁻¹).

Figura 23 – Conformações de ligação calculadas para Fetuína e Asialofetuína sobre AcrL.

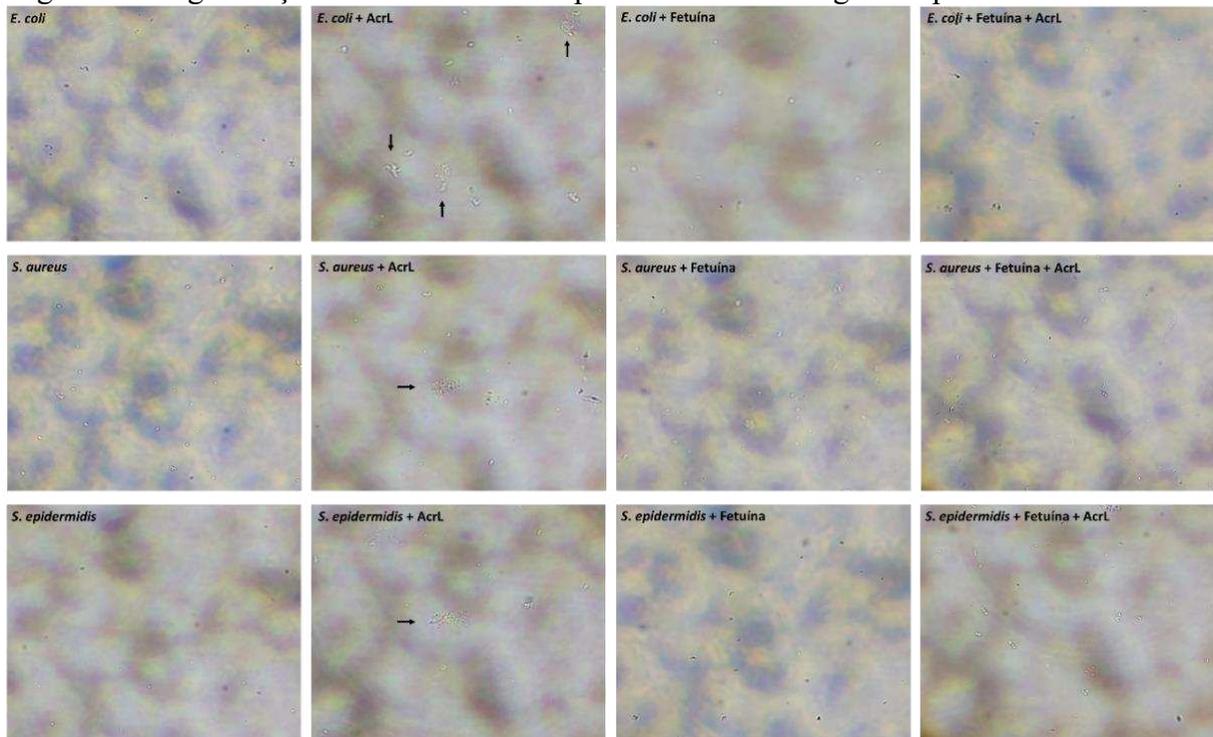


(A) Perfil de interação de AcrL com a Fetuína (desenho de bastões em cor verde). (B) Perfil de interação de AcrL com a Asialofetuína (desenho de bastões em rosa). A estrutura principal de AcrL é representada em desenhos coloridos, enquanto os resíduos que interagem com os carboidratos estão representados como estrutura de bastões. As distâncias de ligação estão representadas em linhas amarelas tracejadas.

4.9 Efeito antimicrobiano da lectina e combinação com antibióticos

A AcrL foi capaz de aglutinar todas as células das cepas testadas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*, sendo a aglutinação inibida pela presença da glicoproteína fetuína (1 mg.mL^{-1})(Figura 24).

Figura 24 – Aglutinação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas por AcrL.



Fonte: elaborado pelo autor

As cepas bacterianas, AcrL ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e fetuina foram incubadas em TBS. As setas pretas indicam a aglutinação bacteriana causada por AcrL.

A AcrL não foi capaz de inibir completamente o crescimento das bactérias patogênicas nas concentrações testadas. Entretanto, a lectina na concentração de $250 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$, quando combinada com diferentes concentrações de ampicilina ($0,390$ a $1000 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) e oxacilina ($0,390$ a $100 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$), apresentou efeito sinérgico contra *S. epidermidis*, enquanto na presença de ampicilina e tetraciclina ($0,190$ a $100 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) exibiu efeito aditivo contra *S. aureus*. O efeito antagônico da lectina foi observado contra *E. coli*, quando combinada com ampicilina e tetraciclina, comportamento também observado quando combinada com oxacilina, frente a bactéria *S. aureus* (Tabela 6).

Tabela 6 – Efeito da lectina AcrL combinada aos antibióticos oxacilina, tetraciclina e ampicilina sobre *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*.

BACTÉRIAS	ANTIBIÓTICO			
	CIM1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (individual)	CIM2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (combinado)	Relação entre CIM	
	Ampicilina			
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	64	32	1/2	Aditivo
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	1.024	128	1/8	Sinergismo
<i>E. coli</i> ATCC 11303	0,250	1	2	Antagônico

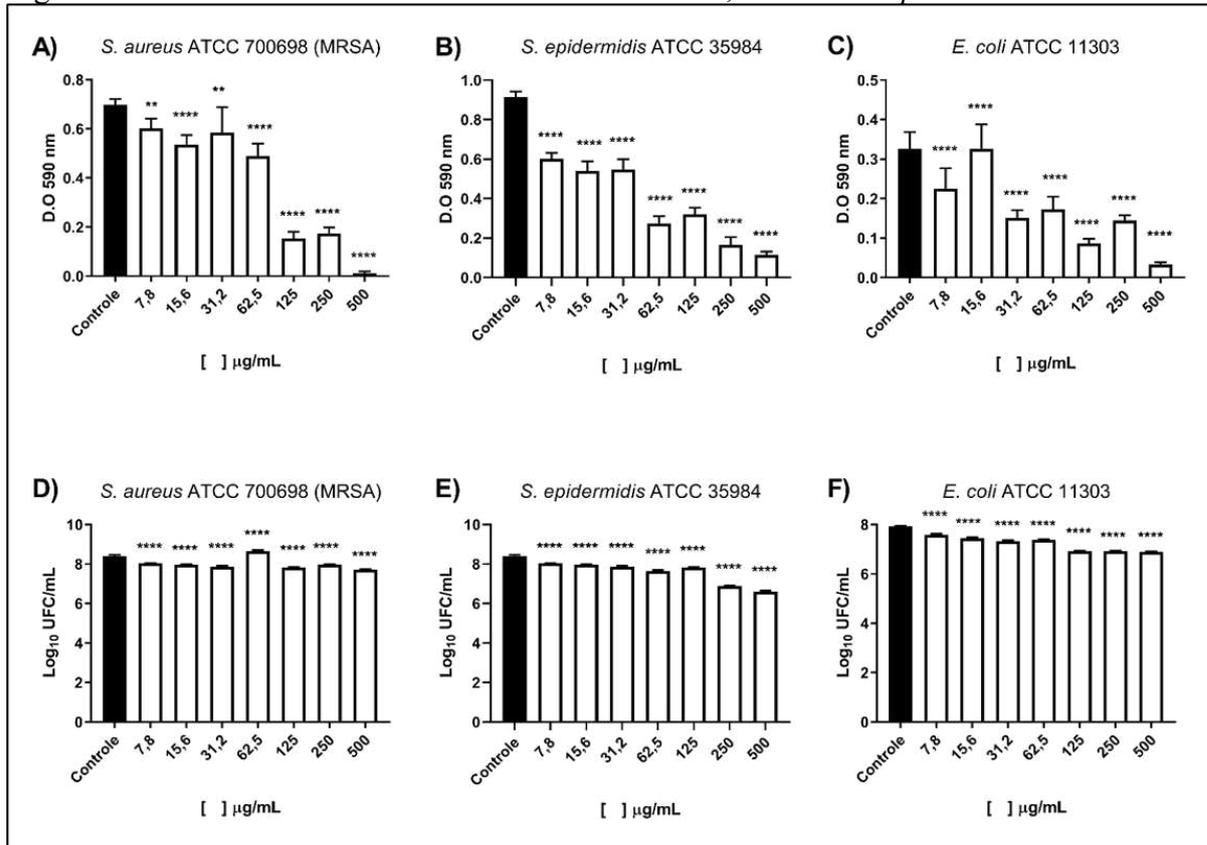
		Oxacilina			
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	128	256	2	Antagônico	
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	256	16	1/16	Sinergismo	
<i>E. coli</i> ATCC 11303	256	256	1	Não interação	
		Tetraciclina			
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	128	64	1/2	Aditivo	
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	0,250	0,250	1	Não interação	
<i>E. coli</i> ATCC 11303	1	4	4	Antagônico	

Fonte: Próprio autor. Valores da Concentração Inibitória Mínima individual (CIM1), Concentração Inibitória Mínima Combinada (CIM2) dos antibióticos combinados a lectina AcrL, e da relação entre CIM2/CIM1. As concentrações dos antibióticos variaram de 256 a 0,250 µg/mL para Oxacilina, 128 a 0,250 µg/mL para tetraciclina e de 1.024 a 0,250 µg/mL para ampicilina. A concentração de AcrL se manteve constante (250 µg/mL). Valores da relação entre as CIM iguais a 1 ou a 1/2 foram interpretados como efeito aditivo, e valores entre 1/4 a 1/16 foram considerados como efeito sinérgico. Valores igual a 2 ou a 4 foram considerados como efeito antagônico.

4.10 Efeitos de AcrL na Formação de Biofilme

Curiosamente, embora a AcrL não tenha sido capaz de inibir completamente o crescimento planctônico das cepas bacterianas testadas, a lectina foi capaz de inibição da formação de biofilme de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. AcrL mostrou reduzir a biomassa dos biofilmes em concentrações variando de 500 a 15,6 µg/mL contra *S. aureus*, enquanto contra *S. epidermidis*, mostrou redução de mais de 30% na biomassa a 7,8 µg/mL. Contra *E. coli* apresentou redução de mais de 89% na biomassa a 500 µg/mL (Figura 25A-B-C). Em relação à enumeração células viáveis dos biofilmes, AcrL foi capaz de reduzir as unidades formadoras de colônias de biofilmes de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* em cerca de 0,5-1 log₁₀ (Figura 25D-E-F).

Figura 25 – Efeito da AcrL sobre biofilmes de *S. aureus*, *E. coli* e *S. epidermidis*



Fonte: Próprio autor. Quantificação da biomassa (A – C) através da coloração por cristal violeta (CV) e contagem de UFC (D – F). Barras brancas representam bactérias tratadas com diferentes concentrações de RuNO₂, barras pretas representam o controle de bactérias não tratadas. **p* 0,05; ***p* 0,01; ****p* 0,001 e *****p* 0,0001 representam diferença estatística em relação ao controle.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, uma nova lectina foi isolada e purificada de extratos aquosos da esponja marinha *A. crassa*, denominada de *Aiolochoia crassa Lectin* (AcrL), através da combinação de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de afinidade em coluna de gel de Sepharose 4B.

Diversas lectinas de esponjas marinhas já foram isoladas por cromatografia de afinidade em matriz de Sepharose™, sendo essa metodologia bastante utilizada purificação de lectinas específicas a galactose e seus derivados presentes em esponjas (ANDRADE *et al.*, 2023; CARNEIRO *et al.*, 2019; MARQUES *et al.*, 2018; MOURA *et al.*, 2006).

A nova lectina, AcrL, mostrou compartilhar algumas características observadas nas lectinas da classe das galectinas, incluindo similaridade de sequência, estrutura secundária e dobramento em β -sanduíche.

Uma característica estrutural notável das galectinas é a necessidade da presença de agentes redutores para exibirem sua atividade de ligação a carboidratos (GUARDIA *et al.*, 2014). Historicamente, esta foi uma característica que diferenciou as galectinas de outras proteínas ligantes de açúcar (CUMMINGS *et al.*, 2022). As galectinas podem ser muito sensíveis à oxidação, principalmente por serem proteínas com cisteínas livres, nas quais a presença de oxigênio provoca a formação de ligações dissulfeto inespecíficas, levando à agregação proteica e à perda da capacidade de ligação a carboidratos (GUARDIA *et al.*, 2014).

Na AcrL, assim como nas ALLs (isolectinas de *Aplysina lactuca*: ALL-a e ALL-b), foram identificadas três cisteínas. Nas ALLs, o estado oxidado desses resíduos reduz a atividade hemaglutinante da proteína (DUARTE *et al.*, 2023). Assim, visando evitar uma possível oxidação, o processo de purificação de AcrL foi realizado na presença de um agente redutor, o tampão TBS contendo cisteína 5 mM.

Em condições redutoras, a AcrL nativa foi observada como uma proteína dimérica. As galectinas podem apresentar diferentes estados de oligomerização. A existência de cadeias polipeptídicas de aproximadamente 15 kDa, capazes de formar dímeros e tetrâmeros, é geralmente uma característica das galectinas prototipo (CUMMINGS *et al.*, 2022). As protogalectinas são encontradas nas esponjas *Aplysina lactuca*, *Chondrilla caribensis* (CCL), *Cinachyrella* sp.(CchGs) e *Geodia cydonium* (GCG) (DUARTE *et al.*, 2023; SOUSA *et al.*, 2021; STALZ *et al.*, 2014; UEDA *et al.*, 2013). De fato, AcrL apresentou semelhança e identidade com estas proteínas, indicando que AcrL é um novo membro da subfamília de protogalectinas.

O alinhamento de AcrL com galectinas de esponjas resultou em semelhanças com as isolectinas de *Apysina lactuca*, ALL-a e ALL-b (C0HM19.1/C0HM20.1), lectina de *Chodrilla caribensis*, CCL (C0HLX7.1), *Geodia cydonium*, GCG (CAA63818. 1) e lectina *Cinachyrella* sp (BAM09151.1), CchG-1. AcrL apresentou identidade de 63%, 63%, 37%, 25% e 25% com ALL-a, ALL-b, CCL, CGC e CchG-1, respectivamente (DUARTE *et al.*, 2023; PFEIFER *et al.*, 1993; SOUSA *et al.*, 2021; UEDA *et al.*, 2013) (ver alinhamento na Figura 17).

AcrL também apresentou identidade moderada com galectinas de vertebrados, e quando comparadas com galectinas de *Homo sapiens* (galectina-1 NP_002296.1), camundongo (galectina-1 NP_032521.1), enguia (Congerin II pdb 1WLWA) e rã (galectina-1 XP_041446670.1). AcrL mostrou identidade de 20%, 18%, 20% e 18% para galectinas de *H. sapiens*, *Mus musculus*, *Conger myriaster* e *Xenopus laevis*, respectivamente (CHERAYIL *et al.*, 1990; COOPER; BARONDES, 1990; MARSCHAL *et al.*, 1992; MURAMOTO *et al.*, 1999) (Figura 18).

Domínios conservados de protogalectinas foram encontrados na sequência de aminoácidos de AcrL, com algumas modificações. Alterações nas regiões conservadas, inclusive no heptapeptídeo canônico e nas regiões de contato na interface do monômero para formação de oligômeros, também foram observadas em CCL e ALLs (DUARTE *et al.*, 2023; SOUSA *et al.*, 2021). Ainda assim, essas proteínas compartilham características típicas de outras galectinas, como a capacidade de formar dímeros ou tetrâmeros. Estas observações indicam que alguma compensação estrutural deve ocorrer para que os padrões de oligomerização sejam mantidos mesmo diante de mudanças nos principais resíduos.

Por outro lado, AcrL, ALLs e CCL apresentaram especificidade diferente em relação às demais galectinas, apresentando ainda alto grau de conservação nos aminoácidos envolvidos na ligação ao carboidrato: H⁴⁰, R⁴⁴, N⁶⁴, W⁷³, E⁷⁶ e R⁷⁸ (DUARTE *et al.*, 2023; SOUSA *et al.*, 2021).

A distribuição das sequências de galectinas em uma árvore filogenética (ver árvore filogenética na Figura 20) indicou que as galectinas das esponjas AcrL, ALLs e CCL pertencem a um grupo diferente das demais proteínas. A presença do peptídeo ⁴⁹NPSTGKPW⁵⁷ em AcrL, ALLs e CCL parece ser um fator chave para esse agrupamento distinto, uma vez que esse peptídeo só foi observado nessas proteínas.

A maioria das galectinas tem a atividade hemaglutinante inibida por galactosídeos livres, enquanto AcrL, ALLs e CCL são inibidas apenas por glicanos complexos contendo galactosídeos. O perfil de inibição de AcrL indica preferência por fetuína e BSM, enquanto asialofetuína e PSM apresentam valores de CIM mais altos. Como na porção terminal da PSM

e da asialofetuína não há ácido siálico (VARKI *et al.*, 2022), e o ácido neuramínico isolado não foi capaz de inibir a AcrL, é possível supor que a presença de ácido siálico em estruturas complexas de carboidratos aumenta a afinidade da lectina pelo ligante. A especificidade das galectinas para o terminal LacNAc (*N*-acetil-lactosamina), presente na asialofetuína, é conhecida (DAM *et al.*, 2005). Entretanto, a maior afinidade de AcrL pelo terminal Sialil-LacNAc, carboidrato presente na fetuína, é um fator incomum para galectinas.

Como já mencionado, galectinas mostram afinidade para resíduos LacNAc. Por exemplo, as galectinas humanas 1, 2, 3, 4 e 7 e a galectina 5 de rato mostram K_a da ordem de 30 a $190 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para asialofetuína (Dam *et al.*, 2005). Embora seja um dado incomum para galectinas, estudos de calorimetria isotérmica (ITC) e inibição da atividade hemaglutinante mostram que a galectina 1 de coração bovino e a galectina 3 de rato podem se ligar a terminais sialisados, sendo capazes de reconhecer o terminal NeuAc(α 2-3)Gal β (1-4)GlcNAc (2,3-Sialil LacNAc), por exemplo. Nos estudos de calorimetria também é interessante observar que alguns valores de K_a para terminais sialisados podem ser mais elevados do que para terminais LacNAc. Essa observação mostra que algumas galectinas podem ter mais afinidade por terminais com ácido neuramínico (BREWER, 2002).

Além disso, os valores de K_a de AcrL interagindo com a fetuína ($3039 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) se mostram bastante elevados quando comparados com as interações de outras galectinas com açúcares com terminais LacNAc ou Sialil-LacNAc. Por exemplo, a interação da galectina 1 bovina com o terminal 2,3-Sialil LacNAc possui K_a de $2,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e com terminal o terminal LacNAc II (Gal β (1-4)GlcNAc) de $2,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Já a galectina 3 de rato possui K_a de $3,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para interação com 2,3-Sialil LacNAc, K_a de $3,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para interação com LacNAc II e K_a de $4,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para interação com 2,6-Sialil DiLacNAc (NeuAc(α 2-6)Gal β (1-4)GlcNAc β (1-3)Gal β (1-4)GlcNAc). Os valores elevados de K_a na interação da fetuína com a AcrL ratificam a afinidade da proteína por terminais sialisados (BREWER, 2002).

Além disso, embora a AcrL não tenha sido inibida pelos galactosídeos testados, ela foi isolada por cromatografia de afinidade em matriz de agarose, o que reforça a hipótese de que AcrL necessita do núcleo do carboidrato para interagir especificamente com a estrutura do glicano. Da mesma forma, os monossacarídeos, incluindo a galactose, não foram capazes de inibir ou inibiram fracamente a atividade hemaglutinante de CCL e ALLs, mas essas lectinas apresentaram alta afinidade por glicoproteínas contendo galactosídeos (CARNEIRO *et al.*, 2017; MARQUES *et al.*, 2018; SOUSA *et al.*, 2021).

Os fatores estruturais que causam esta divergência em relação às demais galectinas ainda precisam ser identificados. No entanto, é interessante notar que o sítio de ligação aos

carboidratos em AcrL, ALLs e CCL é mais extenso do que em outras galectinas, como observado em modelos 3D, sugerindo a capacidade de acomodar ligantes maiores. Isso pode ser evidenciado pela longa alça representada pela região ⁴⁹NPSTGKPW⁵⁷, que não é observada em outras galectinas (Figura 21).

Em uma análise filogenética, AcrL, ALLs e CCL ocupam um ramo separado de outras galectinas de esponja. Esse posicionamento único enfatiza a divergência evolutiva e as características distintas de AcrL, ALLs e CCL dentro da família das galectinas. Investigações adicionais sobre os elementos estruturais responsáveis por essas diferenças e suas implicações funcionais podem fornecer informações valiosas sobre os diversos papéis desempenhados pelas galectinas em vários contextos biológicos.

AcrL foi capaz de aglutinar as cepas bacterianas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* e inibir formação de biofilme bacteriano de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. De fato, as lectinas de invertebrados marinhos reconhecem os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), sendo capazes de se ligar a lipopolissacarídeos, peptidoglicanos, β -glicanos e mananas presentes em diversos microrganismos (GARDÈRES *et al.*, 2015).

Lectinas de esponjas marinhas têm demonstrado potencial no combate a bactérias patogênicas. CCL e ALL, por exemplo, foram capazes de inibir a formação de biofilmes e aglutinar cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* (CARNEIRO *et al.*, 2017; MARQUES *et al.*, 2018). AFL e HIL, isolados de *Aplysina fulva* e *Haliclona implexiformis*, respectivamente, também foram capazes de reduzir a biomassa do biofilme de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Além disso, HiL foi capaz de reduzir o número de células viáveis das cepas das duas espécies de *Staphylococcus* (ANDRADE *et al.*, 2023; CARNEIRO *et al.*, 2019).

Biofilmes são comunidades densamente povoadas de células microbianas que sintetizam uma matriz exopolimérica que pode ser formada por proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos e serve para protegê-las de situações adversas. O biofilme é um importante fator de virulência, visto que ajuda às bactérias a colonizarem o hospedeiro e a protegê-las de antibióticos ou efetores de resposta imune do organismo hospedeiro (KHAN *et al.*, 2023).

A formação do biofilme é um importante mecanismo de resistência bacteriana e pode ser a causa de infecções bacterianas persistentes e recorrentes, uma vez que a entrada do antibiótico é limitada pela presença de um mucopolissacarídeo polimerizável. Além disso, a formação de biofilmes tem sido associada ao aumento de mutações das cepas bacterianas e a maior resistência a antibióticos devido a transferência horizontal dos genes responsáveis pela resistência (FONSECA *et al.*, 2022; MURAGLIA *et al.*, 2023).

Estudos sugerem que lectinas reconhecem e se ligam à carboidratos presentes na

superfície bacteriana, ocupando o sítio de ligação para adesão de microrganismos e inibindo a adesão de bactérias por competitividade, o que pode afetar a formação do biofilme. Além disso, lectinas são capazes de aglutinar bactérias, formando agregados, o que pode diminuir o número de células aderentes, também inibindo a formação do biofilme bacteriano (FONSECA *et al.*, 2022).

AcrL foi combinada com antibióticos de duas classes e diferentes mecanismos de ação. Quando combinado com ampicilina e tetraciclina exibiu atividades aditivas e sinérgicas contra *S. aureus* resistente à meticilina (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* - MRSA) e *S. epidermidis* resistente à meticilina (*Methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis* - MRSE). A lectina foi capaz de potencializar a ação do antibiótico contra cepas bacterianas patogênicas. Como as lectinas podem se ligar à superfície bacteriana e aumentar a permeabilidade da membrana celular, é possível que a AcrL possa facilitar a ação da ampicilina com seu alvo presente na membrana interna, ou mesmo facilitar a entrada da tetraciclina no citoplasma bacteriano.

A ampicilina é um beta-lactâmico classificado como aminopenicilina; oxacilina também pertencente a classe dos beta-lactâmicos e classificada como penicilase-resistente. A ampicilina interage e inativa as proteínas de ligação à penicilina (PBPs) localizadas na membrana interna da parede celular bacteriana. Esta reação interrompe a síntese da parede celular bacteriana e resulta no enfraquecimento da parede celular bacteriana e causa lise celular (SALAMAGA *et al.* 2021). Por outro lado, a tetraciclina é capaz de inibir a síntese de proteínas bacterianas, especificamente visando a subunidade ribossômica bacteriana 30S (CHOPRA E ROBERTS, 2001).

Infecções causadas por bactérias multirresistentes à antibióticos são registradas principalmente em ambiente hospitalar e podem ser observadas também na comunidade. O número de agentes antimicrobianos capazes de combater de maneira efetiva essas infecções multirresistentes vem diminuindo. As cepas MRSA e MRSE são fontes frequentes de infecções hospitalares graves e resistentes à terapia com antibióticos convencionais, causando taxas de mortalidade elevada em pacientes acometidos. Assim, a investigação científica de compostos que combinados com antibióticos sejam capazes de exibir efeitos sinérgico, potencializando a ação do antibiótico é de suma importância (MURAGLIA *at al.*, 2023).

Recentemente, foi relatado o primeiro estudo sobre lectinas de esponjas marinhas associadas a um antibiótico. As ALLs apresentaram efeito sinérgico e/ou aditivo quando combinados com antibióticos ampicilina e tetraciclina, respectivamente, administrados contra *S. aureus* e *S. epidermidis* (DUARTE *et al.*, 2023).

A atividade de lectinas de esponjas marinhas contra cepas bacterianas sugere o uso dessas moléculas como potencializadores da ação antibiótica (ANDRADE *et al.*, 2023; CARNEIRO *et al.*, 2017; CARNEIRO *et al.*, 2019; DUARTE *et al.*, 2023; MARQUES *et al.*, 2018;)

6 CONCLUSÃO

Uma lectina foi isolada, purificada e caracterizada de extratos aquosos da esponja marinha *Aiolochoiria crassa*, denominada de *Aiolochoiria crassa Lectin* (AcrL), através da combinação de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de afinidade em coluna de gel de Sepharose 4B.

AcrL possui 15 kDa e em condições nativas forma um dímero de 36 kDa. AcrL é ligante de galactose, exibindo especificidade para a glicoproteína fetuína, mostrando preferência pela presença do ácido neuramínico no glicano. A estrutura secundária de AcrL mostrou ser composta em maior quantidade por estruturas β e ser estável quando submetida à testes em diferentes temperaturas tendo sua sequência de aminoácido totalmente determinada. AcrL é uma galectina, apresentando semelhança estruturais com galectinas de invertebrados e vertebrados

Como atividade biológica, AcrL foi capaz de aglutinar cepas bacterianas patogênicas, inibir a formação de biofilme e promover efeito sinérgico e aditivo quando consorciada aos antibióticos ampicilina, oxacilina e tetraciclina. A atividade contra cepas bacterianas evidencia o potencial de utilização como agente antimicrobiano.

Estudos complementares são necessários para melhor compreensão da função biológica da lectina, e os resultados apresentados nesse trabalho servirão como base para a aplicação biotecnológica da galectina em modelo biológico contra bactérias patogênicas.

REFERÊNCIAS

- AHMED, M. K.; BHOWMIK, S.; GITERU, S. G.; ZILANI, M. N. H.; ADADI, P.; ISLAM, S. S.; KANWUGU, O. N.; HAQ, M.; AHMED, F.; NG, C. C. W.; CHAN, Y. S.; ASADUJJAMAN, M.; CHAN, G. H. H.; NAUDE, R.; BEKHIT, A. E. D. A.; NG, T. B.; WONG, J. H. An Update of Lectins from Marine Organisms: Characterization, Extraction Methodology, and Potential Biofunctional Applications. **Marine Drugs**, [s.l.], 20, n. 7, 2022.
- ANDRADE, F. R. N. **Caracterização, estudos estruturais e potencial antibacteriano de lectinas isoladas das esponjas marinhas *Haliclona (Reniera) implexiformis* e *Aplysina fistularis***. 2021. 76f. Tese (Doutorado em Biotecnologia de Recursos Naturais) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.
- ANDRADE, F. R. N.; TABOSA, P. A. S.; TORRES, R. C. F.; 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**, [s.l.], v. 95, n. 1, p. 1–14, 2023.
- AO, J.; DING, Y.; CHEN, Y.; MU, Y.; CHEN, X. Molecular characterization and biological effects of a C-type lectin-like receptor in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 16, n. 12, p. 29631–29642, 2015.
- ARASU, A.; KUMARESAN, V.; GANESH, M. R.; PASUPULETI, M.; ARASU, M. V.; AL-DHABI, N. A.; AROCKIARAJ, J. Bactericidal activity of fish galectin 4 derived membrane-binding peptide tagged with oligotryptophan. **Developmental and Comparative Immunology**, [s.l.], v. 71, p. 37–48, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2017.01.019>.
- BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 27, n. 3, p. 343–350, 2011.
- BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, [s.l.], v. 119, p. 419, 1954.
- BRETTING, H.; JACOBS, G.; DONADEY, C.; VACELET, J. Immunohistochemical studies on the distribution and the function of the d-galactose-specific lectins in the sponge *Axinella polypoides* (Schmidt). **Cell and Tissue Research**, [s.l.], v. 229, n. 3, p. 551–571, 1983.
- BREWER, C. F. Thermodynamic binding studies of galectin-1, -3 and -7. **Glycoconjugate Journal**, [s.l.], v. 19, n. 7–9, p. 459–465, 2002.
- BRUSCA, R. C.; MOORE, W.; SHUSTER, S. M. **Invertebrados**. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.

CAPASSO, D.; PIRONE, L.; DI GAETANO, S.; RUSSO, R.; SAVIANO, M.; FRISULLI, V.; ANTONACCI, A.; PEDONE, E.; SCOGNAMIGLIO, V. Galectins detection for the diagnosis of chronic diseases: An emerging biosensor approach. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s.l.]. v. 159, p. 116952, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993623000390>.

CARNEIRO, RÔMULO FARIAS. **Lectinas da esponja marinha *Haliclona (Soestella) caerulea***. 2013. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará.

CARNEIRO, R. F.; DE MELO, A. A.; DE ALMEIDA, A. S.; MOURA, R. D. M.; CHAVES, R. P.; DE SOUSA, B. L.; DO NASCIMENTO, K. S.; SAMPAIO, S. S.; LIMA, J. P. M. S.; CAVADA, B. S.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H. H-3, a new lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*: Purification and mass spectrometric characterization. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 45, n. 12, p. 2864–2873, 2013a.

CARNEIRO, R. F.; DE MELO, A. A.; NASCIMENTO, F. E. P. Do; SIMPLICIO, C. A.; NASCIMENTO, K. S. Do; ROCHA, B. A. M. Da; SAKER-SAMPAIO, S.; MOURA, R. D. M.; MOTA, S. S.; CAVADA, B. S.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H. Halilectin 1 (H-1) and Halilectin 2 (H-2): Two new lectins isolated from the marine sponge *Haliclona caerulea*. **Journal of Molecular Recognition**, [s.l.]. v. 26, n. 1, p. 51–58, 2013b.

CARNEIRO, R. F.; ALMEIDA, A. S. de; MELO, A. A. de; ALENCAR, D. B. de; SOUSA, O. V. de; DELATORRE, P.; NASCIMENTO, K. S. do; SAKER-SAMPAIO, S.; CAVADA, B. S.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H. A chromophore-containing agglutinin from *Haliclona manglaris*: Purification and biochemical characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.]. v. 72, p. 1368–1375, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.003>.

CARNEIRO, R. F.; DE LIMA, P. H. P.; CHAVES, R. P.; PEREIRA, R.; PEREIRA, A. L.; DE VASCONCELOS, M. A.; PINHEIRO, U.; TEIXEIRA, E. H.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H. Isolation, biochemical characterization and antibiofilm effect of a lectin from the marine sponge *Aplysina lactuca*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.]. v. 99, p. 213–222, 2017a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.020>.

CARNEIRO, R. F.; TORRES, R. C. F.; CHAVES, R. P.; DE VASCONCELOS, M. A.; DE SOUSA, B. L.; GOVEIA, A. C. R.; ARRUDA, F. V.; MATOS, M. N. C.; MATTHEWS-CASCON, H.; FREIRE, V. N.; TEIXEIRA, E. H.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H. Purification, Biochemical Characterization, and Amino Acid Sequence of a Novel Type of Lectin from *Aplysina dactylomela* Eggs with Antibacterial/Antibiofilm Potential. **Marine Biotechnology**, [s.l.]. v. 19, n. 1, p. 49–64, 2017b.

CARNEIRO, R. F.; VIANA, J. T.; TORRES, R. C. F.; SILVA, L. T. da; ANDRADE, A. L.; VASCONCELOS, M. A. de; PINHEIRO, U.; TEIXEIRA, E. H.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H. A new mucin-binding lectin from the marine sponge *Aplysina fulva* (AFL) exhibits antibiofilm effects. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s.l.]. v. 662, n. December 2018, p. 169–176, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.12.014>.

- CAVALCANTI, T. E. R. **Taxonomia da espongi fauna marinha da costa pernambucana**. 2019. 229f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.
- CHEUNG, R. C. F.; WONG, J. H.; PAN, W.; CHAN, Y. S.; YIN, C.; DAN, X.; NG, T. B. Marine lectins and their medicinal applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.]. v. 99, n. 9, p. 3755–3773, 2015.
- CHERAYIL, B. J., CHAITOVITZ, S., WONG, C., & PILLAI, S. Molecular cloning of a human macrophage lectin specific for galactose. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s.l.]. 87(18), 7324–7328 (1990).
<https://doi.org/10.1073/pnas.87.18.7324>
- CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s.l.]. v. 65, n. 2, p. 232–260, 2001.
- CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute M07-A10**, 2015.
- COELHO, L. C. B. B.; SILVA, P. M. D. S.; LIMA, V. L. D. M.; PONTUAL, E. V.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. D. S. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.]. v. 2017, 2017.
- CONRAD, J.; ZAHN, R. K.; KURELEC, B.; UHLENBRUCK, G.; MÜLLER, W. E. Aggregation of sponge cells: Immunological characterization of the species-specific *Geodia* aggregation factor. **Journal of Supramolecular and Cellular Biochemistry**, [s.l.]. v. 17, n. 1, p. 1–9, 1981.
- COOPER, D. N., & BARONDES, S. H. Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. **The Journal of cell biology**, [s.l.]. 110(5), 1681–1691. (1990) <https://doi.org/10.1083/jcb.110.5.1681>
- CORPET, F. Multiple Sequence Alignment with Hierarchical Clustering. **Nucleic acids research**, [s.l.]. v. 16, n. 22, p. 10881–10890, nov. 1988.
- CUMMINGS, R.D., *et al.*, **Galectins**. 2022.
- DAM, T. K.; GABIUS, H.-J.; ANDRÉ, S.; KALTNER, H.; LENSCH, M.; BREWER, C. F. Galectins Bind to the Multivalent Glycoprotein Asialofetuin with Enhanced Affinities and a Gradient of Decreasing Binding Constants. **Biochemistry**, [s.l.]. v. 44, n. 37, p. 12564–12571, 1 set. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi051144z>.
- DOS SANTOS SILVA, P. M.; DE OLIVEIRA, W. F.; ALBUQUERQUE, P. B. S.; DOS SANTOS CORREIA, M. T.; COELHO, L. C. B. B. Insights into anti-pathogenic activities of mannose lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.]. v. 140, p. 234–244, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813019345441>.

DUARTE, J. de A.; OLIVEIRA NETO, J. E. de; TORRES, R. C. F.; SOUSA, A. R. de O.; ANDRADE, A. L.; CHAVES, R. P.; CARNEIRO, R. F.; VASCONCELOS, M. A. de; 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**, [s.l.]. 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908423001645>.

DUARTE, P. L.; ANDRADE, F. R. N.; SOUSA, A. R. de O.; 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**, [s.l.]. v. 131, p. 150–159, dez. 2022.

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

FONSECA, V. J. A.; BRAGA, A. L.; FILHO, J. R.; TEIXEIRA, C. S.; DA HORA, G. C. A.; MORAIS-BRAGA, M. F. B. A review on the antimicrobial properties of lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.]. v. 195, p. 163–178, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813021026143>.

FRANSOZO, ADILSON. **Zoologia dos Invertebrados**/Adilson Fransozo, Maria Lucia Negreiros-Fransozo – 1. ed. – [Reimpr.]. – Rio de Janeiro: Roca, 2017. il.

GARDÈRES, J.; BOURGUET-KONDRACKI, M.-L.; HAMER, B.; *et al.* Porifera Lectins: Diversity, Physiological Roles and Biotechnological Potential. **Marine Drugs**, [s.l.]. v. 13, n. 8, p. 5059–5101, 2015. MDPI AG. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/md13085059>.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server BT - **The Proteomics Protocols Handbook**. In: WALKER, J. M. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. p. 571–607.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, [s.l.]. v. 113, n. 3, p. 236–247, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2010.02.004>.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. **Nature Protocols**, [s.l.]. v. 1, n. 6, p. 2527–2535, 2007.

GÓMEZ-ARCHILA, L. G.; ZAPATA, W.; GALEANO, E.; MARTÍNEZ, A.; DÍAZ, F. J.; RUGELES, M. T. Bromotyrosine derivatives from marine sponges inhibit the HIV-1 replication in vitro. **Vitae**, [s.l.]. v. 21, n. 2, p. 114–125, 2014.

GUARDIA, C. M.; CAMELO, J. J.; TRUJILLO, M.; MÉNDEZ-HUERGO, S. P.; RADI, R.; ESTRIN, D. A.; RABINOVICH, G. A. Structural basis of redox-dependent modulation of galectin-1 dynamics and function. **Glycobiology**, [s.l.]. v. 24, n. 5, p. 428–441, 1 maio 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu008>.

GUNDAKER, D. *et al.* Isolation and cloning of a C-type lectin from the hexactinellid sponge *Aphrocallistes vastus*: A putative aggregation factor. **Glycobiology**, [s.l]. 11, 21–29, 2001

GUPTA, D.; BREWER, C. F. Homogeneous Aggregation of the 14-kDa β -Galactoside Specific Vertebrate Lectin Complex with Asialofetuin in Mixed Systems. **Biochemistry**, [s.l]. v. 33, n. 18, p. 5526–5530, 1994.

HAMID, R.; MASOOD, A.; WANI, I. H.; RAFIQ, S. Lectins: Proteins with diverse applications. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, [s.l]. v. 3, n. 4SUPPL.1, 2013.

HASAN, I.; OZEKI, Y. Histochemical localization of N-acetylhexosamine-binding lectin HOL-18 in *Halichondria okadai* (Japanese black sponge), and its antimicrobial and cytotoxic anticancer effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l]. v. 124, p. 819–827, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.222>.

HICKMAN, C.P; ROBERTS, L.S; LARSON, A. **Princípios Integrados de Zoologia**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. 846 p, 2004.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, [s.l]. v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0263785596000185>.

IWAKI, D. *et al.* Functional and structural diversities of C-reactive proteins present in horseshoe crab hemolymph plasma. **Eur J Biochem**, 264:314–326, 1999.

JIMBO, M.; YANOHARA, T.; KOIKE, K.; KOIKE, K.; SAKAI, R.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. The D-galactose-binding lectin of the octocoral *Sinularia lochmodes*: Characterization and possible relationship to the symbiotic dinoflagellates. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, [s.l]. v. 125, n. 2, p. 227–236, 2000.

KAZLAUSKAS, R.; LIDGARD, R.O.; MURPHY, P.T.; WELLS, R.J.; BLOUNT, J.F. Brominated Tyrosine-Derived Metabolites from the Sponge *Ianthella basta*. **Aust. J. Chem.** 1981, 34, 765–786.

KHAN, N. A.; BARTHES, N.; MCCORMACK, G.; O’GARA, J. P.; THOMAS, O. P.; BOYD, A. Sponge-derived fatty acids inhibit biofilm formation of MRSA and MSSA by down-regulating biofilm-related genes specific to each pathogen. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l]. v. 134, n. 8, p. lxad152, 1 ago. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jambio/lxad152>.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: A historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [s.l]. v. 1572, n. 2–3, p. 187–197, 2002.

KITA, A.; JIMBO, M.; SAKAI, R.; MORIMOTO, Y.; MIKI, K. Crystal structure of a symbiosis-related lectin from octocoral. **Glycobiology**, [s.l]. v. 25, n. 9, p. 1016–1023, 2015.

KO, J.; PARK, H.; HEO, L.; SEOK, C. GalaxyWEB server for protein structure prediction and refinement. **Nucleic acids research**, [s.l]. v. 40, p. W294-7, 30 maio 2012.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular biology and evolution**, [s.l.]. v. 35, n. 6, p. 1547–1549, jun. 2018.

KURKCUOGLU, Z.; KOUKOS, P. I.; CITRO, N.; TRELLET, M. E.; RODRIGUES, J. P. G. L. M.; MOREIRA, I. S.; ROEL-TOURIS, J.; MELQUIOND, A. S. J.; GENG, C.; SCHAARSCHMIDT, J.; XUE, L. C.; VANGONE, A.; BONVIN, A. M. J. J. Performance of HADDOCK and a simple contact-based protein–ligand binding affinity predictor in the D3R Grand Challenge 2. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, [s.l.]. v. 32, n. 1, p. 175–185, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10822-017-0049-y>.

KVENNEFORS, E. C. E.; LEGGAT, W.; HOEGH-GULDBERG, O.; DEGNAN, B. M.; BARNES, A. C. An ancient and variable mannose-binding lectin from the coral *Acropora millepora* binds both pathogens and symbionts. **Developmental & Comparative Immunology**, [s.l.]. v. 32, n. 12, p. 1582–1592, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X08001080>.

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

LETUNICK, 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.

LEYN, S. A.; GAO, F.; YANG, C.; RODIONOV, D. A. N-acetylgalactosamine utilization pathway and regulon in proteobacteria: Genomic reconstruction and experimental characterization in *Shewanella*. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.]. v. 287, n. 33, p. 28047–28056, 2012.

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

MARQUES, D. N.; ALMEIDA, A. S. de; SOUSA, A. R. de O.; PEREIRA, R.; ANDRADE, A. L.; CHAVES, R. P.; CARNEIRO, R. F.; VASCONCELOS, M. A. de; NASCIMENTO-NETO, L. G. do; PINHEIRO, U.; VIDEIRA, P. A.; TEIXEIRA, E. H.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H. Antibacterial activity of a new lectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.]. v. 109, p. 1292–1301, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.140>.

MARSCHAL, P.; HERRMANN, J.; LEFFLER, H.; BARONDES, S. H.; COOPER, D. N. Sequence and specificity of a soluble lactose-binding lectin from *Xenopus laevis* skin. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.]. v. 267, n. 18, p. 12942–12949, 1992. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818423654>.

MELO, A. A.; CARNEIRO, R. F.; DE MELO SILVA, W.; MOURA, R. da M.; SILVA, G. C.; DE SOUSA, O. V.; DE SOUSA SABOYA, J. P.; NASCIMENTO, K. S. do; SAKER-SAMPAIO, S.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H. HGA-2, a novel galactoside-binding lectin from the sea cucumber *holothuria grisea* binds to bacterial cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.]. v. 64, p. 435–442, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.12.035>.

MISHRA, A.; BEHURA, A.; MAWATWAL, S.; KUMAR, A.; NAIK, L.; MOHANTY, S. S.; MANNA, D.; DOKANIA, P.; MISHRA, A.; PATRA, S. K.; DHIMAN, R. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.]. v. 134, p. 110827, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691519306179>.

MOTOHASHI, S.; JIMBO, M.; NAITO, T.; SUZUKI, T.; SAKAI, R.; KAMIYA, H. Isolation, amino acid sequences, and plausible functions of the galacturonic acid-binding egg lectin of the sea hare *Aplysia kurodai*. **Marine Drugs**, [s.l.]. v. 15, n. 6, p. 1–14, 2017.

MOURA, R. M. *et al.* CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, [s.l.]. v. 145, n. 4, p. 517–523, 2006.

MURAGLIA, M.; SCHIAVONE, B.I.P.; ROSATO, A.; CLODOVEO, M.L.; CORBO, F. Antimicrobial Synergistic Effects of Linezolid and Vancomycin with a Small Synthesized 2-Mercaptobenzothiazole Derivative: A Challenge for MRSA Solving. **Molecules**, [s.l.]. 28, 6348, 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28176348>

MURAMOTO, K.; KAGAWA, D.; SATO, T.; OGAWA, T.; NISHIDA, Y.; KAMIYA, H. Functional and structural characterization of multiple galectins from the skin mucus of conger eel, *Conger myriaster*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, [s.l.]. v. 123, n. 1, p. 33–45, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305049199000371>.

NAGAI, T.; KAWABATA, S. I.; SHISHIKURA, F.; SUGITA, H. Purification, characterization, and amino acid sequence of an embryonic lectin in perivitelline fluid of the horseshoe crab. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.]. v. 274, n. 53, p. 37673–37678, 1999.

NASCIMENTO-NETO, L. G., CABRAL, M. G., CARNEIRO, R. F., SILVA, Z., ARRUDA, F. V. S., NAGANO, C. S., FERNANDES, A. R., SAMPAIO, A. H., TEIXEIRA, E. H., & VIDEIRA, P. A. (2018). Halilectin-3, a Lectin from the Marine Sponge *Haliclona caerulea*, Induces Apoptosis and Autophagy in Human Breast Cancer MCF7 Cells Through Caspase-9 Pathway and LC3-II Protein Expression. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, [s.l.]. 18(4), 521–528. <https://doi.org/10.2174/1871520617666171114094847>

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**, [s.l.]. v. 5, n. 1, p. 954, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03869-w>.

OLECHNOVIČ, K.; VENCLOVAS, C. D. S. VoroMQA web server for assessing three-dimensional structures of proteins and protein complexes. **Nucleic Acids Research**, [s.l.]. v. 47, n. W1, p. W437–W442, 2019.

PAJIC, I. *et al.* A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: Isolation, characterization and biological activity. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol**, [s.l.]. 132, 213–221, 2002

PAPON, N.; COPP, B.R.; COURDAVAULT, V. Marine drugs: Biology, pipelines, current and future prospects for production. **Biotechnol Adv.** [s.l]. 2022;54:107871. doi:10.1016/j.biotechadv.2021.107871

PECHENIK, J. A. **Biologia dos invertebrados** – 7. ed. – Porto Alegre : AMGH, 2016.

PECH-PUCH, D.; PÉREZ-POVEDANO, M.; GÓMEZ, P.; MARTÍNEZ-GUITIÁN, M.; LASARTE-MONTEERRUBIO, C.; VÁZQUEZ-UCHA, J. C.; NOVOA-OLMEDO, M. L.; GUILLÉN-HERNÁNDEZ, S.; VILLEGAS-HERNÁNDEZ, H.; BOU, G.; RODRÍGUEZ, J.; BECEIRO, A.; JIMÉNEZ, C. Marine organisms from the Yucatan Peninsula (Mexico) as a potential natural source of antibacterial compounds. **Marine Drugs**, [s.l]. v. 18, n. 7, 2020.

PECH-PUCH, D.; GRILO, D.; CALVA-PÉREZ, S. E.; PEDRAS, A.; VILLEGAS-HERNÁNDEZ, H.; GUILLÉN-HERNÁNDEZ, S.; DÍAZ-GAMBOA, R.; TUNJANO, M. F.; RODRÍGUEZ, J.; LENIS-ROJAS, O. A.; JIMÉNEZ, C.; PIMENTEL, C. Antifungal Potential of Marine Organisms of the Yucatan Peninsula (Mexico) against Medically Important *Candida* spp. **Molecules**, [s.l]. 2023.

PFEIFER, K.; HAASEMANN, M.; GAMULIN, V.; BRETTING, H.; FAHRENHOLZ, F.; MÜLLER, W. E. G. S-type lectins occur also in invertebrates: High conservation of the carbohydrate recognition domain in the lectin genes from the marine sponge *Geodia cydonium*. **Glycobiology**, [s.l]. v. 3, n. 2, p. 179–184, 1 abr. 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/glycob/3.2.179>.

RESTREPO, M. P.; JARAMILLO, E. G.; MARTÍNEZ, A. M.; ARANGO, A. M.; RESTREPO, S. R. Anti-parasite and cytotoxic activities of chloro and bromo L-tyrosine derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l]. v. 29, n. 12, p. 2569–2579, 2018.

PETTIT, G.R.; BUTLER, M.S.; WILLIAMS, M.D.; FILIATRAULT, M.J.; PETTIT, R.K. Isolation and structure of hemibastadinols 1-3 from the Papua New Guinea marine sponge *Ianthella basta*. **J. Nat. Prod.** [s.l]. 1996, 59, 927–934.

SAITOU, N. and M. NEI, On the Maximum-Likelihood Method for Molecular Phylogeny. **Japanese Journal of Genetics**, [s.l]. 1987. 62(6): p. 547-548.

SALAMAGA, B.; KONG, L.; PASQUINA-LEMONCHE, L.; LAFAGE, L.; VON UND ZUR MUHLEN, M.; GIBSON, J. F.; GRYBCHUK, D.; TOOKE, A. K.; PANCHAL, V.; CULP, E. J.; TATHAM, E.; O’KANE, M. E.; CATLEY, T. E.; RENSHAW, S. A.; WRIGHT, G. D.; PLEVKA, P.; BULLOUGH, P. A.; HAN, A.; HOBBS, J. K.; FOSTER, S. J. Demonstration of the role of cell wall homeostasis in *Staphylococcus aureus* growth and the action of bactericidal antibiotics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l]. v. 118, n. 44, p. e2106022118, 2 nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.2106022118>.

SALIB, M. N.; HENDRA, R.; MOLINSKI, T. F. Bioactive Bromotyrosine Alkaloids from the Bahamian Marine Sponge *Aiolochroia crassa*. Dimerization and Oxidative Motifs. **The Journal of Organic Chemistry**, [s.l]. v. 87, n. 19, p. 12831–12843, 7 out. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c01415>.

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

SANCHEZ, J.F. *et al.* Biochemical and structural analysis of *Helix pomatia* agglutinin. A hexameric lectin with a novel fold. **J Biol Chem**, [s.l]. 281:20171–20180, 2006.

SADANANDAN, R.; RAUF, A. A. Antibacterial activity of a lectin isolated from marine sponge *Axinella donnani*. **Journal of aquatic biology & fisheries**, [s.l]. v. 6, n. 1968, p. 159–164, 2018. Disponível em: http://keralamarinelife.in/Journals/Vol6-12/6_Rathesh&Arun.pdf.

SADANANDAN, R.; RAUF, A. A. Antifungal and Insecticidal Activity of a Lectin Isolated From Marine Sponge *Fasciospongia Cavernosa*. [s.l]. v. 8, n. 1, p. 19–25, 2021.

SANTOS, A. F. S.; DA SILVA, M. D. C.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. **Current Topics in Peptide and Protein Research**, [s.l]. v. 15, p. 41–62, 2014.

SCHRÖDER, H. C.; USHIJIMA, H.; KRASKO, A.; GAMULIN, V.; THAKUR, N. L.; DIEHL-SEIFERT, B.; MÜLLER, I. M.; MÜLLER, W. E. G. Emergence and disappearance of an immune molecule, an antimicrobial lectin, in basal metazoa: A tachylectin-related protein in the sponge *Suberites domuncula*. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l]. v. 278, n. 35, p. 32810–32817, 2003.

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

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

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, [s.l]. v. 14, n. 11, p. 53–62, 2004.

SHARON, N. Lectins: Past, present and future. **Biochemical Society Transactions**, [s.l]. v. 36, n. 6, p. 1457–1460, 2008.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins. **Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition**, [s.l]. p. 701–705, 2013.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIŠ, J.; OLSEN, J. V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, [s.l]. v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2007.

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**, [s.l]. v. 2, n. 1, p. 1-11, 2014.

SHIRAI, T.; MATSUI, Y.; SHIONYU-MITSUYAMA, C.; YAMANE, T.; KAMIYA, H.; ISHII, C.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K. Crystal Structure of a *Conger* Eel Galectin (Congerin II) at 1.45Å Resolution: Implication for the Accelerated Evolution of a New Ligand-binding Site Following Gene Duplication. **Journal of Molecular Biology**, [s.l]. v. 321, n. 5, p. 879–889, 2002. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283602007003>.

SOUSA, A. R. de O.; ANDRADE, F. R. N.; CHAVES, R. P.; SOUSA, B. L. de; LIMA, D. B. de; SOUZA, R. O. da S.; DA SILVA, C. G. L.; TEIXEIRA, C. S.; SAMPAIO, A. H.; NAGANO, C. S.; CARNEIRO, R. F. Structural characterization of a galectin isolated from the marine sponge *Chondrilla caribensis* with leishmanicidal potential. **Biochimica et biophysica acta. General subjects**, [s.l]. v. 1865, n. 12, p. 129992, 2021.

SPOELDER, H. J. W.; GRONDELLE, R. VAN; GROEN, F. C. A. Estimation of Protein Secondary Structure Analysis from Circular Dichroism Spectra and Error. [s.l]. v. 118, p. 110–118, 1990.

STALZ, H.; ROTH, U.; SCHLEUDER, D.; MACHT, M.; HAEBEL, S.; STRUPAT, K.; PETER-KATALINIC, J.; HANISCH, F. G. The *Geodia cydonium* galectin exhibits prototype and chimera-type characteristics and a unique sequence polymorphism within its carbohydrate recognition domain. **Glycobiology**, [s.l]. v. 16, n. 5, p. 402–414, 2006.

THOMAS, O. P. Artigo. v. 35, n. 6, p. 1189–1193, 2012.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, [s.l]. v. 31, n. 2, p. 455–461, 30 jan. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.

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

UTARABHAND, P.; RITTIDACH, W.; RATTANAPORN, O.; RUNSAENG, P.; HEDRICK, J. L. Sialic acid-specific lectin participates in an immune response and ovarian development of the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, [s.l]. v. 203, p. 132–140, 2017.

VARKI, A. *et al.* (EDS.). **Essentials of Glycobiology**. 4th. ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022.

VASCONCELOS M. A. *et al.* Effect of algae and plant lectins on planktonic growth and biofilm formation in clinically relevant bacteria and yeasts. **Biomed Res Int**. [s.l]. 2014. doi:10.1155/2014/365272

VASTA, G.; AHMED, H. Introduction to Animal Lectins. **Animal Lectins**, n. July 2017, p. 2–10, 2008.

VASTA, G. R.; WANG, J.-X. Galectin-mediated immune recognition: Opsonic roles with contrasting outcomes in selected shrimp and bivalve mollusk species. **Developmental & Comparative Immunology**, [s.l.]. v. 110, p. 103721, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X20301828>.

WIENS, M.; MANGONI, A.; D'ESPOSITO, M.; FATTORUSSO, E.; KORCHAGINA, N.; SCHRÖDER, H. C.; GREBENJUK, V. A.; KRASKO, A.; BATEL, R.; MÜLLER, I. M.; MÜLLER, W. E. G. The Molecular Basis for the Evolution of the Metazoan Bodyplan: Extracellular Matrix-Mediated Morphogenesis in Marine Demosponges. **Journal of Molecular Evolution**, [s.l.]. v. 57, n. SUPPL. 1, p. 60–75, 2003.

WOOD-CHARLSON, E. M.; HOLLINGSWORTH, L. L.; KRUPP, D. A.; WEIS, V. M. Lectin/glycan interactions play a role in recognition in a coral/dinoflagellate symbiosis. **Cellular Microbiology**, [s.l.]. v. 8, n. 12, p. 1985–1993, 1 dez. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00765.x>.

WU, T.; XIANG, Y.; LIU, T.; WANG, X.; REN, X.; YE, T.; LI, G. Oncolytic vaccinia virus expressing *Aphrocallistes vastus* lectin as a cancer therapeutic agent. **Marine Drugs**, [s.l.]. v. 17, n. 6, 2019.

ZHANG, K. Y.; YUAN, W. J.; XU, J. D.; WANG, J. X. Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor functions as a pattern recognition receptor in anti-bacterial immunity of *Marsupenaeus japonicus*. **Developmental and Comparative Immunology**, [s.l.]. v. 89, n. June, p. 122–130, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.08.011>.

ZHANG, X. W.; LIU, Y. Y.; MU, Y.; REN, Q.; ZHAO, X. F.; WANG, J. X. Overexpression of a C-type lectin enhances bacterial resistance in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. **Fish and Shellfish Immunology**, [s.l.]. v. 34, n. 5, p. 1112–1118, 2013.